UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-Graduação em Farmácia

Área de Análises Clínicas

MICRORREGIÕES METABÓLICAS NO CARCINOMA DUCTAL
INFILTRATIVO DE MAMA HUMANA

BIANCA MARIA ALVES DOS SANTOS

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

SÃO PAULO

1999

DEDALUS - Acervo - CQ

30100002701

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Santos, Bianca Maria Alves dos.

Microrregiões metabólicas no carcinoma ductal infiltrativo de mama humana /
Bianca Maria Alves dos Santos.-- São Paulo, 1999.

Tese(Doutorado)—Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de
São Paulo. Departamento Análises Clínicas e Toxicológicas.

Área de concentração: Análises Clínicas.

Linha de pesquisa: Metabolismo tumoral.

Orientador: Curi, Rui.

Versão do título para o inglês: Metabolic microregions in infiltrating ductal
carcinoma.

Descritores: 1. Câncer de mama 2. Metabolismo tumoral 3. Piruvato
quinase

ICB/SBIB/068/99

BIANCA MARIA ALVES DOS SANTOS

MICRORREGIÕES METABÓLICAS NO CARCINOMA DUCTAL
INFILTRATIVO DE MAMA HUMANA

COMISSÃO JULGADORA

Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Rui Curi

Orientador/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

4º. Examinador

São Paulo, de de 1999.

“Nenhum homem é uma ilha isolada; cada homem é uma partícula do continente, uma parte da terra. Se um torrão é arrastado para o mar, a Europa fica diminuída como se fosse um promontório; como se fosse o solar de teus amigos, ou o teu próprio. A morte de qualquer homem me diminui porque sou parte do gênero humano; e por isso não perguntes por quem os sinos dobram, eles dobram por ti.”

(E. Hemingway)

Às pacientes:

Dedicamos a nossa esperança. Haverá algum dia em que mastectomia constará como forma de terapia apenas nos livros de mastologia do passado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo Rui

Minha eterna gratidão, pela solidariedade e prestígio ao meu desempenho profissional, que sempre foram constantes em todas as etapas de minha formação científica.

A todas as pessoas que participaram, direta ou indiretamente, na realização deste trabalho:

Ao prof. Rubens Rosa, a quem devo todo o aprendizado em enzimologia.

Ao meu amigo e co-orientador João Bosco Ramos Borges, médico responsável pela coleta dos materiais biológicos, meu agradecimento especial, não somente pela obtenção dos tecidos, ou pelas sugestões e análise criteriosa deste trabalho, bem como pelo seu companheirismo.

Ao prof. Mário Hirata, meu orientador temporário, co-orientador e amigo, a quem sempre posso recorrer, incondicionalmente, para resoluções profissionais, meu agradecimento sincero.

Ao prof. Luiz Biella, pelo apoio e incentivo que deram início ao desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os motoristas do ICB-III (Lúcio, João e Benedito), pessoas imprescindíveis durante a realização deste trabalho.

Aos Drs. Torloni, Petti, Patrícia Mello, Mário Mourão Neto, Hirofumi, Filomena, Consuelo, Maria do Carmo, profissionais que sempre se prontificaram a contribuir na coleta dos materiais.

À minha amiga incondicional, Marilene Vecchia (Mamy), pelos ensinamentos de cultura celular e pela manutenção da linhagem MCF-7. Se não fosse por isso, agradeceria tão somente pela sua amizade.

À Dra. Eva por sugestões relativas ao trabalho, bem como pelas bibliografias gentilmente cedidas.

À Dra. Lor Cury, a quem sempre sou grata, pelo apoio técnico e pessoal.

Ao prof. José Nicolau e Douglas Nesadal de Souza, por cederem o laboratório junto à FOU SP, para todas as análises de isoenzimas, meu inexpressável reconhecimento.

Aos meus amigos, em especial Edson, Gabriel, Catarina, Abrahão, Rita, Cleoni, Primavera, e Ida que estão sempre dispostos a colaborar nos meus projetos.

A todos os amiguinhos do nosso laboratório de Fisiologia celular, indistintamente, pela constante solidariedade e alegria radiante no trabalho.

À Marlene, Margot, Moa, Robertinho, Manu e Williams pelos apoios técnicos em diferentes etapas desse estudo.

À Astrid, pelo empenho irrestrito no preparo dos alunos de pós-graduação.

Aos Bibliotecários do ICB1 e Conjunto das Químicas, em especial à Moema, profissionais que sempre se prontificaram a auxiliar pós-graduandos.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida para o aprimoramento da Ciência

Ao Reinaldo (Tuba), Maristela, Roberto e Lino, estagiários que se propuseram a colaborar gratuitamente com este trabalho

À Shigueko Sonohara Troyano Pueyo e Dra. Mitzi Brentani pela doação das células MCF-7.

À Neusinha e Arnor, meus amigos de sempre, em qualquer local que estejam.

À Telma Guarisi, Patrícia Meire Escorcio, Cristiane Paulino Ferreira minhas acessoras diretas para a coleta de materiais.

À Meiri Armelim e Walter Terra, pelas informações técnicas referentes a cultura de células e cinética enzimática.

À Janaina S. Itaboraí, amiga que me incentiva sempre, agradeço pela crônica sobre minha tese.

À Cláudia e José Maria (ICB1), por todos os auxílios para a coleta dos materiais

À Sibeles e Kalli (Secretaria PG-IQ), que me acompanharam e apoiaram desde o início do projeto.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-graduação da FCF, por todo o apoio aos alunos.

Ao José Roberto e João pelo apoio técnico para as fotografias.

À Helena e Ricardo (FESBE) pela solidariedade nos momentos mais imprevistos do desenvolvimento desse trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	
1.1. Considerações gerais	9
1.2. Glândula mamária	10
1.3. Patologias associadas à glândula mamária	12
1.4. Neoplasias da mama	15
1.5. Metabolismo da célula neoplásica	21
2. OBJETIVOS	36
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1. Reagentes	37
3.2. Material biológico	37
3.3.1 Cultura das células MCF-7	39
3.4.2. Incubação das fatias tumorais com glicose e insulina	39
3.4.1. Determinação de lactato no meio de incubação	40
3.5.1. Preparo dos extratos teciduais	40
3.5.3. Determinação de proteínas	41
3.5.4. Determinação de enzimas glicolíticas	41
3.5.5. Determinação da glutaminase dependente de fosfato	44
3.5.7. Determinação da citrato sintetase	45
3.5.8. Determinação da glicerol-fosfato desidrogenase	45
3.5.9. Determinação da glicose-6-fosfato desidrogenase	46

3.6. Parâmetros cinéticos da piruvato quinase em extratos teciduais	46
3.6.5. Estudo das isoenzimas da piruvato quinase	47
3.7. Purificação da piruvato quinase por cromatografia	48
3.8. Análise estatística	49
 4. RESULTADOS	
4.1. Histórico das pacientes	50
4.2. Consumo de glicose e produção de lactato por fatias tumorais	50
4.3. Atividade das enzimas glicolíticas e GDH em carcinomas e mama	52
4.3. Atividade das enzimas glicolíticas em diferentes áreas do tumor	57
4.3. Atividade das enzimas glicolíticas em carcinomas e mama	58
4.3. Atividade das enzimas glicolíticas quanto ao grau histológico na periferia	59
4.3. Atividade das enzimas glicolíticas quanto ao grau histológico no centro	60
4.4. Comparação da atividade da glutaminase com o grau histológico	61
4.3. Atividade das enzimas glicolíticas em carcinomas células MCF-7	62
4.4. Atividade da glutaminase em carcinomas e mama	63
4.4.1 Atividade da citrato sintetase e glicose-6-fosfato desidrogenase	64
4.5. Parâmetros cinéticos da piruvato quinase em extratos teciduais	66
4.5 Perfil eletroforético da piruvato quinase	69
4.7 Purificação da piruvato quinase	70
4.8 Parâmetros cinéticos da piruvato quinase purificada	72
 5. DISCUSSÃO	77
 6. CONCLUSÕES	103
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

LISTA DE ABREVIATURAS

Aldo	aldolase
ARNT.....	“aryl hydrocarbon nuclear translocator”
ADP.....	adenosina difosfato
ATP.....	adenosina trifosfato
CDI	carcinoma ductal infiltrativo
CoA	coenzima A
CS	citrato sintetase
DAP.....	Diidroxiacetona fosfato
DMEM.....	Dulbecco's modified Eagle medium
DTNB.....	ditio-bis(2 nitrobenzóico)
EGF.....	fator de crescimento epidérmico
FDP.....	frutose 1,6-bifosfato
FGF.....	fator de crescimento de fibroblastos
α -GDH	glicerol-3-fosfato desidrogenase
GDH-TPI.....	glicerofosfato desidrogenase-triose fosfato isomerase
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G6PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
HE.....	hematoxilina-eosina
HIF	fator induzível por hipóxia
HK	hexoquinase
IFN	interferon
IGF-I.....	fator de crescimento semelhante à insulina
IL	interleucina
K_m	constante de Michaelis-Menten
LDH	lactato desidrogenase
NAD.....	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
PEP	fosfoenolpiruvato

PGK	fosfoglicerato quinase
PK	piruvato quinase
TGF	“transforming growth factor”
TNF	fator de necrose tumoral
TNM	tumor, linfonodos, metástase
TRIS	Tris(hidroxi)metilaminometano
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

No presente estudo analisou-se o metabolismo de glicose e glutamina, através da determinação da atividade enzimática, em carcinomas ductais infiltrativos de pacientes sem tratamento. As pacientes estavam na faixa etária entre 32 e 68 anos e cerca de 75% no período pós-menopausa. Os tumores estudados apresentavam graus de diferenciação e tamanho distintos; no entanto, sem metástases distantes. Os seguintes parâmetros foram analisados: a) efeito da insulina sobre o consumo de glicose em fatias tumorais, b) atividades das enzimas da via glicolítica e da glutaminase nas áreas do centro e periferia do tumor, c) parâmetros cinéticos da piruvato quinase purificada. Os resultados foram comparados entre os tumores e a glândula mamária e entre as áreas centrais e periféricas dos próprios tumores.

O consumo de glicose mostrou-se maior nos carcinomas, principalmente no centro que na periferia do tumor, mas não foi alterado pela insulina. Não houve relação entre o consumo de glicose e o tamanho dos tumores, nem com o grau histológico. Inversamente, na glândula mamária, a insulina (100 μ U/ml) aumentou a captação de glicose. A concentração de lactato produzida, pela incubação das fatias tumorais com glicose, foi significativamente maior nos carcinomas do que na glândula mamária, equivalente ao aumento do fluxo glicolítico.

A atividade das enzimas da via glicolítica foi maior nos carcinomas em comparação ao tecido normal. A atividade foi também significativamente diferente tanto na comparação entre as áreas do centro e periferia do tumor, quanto considerando-se o grau de diferenciação dos carcinomas. Nas áreas centrais, as atividades enzimáticas foram mais elevadas, enquanto que considerando-se os graus histológicos, tumores menos diferenciados apresentaram atividades mais elevadas que os de maior grau de diferenciação. Dentre as enzimas reguladoras da glicólise, a piruvato quinase apresentou a maior atividade em comparação à hexoquinase e fosfofrutoquinase-1. Este aumento foi significativamente maior nos carcinomas associados com

comprometimento de linfonodos axilares. A piruvato quinase purificada mostrou K_m de 0,23 mM para fosfoenolpiruvato e 0,3 mM para ADP. ATP inibiu em 40% a atividade da enzima, enquanto que alanina, fenilalanina e cálcio inibiram em 55%, 84% e 93% a atividade da enzima, respectivamente. A frutose 1,6-bifosfato induziu 36% de ativação e reverteu em 100% a inibição causada por fenilalanina, em 87% aquela da alanina e cerca de 56% para ATP, mas não reverteu a inibição por cálcio quando em concentrações saturantes e apenas em 15% em concentrações sub-saturantes. O padrão eletroforético da piruvato quinase diferiu da mama e tumores benignos (fibroadenomas), o que pode representar um marcador de malignidade.

A atividade das enzimas citrato sintetase e glicerol-3-fosfato desidrogenase mostrou-se diminuída de acordo com o aumento da atividade glicolítica e relacionou-se diretamente com o grau de diferenciação dos carcinomas. Tumores diferenciados mostraram maior atividade.

A atividade da glutaminase foi maior nos carcinomas em comparação à glândula mamária, sendo ainda maior nas áreas do centro do tumor que nas áreas periféricas. O grau de diferenciação também correlacionou-se com a atividade da enzima, mas não foram observadas diferenças significativas quando considerou-se o tamanho tumoral.

As diferenças metabólicas observadas podem associar-se ao comportamento clínico heterogêneo entre pacientes com o mesmo tipo de carcinoma.

ABSTRACT

Glucose and glutamine metabolism of infiltrating ductal carcinomas of untreated patients was studied by determining enzyme activities. The patients were between 32 and 68 years old and about 75% were in post-menopausal period. The tumors have different histological grading and sizes but no distant metastasis. The following parameters were analysed: a) effect of insulin on glucose uptake by tumor slices, b) glycolytic (hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase) and glutaminolytic (glutaminase) enzyme activities, c) kinetic parameters of purified pyruvate kinase. The results were compared to those of mammary gland and between center and periphery regions of the tumors.

Glucose consumption was higher in the carcinomas, compared to mammary gland, specially in the solid region (center) than in the periphery, but it was not altered by insulin. No correlation was found between glucose consumption rate and the tumor size or differentiation grading. Inversely, in the mammary gland, insulin (100 μ U/ml) increased glucose uptake. Lactate production was significantly higher in the carcinomas than in the mammary gland according to the glycolytic flux.

The glycolytic enzyme activities were higher in the carcinoma than in the mammary gland. The enzyme activities were more elevated in the center as compared to peripheric areas of the tumor. In the tumor center, the enzyme activities were highest in the undifferentiated carcinoma. Pyruvate kinase (PK) presented higher activity than phosphofructokinase 1 and hexokinase activities. Purified PK from the tumor presented a reduced K_m for phosphoenolpyruvate (0,23 mM) and ADP(0,3 mM). ATP inhibited 40% of the enzyme activity, while alanine, phenilalanine and calcium inhibited it by 55%, 84% and 93%, respectively. Fructose 1,6 bisphosphate enhanced 36% of enzyme activity and reverted by 100% the inhibition caused by phenilalanine, 87% that of alanine and 56% that of ATP, but did not revert the inhibition by Ca^{+2} when at saturating

concentration, having a capacity of reverting only 15% of the inhibition caused by near-saturating concentration of Ca^{+2} . The citrate synthase and α -glycerol phosphate dehydrogenase activities were reduced according to increase in the glycolytic activity and had a direct correlation with the histological grading. Differentiated tumors had higher activities.

Glutaminase activity was elevated in carcinomas as compared to mammary gland, being even higher in the central regions of the tumors. The enzyme activity was also higher in the moderate differentiated tumors than that in the differentiated tumors, but no significant differences were observed when the tumor size was considered.

There was a relationship between the data and the clinical heterogeneity of the disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

O câncer de mama é de ampla incidência e ainda constitui uma causa importante de mortalidade. Dados da OMS mostram que esta patologia representa a terceira neoplasia de maior ocorrência no mundo. Em mulheres, este é o tipo mais freqüente de todos os casos de neoplasias, atingindo a faixa etária de 20 a 80 anos. Estima-se que, no período de 1994 a 2000, cerca de 2 milhões das mortes de mulheres ocorrerão em consequência do câncer de mama (PARKIN et al., 1993).

O câncer mamário é uma doença de progressão muito variável, sendo geralmente lenta, mesmo em mulheres que apresentam metástases à distância. Aproximadamente 40 a 50% de todas as pacientes com este tipo de câncer podem não manifestar a doença 10 anos após o diagnóstico (HENDERSON, 1980). Esta constatação, porém, não significa cura, considerando-se que mesmo após esse período, pode haver recorrência. Raramente essas mulheres apresentam metástases após 30 anos da detecção da doença. Embora as causas da quiescência prolongada sejam desconhecidas, alterações da função imunológica e das concentrações plasmáticas de hormônios são as explicações mais usuais.

A disseminação sistêmica das células neoplásicas constitui o principal aspecto clínico da expansão destruidora das células neoplásicas, o que contribui para a maioria das mortes relacionadas ao câncer. No início do processo metastático ocorre invasão local do tecido adjacente pelas células tumorais, logo após o crescimento primário do tumor e este tornar-se vascularizado (MacDONALD & FORD, 1997). Durante esse processo os substratos parecem ter uma importância fundamental na migração das células. Alguns estudos mostram que a glicose representa um fator essencial para as metástases, assim como a própria vascularização tumoral (MAZUREK et al.,

1997), enquanto que outros substratos, também metabolizados por tumores, como os corpos cetônicos, ácidos graxos e a glutamina, não teriam a mesma importância durante esse estágio.

As diferenças intrínsecas das células do câncer de mama que contribuem para o comportamento clínico diverso da patologia não são conhecidas. As características bioquímicas de células normais e neoplásicas representam um aspecto importante das alterações acarretadas por oncogenes. Tais alterações podem ser utilizadas como marcadores prognósticos da progressão do câncer ou possibilitar diagnóstico precoce. Além disso, o conhecimento preciso do metabolismo do câncer permite prever respostas à terapia ou ainda meios de aumentar a eficácia do tratamento.

1.2. Glândula mamária

As mamas consistem de tecido glandular, tecido fibroso conectando seus lobos e tecido adiposo nos espaços entre os lobos (SOUZA & SALVATORE, 1979). A mama total está contida dentro da fáscia mamária, composta por duas cápsulas, uma subdérmica (superficial) e outra profunda que repousa sobre os músculos peitorais. O tecido glandular não ocupa a eminência total da glândula mamária; observa-se uma quantidade variável de tecido adiposo envolvendo o estroma em torno dos lobos. Na porção central predomina o tecido glandular e a periferia é predominantemente gordurosa. A superfície profunda da mama é côncava e está moldada sobre a parede ventral de contato com a fascia peitoral, lateralmente com as fâscias axilares e músculo serratio anterior e, na porção inferior, pode recostar-se sobre os músculos oblíquo externo e reto abdominal. A papila mamária, ou mamilo, projeta-se como um corpúsculo cilíndrico ou cônico situado um pouco abaixo do centro de cada mama, na altura do quarto espaço intercostal. O tecido mamário estende-se variavelmente até a axila como uma cauda glandular de Spence (McCARTY & TUCKER, 1992).

No estado de repouso, a glândula mamária consiste de seis a dez sistemas de ductos maiores, cada qual dividido em lóbulos, que são unidades funcionais do parênquima mamário. Os lóbulos estão unidos por tecido conjuntivo frouxo (areolar), vasos sangüíneos e ductos. Cada lobo apresenta seu ducto secretor próprio. Lóbulos menores consistem de um grupo de alvéolos arredondados, que se abrem em ramificações menores de ductos lactíferos (McCARTY & TUCKER, 1992). A junção destes pequenos ductos forma ductos maiores que, por sua vez, terminam em um único canal correspondente a uma das divisões principais da glândula. Os ductos excretores variam de 15 a 25 e são denominados túbulos lactíferos, que convergem para a papila. Os pontos de convergência resultam em dilatações ou ampolas, que servem como reservatórios de leite (GRAY, 1985).

Observa-se uma variação do epitélio glandular da mama de acordo com o seu grau de atividade. Durante a puberdade, a mama feminina aumenta gradualmente de tamanho e assume forma semi-esférica sob a influência de hormônios ovarianos. Os ductos alongam-se, mas o aumento no tamanho é devido principalmente à deposição de gordura. Em mulheres que não amamentam, os alvéolos são muito pequenos e sólidos, sendo preenchidos por uma massa de células poliédricas granulares. Com o término do desenvolvimento das mamas, durante e após a puberdade, as mesmas ficam quiescentes até a gravidez. Somente neste estado a mama atinge sua completa maturação morfológica e atividade funcional (GRAY, 1985). Durante a gravidez os alvéolos aumentam e as células multiplicam-se rapidamente. No começo da lactação as células centrais sofrem degeneração da gordura e são eliminadas como corpúsculos do colostro. O crescimento deve-se também ao aparecimento de células secretoras e mudanças nos tecidos de sustentação. A reatividade à insulina também é adquirida nesta fase (MARCHANT, 1993). O crescimento adicional requer estrógeno, progesterona, hormônios tireoidianos (tiroxina), cortisol, hormônio do crescimento, prolactina e hormônio lactogênico placentário humano. Na gravidez, o hormônio lactogênico placentário e

ocitocina complementam os efeitos desse crescimento (SOUZA & SALVATORE, 1979).

A fase pós-menopausa associa-se com alterações na quantidade de tecido adiposo e diminuição do tamanho. Nesta fase, as mamas também são órgãos mais susceptíveis a várias alterações patológicas, destacando-se anormalidades associadas com atividade hormonal, irritação devido à retenção de secreções, infecções agudas ou crônicas, pseudotumores e, principalmente tumores malignos, os quais apresentam um pico de incidência durante e após esta fase (GIARELLI et al., 1987; COTRAM et al., 1994).

1.3. Patologias associadas à glândula mamária

As alterações patológicas da glândula mamária são predominantemente relacionadas às mulheres. A mama masculina mostra-se relativamente insensível a influências endócrinas e, aparentemente, resistente a neoplasias (COTRAM et al., 1994). A ginecomastia, principal anormalidade não maligna nas mamas dos homens (MARCHANT, 1993), caracteriza-se por um estado hipertrófico acompanhado por proliferação do epitélio ductal e do tecido conjuntivo mamário (GIARELLI et al., 1987). A incidência de câncer em mama masculina é de aproximadamente 1% em relação às mulheres (MARCHANT, 1993).

As doenças mamárias são usualmente divididas em quatro grupos principais: doenças inflamatórias (mastites), tumores benignos, alterações fibrocísticas e tumores malignos (COTRAM et al., 1994). Clinicamente a maioria delas apresenta-se como massas palpáveis, lesões inflamatórias, secreção papilar ou anormalidades mamográficas. As mastites, que são alterações patológicas comuns das mamas, caracterizam-se clinicamente por vermelhidão, tumescência, dor e calor locais, podendo ocorrer na mulher grávida ou no ciclo grávido-puerperal (SOUZA & SALVATORE, 1979).

Alterações fibrocísticas relacionam-se à resposta fisiológica exacerbada a mudanças no ambiente hormonal, que também resulta em dor e nodularidade

das mamas (mastodinia, mialgia), presença de uma massa dominante e secreção papilar (GIARELLI et al, 1987; MARCHANT, 1993). A lesão é usualmente bilateral e observa-se um pico de incidência das alterações fibrocísticas numa faixa entre 30 e 50 anos de idade (GIARELLI et al., 1987). A frequência diminui progressivamente após a menopausa (BARTOW, 1995).

Uma miscelânea de modificações morfológicas variáveis incluem-se entre as alterações fibrocísticas, desde alterações inócuas até aquelas associadas com risco aumentado de carcinoma. Os aspectos morfológicos variam desde lesões que consistem principalmente de cistos (císticas), até aquelas caracterizadas por um crescimento excessivo do estroma fibroso, ou lesões nas quais ocorrem tanto proliferação estromal quanto epitelial (dilatação cística dos ductos terminais), ou ainda outros tipos em que predomina a proliferação epitelial, com proliferação variável dos elementos epiteliais do ducto terminal (BARTOW, 1995). Em consequência da grande variabilidade das alterações fibrocísticas, usualmente distinguem-se três padrões morfológicos: (1) formação de cisto e fibrose, (2) hiperplasia epitelial, e (3) adenose esclerosante.

Embora a patogênese do câncer de mama seja pouco conhecida, inúmeros fatores são associados com o aumento de risco, como fatores genéticos, estado hormonal, influências ambientais, alterações fibrocísticas atípicas e câncer prévio (BARTOW, 1995).

Existem evidências de que a hiperplasia epitelial, quando atípica, está associada com risco aumentado de carcinoma mamário (COTRAM et al., 1994). O significado clínico das alterações fibrocísticas relaciona-se ao fato de que estas também desenvolvem massas e microcalcificações nas glândulas mamárias, semelhantes a tumores malignos e, algumas delas, à maior predisposição para desenvolver carcinoma (DUPONT & PAGE, 1985). Há constatações de que o risco ao desenvolvimento de carcinoma de mama é de 4 a 5 vezes maior na população com lesões atípicas (DUPONT et al., 1994).

Existe também maior susceptibilidade ao câncer mamário nas mulheres cujas mães, irmãs ou filhas apresentaram esta doença, quando comparadas à população em geral. Os relatos sobre as probabilidades, em mulheres norte-americanas, cujas irmãs e mães tiveram diagnóstico de tumores benignos, de desenvolverem câncer, são cerca de 14% e 3% de morte após o seu desenvolvimento (DUPONT et al., 1994).

Estudos epidemiológicos buscam identificar fatores que predispõem ao risco do desenvolvimento de carcinomas. Há evidências de que fatores reprodutivos, como idade da menarca, as características dos ciclos menstruais e a idade da menopausa têm relação direta com o risco aumentado de câncer de mama (SOUZA & SALVATORE, 1979, FRANCO, 1997). Diversos relatos associam o maior intervalo de duração da fase reprodutiva, em que as mamas permanecem sob estímulo hormonal, com o aumento de risco de desenvolvimento de neoplasias (TAVASSOLI, 1992; FRANCO, 1997). Por outro lado, a paridade e menopausa precoces implicam em efeito protetor (FRANCO, 1997). Proporcionalmente, o risco é mais freqüente para mulheres que tiveram o primeiro parto a termo aos 30 anos, do que nas mulheres mais jovens, mas este índice triplica para o caso das nulíparas (FRANCO, 1997).

Dados estatísticos mostram que a probabilidade de neoplasias mamárias aumenta com o avanço da idade. Assim, o envelhecimento pode ser considerado como um dos principais fatores de risco. Diversos estudos mostram que a incidência do câncer mamário é mais elevada entre mulheres com idade entre 50 e 70 anos do que naquelas entre 30 e 50 anos (FRANCO, 1997).

Segundo estimativas do National Center for Health Statistics (1998), a maior incidência de novos casos de neoplasias em mulheres norte-americanas deve-se ao câncer de mama (30%), seguido pelo câncer de pulmão (13%) e colon (11%). No mesmo estudo avaliou-se a proporção das causas de mortes em mulheres, entre aproximadamente 270.000 casos, em que 43.500 relacionavam-se ao câncer de mama (LANDIS, 1998).

De acordo com estatísticas do Ministério da Saúde, no Brasil, os índices de mortalidade por neoplasias, em mulheres, corresponderam a 15,1% no ano de 1995 e, deste percentual, 14,2% decorreram do câncer mamário. Destaca-se ainda, que nos estados do RJ, RS e SP, a incidência é significativamente maior (CHAGAS, 1995). Deve-se ressaltar que o número de casos novos tem se mantido constante e o número de óbitos, decorrentes desses, elevou-se nos últimos anos (ABIB et al., 1996).

1.4. Neoplasias mamárias

Os neoplasmas constituem as lesões mais importantes da glândula mamária e, provavelmente, as mais comuns (COTRAM et al., 1994). Os tumores podem relacionar-se ao tecido conjuntivo mesenquimal, estruturas epiteliais (glandulares ou não) e tecido adiposo. Os vários tipos tumorais são classificados como papilomas da pele, carcinomas de células escamosas da pele, adenomas, papilomas de ductos, carcinomas ductais (de origem glandular), além de uma variedade de tumores mesenquimais benignos e malignos, tais como fibroma e fibrossarcoma, tumor de célula granular, condrossarcoma, lipoma e lipossarcoma, sarcoma osteogênico, angioma e angiossarcoma.

De modo geral, costuma-se denominar os tumores malignos como câncer, em comparação aos benignos. Várias classificações histopatológicas, porém, são feitas de acordo com a localização da porção atingida ou com o tecido de origem do tumor. Os tumores benignos que surgem na superfície epitelial são denominados papilomas, enquanto que aqueles oriundos do epitélio glandular denominam-se adenomas. Por outro lado, tumores malignos resultantes no epitélio superficial são chamados carcinomas, enquanto que aqueles originados do epitélio glandular denominam-se adenocarcinomas (SNELL, 1985). Fibroadenoma é o tumor benigno mais comum na mama, enquanto que carcinoma é o tumor maligno de maior ocorrência (BARTOW, 1995).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os tumores mamários podem ser classificados em dois grandes grupos, com base no potencial de invasão ou agressividade: (1) invasivos ou infiltrativos e (2) não invasivos, que ainda são divididos em vários subgrupos. De acordo com a localização dos tumores, estes subdividem-se em: a) carcinoma intraductal, carcinoma intraductal com doença de Paget, carcinoma lobular *in situ*, correspondentes ao grupo de tumores não invasivos;

b) carcinoma intraductal não especificado, carcinoma ductal infiltrativo com doença de Paget; carcinoma lobular infiltrativo; carcinoma medular, carcinoma colóide ou mucinoso; carcinoma tubular; carcinoma cístico adenoide; carcinoma apócrino; carcinoma papilar invasivo, incluídos no grupo de tumores invasivos ou infiltrativos.

Considera-se que mais de 80% dos casos de câncer mamário compreendem o carcinoma ductal infiltrativo (GIARELLI et al., 1987). A segunda variedade mais comum é o lobular infiltrativo, que constitui quase 10% e, particularmente, apresenta o mesmo prognóstico do carcinoma ductal infiltrativo. O carcinoma medular é o terceiro tipo mais comum, correspondendo de 5 a 10% dos tipos de câncer invasivo de mama (BARTOW, 1995).

No carcinoma ductal infiltrativo ocorre a invasão do estroma, pelas células malignas, que usualmente induz proliferação fibroblástica peritumoral muito pronunciada. Esta desmoplasia leva a uma massa palpável, que é o sinal inicial mais comum do carcinoma ductal. O carcinoma ductal infiltrativo ocorre freqüentemente como uma massa fixa e dura, que é referida como carcinoma cirroso. Ao exame macroscópico o tumor é tipicamente firme e mostra margens irregulares. A superfície é de coloração cinza-pálida e granulada, com manchas amareladas e margens não delineadas (BARTOW, 1995).

Os diferentes graus histológicos e estágios clínicos do câncer de mama subdividem-se em grupos homogêneos menores. De acordo com o potencial metastático dos diversos tipos de câncer mamário, estes podem ser divididos em *não-metastáticos* (intraductal *in situ* ou carcinoma lobular *in situ*),

metastáticos incomuns (carcinoma colóide ou mucinoso; medular; adenocarcinoma tubular; carcinoma cístico adenóide) e *moderado ou altamente metastáticos* (todos os outros tipos). Os vários estágios clínicos, segundo o sistema de classificação TNM da Union Internationale Contre Cancer, podem ser subdivididos em I, II, III e IV, que refletem a extensão anatômica dos tumores. No estágio I, os tumores apresentam menos de 2 cm de diâmetro, sem comprometimento nodular (axilar) e com ausência de metástases. O estágio II inclui tumores com menos de 5 cm de diâmetro, com nódulos axilares, mas sem metástases distantes, ou ainda tumores maiores que 5 cm, sem comprometimento de nódulos ou com metástases distantes. Estágio III inclui todos os tipos de câncer de mama de qualquer tamanho, com possível envolvimento da pele, parede peitoral e tórax e comprometimento nodular, incluindo nódulos axilares e linfonodos mamários internos fixos, mas sem metástases disseminadas. No estágio IV, estão classificados quaisquer formas de câncer de mama, com ou sem comprometimento de nódulos, fixação peitoral ou da parede torácica, mas com metástases disseminadas (LEWIS, 1993, COTRAM et al., 1994).

Fatores imunológicos e hormonais, além dos fatores genéticos, também estão relacionados com o desenvolvimento de neoplasias (STEWART & HEPPNER, 1997). Outros relacionam-se às propriedades intrínsecas do tumor, como adesão, transformação, invasão e metástase das células tumorais em sítios secundários (SMITH et al., 1984). A perda da integridade na junção de células epiteliais devido a alterações na estrutura e expressão de proteínas de adesão, como E-caderina, parece associar-se com o aumento no potencial de invasividade e constituir um dos fatores importantes para a progressão de carcinomas de mama (DICKSON, 1992, BIRCHMEIER e BEHRENS, 1994), além de ser um marcador de mau prognóstico (CHRISTOFORI & SEMB, 1999).

Uma constatação importante, relativa à resposta imunológica local do câncer mamário, é a evidência de que o grau de infiltração de células inflamatórias na massa tumoral associa-se com mau prognóstico (STEWART &

HEPPNER, 1997). Num estudo entre inúmeros casos de câncer ductal graus I e II, previamente tratados, avaliando-se 18 fatores associados à recorrência dos tumores, a reação linfocitária estromal foi o índice de maior correlação com a reincidência dos tumores (KURTZ et al., 1990). Observou-se que a produção aumentada de citocinas (IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- α , GM-CSF, VEGF), pelos linfócitos, estimula o crescimento tumoral (VITOLLO, 1992), enquanto que aquelas secretadas pelos macrófagos, estimulam as células endoteliais, o que promove a angiogênese tumoral e contribui com a disseminação sistêmica da doença (LEEK et al., 1996). A super expressão e amplificação de oncogenes *erb-B2*, *int-2*, ou *c-myc* também correlacionam-se com esses achados.

Por outro lado, alguns estudos mostram que a expressão do produto do oncogene *erbB2*, embora represente um fator de mau prognóstico (SLAMON et al., 1989), quando ocorre em associação com a infiltração leucocitária no tumor mamário, representa um bom prognóstico (PUPA et al., 1993). A resposta imunológica, via de regra, tem efeito anti-neoplásico, segundo a maioria dos estudos (GELIN et al., 1991; RUITER et al., 1991; SHU et al., 1995).

A avaliação de fatores prognósticos associados ao câncer mamário possibilita orientar um tratamento mais objetivo da neoplasia mamária e proporciona perspectivas quanto à taxa de sobrevida das pacientes. Há um consenso quanto aos fatores associados ao prognóstico: tamanho tumoral, comprometimento axilar, grau histológico, estadiamento clínico, tipo histopatológico do tumor, elastose, invasão vascular, metástases, receptores hormonais (progesterona; estrógeno), número e tipo de oncogenes expressos e produtos secretados pelas próprias células tumorais, entre eles catepsina D (SOUZA & SALVATORE, 1979; FRANCO, 1997).

Com base nos fatores prognósticos, o comprometimento dos órgãos linfóides constitui o parâmetro de maior importância no câncer de mama. Há uma relação inversa entre o número de linfonodos comprometidos e a taxa de sobrevida da paciente. A probabilidade de recidiva, após 10 anos, é de 75%

quando há metástase axilar, e de 20 a 25% nas pacientes com axila negativa (SUNDERLAND & Mc GUIRE, 1990, FRANCO, 1997).

Clinicamente, o diagnóstico precoce ainda constitui uma grande dificuldade. Fisher (1988), preconizou que todo câncer de mama que se manifesta clinicamente deve ser considerado uma doença sistêmica, com base em que um tumor de 10 mm, detectável pelo exame físico, já possui 10^9 células e sofreu cerca de trinta duplicações (FRANCO, 1997). Antes desse estágio, ao atingir 1 ou 2 mm, já detectável pelo exame mamográfico, supõe-se que ocorreram vinte duplicações, e hajam cerca de 10^6 células, com presença de angiogênese e possível potencial metastático (BUCCHERI, 1991).

As metástases são tidas como os eventos principais do desenvolvimento tumoral. Antes desta fase, o câncer de mama pode ser considerado uma doença loco-regional (FRANCO, 1997). Acredita-se que as metástases não estejam sob a mesma regulação que o tumor, uma vez que mesmo lesões malignas pequenas, no limite da detecção por mamografia ou palpação, podem já ser metastáticas (DICKSON, 1992).

Observações clínicas levaram à conclusão de que a velocidade de crescimento do tumor mamário, ou de sua disseminação sistêmica, é o principal determinante da taxa de sobrevivência das pacientes. Comparativamente, entre outros tipos de neoplasia, o câncer de mama representa o de evolução mais lenta, com aproximadamente 7% da velocidade de crescimento encontrada em tumores embrionários e linfomas (FRANCO, 1997). Em contraposição, verifica-se que, dentre as neoplasias humanas, o câncer de mama é o tipo de maior reincidência após longo período de quiescência (SMITH et al., 1984).

Os eventos biológicos envolvidos na progressão dos tumores malignos da mama mostram comportamento distinto de outros tipos tumorais. Enquanto nos carcinomas de pulmão, sem tratamento quimioterápico, 70% dos pacientes irão a óbito no intervalo de um ano, nos cânceres de mama a evolução da doença é imprevisível (WILLIAMSON, 1980; SMITH, 1984). Assim, há diferentes tipos de câncer mamário: alguns em que o tumor aumenta sem

invasão vascular ou linfática e outros em que as metástases à distância ocorrem antes que o tumor atinja grandes dimensões (SMITH, 1984; KOPANS, 1998).

A formação do tumor primário é o requisito para sua propagação, por via direta, através dos ductos e, posteriormente, parênquima ou ainda por vias linfática e sangüínea. Contudo, entre os fatores de importância na disseminação metastática, o tamanho tumoral parece variar de acordo com o tipo de tumor, enquanto que de acordo com o grau de diferenciação, há maior probabilidade para os tumores com alto grau histológico. Tumores de menor diferenciação associam-se com maior disseminação (FRANCO, 1997).

FOLKMAN (1971) postulou que a neoangiogênese precede a proliferação das células tumorais. Em estudos mais recentes, o papel dos fatores de crescimento relacionados à angiogênese tumoral também tem sido evidenciado, com FGF, TGF- α e TGF- β (DICKSON, 1992) e VEGF (FOLKMAN, 1996), embora mecanismos genéticos e moleculares que controlam o desenvolvimento vascular ainda sejam pouco conhecidos. A importância da neovascularização no prognóstico do câncer mamário, porém, é bem evidenciada quanto à sobrevida das pacientes e ao intervalo livre de doença (WEIDNER et al., 1991; BOSARI, 1992).

A expressão de fatores de crescimento mostra efeitos diversos no próprio tumor ou no organismo: TGF- β tem ação sobre a angiogênese e proliferação das células neoplásicas, enquanto que TGF- β_1 parece alterar a infiltração de linfócitos e macrófagos, associando-se com as metástases (WALTER, 1997).

Entre os sítios principais de metástases dos cânceres mamários, destacam-se os ossos. Há evidências de reabsorção óssea excessiva e patológica, desencadeada por hiperfunção dos osteoclastos, associando-se com fraturas e hipercalcemia. Uma variedade de produtos secretados pelas células tumorais, como citocinas (interleucinas, prostaglandinas, TNF), teria papel na estimulação osteoclástica (SIRIS, 1997). De acordo com dados

estatísticos, mais de 85% das mortes em mulheres com câncer de mama envolvem comprometimento esquelético (GALASKO, 1997).

Grande número dos estudos relativos ao câncer destacam as taxas proliferativas elevadas como a principal característica das células tumorais. Contudo, vários relatos mostram que o potencial proliferativo por si só não capacita a massa tumoral a metastatizar em sítios secundários. Uma série de fatores, como autócrinos e de crescimento, ou substratos energéticos, que são pré-requisitos para a disseminação das células tumorais, mostram-se associados. Existem ainda evidências de que a migração das células neoplásicas através do estroma e vasos sanguíneos depende de produtos tumorais, como o fator de motilidade autócrina, além de fatores de crescimento insulina-símile, como IGF-I, que tem ação mitogênica, estimula a quimiotaxia e tem papel na migração das células metastáticas em sítios secundários. A expressão aumentada de IGF-I e de seu receptor, que se mostra envolvido na proteção das células tumorais contra apoptose (QUINN et al., 1996), correlaciona-se com a proliferação de tumores primários e metastáticos da mama. Num estudo relacionado à disseminação das células neoplásicas *in vitro*, BECKNER et al. (1990) também demonstraram que a motilidade das células metastáticas em melanoma humano depende da presença de glicose no meio de incubação, fator que atua como substrato primário para a migração celular.

1.5. Metabolismo da célula neoplásica

Embora o metabolismo de vários neoplasmas seja investigado há aproximadamente sete décadas (WARBURG, 1926; WARBURG, 1930), os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na iniciação e desenvolvimento dos tumores mamários humanos, assim como na progressão maligna, ainda são pouco conhecidos. Sabe-se, no entanto, que o processo de proliferação de populações neoplásicas requer um suprimento energético elevado (WARBURG, 1956; WEINHOUSE, 1972; MATSUNO, 1987;

EIGENBRODT et al., 1994), além de fatores angiogênicos evidenciados por FOLKMAN (1971), que demonstrou a dependência tumoral quanto aos vasos sanguíneos para o suprimento de nutrientes.

Sabe-se que o potencial de proliferação das células neoplásicas está associado com a expressão contínua de oncogenes que regulam a proliferação (BLOCH, 1989). Muitas alterações genéticas associadas ao desenvolvimento do câncer de mama resultam da amplificação, mutações pontuais e translocações de oncogenes (MOTOKURA & ARNOLD, 1993; TLSTY et al., 1993; Di LEONARDO et al., 1993). As diferenças entre o comportamento metabólico das células cancerosas e suas inter-relações podem resultar de alterações moleculares. Vários oncogenes relacionados neste processo, nas neoplasias mamárias, como *c-myc* (20%), *c-erb-B2* (20%) e *ras*, em menor proporção, constituem fatores de prognóstico (VAN der VIJVER & NUSSE, 1991; DICKSON et al., 1992; WALTER et al., 1997). As conseqüências metabólicas da amplificação de oncogenes ainda não foram totalmente elucidadas, mas este fato pode ser importante para o prognóstico e tratamento dos tumores malignos.

A principal manifestação das alterações genéticas parece se refletir na expressão das enzimas. WEBER (1977) demonstrou um desbalanço enzimático ordenado, em várias células neoplásicas, o que poderia contribuir na transformação e progressão de tumores malignos. Denomina-se Progressão os vários graus de malignidade expressos durante o processo neoplásico. Transformação refere-se ao potencial maligno indutor de modificações que são transmitidas às outras células, sendo característico para cada tumor. Estudos relacionados ao metabolismo de glicose e glutamina indicam que as atividades de certas enzimas, como a hexoquinase II, ligada à membrana mitocondrial, e a glutaminase associam-se com a progressão tumoral (BUSTAMANTE et al., 1981, BAGGETTO, 1997).

Observa-se também que a progressão do tumor está associada com um desequilíbrio no processo de diferenciação das células neoplásicas. Além

do potencial proliferativo exacerbado e drenagem dos estoques metabólicos do hospedeiro, pelas células funcionalmente modificadas, há um aumento do número de células imaturas (BLOCH, 1989). Concomitantemente com a expansão de populações celulares com características fetais, observa-se também a expressão de alguns marcadores de estágios imaturos do desenvolvimento, como o antígeno carcino-embriogênico e a alfa-fetoproteína. A produção de hormônios ectópicos também parece resultar do estado embrionário do tumor. De modo similar, esse estado imaturo da população celular tumoral, em proliferação, pode ser evidenciado pela presença de enzimas caracterizadas por aspectos imaturos. As constatações da recorrência de fatores fetais e reexpressão de enzimas com características embrionárias, nos tumores malignos, têm permitido a sua utilização como marcadores para o diagnóstico e prognóstico de neoplasias. Das enzimas estudadas citam-se a isoenzima piruvato quinase K ou M₂ em vários tipos de tumor (BLOCH., 1989), ou a hexoquinase nos hepatomas (FARINA et al., 1974), e ainda a presença de isoenzimas da lactato desidrogenase na descarga papilar, que permite diferenciar os tumores benignos dos malignos de mama (KAWAMOTO, 1994).

WARBURG (1956) foi um dos primeiros pesquisadores a demonstrar a importância do metabolismo de glicose em várias linhagens de células neoplásicas. Estudos clássicos demonstram que os tumores malignos metabolizam glicose ativamente, através da glicólise, com formação de lactato, mesmo que na presença de oxigênio (STUBBS et al., 1995). Em contraposição, nas células normais, esta via ocorre particularmente em condições de anaerobiose, como no músculo durante a atividade física intensa. Embora os tumores apresentem taxas elevadas de glicólise aeróbia, ainda não está totalmente elucidado se esta é essencial para a célula tumoral ou se representa uma manifestação marginal da transformação maligna. Várias hipóteses têm sido propostas para explicar o elevado fluxo glicolítico em células tumorais, o qual poderia ser consequência de alterações nas propriedades das enzimas

reguladoras, como a fosfofrutoquinase-1 (LAZO, 1981), hexoquinase e piruvato quinase, ou ainda fosfofrutoquinase-2 (BAGGETTO, 1997).

Existem ainda suposições de que o elevado metabolismo glicolítico da célula tumoral deva-se à: 1) atividade aumentada da ATPase dependente de Na e K, que acarreta aumento na concentração de ADP, e ativa a etapa final da glicólise; 2) deficiência do transporte de íons H^+ do NADH gerado no citossol, como consequência da redução na atividade das lançadeiras glicerol-fosfato e malato-aspartato; 3) alteração das mitocôndrias, tanto pela redução do número (50%) quanto da sua estrutura, limitando o metabolismo oxidativo por reduzir a competição pelo ADP disponível no citossol (ARGILÉS & LÓPEZ-SORIANO, 1990; BAGGETTO, 1997; STUBBS, 1995).

O metabolismo dos tumores malignos é particularmente distinto do das células normais, exceto em relação àquelas com alta taxa proliferativa, como enterócitos e linfócitos (NEWSHOLME et al., 1988). O tumor parece atuar como um sequestrador metabólico dos nutrientes circulantes, captando compostos vitais ao organismo portador. Assim, a massa tumoral comporta-se como um parasita que alimenta-se às custas do seu hospedeiro (ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988). As consequências da invasão tumoral sobre o metabolismo do portador são várias, no entanto, a redução da eficiência metabólica do organismo é um ponto comum a todos os tumores malignos. Depleção proteica muscular, depleção lipídica, gliconeogênese aumentada e desacoplamento entre respiração e fosforilação oxidativa constituem as principais respostas do organismo à invasão tumoral (ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988). O resultado final destas alterações metabólicas é um profundo desequilíbrio no organismo, que termina em caquexia e, eventualmente, morte.

Inúmeros estudos demonstram que glicose e glutamina são substratos consumidos avidamente por células de proliferação rápida (NEWSHOLME et al., 1988). Sabe-se também que a utilização elevada desses substratos, mas somente oxidação parcial, é característica de algumas células normais, como linfócitos, enterócitos, timócitos, colonócitos e fibroblastos, e, particularmente,

das células tumorais. Estas observações evidenciam que tanto células normais de proliferação rápida, quanto tumorais, comportam-se como sistemas dissipadores de energia, dotados de alta capacidade de fluxo glicolítico e glutaminolítico (MEDINA, 1990).

KOVACEVIC' (1983) demonstrou que glicose e glutamina contribuem como precursores para a síntese de proteínas e nucleotídeos nas células neoplásicas, o que justifica a demanda elevada destes substratos pelos tumores, enquanto outros estudos também evidenciam sua importância na produção de lipídios, como triacilglicerol, para o desenvolvimento tumoral (CURI et al., 1987 ; KOWALCHUK et al., 1987; CURI et al., 1994).

A glicólise aeróbia parece constituir uma via metabólica essencial para a progressão das neoplasias malignas (WARBURG, 1956; WEBER, 1977) e, em alguns tumores de crescimento rápido, contribui com mais de 50% da energia (NAKASHIMA et al., 1984). Os mecanismos envolvidos nas alterações da capacidade glicolítica podem envolver modificações pós-tradução associadas às propriedades cinéticas da hexoquinase (GOLSHANI-HEBRONI et al., 1997). BRAND (1997) relatou que o aumento na atividade glicolítica das células neoplásicas pode representar um mecanismo de proteção contra espécies reativas de oxigênio geradas pelo metabolismo oxidativo da glicose, uma vez que o piruvato formado pela glicólise representa um composto com capacidade antioxidante.

MAZUREK et al. (1997), por outro lado, evidenciaram que o papel da glicólise tanto no desenvolvimento do tumor, quanto no processo metastático, resulta da formação e aumento na concentração de fosfometabólitos intermediários como glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose 1,6-bifosfato e fosfoenolpiruvato, que atuam como ativadores na seqüência de reações da glicólise ou de outras vias associadas. A importância da glutaminólise é evidenciada pelas concentrações elevadas de glutamina (2 mM) de certos tumores sólidos, uma vez que algumas células tumorais sobrevivem e proliferam em condições limitadas de glicose, quando há disponibilidade de

oxigênio.

Outros estudos mostram que as alterações no metabolismo das células tumorais estão também associadas a mudanças no transporte de membrana, o que leva ao aumento nas concentrações intracelulares de diferentes metabólitos (HOLLEY, 1972; BHARGAVA, 1988). O transporte ativo de glicose, observado nas células cancerosas, é acompanhado por aumento na atividade das enzimas glicolíticas (ROSA, 1979; ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988). Os parâmetros cinéticos de algumas enzimas, como hexoquinase, mostram-se distintos em alguns tipos de tumor. No caso de tumores humanos que atingem estômago, pulmão, ovário e útero, o K_m desta enzima apresenta-se 10 vezes menor que nos tecidos normais (SHAPOT, 1979). Com base nestas considerações é que a hexoquinase II vem sendo proposta como um marcador de neoplasias humanas (GUDNASON et al, 1984). BALINSKY et al. (1983) também caracterizaram várias isoenzimas da piruvato quinase, lactato desidrogenase e malato desidrogenase em tecido mamário normal, benigno e maligno, que poderiam representar marcadores tumorais de diferenciação entre os estágios pré-maligno e maligno dos estágios benignos.

Estudos mais recentes relacionados ao metabolismo tumoral, envolvendo espectroscopia de ressonância magnética nuclear, têm reavaliado vários aspectos das diferenças metabólicas entre os tecidos normais e neoplásicos. STUBBS et al. (1995) determinaram que as relações entre as concentrações de H^+ e lactato, nos meios intra e extracelulares de hepatomas, são inversas àquelas observadas no fígado normal, o que diverge dos estudos clássicos. As medidas *in vivo* mostram que o gradiente de pH dos tumores malignos, humanos ou de animais, mostra-se inverso ao tecido normal, onde o pH intracelular (7,0) é maior que o pH extracelular (6,8), proporcionando um ambiente cuja neutralidade garante a sobrevivência das células tumorais. A maioria dos estudos que utilizam medidas através de microeletrodos, no entanto, mostram que os valores de pH tumoral são ácidos (GRIFFITHS, 1991). Em oposição a estes trabalhos, NG et al. (1989) relataram variações no pH do

câncer de mama entre 7,4 e 7,7. Diversos estudos, contudo, ressaltam observações de que o pH mostra variações intra-tumorais, o que poderia associar com metabolismo diferenciado entre regiões do próprio tumor (NEWELL, 1989).

No mesmo estudo, citado anteriormente, alguns íons apresentaram concentrações aumentadas, como Na^+ (2 vezes), Ca^{+2} (8 vezes) e Pi (2 vezes), enquanto Mg^{+2} , K^+ , MgATP^{-2} e HCO_3^- mostraram-se menores que no tecido normal. Em particular, ressalta-se o aumento na captação e acúmulo de Ca^{+2} , que pode ocorrer simultaneamente com o aumento na entrada de ânions fosfato, em quantidades equivalentes. Em consequência, há a formação de precipitados de fosfato de cálcio insolúveis, que induzem calcificação de alguns tumores, inclusive mamários, constituindo a base para o diagnóstico destes últimos através de mamografia (STUBBS et al., 1995).

Uma série de fatores de crescimento tumorais estão também associados às adaptações metabólicas induzidas por tecidos neoplásicos. Alguns estudos demonstram que certos fatores secretados por carcinomas mamários, em particular $\text{TGF-}\alpha$ e β e EGF, têm efeito na estimulação da reabsorção óssea, o que poderia ter profundas implicações para o tratamento de pacientes com metástases ósseas (EVANS et al., 1991). Além disso, o EGF estimula a glicólise tumoral acelerando o consumo de glicose (BAULIDA et al., 1992).

Embora o EGF seja um fator necessário para o epitélio mamário normal, alguns estudos mostram que a expressão aumentada do seu receptor (EGFR), que apresenta um domínio intracelular de tirosina quinase, com homologia com v-erbB, relaciona-se com mau prognóstico do câncer de mama e resposta deficiente à hormonioterapia (WALTER, 1997).

Dentre os fatores prognósticos, sabe-se que o grau de diferenciação de vários tipos de tumor maligno associa-se diretamente com o seu metabolismo. Alguns hepatomas de crescimento lento, diferente do fígado e de tumores menos diferenciados, utilizam-se de maior quantidade de ácidos graxos do que

glicose como fonte energética. Ao contrário, nos tumores pouco diferenciados, de crescimento rápido, as alterações das mitocôndrias parecem induzir maior dependência da utilização de glicose (WEBER, 1977).

O crescimento tumoral depende basicamente da sua natureza. Assim, de acordo com as características de crescimento, os tumores podem ser classificados em vários tipos: tumores de crescimento rápido, intermediário e lento. O grau de diferenciação do tecido relaciona-se ao seu desenvolvimento, ou seja, quanto menos diferenciados os tumores, mais rapidamente crescem (ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988). Segundo WEINHOUSE (1980), as taxas de glicólise aeróbia aumentam de acordo com o grau de diferenciação das células tumorais. Este fato pode ser constatado pelo tempo de sobrevivência de pacientes com tumores cerebrais, cuja previsão baseia-se na atividade glicolítica; pacientes com tumores que apresentam taxas mais elevadas, sobrevivem por períodos mais curtos (PEDERSEN, 1997).

EIGENBRODT et al. (1998) também estudaram a interação entre glicólise e glutaminólise em tumores experimentais de vários tamanhos. O crescimento tumoral é acompanhado por alterações no consumo e utilização dos substratos, o que permite dividi-los em três grupos metabólicos: Tumores pequenos caracterizaram-se pela baixa conversão de glicose para lactato, enquanto que em relação à glutamina esta via mostrou-se elevada. Nos tumores médios, o fluxo de glicose para lactato e a utilização de oxigênio aumentaram, mas o consumo de glutamina e serina reduziram. Nos tumores de grande tamanho, embora as taxas de utilização de glicose e oxigênio fossem maiores, o suprimento destes foi diminuído. Estas alterações parecem correlacionadas com a atividade das enzimas, de modo que a piruvato quinase aumentou de acordo com o peso do tumor e a utilização de glicose e oxigênio.

A glutamina é considerada um importante precursor da síntese de proteínas e nucleotídeos tumorais, que associam-se ao crescimento (KOVACEVIC', 1972). Embora seja o aminoácido mais abundante do organismo (SOUBA, 1993), o alto consumo deste pelas células tumorais, 45% a mais do

que em órgãos saudáveis, reduz a disponibilidade de glutamina circulante para os outros tecidos do organismo. Há, entretanto, evidências de que a concentração de glutamina, nas células tumorais, é muito baixa e, além disso, a atividade da glutamina sintetase é bastante reduzida (ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988).

A glutamina é um importante substrato energético para as células de proliferação rápida, sendo oxidada através da glutaminase dependente de fosfato. Esta enzima converte glutamina a glutamato e amônia na primeira etapa de uma série de reações, que geram vários intermediários metabólicos requeridos para o crescimento tumoral (SOUBA, 1993). Há uma estreita correlação entre a atividade da glutaminase, o consumo de glutamina e o crescimento de diversos tumores malignos (SOUBA, 1993) ou proliferação de linhagens neoplásicas em cultura (COLQHOUN et al., 1997). Outros aminoácidos, como metionina e serina, também são descritos modular a resposta do organismo ao crescimento tumoral, contribuindo para reduzir as metástases, mas suas proporções são significativamente menores (TOROSIAN et al., 1995).

COLLINS et al. (1997) analisaram os efeitos da privação de glutamina sobre linhagem tumorigênica de mama em comparação ao crescimento tumoral *in vivo*. As alterações no metabolismo tumoral mostraram-se de acordo com o nível de depleção do aminoácido. Nos tumores grandes houve diminuição significativa na concentração de glutamina em comparação aos tumores pequenos, enquanto que as concentrações da glutamina sintetase mostraram-se inversas, o que pode representar um mecanismo adaptativo para sobrevivência das células neoplásicas em condições de baixa concentração de glutamina.

Várias questões são levantadas quanto às interações entre o metabolismo de glicose e glutamina de tumores malignos, em que a presença de um dos substratos afeta a oxidação e taxa de consumo do outro, como ocorre em linfócitos (ARDAWI & NEWSHOLME, 1983). KOVACEVIC' (1972)

incubou tumor mamário de camundongo (tumor de Ehrlich), na presença de 0,5 mM de glutamina e 5 mM de glicose, e observou não haver alteração significativa nas taxas de consumo e oxidação de glicose. Ao contrário, em relação à glutamina, as taxas de consumo e oxidação diminuíram em 31% e 54%, respectivamente (MEDINA et al., 1988). As diferenças nas taxas de consumo e oxidação dos substratos levaram ZIELKE et al. (1978) a sugerir que quando as células tumorais podem selecionar dentre diferentes substratos, há utilização preferencial de glicose, fato que justifica a redução na taxa de oxidação de glutamina em tumores, bem como em células de proliferação rápida.

Por outro lado, a glutamina parece ser a principal fonte de nitrogênio para a biossíntese de purinas e pirimidinas (BODE, 1994). Em animais portadores de câncer e humanos, há depleção progressiva de glutamina do organismo, à medida que o tumor progride.

Em hepatomas, há um transporte ativo de glutamina (SOUBA, 1993; BODE et al., 1994) mediado por sistemas carreadores, dependentes de sódio, A e ASC. Em particular, ressalta-se que nos tumores sólidos, com vascularização deficiente, o sistema de transporte A é ativo, uma resposta adaptativa que torna as células malignas mais eficientes para competirem com o organismo pela glutamina circulante (SOUBA, 1993).

Há poucos estudos enfocando a importância deste aminoácido nas neoplasias mamárias. WASA et al. (1996) avaliaram o transporte de glutamina em diferentes linhagens celulares derivadas de tumores sólidos humanos (mama, cólon e fígado) e constataram importante variação do K_m do transportador entre os tumores. Entre linhagens mamárias, T47D e HBL 100, observou-se variação quanto ao grau de dependência do aminoácido para o crescimento, o que demonstra que alguns cânceres sobrevivem em ambientes com concentrações menores de glutamina. Desse modo, supõe-se que o potencial tumorigênico de células transformadas que se adaptam a sobreviver

na ausência de glutamina é maior que aquele das células de origem que apresentam dependência do aminoácido.

Apesar das informações acima, existem controvérsias quanto ao papel da glutamina como substrato para o crescimento tumoral, uma vez que alguns estudos mostram um efeito supressor do desenvolvimento do tecido neoplásico. KLIMBERG et al. (1996) avaliaram a taxa de crescimento de células de adenocarcinoma mamário implantadas em animais tratados com dieta suplementada com glutamina e observaram que os tumores de ratos com suplementação apresentavam menor tamanho (40%) e ausência de metástase. A supressão do crescimento tumoral pela glutamina foi mediada por aumento da atividade citotóxica de células natural killer (NK), estimuladas pelo aumento da síntese de glutathione, um produto da glutamina.

Observações relativas à importância da glutamina levaram a estudos sobre sua utilização como suporte nutricional em pacientes com câncer, considerando-se que este aminoácido contribui para a manutenção do equilíbrio nitrogenado. A administração de dietas parenterais suplementadas com glutamina, em combinação com quimioterapia, aumenta a sobrevivência dos pacientes, em comparação ao tratamento quimioterápico sem suporte nutricional. KLIMBERG et al. (1994) demonstraram que as dietas contendo glutamina, associadas ao tratamento com metotrexato, aumentavam a ação tumoricida do medicamento e reduzia a mortalidade de animais com fibrossarcoma. Os mecanismos associados a estes efeitos parecem ser devido à glutathione (ROUSE et al., 1995) ou à redução da proteólise muscular e retenção de nitrogênio no organismo (KAIBARA et al., 1994).

O quadro de caquexia é observado em alguns pacientes com câncer, nos estágios mais avançados da doença e está associado ao turnover proteico. PARRY-BILLINGS et al. (1991) demonstraram que animais com tumor de Walker-256 apresentam redução na concentração de glutamina no tecido muscular e no plasma, o que afeta a resposta imunológica e favorece o crescimento tumoral. Este aminoácido desempenha papel fundamental na

funcionalidade de linfócitos, macrófagos e neutrófilos (CURI et al., 1999). Os resultados obtidos em animais também estão de acordo com aqueles observados em pacientes caquéticos (BENNEGARD et al., 1982).

O tumor também compete continuamente com os tecidos normais pela glicose circulante, levando o organismo à hipoglicemia. No entanto, em estudos experimentais, verifica-se que nem todos os animais portadores de tumor desenvolvem hipoglicemia (MEDINA, 1990) e esta resposta diferenciada pode estar associada à super-expressão de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF-I) e de seus receptores, que mimetizam as ações da insulina (SEBASTIAN, 1997).

O transporte de glicose, nas células tumorais, não parece ser insulino-dependente uma vez que, ocasionalmente, a hipoglicemia observada em animais portadores de tumores ocorre, concomitantemente, com concentrações normais, ou mesmo diminuídas, de insulina plasmática (SCHEIN et al., 1979 ; HEBER & BYERLEY, 1985).

FERNANDES (1989) observou, em ratos portadores do carcinossarcoma de Walker 256, que o consumo de glicose por células tumorais incubadas era insulino-independente, de modo que a administração diária de insulina por via subcutânea (5 U/100 g peso) reduzia o estado caquético do animal e a taxa de crescimento tumoral. Assim, a insulina reduz, possivelmente, a disponibilidade de glicose para o tecido tumoral e concomitantemente o seu crescimento, aumentando o fluxo desse substrato para o organismo do portador. Resultados similares foram obtidos por HARMON & HILF (1976) em adenocarcinoma mamário de ratos diabéticos. A importância da insulina para o crescimento tumoral, no entanto, ainda é controversa, pois a expressão aumentada de receptores de insulina, em alguns tumores de mama, correlaciona-se diretamente com o crescimento desses (MILAZZO et al., 1992, FRITTITTA et al., 1997).

A insulina parece interferir indiretamente com o metabolismo da célula tumoral. GOLSHANI-HEBRONI & BESSMAN (1997) relataram que a ligação da

hexoquinase II a porinas da membrana mitocondrial, estimulada por insulina, é um mecanismo que permite rápida fosforilação da glicose, que entra na célula, pelo ATP produzido no ciclo de Krebs e parece também estimular a síntese proteica tumoral. A alta capacidade glicolítica permite a sobrevivência e migração das células tumorais em áreas hipóxicas (MAZUREK, 1997).

Recentemente, os mecanismos moleculares relacionadas à elevada atividade glicolítica, dos tumores malignos, foram elucidados pelo estudo de genes das enzimas da via glicolítica e outros genes que são induzidos por hipóxia através da ligação do fator de transcrição denominado HIF-1/ARTN (DANG et al., 1997). A ativação desse heterodímero por baixas tensões de oxigênio induz sua ligação a elementos responsivos à hipóxia (seqüência 5'-RCGTG-3') localizados em regiões regulatórias de vários genes, incluindo aqueles do transporte de glicose e das enzimas glicolíticas, estimulando aumento nas suas expressões (MAXWELL et al., 1997, KRESS et al., 1997, DANG & SEMENZA, 1999). Há também evidências de que as alterações do metabolismo de glicose observadas nos cânceres resultam de respostas adaptativas das células tumorais à deficiência de oxigênio, alterações oncogênicas e apoptose. O principal fator que parece induzir adaptação metabólica das células tumorais, num ambiente hostil, é a hipóxia crônica, resultante da distância dos vasos sangüíneos, principalmente nos tumores sólidos (DANG e SEMENZA, 1999).

Num estudo de revisão, VAUPEL et al.(1989) analisaram o efeito da vascularização sobre o metabolismo de várias neoplasias humanas (cérebro, hepatomas, lesões metastáticas, cânceres de mama, linfomas, carcinomas de útero e melanomas), além de outros tumores malignos sólidos. O fluxo sangüíneo mostrou grande variação quando comparados tumores de classificação histológica similar, ou estes em relação aos seus tecidos de origem, ou ainda a mesma área tumoral em tempos diferentes . Um exemplo são os cânceres mamários, onde o fluxo sangüíneo é substancialmente maior que na mama na fase pós-menopausa, mas menor que na mama em lactação.

Desse modo, considera-se que a progressão das neoplasias malignas, após período de crescimento avascular, torna-se possível se o suprimento de nutrientes e remoção de produtos do metabolismo, como lactato, H^+ , além de produtos de necrose, ocorrerem através do fluxo sanguíneo adequado. Isso permite trocas adequadas entre o leito da microcirculação e células neoplásicas, uma vez que o fluxo sanguíneo diminui à medida que os tumores aumentam. Assim, pode se estabelecer uma correlação estreita entre a distribuição de oxigênio no tecido normal e a bioenergética, considerando-se que a deficiência de microcirculação limita o metabolismo energético pela falta de oxigênio.

A resistência à terapia representa uma das dificuldades mais evidentes no tratamento das neoplasias mamárias. Estudos relacionando o comprometimento da vascularização em tumores hipóxicos e a deficiência na resposta à terapia, seja quimio ou radioterápica, são bem evidenciados (KENNEDY, 1980; SARTORELLI, 1988; LYON, 1988; OVERGAARD, 1989). Há relatos de que as células hipóxicas mostram-se mais resistentes à maioria dos quimioterápicos, devido às distâncias das áreas de vascularização do tumor, principalmente na região central (SARTORELLI, 1988) ou devido à redução na progressão através do ciclo celular. Contudo, alterações metabólicas associadas a esta manifestação não estão elucidadas. VAUPEL et al (1989) demonstraram que os tumores malignos, principalmente sólidos, freqüentemente têm suprimento sanguíneo deficiente, o que resulta em áreas de acidose e privação de nutrientes, com regiões depletadas em tensão de oxigênio, o que altera a sensibilidade aos tratamentos radio e quimioterápico. Desse modo, tumores sólidos e hipóxicos, associam-se com mau prognóstico.

Neste aspecto, vários estudos correlacionam observações clínicas do comportamento heterogêneo, do câncer mamário, com a biologia tumoral (SCHNIPPER, 1986). SUTHERLAND (1988) relatou que a angiogênese anormal dos tumores malignos associa-se com o desenvolvimento de microrregiões heterogêneas, tanto por alterações da estrutura celular quanto da

oxigenação e pH intratumorais. Pelo modelo esferóide, as células devem distribuir-se em áreas distintas do tumor, estando aquelas em fase proliferativa dentro de poucas camadas próximas aos vasos sanguíneos e as células quiescentes e necróticas em regiões progressivamente distantes da área de vascularização. Outras evidências da heterogeneidade de áreas do tecido tumoral também relacionam-se ao comprometimento do fluxo de nutrientes e oxigênio, levando a alterações no gradiente de pH, concentração de metabólitos e hormônios intratumorais (VAUPEL et al., 1981; DURAND, 1991; CASCIARI et al., 1988; CASCIARI et al., 1992).

Alguns estudos têm demonstrado a importância de diferentes terapias de acordo com o tipo de câncer. A hipóxia e heterogeneidade das áreas, principalmente nos tumores sólidos, associa-se com as diferenças no crescimento e nas respostas à terapia, principalmente em células hipóxicas que mostram-se resistentes à radiação ionizante (SARTORELLI et al., 1995). Neste sentido, NORDSMARK et al.(1996) constataram que o pré-tratamento de carcinomas de cabeça e pescoço por oxigenação auxilia na resposta à radiação, dada a grande variação na pO_2 intratumoral. Os estudos referentes à influência do metabolismo nessas respostas são ainda restritos.

Embora muitos aspectos das teorias estabelecidas por WARBURG (1956) e outros pesquisadores ainda sejam totalmente aceitos, vários pontos relativos ao metabolismo tumoral permanecem por ser esclarecidos. BAGGETTO (1990) relatou que o impacto do tumor sobre o organismo está estreitamente associado com a utilização de substratos, principalmente glicose, devido à proliferação exacerbada das células, mas os fatores que contribuem para o aumento do fluxo glicolítico podem variar de tumor para tumor.

Alguns tumores mamários, como carcinoma ductal infiltrativo, são massas macroscopicamente heterogêneas, com áreas de microcalcificação. Assim, questões relativas ao metabolismo nas diferentes áreas do tumor ainda não foram respondidas.

2. OBJETIVOS

O presente estudo objetivou analisar aspectos do metabolismo de glicose e glutamina em áreas do centro (compactas e calcificadas) e periferia (não compactas e não calcificadas) de carcinomas ductais infiltrativos humanos. Os aspectos listados abaixo foram estudados.

1. Efeito da insulina sobre o consumo de glicose por fatias de carcinoma ductal infiltrativo e comparação com a mama normal.

2. Comparação entre as atividades das enzimas glicolíticas no centro e periferia dos tumores e na glândula mamária.

3. Determinação da atividade da glutaminase dependente de fosfato .no centro e periferia dos tumores e na glândula mamária.

4. Determinação das características cinéticas da piruvato quinase do homogenado de tecido tumoral e após a purificação da proteína.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Os substratos e enzimas utilizadas nas análises enzimáticas ADP, ATP, glicose-6-fosfato desidrogenase, frutose-6-fosfato, frutose 1,6-bifosfato, NAD, NADH, NADP, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato, piruvato, glicerol-3-fosfato, acetil-CoA, glicerol fosfato desidrogenase-triose fosfato isomerase, aldolase, glicose-6-fosfato desidrogenase, lactato desidrogenase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, triose isomerase, glutamato desidrogenase, e a resina celulose fosfato, utilizada na purificação da piruvato quinase, foram obtidos da Sigma Co. (St Louis, USA). Os reagentes utilizados no preparo dos tampões, glicose e glutamina foram obtidos da Merck (Darmstadt, Germany) e Boehringer (Mannheim, Germany). Os meios de cultura para as células MCF-7 foram obtidos da Gibco BRL (Gaithersburg, USA). As fitas de acetato de celulose (Chemegel) foram obtidas da Zimochimica (Itália).

3.2. Material biológico

3.2.1. Tecidos

Foram estudados carcinomas ductais infiltrativos, sem qualquer tratamento prévio, de pacientes (n=25) submetidas à biópsia. Os tumores utilizados neste estudo foram classificados em estadiamento clínico III e graus histopatológicos I, II Ia e III. Utilizou-se o sistema TNM da Union Internationale Contre Cancer (UICC) para classificação clínica e histopatológica.

As glândulas mamárias normais (n=4) foram coletadas de pacientes submetidas a mamoplastia redutora. Os tumores e glândulas mamárias foram obtidos cirurgicamente e identificados por técnicas histopatológicas, junto ao

Setor de Ginecologia do Hospital e Maternidade Brasil, Santo André, e Faculdade de Medicina de Jundiaí, São Paulo.

Todas as técnicas para coleta dos materiais biológicos seguiram normas do Código de Ética Médica. As pacientes foram identificadas como **P**, seguido pela designação do número de acordo com as suas respectivas idades.

3.2.2. Exame histopatológico

Fragmentos de tumores foram coletados e identificados junto aos setores de anatomia patológica dos hospitais nos quais foram obtidos os materiais biológicos. Os tecidos foram corados por hematoxilina-eosina e identificados morfolologicamente.

3.2.3. Obtenção e conservação dos tecidos

Os tumores e glândulas mamárias foram coletados e mantidos imediatamente em solução Krebs-Ringer pH 7,4 a 0 °C, até o processamento das análises de incubação dos tecidos com insulina.

Removeu-se da massa tumoral o tecido adiposo e sangue. Os tumores foram lavados em solução fisiológica e mantidos em solução Krebs-Ringer pH 7,4 a 0°C, imediatamente após sua coleta. Posteriormente, estes tecidos foram conservados em nitrogênio líquido até o processamento das análises, exceto para as determinações de consumo de metabólitos e eletroforese de isoenzimas, nas quais foram utilizadas tecidos frescos.

3.2.4. Fracionamento das áreas tumorais

Logo após a remoção cirúrgica, os tumores foram cortados com bisturi, desde a sua extremidade superior até a inferior, em fragmentos de 1 cm até 3 cm de diâmetro. Estas fatias, em seguida, foram segmentadas em porções do centro e periferia tumorais e conservadas em nitrogênio líquido até o processamento das análises.

3.3. Células MCF-7

Linhagens de células tumorais de mama, MCF-7, foram provenientes do Instituto Ludwig (Londres) para os estudos comparativos com tumores mamários. As células foram doadas pela Prof. Dra. Maria Mitzi Brentani (FMUSP).

3.3.1. Cultura da linhagem tumoral MCF-7

As células foram cultivadas em frascos estéreis contendo meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium), pH 7,4, adicionado de 10% de soro fetal bovino e incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Lab-Line) até atingirem a confluência. Após esta fase, as mesmas foram raspadas e o "pool" obtido foi mantido em nitrogênio líquido até o processamento da análise. As células foram utilizadas na determinação da atividade das enzimas glicolíticas e eletroforese da piruvato quinase.

3.4. Métodos

3.4.1. Incubação das fatias de tumores na presença de glicose e insulina

Fatias do tecido tumoral, de aproximadamente 50 mg de peso, foram incubadas a 37° C, sob agitação constante, durante 60 minutos, na presença de glicose para obter concentração final de 5,6 mM e insulina 100 µU/ml ou 1000 µU/ml. Os tecidos foram incubados em frascos erlenmeyer siliconizados (silicone 1% em acetona) contendo solução tampão Krebs-Ringer (600 µl) pH 7,4, albumina bovina livre de ácidos graxos 10% (200 µl), glicose 56 mM (100 µl), insulina 1000 e 10.000 µU/ml (100 µl), completando o volume total de 1 ml. Após 1 hora de incubação, a reação foi interrompida pela adição de ácido perclórico 25%. O sobrenadante foi centrifugado a 15000 r.p.m. em centrífuga Incibrás spin I, durante 1 minuto. O sobrenadante obtido foi neutralizado com

solução de trietanolamina-KOH 0,5M e 2 M e utilizado para a determinação de lactato. Amostras de músculo e tecido adiposo de ratos foram utilizadas como padrões de referência para a determinação da responsividade à insulina.

3.4.2. Determinação da produção de lactato por fatias tumorais incubadas com glicose

O lactato produzido no meio de incubação das fatias tumorais foi determinado através do método de ENGLE (1978), utilizando-se mistura de ensaio contendo tampão glicina 50 mM, EDTA 5 mM e hidrato de hidrazina pH 8,85: NAD 15 mM e LDH 1,0 U/ml. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Gilford modelo Response a 340 nm.

3.4.3. Determinação da concentração de glicose no meio de incubação

A partir da incubação do tecido tumoral, após neutralização, a concentração de glicose no sobrenadante foi determinada através de Kit para a reação da glicose oxidase, segundo o método descrito por TRINDER (1969). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Gilford Response) a 505 nm.

3.5. Determinação enzimática

3.5.1. Obtenção dos extratos teciduais

Fatias tumorais e da glândula mamária foram homogeneizadas com 10 volumes (p/v) de meio de extração a 0°C, utilizando-se homogeneizador de alta rotação (VIEIRA et al., 1987), em intervalos de 15 a 30 segundos. Os extratos obtidos foram centrifugados a 11.500g. em centrífuga refrigerada Sorvall RC-2 a 4°C por 30 minutos. Os sedimentos foram desprezados e os sobrenadantes, após filtração, foram utilizados para a determinação da atividade enzimática e do conteúdo proteico.

3.5.2. Meio de extração das enzimas glicolíticas

Na determinação da atividade das enzimas glicolíticas, utilizou-se meio de extração composto de Tampão Tris-HCl 50 mM, β -mercaptoetanol 10 mM, KCl 70 mM e MgSO_4 8 mM, pH 7,4.

3.5.3. Determinação de proteínas nos extratos teciduais

A concentração protéica dos extratos, foi determinada segundo o método de LOWRY et al. (1951), utilizando-se albumina bovina como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro Gilford Response a 660 nm.

3.5.4. Determinação da atividade das enzimas glicolíticas

A atividade das enzimas foi determinada em função da oxidação do NADH ou da redução de NAD^+ e NADP^+ , a 340 nm, utilizando-se espectrofotômetro Gilford Response, em temperatura de 30°C. A atividade das enzimas foi determinada segundo os métodos a seguir:

Hexoquinase (HK): ATP:D-hexose-6-fosfotransferase (E.C. 2.7.1.1)

A hexoquinase catalisa a conversão de hexoses a hexose-6-fosfato, conforme a reação:

Enzima determinada segundo o método de UYEDA & RACKER (1965), modificado, em meio de reação contendo Tris-HCl 74 mM pH 7,4; MgCl_2 40 mM, ATP 2 mM, glicose 25 mM, NADP 1 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) 2 U/ml.

Fosfoglicoisomerase (PGI): ATP: D-glicose-6-fosfato cetoisomerase (E.C. 5.3.1.9)

Glicose-6-fosfato -----> Frutose-6-fosfato

A atividade enzimática foi determinada segundo o método de NOLTMAN (1966). O meio de reação continha Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, frutose-6-fosfato 2 mM, NADP 0,6 mM, MgCl₂ 10 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 0,3 UI/ml.

Fosfofrutoquinase-1 (PFK-1): ATP: D-frutose-6-fosfato-1-fosfotransferase (E.C. 2.7.1.11)

Frutose-6-fosfato + ATP -----> Frutose 1,6-bifosfato + ADP

A enzima foi determinada segundo o método de MANSOUR, (1963), modificado, em meio contendo Tris-HCl 40 mM pH 7,2: EDTA 5 mM, ATP 1 mM, frutose-6-fosfato 1 mM, NADH 0,7 mM, α -glicerol fosfato desidrogenase-triose fosfato isomerase (GDH-TIM) 0,1 UI/ml, aldolase, 0,4 UI/ml.

Frutose-bifosfato aldolase (Aldolase): Frutose 1,6 bifosfato: D-gliceraldeído 3 fosfato liase (E.C. 4.1.2.6)

Frutose 1,6-bifosfato -----> Diidroxiacetona-P + Gliceraldeído-3-fosfato

A aldolase foi determinada conforme o método descrito por BLOSTEIN & RUTTER (1963), em meio de reação composto por Tris-HCl 100 mM, pH 7,4, frutose 1,6-bifosfato 1 mM, NADH 1 mM, GDH-TIM 0,1 U/ml.

Fosfoglicerato quinase (PGK): ATP:3-fosfo-D-glicerato-1-fosfotransferase (E.C. 2.7.2.3)

3-Fosfoglicerato + ATP -----> 1,3,-Bifosfoglicerato + ADP

A enzima foi determinada pelo método descrito em BERGMEYER (1974). O meio de reação continha tampão Trietanolamina 80 mM, MgSO_4 2 mM, EDTA 0,5 mM, pH 7,4, 3-fosfoglicerato 5 mM, ATP 1 mM, NADH 0,5 mM e GAPDH 2 U/ml.

Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH): D-gliceraldeído-3-fosfato: NAD oxidoreductase (E.C. 1.2.1.12)

A atividade da GAPDH foi medida de acordo com o método descrito por BERGMEYER (1974), em meio de reação contendo Trietanolamina-HCl 80 mM, pH 7,5; EDTA 0,9 mM; 3-fosfoglicerato 6 mM, MgSO_4 2 mM, ATP 1 mM, NADH 0,9 mM e fosfoglicerato quinase (PGK) 1,5 U/ml.

Piruvato quinase (PK): ATP: Piruvato fosfotransferase (E.C. 2.7.1.40)

A enzima foi analisada de acordo com o método de BÜCHNER & PFLEIDERER (1955), num sistema contendo Tris-HCl 50 mM pH 7,4; fosfoenolpiruvato 1 mM, ADP 0,5M, NADH 1,3 mM, MgCl_2 20 mM e LDH 1,0 UI/ml.

Lactato desidrogenase (LDH): L-lactato: NAD oxidoreductase (E.C. 1.1.1.27)

A atividade desta enzima foi determinada segundo o método de BERGMEYER & BERNT (1974), em meio de reação composto por tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4, piruvato 1 mM e NADH 1,3 mM.

3.5.5. Determinação da atividade da glutaminase dependente de fosfato

L-glutamina amido-hidrolase (E.C. 3.5.1.2)

A atividade dessa enzima foi determinada pelo método de LOWRY & CURTHOYS (1973) através de duas reações, sendo a primeira catalisada pela glutaminase, seguida pela análise do produto da reação, o glutamato.

3.5.6. Extração dos tecidos

Os tecidos foram homogeneizados com 10 volumes (p/v) de tampão de extração a 0°C, composto por K₂HPO₄ e KH₂PO₄ 150 mM (concentração equimolar), Tris 50 mM, EDTA 1 mM, pH 8,6, utilizando-se homogeneizador de alta rotação (VIEIRA et al., 1987) em intervalos de 15 e 30 segundos.

1ª. Reação: Determinação da atividade da glutaminase

O homogeneizado foi incubado a 37°C em 1 ml de meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 250 mM, tampão Tris-EDTA 50/0,2 mM, Triton-X-100 a 1%, pH 8,6, e L-glutamina 20 mM. Após 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida com ácido tricloroacético 25% e o sobrenadante obtido, após centrifugação, foi neutralizado com solução de Tris-KOH 0,5 M/2 M e utilizado para a dosagem de glutamato.

2ª. Reação: Análise de glutamato no neutralizado

O glutamato foi determinado num sistema contendo tampão glicina 50 mM e hidrato de hidrazina 99% a 40 mM pH 9,0; NAD 15 mM; ADP 3 mM e glutamato desidrogenase 4,0 U/ml, segundo método descrito por ARDAWI et al. (1983).

3.5.7. Determinação da atividade da citrato sintetase

Citrato-oxaloacetato-liase (E.C. 4.1.3.7)

A enzima foi determinada de acordo com o método descrito por ALP et al. (1976). Na homogeneização dos tecidos utilizou-se tampão de extração contendo Tris-HCl 50 mM e EDTA 1 mM na proporção de 1:2 (p/v). A atividade enzimática foi determinada em meio de reação contendo Tris-HCl 100 mM, DTNB 0,2 mM, Triton-X-100 1% e acetil-CoA 15 mM. A reação era iniciada pela adição da enzima ao meio. A leitura do produto (DTNB-CoA) formado foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm, que é proporcional à atividade da enzima.

3.5.8. Determinação da α -glicerol-fosfato desidrogenase

Glicerol-3-fosfato: NAD 2-oxidoreductase (E.C. 1.1.1.8)

A enzima foi determinada segundo o método descrito por BERGMAYER (1974), em meio de reação contendo tampão Trietanolamina 300 mM, pH 7,4, glicerol 3-fosfato 0,5 mM, NADH 0,6 mM.

3.5.9. Determinação da glicose-6-fosfato desidrogenase

D-glicose-6-fosfato: NADP 1-oxirredutase (EC 1.1.1.49)

Enzima determinada de acordo com o método descrito por BERGMEYER (1974). O meio de reação continha tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,6 e MgCl_2 10 mM, glicose-6-fosfato 1 mM e NADP 0,5 mM. A reação foi iniciada pela adição de substrato ao meio.

3.6. Parâmetros cinéticos da piruvato quinase em extratos de tumores e glândula mamária

3.6.1. Determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m)

Os tumores e glândulas mamárias foram homogeneizados com 5 volumes (p/v) de tampão de extração contendo Tris-HCl 100 mM pH 7,4 ; KCl 70 mM ; MgCl_2 8 mM e β -mercaptoetanol 10 mM.

Os efeitos de PEP e ADP sobre a atividade da piruvato quinase da glândula mamária e carcinomas ductais infiltrativos foram estudados em meio de reação (1 ml) contendo MgCl_2 7 mM; KCl 50 mM, NADH 1,3 mM; LDH 10 U/ml em tampão Imidazol 50 mM, pH 7,4. A reação foi iniciada pela adição de alíquotas dos substratos em concentrações variáveis de 0,02 a 3,0 mM ao meio de reação contendo os extratos teciduais.

Para determinar as constantes de Michaelis-Menten (K_m) utilizou-se o sistema de LINEWEAVER-BURK (1934), através da equação da reta obtida pelo plote do inverso da concentração de substrato ($1/S$) no eixo x versus o inverso da velocidade da reação ($1/V$) no eixo y.

3.6.2. Efeito do ATP e alanina sobre a piruvato quinase de extrato bruto do tumor e da enzima purificada

Os efeitos dos metabólitos sobre a atividade da enzima em extratos brutos de tumores foram determinados em concentrações de alanina de 0,2 a 10 mM e ATP de 0,1 a 3,0 mM, adicionados ao meio de reação da enzima (3.5.4), contendo PEP e ADP. Todos os experimentos foram realizados na presença ou ausência de frutose 1,6-bifosfato 1 mM no meio de reação.

Os efeitos dos metabólitos ATP, alanina e DL-fenilalanina sobre a enzima purificada foram determinados em concentrações de 0,02 a 3,5 mM, adicionados ao meio de reação, conforme descrito no item 3.6.1. A reação era iniciada pela adição de alíquota dos metabólitos ao meio de reação contendo os extratos dos tecidos. Todas as análises foram realizadas na presença ou ausência de frutose 1,6-bifosfato 1 mM.

3.6.3. Efeito da concentração hidrogeniônica sobre a atividade da piruvato quinase tumoral

O efeito do pH sobre a atividade da enzima tumoral foi determinado em meio de reação para piruvato quinase (item 3.5.4) contendo tampão imidazol 50 mM em valores de pH variando de 6,0 a 9,0.

3.6.4. Efeito do Ca^{++} sobre a atividade da enzima purificada

A atividade da piruvato quinase foi determinada em meio de reação contendo concentrações variáveis de CaCl_2 de 0 a 10 mM. Os efeitos do cátion sobre a atividade também foram avaliados em presença de frutose 1,6-bifosfato 1 mM.

3.6.5. Estudo de formas múltiplas da piruvato quinase

Os extratos brutos dos tumores e da glândula mamária, obtidos para o estudo cinético, foram simultaneamente utilizados para a análise eletroforética da piruvato quinase. O estudo das formas múltiplas da enzima foi realizado por eletroforese de zona, utilizando-se tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, contendo

sacarose 500 mM, frutose 1,6-bifosfato 1 mM e β -mercaptoetanol 10 mM, segundo método descrito por SUSOR & RUTTER (1971). Amostras de fígado e músculo de rato, além de piruvato quinase do músculo de coelho (Sigma), foram utilizadas como referência para as enzimas dos tecidos estudados. Alíquotas contendo 1 a 3 U/ml foram aplicadas em fita de acetato de celulose e a eletroforese executada durante 3 horas a 250 V. As fitas foram reveladas após sua colocação sobre placa de vidro contendo uma camada de ionagar 5 mg/ml solidificado, adicionado de imidazol-HCl 50 mM, pH 7,5, $MgCl_2$ 10 mM, KCl 60 mM, EDTA 5 mM, PEP 2 mM, ADP 1 mM, NADH 1mM, FDP 1 mM e LDH 1 U/ml. As fitas foram mantidas sobre esta camada de agar, em estufa (37°C), durante 30 minutos. A visualização das bandas foi feita através da incidência de luz UV sobre as fitas mantidas na placa.

3.7. Purificação parcial da piruvato quinase por cromatografia

3.7.1. Cromatografia em fosfocelulose

A purificação parcial da piruvato quinase do carcinoma ductal infiltrativo foi realizada segundo método descrito por PLAXTON & STOREY (1985).

A resina foi ativada segundo procedimento descrito por VILLELA et al. (1973) e posteriormente equilibrada com tampão imidazol 25 mM, contendo EDTA 3 mM e β -mercaptoetanol 10 mM até obter pH 7,0. A seguir, a resina foi empacotada em coluna (1,5 X 20 cm) e lavada com o mesmo tampão de equilíbrio, em volume mínimo correspondente a 5 volumes daquele ocupado pela resina. Após a lavagem e equilíbrio da fosfocelulose (tampão imidazol 25 mM, pH 7,2 NaF 50 mM, EDTA 3 mM e β -mercaptoetanol 10 mM), a enzima foi aplicada em concentração determinada previamente e o fluxo mantido em 15 ml/hora. A cromatografia foi realizada em câmara refrigerada (4°C) utilizando-se sistema coletor de frações (Pharmacia). Nas frações coletadas foram determinadas as absorbâncias para proteína a 280 nm e a atividade da piruvato

quinase nas frações de alta absorbância. Em etapa posterior, quando a A_{280} das frações coletadas era de aproximadamente zero, a enzima foi eluída com ADP 2,5 mM, em tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5 e β -mercaptoetanol 10 mM. As frações foram reunidas e concentradas, através de sistema de filtração Centriprep-10 (Amicon) e conservadas, sob refrigeração, no mesmo tampão de eluição contendo 20% de glicerol.

Os parâmetros cinéticos determinados na enzima purificada foram descritos para os extratos teciduais (itens 3.6.1 a 3.6.5).

3.8. Análise estatística

Utilizou-se os testes para análise multivariada ANOVA com diferenças analisadas por Tukey-Kramer para comparação entre os grupos de tratamento (tumor, glândula mamária e áreas tumorais), de acordo com o Programa GraphPad InStat tm V2.05. O nível de significância foi fixado em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Histórico das pacientes

Os dados referentes às pacientes e às características histopatológicas dos respectivos tumores constam na Tabela 1. As classificações histopatológicas foram baseadas no sistema TNM, de acordo com o tamanho do tumor (T), número de linfonodos comprometidos (N) e metástases à distância (M). Não foram observadas relações entre os tamanhos dos tumores ou linfonodos comprometidos e a idade das pacientes.

Os dados apresentados correspondem a uma amostragem média de todos os casos estudados, que foi de 25 pacientes.

Nas Figuras 1 e 1a estão apresentadas as características macroscópicas e histopatológicas dos carcinomas ductais infiltrativos. Na Figura 1a observam-se as características morfológicas de carcinoma com grau bem diferenciado.

4.2. Consumo de glicose e produção de lactato

Os resultados relacionados ao consumo de glicose e aos efeitos da insulina sobre esta estão apresentados na Tabela 2. Os resultados mostram a comparação do consumo de glicose e a produção de lactato entre tumores e glândula mamária normal, além do efeito da insulina sobre a captação de glicose nos respectivos tecidos. Os resultados também foram comparados entre os próprios tumores, de acordo com as áreas do centro e periferia.

Nos carcinomas, as taxas de consumo de glicose e produção de lactato mostraram-se, respectivamente, cerca de 2 e 5 vezes mais elevadas em comparação à glândula mamária. Houve diferença significativa entre o consumo de glicose dos tumores e a mama, sendo esta cerca de 85 a 100% maior no centro do que na periferia. A produção de lactato nos carcinomas correspondeu de 90 a 100% da glicose consumida, enquanto que no tecido mamário esta produção foi cerca de 30%.

Não houve diferença na captação de glicose nos carcinomas, por efeito da insulina, enquanto que esta aumentou de 3,5 vezes o consumo na glândula mamária. A produção de lactato nos tumores não foi alterada pelo efeito do hormônio, mas este acarretou aumento na produção do metabólito na glândula mamária.

TABELA 1. Dados das pacientes e características histopatológicas dos carcinomas

PACIENTE	IDADE	TIPO tumor	GRAU Histológico	LINFONODO Comprometido	NÍVEL dos LN	TAMANHO Tumor (cm)
Benigno	17	FAJ	-----	-----	-----	4,0
P34	34	CDI	I	2 em 15	II (2)	7,0
P40	40	CDI	I	9 em 17	I(6);II(5);III(6)	7,0x5,0x4,0
P57-I	57	CDI	I	3 em 20	II (1); III (2)	3,5x3,0x1,5
P58	58	CDI	I	7 em 29	I (4); II (3)	3,0
P52	52	CDI	II	2 em 20	I (2)	4,0 x 3,5
P60	60	CDI	II	6 em 18		2,5
P68	68	CDI	II	2 em 19		2,5x5x1,0
P39	39	CDI	III	0 (12)		9,0 x 7,0
P47	47	CDI	III	0 (10 livres)		8,0 x 3,0
P49	49	CDI	III	06	I (3), II(2), III(1)	1,5x1,0x0,5
P57-III	57	CDI	III	11 em 15	I(8), II(3), III(4)	2,3 x 2,0
P59	59	CDI	III			3,0x2,0x1,5
P63	63	CDI	III	0 em 25		2,0

Todas as pacientes (P) foram biopsiadas antes de radioterapia ou quimioterapia.

CDI corresponde a carcinoma ductal infiltrativo. FAJ corresponde a fibroadenoma juvenil.

Os valores indicados como linfonodos (LN) comprometidos correspondem ao número de linfonodos contendo metástases no total removido, respectivamente. Os números relativos ao nível dos linfonodos comprometidos, distribuídos nos níveis I, II e III, referem-se à distribuição anatômica dos linfonodos. Os valores únicos referentes ao tamanho tumoral correspondem ao maior diâmetro do tumor.

P57-I e P57-III correspondem a pacientes com mesma idade, com CDI de graus histológicos I e III, respectivamente.

TABELA 2. Efeito da insulina sobre a utilização de glicose e produção de lactato em fatias de carcinomas ductais infiltrativos e da glândula mamária

	UTILIZAÇÃO		PRODUÇÃO	
	Glicose		Lactato	
Glândula mamária Sem Insulina	$- 3,0 \pm 1,2$		$2,50 \pm 0,40$	
Glândula mamária Com Insulina	$- 8,0 \pm 1,0^*$		$4,10 \pm 0,18^*$	
Tumor sem Insulina	C	$-5,3 \pm 1,0^{**}$	C	$12,5 \pm 1,6^{**}$
	P	$-2,5 \pm 0,7$	P	$4,5 \pm 1,0$
Tumor com Insulina	C	$- 4,7 \pm 1,0$	C	$12,7 \pm 1,0$
	P	$- 2,6 \pm 0,5$	P	$5,3 \pm 1,0$

Resultados expressos como média $\pm$ erro padrão médio ($\mu\text{mol/h}$ por g de tecido fresco). Os tecidos (50 mg) foram incubados com glicose na concentração de 5,6 mM, adicionados de insulina nas concentrações de 100 $\mu\text{U/ml}$ e 1000 $\mu\text{U/ml}$. **C** e **P** correspondem a áreas centrais (calcificadas) e periféricas (não calcificadas) do tumor maligno, sendo n o número de incubações de cada tecido em duplicata ($n=12$ tumores) e ($n=3$ glândulas mamárias). O sinal negativo indica o consumo de glicose do meio de incubação. * $p < 0,05$ para consumo de glicose e produção de lactato na glândula mamária, e ** para comparação entre áreas tumorais através de análise por ANOVA pelo teste de Tukey.

4.3. Atividade das enzimas glicolíticas

A atividade das enzimas glicolíticas nas áreas do centro e periferia dos carcinomas está apresentada nas Tabelas 3 e 4 e, de acordo com os graus histológicos, nas Figuras 4, 5 e 6, respectivamente (item 3.5.2 Material e Métodos). Na Tabela 3 constam as comparações entre as atividades nos carcinomas e glândula mamária, ou entre as áreas dos próprios tumores.

De acordo com a área tumoral analisada, as atividades enzimáticas foram mais elevadas no centro que na periferia e, quando comparadas à mama, as atividades de ambas as áreas foram ainda maiores.

TABELA. 3. Atividade das enzimas das vias glicolítica e α -GDH em carcinomas e glândula mamária normal

ENZIMAS	GLÂNDULA MAMÁRIA	CARCINOMAS
<u>HK</u>	0,014 $\pm$ 0,0035	0,070 $\pm$ 0,013 (n=7)
<u>PGI</u>	0,57 $\pm$ 0,065	2,83 $\pm$ 0,60 (n=7) *
<u>PFK-1</u>	0,010 $\pm$ 0,002	0,09 $\pm$ 0,03 (n=5)
<u>Aldolase</u>	0,11 $\pm$ 0,002	0,170 $\pm$ 0,03 (n=4)
<u>GAPDH</u>	0,10 $\pm$ 0,015	0,95 $\pm$ 0,10 (n=4) *
<u>PGK</u>	0,08 $\pm$ 0,002	1,50 $\pm$ 0,20 (n=4) *
<u>PK</u>	0,38 $\pm$ 0,11	2,70 $\pm$ 0,12 (n=6)
<u>LDH</u>	0,53 $\pm$ 0,13	3,1 $\pm$ 0,88 (n=6) *
<u>α-GDH</u>	0,079 $\pm$ 0,012	0,033 $\pm$ 0,006 (n=7)

Os resultados de cada um dos tecidos estão expressos como atividade específica (**U/mg de proteína**) a 30°C, em termos de média e erro-padrão da média. O significado estatístico da comparação entre os grupos, pelo ANOVA e teste de Tukey, é indicado como * para $p < 0,05$. O número (n) de tecidos mamários normais analisados foi de 3. Todos os tumores correspondem a carcinomas ductais infiltrativos em diversos estágios de diferenciação. Os símbolos utilizados para as enzimas estão descritos em Materiais e Métodos (seção 3, item 3.5.2).

FIGURA 1. Características macroscópicas do carcinoma ductal infiltrativo, com margens amareladas e superfície brancacenta com evidente fibrose nas áreas do centro.

FIGURA 1A. Corte histológico de carcinoma ductal infiltrativo grau I. Observar ninhos características de células neoplásicas em meio a grande quantidade de tecido fibroso nas áreas centrais. Coloração HE. Aumento 500X.

FIGURA 2A Corte histológico da região central do carcinoma ductal infiltrativo grau III. Observar grande número de células neoplásicas em meio a tecido conjuntivo contendo grande quantidade de fibrose. Nota-se ausência de formação tubular/glandular, com escassez de infiltrado linfóide. Coloração HE. Aumento 125X.

FIGURA 2B. Corte histológico da região periférica de carcinoma ductal infiltrativo grau III. Observa-se grande número de células neoplásicas em meio a matriz de tecido conjuntivo, com raras formações tubulares/glandulares. Coloração HE. Aumento 125X.

FIGURA 3A Corte histológico da área central de carcinoma ductal infiltrativo grau III. Observar numerosos agrupamentos sólidos de células neoplásicas e raros agrupamentos que formam estruturas tubular/glandular. Infiltração linfóide moderada. Coloração HE. Aumento 125X.

FIGURA 3B Corte histológico da área periférica de carcinoma ductal infiltrativo grau III. Observar massas sólidas de células neoplásicas em meio a tecido fibroso. Coloração HE. Aumento 125X.

TABELA 4. Atividades das enzimas glicolíticas em diferentes áreas dos carcinomas ductais infiltrativos

ENZIMAS	ÁREA NÃO CALCIFICADA	ÁREA CALCIFICADA
<u>HK</u>	0,075 ± 0,006 (n=4)	0,10 ± 0,008 (n=5)
<u>PGI</u>	2,29 ± 0,27 (n=5)	3,35 ± 0,60 (n=6)
<u>PFK-1</u>	0,10 ± 0,034 (n=4)	0,16 ± 0,03 (n=6)
<u>Aldolase</u>	0,21 ± 0,06 (n=4)	0,17 ± 0,012 (n=4)
<u>PGK</u>	1,54 ± 0,28 (n=3)	2,9 ± 0,7 (n=4)
<u>PK</u>	0,59 ± 0,12 (n=4)	3,5 ± 1,0 (n=6) *
<u>LDH</u>	2,0 ± 0,75 (n=4)	3,2 ± 0,53 (n=6)

Os resultados da atividade das enzimas estão expressos como **U/mg proteína**. Os tecidos foram denominados *calcificado* e *não calcificado* de acordo com a compactação das áreas tumorais. O centro do carcinoma foi caracterizado como compacto (calcificado) e a periferia não compacta (não calcificado). Todos os tecidos tumorais foram classificados como carcinomas ductais infiltrativos de grau moderadamente diferenciado (II e IIa). *n* representa o número de amostras determinadas em duplicata.

FIGURA 4: Atividade das enzimas glicolíticas em carcinomas ductais infiltrativos e na glândula mamária (U/mg proteína). Os carcinomas apresentados correspondem a graus moderadamente diferenciados (grau II), com áreas calcificadas (compactas) e não calcificadas (não compactas). Os resultados estão expressos como médias de 4 determinações em cada tecido, referidos na Tabela 1.

FIGURA 5. Atividade das enzimas glicolíticas em carcinomas ductais infiltrativos de vários graus de diferenciação nas áreas tumorais não calcificadas. Os valores estão expressos como atividade específica (U/mg de proteína), correspondentes às médias de 4 determinações. Os tumores denominados de intermediários correspondem a carcinomas com graus de diferenciação intermediários (grau II) entre tumores moderadamente diferenciados (grau IIa) e diferenciados (grau I).

FIGURA 6. Atividade das enzimas glicolíticas em carcinomas ductais infiltrativos de diferentes graus de diferenciação nas *áreas calcificadas* (centro do tumor). Os resultados estão expressos como atividade específica (U/mg) das médias de 4 determinações. Tumores diferenciados (grau I), intermediários (grau II) e moderadamente diferenciados (grau IIa).

FIGURA 7: Atividade da glutaminase dependente de fosfato em carcinomas ductais infiltrativos em vários estágios de diferenciação e glândula mamária. Os resultados médios mostram comparações entre diferentes áreas tumorais e estão expressos como nmol/min/mg de proteína. Tumores mais diferenciados (grau I), Intermediário (grau II), Moderado (grau IIa), Pouco diferenciado (grau III)

A Tabela 5 mostra a atividade das enzimas glicolíticas de carcinomas ductais infiltrativos em comparação às células MCF-7. As atividades enzimáticas foram significativamente maiores nas células tumorais que nos carcinomas mamários. Na Figura 8 observam-se as características morfológicas da linhagem MCF-7 em cultura, caracterizada por formação de monocamada na confluência.

FIGURAS 8 e 9. Monocamada da linhagem MCF-7 cultivada em meio DMEM pH 7,4, com 10% de soro fetal bovino. As células apresentam granulações citoplasmáticas características. Microscopia de luz invertida, com uso de diferentes filtros, aumento de 500X.

TABELA 5. Comparação entre atividade de enzimas glicolíticas em carcinomas ductais infiltrativos e células MCF-7.

ENZIMAS	CARCINOMA	MCF-7
<u>HK</u>	0,070 ± 0,013	0,29 ± 0,05 *
<u>PGI</u>	2,83 ± 0,60	11,3 ± 0,37 *
<u>PFK-1</u>	0,08 ± 0,03	0,29 ± 0,05 *
<u>Aldolase</u>	0,17 ± 0,03	0,25 ± 0,03 *
<u>GAPDH</u>	1,05 ± 0,10	3,20 ± 0,5 *
<u>PGK</u>	1,50 ± 0,20	1,70 ± 0,45
<u>PK</u>	2,70 ± 0,12	4,90 ± 0,53 *
<u>LDH</u>	3,1 ± 0,88	7,24 ± 1,0 *

Os resultados estão expressos como U/mg de proteína, em valores da média ± erro padrão da média, sendo $n=5$ o número de amostras de pool de ambas as áreas dos carcinomas e $n=3$ número de amostras de células MCF-7 analisadas. Os tumores correspondem a carcinomas ductais infiltrativos em diversos graus de diferenciação. O índice de significância é indicado como * para $p < 0,05$.

4.4. Atividade da glutaminase dependente de fosfato

A Tabela 6 apresenta os valores da atividade da glutaminase nos carcinomas e mama normal (3.5.5 Material e Métodos). As atividades nos tecidos tumorais também foram analisados em áreas calcificadas e não calcificadas e os resultados comparados ao tecido normal. As atividades enzimáticas estão expressas como $\mu\text{mol/min}$ por g de tecido e nmol/min por mg de proteína e foram significativamente maiores nas áreas calcificadas. Nas

áreas não calcificadas a atividade enzimática foi significativamente maior que na glândula mamária quando comparada à atividade específica da enzima (nmol/min por mg de proteína).

TABELA 6. Atividade da glutaminase em carcinomas e glândula mamária

TECIDO	ATIVIDADE	
	<i>μmol/min por g tecido</i>	<i>nmol/min por mg de proteína</i>
<u>Glândula mamária</u>	2,62 ± 0,40 (n=2)	220 ± 18,3 (n=2)
<u>Tumor calcificado</u>	3,40 ± 0,12 (n=8)	593 ± 56,3 (n=8) *
<u>Tumor não calcificado</u>	2,55 ± 0,32 (n=8)	407,5 ± 35,6 (n=7) **

Resultados expressos como média ± erro padrão da média, sendo *n* o número de tecidos analisados. Todos os tumores correspondem a carcinomas ductais infiltrativos em diferentes graus de diferenciação. A enzima foi determinada a 37°C, segundo descrição em Material e Métodos. A diferença estatística (*p*<0,05) está indicada como * para a comparação entre glândula mamária e área tumoral calcificada (centro) e ** para comparação entre as áreas de calcificação dos tumores.

4.4.1. Atividades da citrato sintetase e glicose-6- fosfato desidrogenase

Na tabela 7 estão expressos os resultados da citrato sintetase e da glicose-6-fosfato desidrogenase (3.5.7 e 3.5.8 Material e Métodos). Os

resultados estão comparados com a glândula mamária e expressos como valores médios $\pm$ erro padrão médio de vários carcinomas ductais infiltrativos. Os resultados também estão comparados entre as áreas do centro e periferia do tumor e de acordo com o grau de diferenciação.

TABELA 7. Atividade da citrato sintetase e glicose-6-fosfato desidrogenase.

	Glicose-6-P-DH	Citrato sintetase
Glândula mamária	50,5 $\pm$ 9,4	53 $\pm$ 10,3
CDI diferenciado	C 58,3 $\pm$ 6,8 P 65,8 $\pm$ 9,0	C 160 $\pm$ 19,2* P 152 $\pm$ 11,0
CDI moderadamente Diferenciado	C 67 $\pm$ 9,5 P 75 $\pm$ 7,0	C 76,2 $\pm$ 11,0 P 68,5 $\pm$ 10,0

Resultados expressos em *nmol/min por mg* de proteína. CDI corresponde a carcinoma ductal infiltrativo. **C** e **P** correspondem a áreas do centro e periferia dos carcinomas. * $p < 0,05$ para comparação entre glândula mamária ($n=4$) e carcinomas ($n=8$). CDI diferenciado (grau I), CDI moderadamente diferenciado (grau II).

4.5. Parâmetros cinéticos da piruvato quinase em extratos de carcinomas ductais infiltrativos e tecido mamário

As constantes de afinidade para fosfoenolpiruvato (PEP) e ADP (3.6.1 Material e Métodos) foram determinadas em extratos de carcinomas ductais infiltrativos e glândula mamária em concentrações variáveis dos substratos (0,1 a 3 mM). As constantes de Michaelis-Menten (K_m) foram determinadas de acordo com o sistema de Lineweaver-Burk (Figura 10).

A curva de saturação para PEP mostrou correlação hiperbólica, ou cinética Michaeliana, tanto nos tumores quanto na glândula mamária. O plote de Lineweaver-Burk mostrou valores médios de K_m para PEP de $0,23 \pm 0,07$ mM ($n=4$) nos carcinomas ductais infiltrativos e $1,2 \pm 0,21$ mM para a mama normal ($n=3$).

O efeito dos metabólitos ATP e alanina, apresentados nas Figuras 11 e 12, foi determinado em tumores de distintos graus de diferenciação. Nos tumores diferenciados observou-se porcentagem de inibição enzimática menor que aquela observada nos tumores de grau de diferenciação moderada. Esta inibição foi maior pela alanina que pelo ATP.

Os resultados apresentados na Figura 13 mostram a atividade da piruvato quinase de extratos de carcinomas moderadamente diferenciado e diferenciado, em tampão fosfato, com diferentes pH entre 6,0 e 8,0. A perda da atividade, na faixa de pH 6,0, foi de aproximadamente 22% nos tumores moderadamente diferenciados e de 30% nos tumores diferenciados. O pH ótimo da piruvato quinase de ambos os tumores foi próximo ao pH fisiológico, 7,4.

FIGURA 10. Plotes de Lineweaver-Burk ($1/V$ vs $1/S$) para PEP em extratos brutos de carcinomas ($n=4$) e glândulas mamárias ($n=3$). A enzima foi determinada com concentrações de 0 a 3 mM de substrato a 30°C , de acordo com o método de Büchner & Pfeleiderer, descrito em Material e Métodos.

FIGURA 11. Efeito do ATP sobre a atividade da piruvato quinase de extratos brutos de carcinomas ductais infiltrativos de diferentes graus de diferenciação. O ATP foi adicionado ao meio de reação contendo PEP 1 mM e a atividade da enzima foi determinada conforme método descrito em Material e Métodos.

FIGURA 12. Atividade da piruvato quinase de extratos brutos de carcinomas ductais infiltrativos de diferentes graus de diferenciação na presença de alanina. O metabólito foi adicionado ao meio de reação contendo PEP 1 mM. A atividade da enzima foi determinada segundo o método descrito em Material e Métodos.

FIGURA 13. Atividade da piruvato quinase de extratos tumorais de carcinomas ductais infiltrativos em diferentes concentrações hidrogeniônicas. A atividade da enzima foi determinada de acordo com o método descrito em Material e Métodos.

4.6. Perfil eletroforético de piruvato quinase em acetato de celulose

A Figura 14 mostra o padrão de mobilidade da piruvato quinase de extratos de carcinomas ductais infiltrativos, de diferenciação moderada, em comparação à glândula mamária e outros tumores, maligno (melanoma), ou benigno (fibroadenoma juvenil), utilizando-se como padrões de referência fígado de rato e músculo de coelho. Os padrões de fígado de rato e músculo de coelho apresentaram migração em direção ao polo positivo, onde a enzima hepática caracteriza-se pela presença de duas bandas (isoenzimas K e L)₁ e o músculo apenas por uma isoforma (M1). Todos os carcinomas mamários e o melanoma tiveram mobilidade diferente daquela observada no fígado, do tumor benigno (fibroadenoma juvenil) e da glândula mamária. A migração ocorreu em direção ao polo negativo, enquanto que o tumor benigno apresentou migração oposta à dos tumores malignos e a glândula mamária não mostrou mobilidade em direção a qualquer um dos polos.

FIGURA 14. Perfil eletroforético da piruvato quinase em acetato de celulose. A enzima foi aplicada na concentração de 0,3 U/ml e revelada conforme descrito

em Material e Métodos. As bandas da piruvato quinase dos carcinomas ductais infiltrativos, melanoma e células MCF-7 estão indicadas em direção ao polo negativo, enquanto que o fibroadenoma, músculo e fígado de rato apresentaram mobilidade em direção ao polo positivo. 1=mama, 2=fibroadenoma, 3=fígado, 4=músculo, 5=melanoma, 6=CDI, 7=MCF-7.

4.7. Purificação da piruvato quinase do carcinoma ductal infiltrativo

Os resultados da purificação parcial da piruvato quinase por cromatografia de troca iônica em fosfocelulose estão resumidos na Tabela 8 (Ítem 3.7.1 Material e Métodos). A atividade específica da enzima no eluato foi de 98 U/mg, com rendimento de 48%. As etapas de lavagem e eluição (A) da enzima estão representados na Figura 15.

Na etapa inicial da purificação da piruvato quinase, modificou-se a metodologia por excluir-se a fase de precipitação da enzima por sulfato de amônio. A alteração dessa etapa preliminar da cromatografia da piruvato quinase dos carcinomas ductais infiltrativos resultou da precipitação da enzima apenas com concentrações elevadas de sulfato de amônio, correspondente a cerca de 90% de saturação. Posteriormente, devido à perda substancial na atividade enzimática (50 a 60 % em relação à atividade inicial), na diálise da amostra, eliminou-se esta etapa (precipitação) durante o procedimento da purificação. Os resultados referem-se à aplicação do extrato tecidual diretamente na resina, seguida das etapas posteriores, conforme descrito em Material e Métodos (ítem 3.7).

TABELA 8. Etapas de purificação da piruvato quinase de carcinoma

Fração	Atividade e Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação (X)
Extr. Bruto	102	18,2	5,5	100	-----
P.celulose	49	0,5	98	48	18

Resultados correspondentes às etapas de purificação da piruvato quinase de carcinoma ductal infiltrativo P₄₀ ($n=1$). Os tecidos foram extraídos na proporção de 1/5 em tampão Imidazol 50 mM. As determinações da atividade da enzima e concentração de proteína foram realizadas através dos métodos de Büchner & Pfeleiderer (1955) e Lowry (1951), respectivamente.

FIGURA 15. Cromatografia da piruvato quinase tumoral em fosfocelulose: eluição com ADP. A resina foi empacotada em coluna de 1,5x20 cm e equilibrada com tampão imidazol 0,02 M pH, 7,0, conforme descrito em Material e Métodos, e operada a um fluxo de 2ml/min. Após a adição de ADP 5 mM (ponto A) foram coletados 2 ml/ tubo.

4.8. Constantes de afinidade para PEP e ADP e efeito de moduladores sobre a atividade da piruvato quinase purificada

As curvas de saturação (PEP e ADP) e os valores de K_m da piruvato quinase tumoral purificada parcialmente estão apresentados nas Figuras 16, 16a e 17. A enzima apresentou cinética michaeliana com valores de K_m de 0,23 mM para PEP e 0,28 mM para ADP, aproximados aos valores obtidos nos extratos brutos dos tumores (Figura 10). Os efeitos dos metabólitos ATP, alanina e fenilalanina estão apresentados na figura 18. A inibição pelo cátion Ca^{+2} está demonstrada na figura 19. A inibição foi de aproximadamente 50% na presença de 1,5 mM de $CaCl_2$, e de 93% na concentração de 10 mM de $CaCl_2$. A adição de frutose 1,6-bifosfato 1 mM não reverteu a inibição da enzima.

FIGURA 16. Efeito da concentração de PEP sobre a atividade da piruvato quinase purificada de carcinoma ductal infiltrativo. O meio de reação continha ADP 1 mM, PEP nas concentrações de 0,02 a 3 mM, $MgCl_2$ 7 mM, KCl 50 mM, NADH 0,13 mM, LDH 3 UI/ml, EDTA 10 mM em tampão imidazol 50 mM, pH 7,4. A atividade da enzima foi determinada de acordo com o método de Büchner & Pfeleiderer, a 30°C.

FIGURA 16a. Linha de tendência da curva de saturação da piruvato quinase por fosfoenolpiruvato (Figura 16).

FIGURA 17. Efeito da concentração de ADP sobre a atividade da piruvato quinase purificada de carcinoma ductal infiltrativo. O meio de reação (1 ml) continha PEP 1,5 mM, MgCl_2 7 mM, KCl 7 mM, KCl 50 mM, NADH 0,13 mM, LDH 3UI/ml, EDTA 1,0 mM e ADP nas concentrações de 0,02 a 3 mM em tampão imidazol-HCl 50 mM, pH 7,4 e temperatura de 30°C.

FIGURA 18. Efeito dos metabólitos L-alanina , L-fenilalanina e MgATP na atividade da piruvato quinase purificada de carcinoma ductal infiltrativo. O meio de reação foi o mesmo utilizado nas medidas da atividade da enzima (Material e Métodos) adicionado dos metabólitos em concentrações de 0,1 a 3 mM. Todas as análises foram realizadas na presença de FDP 1 mM.

4.9. Atividade da piruvato quinase purificada em função do pH

A atividade da enzima purificada, na presença de diferentes concentrações hidrogeniônicas estão representadas na Figura 20. O pH ótimo foi próximo ao pH 7.4, conforme já descrito nos extratos brutos de tumores diferenciado e moderadamente diferenciados (Figura. 13), embora em pH básico como 8,0 e 9,0, ou ácido, 6,0 e 6,5, as atividades corresponderam a cerca de 55% e 54% da atividade máxima, respectivamente.

4.10. Efeito de moduladores sobre a atividade da piruvato quinase

O efeito dos moduladores negativos estão representados na Figura 18 (item 3.6.2 Material e Métodos). Os efeitos da frutose 1,6-bifosfato (FDP), modulador alostérico positivo, foram avaliados em relação à ativação da enzima, ou à reversão dos efeitos de inibidores sobre a enzima: ATP, fenilalanina, alanina e cálcio.

A alanina inibiu a atividade da piruvato quinase purificada em cerca de 55%, nas concentrações de 2,0 a 4,0 mM. Em estudo no extrato bruto dos tumores, observou-se inibição máxima de aproximadamente 45% nos tumores de diferenciação moderada (grau II) e 30% em tumores diferenciados (grau I). Assim, na enzima purificada, a inibição por alanina foi maior do que nos extratos brutos. O grau histológico do carcinoma correspondente à enzima purificada era diferenciado (P₄₀).

Em relação aos efeitos da fenilalanina, a inibição foi mais significativa que aquela obtida pela alanina, nas mesmas concentrações (2,5 a 3,0 mM), sendo a inibição máxima de 84%. O Mg.ATP e cálcio mostraram inibição máxima em 40% e 93%, nas concentrações máximas de 3,0 e 10,0 mM, respectivamente (Figuras 18 e 19).

Quando avaliados os efeitos da frutose 1,6-bifosfato (FDP), observou-se aumento de 36% na atividade da enzima. Em presença dos inibidores ATP, alanina e fenilalanina, verificou-se que a FDP revertia total ou parcialmente a inibição, sendo 100% para fenilalanina, 87% para alanina e cerca de 56% para ATP, nas concentrações máximas testadas (4 mM). Em relação ao cálcio, a FDP reverteu apenas 3% da inibição, quando a concentração do metabólito era máxima (10 mM). Em concentrações sub-saturantes de cálcio, a FDP reverteu apenas parcialmente a inibição. Nas concentrações de 0,1 a 0,5 mM de CaCl₂, verificou-se recuperação máxima da atividade enzimática em cerca de 15%, resultados que são significativamente menores que aqueles obtidos para alanina e fenilalanina.

FIGURA 19. Efeito do cátion Ca^{++} sobre a atividade da piruvato quinase purificada de carcinoma mamário. A atividade enzimática foi determinada em meio de reação (1 ml) contendo ADP 1 mM, PEP 1,5 mM, MgCl_2 7 mM, KCl 50 mM, NADH 0,13 mM e LDH 3ui/ ML, EDTA 0,01 mM, com cálcio de nas concentrações de 0 a 10 mM e FDP 1 mM, em tampão imidazol, a 30°C.

FIGURA 20. Atividade da piruvato quinase purificada em função do pH. O meio de reação (1 ml) continha ADP 1 mM, PEP 1,5 mM, MgCl_2 7 mM, KCl 50 mM, NADH 0,13 mM, LDH 3 UI/ml, EDTA 0,01 mM em tampão imidazol-HCl 50 mM, com pH variando de 6,0 a 9,5, na temperatura de 30°C.

5. DISCUSSÃO

Tanto sob os aspectos clínico quanto epidemiológico, o câncer pode ser considerado a doença de maior importância deste século, ainda que comparada à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) ou a outras patologias de alta mortalidade, como as doenças cardíacas e infecciosas (hepatite, tuberculose). A complexidade das inter-relações químicas de células neoplásicas malignas podem ser evidenciadas pela permanência dos postulados pioneiros descritos por WARBURG, desde meados da década de 20. Contudo, nas últimas décadas, verifica-se que a evolução no conhecimento do metabolismo e biologia molecular de tumores tem fundamentado bases para o desenvolvimento de drogas anti-neoplásicas, como inibidores da utilização de glutamina, 6-diazo-5-oxo-1-norleucina (DON), ou asparaginase no tratamento das leucemias, ou tamoxifeno no tratamento de câncer de mama, entre outros (LAVIETES et al., 1974; LYONS et al., 1990, GRIFFITHS, 1993), e contribuído para aumentar o intervalo livre de doença, ou o intervalo de sobrevida de pacientes cancerosos.

No presente estudo, foram analisadas enzimas do metabolismo de glicose e glutamina em cânceres de mama humana, sem a abordagem de fatores angiogênicos, genéticos ou da resposta imunológica das pacientes. Os resultados foram comparados ao tecido mamário normal, entre os próprios carcinomas e entre as diferentes áreas intratumorais. Estes dados foram também associados aos fatores prognósticos do câncer de mama, como o tamanho do tumor, grau histológico e linfonodos comprometidos, com o objetivo de relacionar a importância dos resultados com a evolução clínica das pacientes.

O grupo estudado compreendeu mulheres na faixa etária de 34 a 68 anos, sendo que 75% estavam na fase da menopausa e 25% na menacme (Tabela 1). Exceto no caso de dois tumores, utilizados nas análises preliminares, sendo um deles de paciente submetida à quimioterapia e outro à radioterapia, foram excluídos do estudo todas as pacientes submetidas a qualquer tratamento prévio, uma vez que estas terapias comprometem os resultados histológicos e,

conseqüentemente, as análises enzimáticas. Em experimentos preliminares de cultura primária de carcinomas cujas pacientes foram submetidas à quimioterapia, observou-se que as células não atingiam a fase S durante a proliferação *in vitro*, dado que evidencia a efetividade desse tratamento na inibição da proliferação das células neoplásicas e, possivelmente, sobre a atividade metabólica. NEEMAN et al. (1990) estudaram os efeitos induzidos pela quimioterapia sobre o metabolismo energético de células neoplásicas de mama e observaram que as drogas utilizadas causavam inibição do ciclo de Krebs devido à falta de utilização de energia. Em conseqüência, ocorria morte celular dependente do tempo e da concentração das drogas. Com base nos dados das culturas *in vitro*, ou naqueles descritos na literatura, os tumores tratados não foram utilizados em qualquer análise.

Os parâmetros adotados para as análises bioquímicas basearam-se fundamentalmente nas características macroscópicas dos carcinomas. Embora estes representem tumores malignos de características muito sólidas, observa-se grande heterogeneidade entre suas áreas, com tecidos muito compactos ou sólidos, usualmente nas áreas centrais, e áreas periféricas não compactas, com características semelhantes ao tecido mamário normal. Desse modo, os resultados foram expressos de acordo com a área tumoral analisada.

Um aspecto clínico importante a ser ressaltado, em relação às características sólidas de certos tumores malignos, refere-se à baixa vascularização e hipóxia, decorrentes dessa, como um dos principais fatores que induzem resistência à terapia, seja por agentes quimioterápicos, seja por radioterápicos (OVERGAARD, 1989; VAUPEL, 1991; DURAND, 1991), tornando-os tumores de mau prognóstico (SCHELLENS et al., 1996). Desse modo, tumores sólidos apresentam natureza heterogênea, que pode ser evidenciada pela evolução clínica distinta entre pacientes.

O consumo de glicose pelos carcinomas (Tabela 2) mostrou-se variável de acordo com a área intratumoral analisada. No centro do tumor o consumo mostrou-se 2 vezes maior que na sua periferia e, aproximadamente a mesma

diferença, quando comparados o consumo entre tumor e glândula mamária. Esta maior atividade glicolítica do carcinoma, em relação à mama, está de acordo com relatos em outras neoplasias, indicando que nos carcinomas mamários a glicose deve representar um substrato essencial para a progressão do tumor. Em estudo similar, KOVACEVIC' (1972) avaliou o papel do metabolismo de aminoácidos, principalmente glutamina, frente ao da glicose, incubando células do tumor de Ehrlich (tumor mamário de camundongos) com concentrações fisiológicas de ambos os substratos. Este autor observou que tanto o consumo quanto a oxidação da glutamina eram significativamente menores que o da glicose, o que indica seletividade do tumor pelo último substrato. GREINER et al. (1994) também observaram que a progressão das células, durante as fases G₁ para S do ciclo celular, depende essencialmente da glicose como substrato, de modo que a glutamina, nem mesmo associada a ribose ou uridina induzem, isoladamente, a proliferação em células normais de divisão rápida. Segundo os autores, esses processos mostram-se mais acentuados nas células neoplásicas.

Embora alguns estudos também relatem valores, de até 18 vezes maiores, na utilização de glicose em células normais de proliferação rápida, como timócitos ativados com mitógenos (GREINER, 1994), ou ainda durante estágios pré-neoplásicos (BANNASCH et al., 1997), o consumo elevado de glicose é uma característica das neoplasias malignas, em maior ou menor proporção. As diferenças observadas entre estas diversas neoplasias parecem associar-se com as características do tumor, como sua origem, o grau histológico e o potencial metastático.

Na análise do consumo de glicose entre os carcinomas, considerando-se suas características histológicas, não houve relação entre o grau de diferenciação e a captação do metabólito. Esses resultados devem-se possivelmente ao fato de que a maioria das determinações foram realizadas em carcinomas moderadamente diferenciados (grau IIa). Contudo, vários estudos mostraram que tumores menos diferenciados e, clinicamente mais agressivos, apresentam consumo aumentado de glicose, quando comparados àqueles de

maior grau de diferenciação, cujas células mostram-se morfológicamente mais próximas do tecido normal.

Não foram observadas diferenças significativas entre o consumo de glicose quando considerado o tamanho tumoral, embora alguns estudos relatem resultados divergentes. KALLINOWSKI et al. (1988) observaram diminuição nas taxas de captação de glicose em carcinomas mamários humanos, transplantados para animais, com o crescimento do tumor. Resultados semelhantes foram descritos por VAUPEL et al. (1989). É possível que os tumores de maior tamanho apresentem maior consumo de metabólitos, uma vez que o tamanho tumoral representa um indicativo da alta taxa proliferativa das células neoplásicas. No entanto, esta hipótese não corresponde aos dados obtidos. Alguns estudos mostram que a taxa de captação de glicose nos tumores malignos é diretamente proporcional à disponibilidade do substrato, sendo esta controlada pelo fluxo sangüíneo no tecido. Desse modo, há uma tendência da taxa de consumo da glicose declinar com o aumento do tumor, devido ao comprometimento dos vasos sangüíneos (Vaupel et al., 1989). Essa informação poderia explicar o mesmo consumo entre tumores de tamanhos distintos, grandes ou pequenos.

EIGENBRODT et al. (1998) também observaram, em carcinomas de tireóide e cérvix humanos, transplantados para animais, diferenças nas taxas de consumo de glicose ou de aminoácidos, glutamina e serina, de acordo com o tamanho. Nesse estudo, os tamanhos tumorais também influenciaram as vias de metabolização dos substratos e o fluxo de oxigênio, de modo que os tumores foram divididos em função do metabolismo e do tamanho em: pequenos, médios e grandes. Enquanto nos tumores pequenos, a conversão de glutamina para lactato era maior do que a de glicose, nos tumores de tamanhos médio e grande, a diminuição do suprimento de oxigênio causava redução no fluxo de glutamina e maior utilização de glicose.

O consumo de glicose pode ter maior importância nos tumores sólidos, uma vez que as células das camadas mais internas tornam-se privadas do metabólito e pode contribuir para a necrose no centro do tumor (SUTHERLAND

et al. 1988). Os resultados obtidos nesse estudo, no entanto, mostraram-se inversos ao trabalho descrito, onde fatias tumorais do centro apresentaram maior captação de glicose que a área periférica. SCHWEIKI et al.(1995) relataram que a privação de glicose nas áreas hipóxicas dos tumores sólidos, que geralmente ocorrem no interior, induz a expressão de vários genes, incluindo aqueles associados à angiogênese tumoral, VEGF, e ao transporte de glicose, GLUT1, que atua como um mecanismo compensatório para a depleção de nutrientes nas células neoplásicas.

Na avaliação do fluxo glicolítico, determinado pela relação entre lactato produzido e glicose consumida, verifica-se que a maior proporção desta foi convertida a lactato. Não se observou relação da produção de lactato com o tamanho tumoral, os linfonodos comprometidos, ou a idade reprodutiva das pacientes (Tabela 2). Quando considerado o grau histológico do tumor, este resultado foi semelhante ao observado no consumo de glicose, uma vez que as determinações resultaram somente de tumores moderadamente diferenciados (grau IIa). Supõe-se, no entanto, que os carcinomas mais diferenciados apresentem menor produção de lactato e maior fluxo de piruvato para o ciclo de Krebs, de acordo com dados obtidos nas análises da citrato sintetase em carcinomas de estágios de maior diferenciação. Inversamente, na glândula mamária, considera-se que a maior proporção da glicose consumida foi oxidada por via aeróbia, com base na relação estequiométrica da glicólise, em que 1 mol de glicose produz 2 mols de lactato. Desse modo, assume-se que cerca de 50% do consumo deste substrato destinou-se à formação de acetil-CoA para o ciclo de Krebs (Tabela 2). Por outro lado, tomando-se por base a produção de lactato, dos carcinomas mamários, estima-se que a maior parte da glicose consumida (cerca de 95%) foi metabolizada por via anaeróbia, o que condiz com a baixa atividade da citrato sintetase no ciclo de Krebs (Tabela 7) e às características sólidas dos carcinomas. Os resultados obtidos corroboram com dados observados em outros tipos de tumores malignos (WARBURG, 1956; FEARON,

1985). Cabe ressaltar, contudo, que estes dados referem-se apenas aos carcinomas de graus moderadamente diferenciados (grau II e IIa).

VAUPEL et al. (1989) também mostraram que dependendo da linhagem tumoral, 40 a 85% da glicose captada pelas células são metabolizados para lactato. Alguns estudos mostram que essa produção chega a 90% da glicose consumida (BAGGETTO, 1997). Embora a glicólise aeróbia seja típica dos tumores malignos (WARBURG, 1956), as características sólidas dos carcinomas ductais infiltrativos sugerem que a metabolização de glicose ocorra por via anaeróbia, devido às condições de baixa vascularização e oxigenação desse tipo de tumor. Em muitos tumores humanos observa-se hipóxia profunda, o que parece contribuir para as alterações metabólicas observadas. Segundo alguns relatos, a distância de 100 a 200 μm da área de vascularização resulta em ambiente hipóxico, de modo que nos tumores de grande tamanho observam-se ambientes mais ácidos, resultantes da produção elevada de lactato pela glicólise e redução do metabolismo oxidativo.

Há várias evidências de que o fenótipo angiogênico representa um componente essencial para a progressão tumoral e mostra-se associado ao gene p53. BOUCK (1996) relacionou a latência no crescimento de alguns tumores com a deficiência de suporte vascular, de modo que estes mantinham-se clinicamente benignos. Este dado, porém, é controverso aos achados angiogênicos obtidos por "mapeamento dopplerfluxométrico", onde tumores de mama agressivos se apresentaram avasculares e outros bem diferenciados mostravam trama vascular exuberante (BORGES, 1998).

A análise da angiogênese pode explicar, pelo menos parcialmente, o metabolismo diferenciado entre as regiões do centro e periferia dos carcinomas ductais infiltrativos. Embora o presente estudo não tenha avaliado a distribuição dos vasos sangüíneos pelo tumor, em trabalho relacionado à angiogênese de 66 carcinomas mamários nos estágios I, II e IIIa, BORGES (1998), observou neovascularização em 96% dos tumores, sendo que em 95% destes foram detectados vasos na periferia e em 50% os vasos distribuíam-se no centro.

VAUPEL et al. (1989) demonstraram que a vascularização deficiente é o principal fator determinante da heterogeneidade metabólica observada nos tumores malignos, principalmente sólidos, tornando-se mais evidente com o tamanho do tumor e a idade da paciente (VAUPEL, 1981). Outros relatos mostram que o ambiente metabólico do tecido neoplásico torna-se heterogêneo com o crescimento tumoral, até que seu tamanho seja detectável (VAUPEL, 1981; SUTHERLAND et al, 1988).

Comparando-se os resultados de estudos imuno-histoquímicos utilizados para a identificação de marcadores tumorais (Hospital das Clínicas-FMUSP), verifica-se heterogeneidade nas suas distribuições entre as regiões do centro e periferia de tumores malignos da mama. Este dado permite a identificação de marcadores de diferenciação distintos que correlacionam-se com a evolução clínica das pacientes e o próprio comportamento biológico do tumor. No presente estudo foram obtidas evidências de que essa informação também pode associar com o comportamento metabólico dos tumores analisados.

Os efeitos da insulina sobre o consumo de glicose foram distintos entre a mama e os carcinomas (Tabela 2). Nesse aspecto, os estudos descritos em outras neoplasias, mostram-se controversos (HARMON & HILF, 1976; UNTERBURGER et al., 1990). Nos carcinomas estudados, a insulina não alterou a captação de glicose, tanto em concentrações fisiológicas quanto supra-fisiológicas (100 e 1000 μ U/ml) (Tabela 2). Este resultado foi semelhante a dados obtidos em animais com tumor de Walker 256 (FERNANDES, 1989). De acordo com os dados clínicos das pacientes, estas não apresentaram alteração da glicemia em decorrência da presença do tumor. De fato, a hipoglicemia não se manifesta com frequência em pacientes com neoplasias mamárias, exceto nos casos graves em que há caquexia.

No tecido mamário normal, embora o consumo fosse menor, houve um resultado adverso ao observado no tumor por efeito da insulina, que aumentou significativamente a captação de glicose (Tabela 2). Sabe-se que a glicose representa um substrato importante para a glândula mamária, como precursor de

lipídios e lactose, principalmente no período da lactação, quando o consumo é cerca de 80 a 90% da glicose circulante, em consequência da atividade sintética elevada. Esta resposta exacerbada da glândula mamária durante a lactação é comparada, muitas vezes, à de um tumor benigno (KUHN, 1978; WILLIAMSON, 1987). As glândulas analisadas porém, não se apresentavam em fase de lactação e, segundo alguns estudos, mesmo após este período, estas sofrem involução e reverterem a um estado relativamente inativo (WILLIAMSON, 1987). Desse modo, esperava-se um consumo diminuído de glicose no tecido glandular em comparação ao tecido tumoral, de modo que o aumento observado deveu-se à ação da insulina. No entanto, esta não acarretou aumento na produção de lactato dos tumores.

Considerando-se os efeitos da insulina sobre o consumo de glicose no tecido adiposo branco e músculo esquelético de ratos, esses foram incubados, nas mesmas condições, como controle da resposta típica de tecidos insulino-dependentes. Segundo alguns estudos, a glândula mamária mostra expressão de GLUT1, enquanto que carcinomas ductais infiltrativos e medulares apresentam transportadores GLUT1 e, também em menor proporção, GLUT2 (BROWN et al., 1993). No mesmo estudo imuno-histoquímico, observou-se a expressão de GLUT4 em alguns carcinomas ductais infiltrativos, somente em "clusters" intracelulares dos grânulos situados próximo ao núcleo.

Segundo alguns estudos, durante o desenvolvimento, o transportador GLUT2 permanece em níveis baixos, enquanto que o GLUT1, considerado como a isoforma fetal, é freqüentemente reexpresso nas lesões pré-neoplásicas de fígado (BANNASCH et al., 1997).

Comparando-se os transportadores de glicose, descritos na literatura, aos dados relativos ao consumo de glicose (Tabela 2) na glândula mamária, verifica-se divergência entre os mesmos. Sabe-se que a insulina regula a atividade de transportadores GLUT4 de algumas células, de modo que não se esperava efeito marcante desta sobre o consumo de glicose no tecido glandular, supondo-se que os transportadores presentes nesse são GLUT1. Supõe-se, a

partir desses resultados, que o efeito da insulina na mama possa resultar da incubação do tecido adiposo adjacente, uma vez que a glândula mamária está envolvida por densa massa adiposa, que corresponde à maior parte do volume da mama (SOUZA & SALVATORE, 1979; FRANCO, 1997). Outra hipótese que ainda poderia ser considerada, refere-se aos efeitos da insulina sobre a glândula mamária serem resultantes da ação periférica.

Em estudo recente, GROVER-McKAY et al. (1998) observaram aumento na expressão do transportador GLUT1 em cânceres mamários, que contribuía para o aumento no consumo de glicose e com o potencial de invasão das células tumorais. Outros estudos associados à hipóxia demonstram que esta, a insulina e o IGF-I aumentam a expressão de vários genes que facilitam o suprimento de metabólitos para os tecidos, como o transportador GLUT1 e GLUT3 e enzimas glicolíticas, através da ativação de um fator induzível por hipóxia, HIF-1 (ZELZER et al., 1998). Considerando-se as características sólidas dos carcinomas, supõe-se que a hipóxia resultante represente um dos fatores que justificam as alterações no consumo de glicose, por provável ativação do seu transportador pelo HIF-1.

Não ficou esclarecido porém, se a falta de responsividade dos tecidos neoplásicos aos efeitos da insulina relacionam-se à malignidade tumoral, ou ocorre independente desta, também nos tumores benignos, por hiperplasia tecidual, visto que durante o próprio desenvolvimento, as mamas adquirem responsividade à insulina (MARCHANT, 1993) e, posteriormente esta característica parece ser perdida. Estes efeitos foram evidentes quando comparados aos dados obtidos a partir de uma paciente portadora de diabetes mellitus tipo I. No entanto, não foram observadas diferenças entre os resultados do consumo de glicose neste tumor e naqueles de pacientes sem a doença.

A heterogeneidade macroscópica dos carcinomas, com áreas centrais mais sólidas ou compactas, relacionou-se diretamente ao padrão enzimático, de modo que no centro do tumor as atividades mostraram-se mais elevadas que na porção periférica. Pelos relatos da literatura, em que a tendência do crescimento

tumoral deve ocorrer na periferia do tumor, baseado na propriedade de invasão de suas células e onde o suprimento de vasos sanguíneos é maior, esperava-se que na área periférica as atividades enzimáticas fossem mais elevadas, principalmente aquelas associadas ao metabolismo aeróbio. No entanto, nas áreas mais compactas do centro do tumor, houve aumento maior nas atividades das enzimas, tanto glicolíticas quanto da glutaminase do que nas áreas periféricas. De acordo com os resultados histopatológicos, a distribuição equivalente da celularidade entre estas indica que a maior atividade enzimática no centro do tumor não se relaciona com o número de células (Figuras 2 e 2a, 3 e 3a). No entanto, os estudos relacionando o grau nuclear e o índice de coesividade entre as mesmas representam parâmetros mais indicados para complementar estas observações. Esta atividade aumentada e proporção semelhante das células no centro sugerem que as células das áreas mais centrais dos tumores sólidos, como os carcinomas ductais infiltrativos, poderiam representar células-tronco (stem cells), o que justificaria um metabolismo mais ativo nessa região. SUTHERLAND (1988) mostrou que a heterogeneidade celular dos tumores sólidos leva à distribuição de células proliferativas na periferia, enquanto que no centro as mesmas mantêm-se em estado quiescente e posteriormente tornar-se-ão células responsáveis pela reincidência do tumor e pelas metástases.

VAUPEL et al. (1989) evidenciaram, num estudo de revisão relacionado ao fluxo sanguíneo e suprimento de nutrientes e oxigênio, em tumores humanos, que a taxa metabólica tumoral relaciona-se diretamente à oxigenação tecidual, uma vez que áreas de hipóxia e anóxia distribuem-se heterogeneamente dentro da massa tumoral. Desse modo, a pO_2 interfere com as diferenças relacionadas ao grau de diferenciação celular, à distribuição heterogênea nas concentrações de ATP, glicose, aminoácidos, corpos cetônicos e ao próprio pH de vários tipos de tumor maligno humano, incluindo os carcinomas de mama, dados que estão de acordo com os resultados obtidos.

Os estudos sugerindo que a oxigenação tecidual é essencial para o fluxo de metabólitos nos tumores são diversos. Assim, a oxigenação deficiente decorrente da solidez dos carcinomas ductais infiltrativos poderia ser um dos principais fatores associados às alterações metabólicas observadas. Desse modo, a atividade mais elevada das enzimas glicolíticas e do consumo de glicose, de acordo com a região tumoral, poderia ser justificada pela baixa vascularização do tecido.

A atividade mais elevada das enzimas no tecido tumoral em relação ao tecido normal correspondente (Tabela 3), indica capacidade aumentada de utilização de glicose pelos carcinomas (Tabela 2). No entanto, na análise da atividade das enzimas glicolíticas, considerando-se os graus histológicos dos carcinomas, observou-se uma relação inversa entre os dados (Figuras 5 e 6). WEBER (1977) e DESHPANDE et al. (1981) também constataram relação similar para outros tipos de tumor maligno. Este fato poderia associar-se ao aumento no número de células imaturas nos carcinomas pouco diferenciados ou à vascularização deficiente, o que acarretaria elevação do metabolismo glicolítico. Alguns estudos também têm relatado elevação da glicólise de acordo com a capacidade metastática das células neoplásicas, de modo que tumores mais agressivos apresentam atividade das enzimas glicolíticas aumentada (SPYRATOS, 1986). Clinicamente, observa-se comportamento heterogêneo entre as pacientes com cânceres de mama similares entre si, de modo que o prognóstico da doença seja um parâmetro muito imprevisível (KOPANS, 1998). Essas diferenças metabólicas intratumorais podem estar relacionadas ao comportamento clínico distinto entre as pacientes.

Num estudo similar, DESHPANDE et al. (1981) acompanharam a evolução clínica das pacientes, após a remoção de carcinomas ductais infiltrativos, através das alterações de várias enzimas do metabolismo de carboidratos. Havia uma relação inversa entre as altas atividades da 6-fosfogluconato desidrogenase e fosfofrutoquinase, e conseqüente diminuição da glicerol-fosfato desidrogenase, e a recorrência dos tumores após 4 anos de

intervalo livre de doença. A redução da relação entre α -glicerol fosfato desidrogenase e 6-fosfogluconato desidrogenase pode ser considerada como um fator de mau prognóstico.

Recentemente, BEREITER-HAHN et al. (1995) evidenciaram uma associação da atividade das enzimas da via glicolítica a microfilamentos do citoesqueleto, durante a progressão do ciclo celular. A demanda energética elevada, com aumento na produção de lactato, mas não do consumo de oxigênio para a produção de ATP, indica a importância dessa via na produção de energia para a motilidade celular. Outros estudos também mostram que a expressão aumentada das enzimas glicolíticas durante a formação do tumor, com ligação da aldolase C a filamentos de actina, além do aumento na atividade da GAPDH e PK tipo M₂, correlaciona com a ocorrência de metástases (HENNIPMAN et al., 1989; BOARD et al., 1990; EPNER et al., 1993). Estas observações podem explicar o maior aumento na atividade destas enzimas com o nível de comprometimento dos linfonodos. De fato, dentre as enzimas glicolíticas cujo aumento da atividade associou-se ao comprometimento dos linfonodos, destaca-se a piruvato quinase, resultado que está de acordo com os relatos associando a enzima com os processos metastáticos (MAZUREK et al., 1997).

A atividade da α -GDH (Tabela 3) também associou-se com os graus histológicos dos tumores. Nos carcinomas mais diferenciados, as atividades foram mais elevadas que naqueles de menor diferenciação; resultados que mostram-se opostos àqueles observados nas enzimas glicolíticas e glutaminase. No entanto, não houve relação entre a atividade da α -GDH e os tamanhos dos tumores ou o número de linfonodos comprometidos. Na análise comparativa entre mama e carcinomas, houve diminuição da atividade enzimática no tecido neoplásico, o que está de acordo com relatos sobre a redução na transferência de equivalentes redutores, produzidos no citoplasma, para a mitocôndria das células tumorais. Explica-se esta alteração pela deficiência dos sistemas de reoxidação de NADH nos tumores malignos, tanto no citoplasma, pelo glicerol-3-fosfato, responsável pelo transporte de hidrogênio do NADH gerado no citossol

para a mitocôndria, ou ainda pelo sistema malato/aspartato mitocondrial (BOXER & DEVLIN, 1961). Em consequência dessas alterações, verifica-se aumento na reoxidação de NADH através da lactato desidrogenase e aumento do fluxo glicolítico. Desse modo, a diminuição na atividade da glicerol 3 fosfato desidrogenase (Tabela 3) correlacionou-se com a redução citrato sintetase e aumento significativo na produção de lactato (Tabela 3). Embora a maioria dos estudos relatem diminuição dos sistemas de reoxidação de NADH nos tumores malignos, MATSUNO (1992) demonstrou que linhagens celulares de hepatoma humano, que utilizam principalmente glutamina, para formação de ATP, reoxidam NADH mitocondrial através da lançadeira malato-aspartato.

Na comparação dos dados, relacionando-se o metabolismo aeróbio e anaeróbio da glicose ao grau histológico dos tumores, houve uma relação inversa entre as atividades da citrato sintetase e das enzimas glicolíticas. A atividade da citrato sintetase foi maior nos carcinomas diferenciados que naqueles de menor diferenciação ou indiferenciados (Tabela 7), enquanto que as atividades das enzimas glicolíticas mostraram-se opostas. Esse resultado pode associar-se com a taxa proliferativa do tumor e à própria hipóxia do tecido, uma vez que a citrato sintetase participa do metabolismo aeróbio. Além disso, supõe-se que nos carcinomas menos agressivos, ou histologicamente mais diferenciados, o metabolismo mantém-se mais próximo ao do tecido mamário normal, fato que contribuiria para a maior oxidação de glicose pelo ciclo do ácido cítrico e maior aporte de ATP, que nos tumores menos diferenciados, onde a glicólise é predominante.

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase mostrou grande variação entre as áreas analisadas (Tabela 7). Do mesmo modo que dados das enzimas glicolíticas, não foram observadas diferenças significativas em relação ao tamanho, nem ao grau histológico do tumor, uma vez que carcinomas de graus menos diferenciados apresentaram resultados similares àqueles de maior diferenciação. Este dado é controverso aos resultados observados em células de proliferação rápida, descritos na literatura, considerando-se que a via das

pentoses tem papel importante na formação de precursores da síntese de DNA e RNA e, conseqüentemente, apresenta-se aumentada nas células com taxa proliferativa mais elevada. Por outro lado, observou-se uma relação direta entre a atividade da enzima e o número de linfonodos comprometidos. Estudos *in vitro* relacionados à proliferação celular de lesões pré-neoplásicas e neoplasias induzidas por carcinógenos, mostram que a atividade da enzima associa-se diretamente com a proliferação das células em ambos os estágios (BABA et al., 1989). Alguns estudos demonstram ainda a associação entre os tumores mamários malignos, com receptores positivos para estradiol, e a atividade mais elevada da glicose-6-fosfato desidrogenase que aqueles com receptores negativos (DUFFY & DUFFY, 1977). Outros relatos mostram que somente nos tumores com receptores estrogênicos positivos, com atividade elevada da glicose-6-fosfato desidrogenase, os receptores são funcionais. A determinação da enzima parece ser importante no período pós-mastectomia como um teste adicional para selecionar tratamento endócrino às pacientes. Na análise dos resultados, não foi observada associação entre a atividade da enzima e o estado hormonal das pacientes, embora em algumas das mulheres menopausadas houvesse maior aumento na atividade da enzima.

Conforme relatado por WEINHOUSE (1980), que também demonstrou nos tumores malignos que as taxas de glicólise aeróbica aumentam de acordo com o grau de diferenciação das células tumorais, ou o padrão particular de crescimento tumoral, ocorre utilização preferencial ou de glicose ou aminoácidos, glutamina e asparagina, pelas células cancerosas, que poderia ser destinada para as atividades energéticas ou biossintéticas (ARGILÉS & AZCÓN-BIETO, 1988).

Estabelecendo-se uma comparação entre alguns parâmetros cinéticos da piruvato quinase determinados em extratos teciduais (Figuras 11 e 12) e as observações clínicas das pacientes com tumores de grau histológico I, observou-se uma relação inversa. Clinicamente, o prognóstico mostra-se melhor nas pacientes com tumores diferenciados (grau I) que naquelas com tumores mais

agressivos (SOUZA & SALVATORE, 1979). No entanto, há também relatos de que tumores malignos indiferenciados, que apresentam maior agressividade, respondem melhor ao tratamento quimioterápico que aqueles mais diferenciados. Por outro lado, analisando-se a cinética de inibição da piruvato quinase, nos extratos tumorais, de acordo com o grau histológico, nos tumores menos diferenciados a inibição da enzima por ATP e alanina foi estatisticamente maior que nos tumores diferenciados (Figuras 11 e 12). Embora este resultado mostre-se paradoxal às atividades enzimáticas aumentadas nos carcinomas de menor diferenciação, tal parâmetro poderia estar associado à malignidade e ao próprio prognóstico.

Sob o aspecto macroscópico, supõe-se que as áreas mais sólidas dos carcinomas mamários representem regiões necróticas, conseqüentes à baixa vascularização do tecido, uma vez que estas encontram-se, principalmente, no centro do tumor (Figura 1). Alguns estudos relatam que na maioria dos tumores sólidos ocorre necrose resultante da difusão limitada de nutrientes essenciais para as células tumorais ou remoção inadequada de produtos do metabolismo pelo sistema vascular (ROTIN et al., 1986). Tanto os dados da literatura quanto os resultados obtidos mostram-se opostos a estas observações. Macroscopicamente, verifica-se no tecido tumoral sólido evidente aspecto cirroso correspondendo a “fibrose” das porções centrais (Figura 1). Pelos exames histopatológicos observou-se que as áreas centrais apresentam-se densas, com grande quantidade de tecido fibroso envolvendo as células neoplásicas (Figuras 1a, 2a, 3a). Segundo os estudos com modelos esferóides, as células das camadas mais internas tornam-se privadas de oxigênio e metabólitos, devido à baixa vascularização, o que contribui para a necrose no centro do tumor, embora não fossem observados tais aspectos nos carcinomas estudados.

FREITAS et al, (1996) verificaram que o desenvolvimento de carcinoma sólido em animais inoculados com células do carcinoma de Ehrlich é acompanhado pela formação de tumor infiltrado por fibras e com áreas internas de necrose. Nesse modelo, as enzimas LDH, glicose-6-fosfato desidrogenase e

succinato desidrogenase distribuíram-se distintamente entre as áreas do tumor. No entanto, a maior atividade das enzimas nas regiões perinecroticas, foi descrita como um mecanismo de adaptação para síntese de lipídios e purinas a partir dos produtos de degradação a partir da necrose das células distantes da vascularização, de modo a considerar que o tecido tumoral apresenta auto-fagia.

Do mesmo modo, WASA et al (1996) relataram que a vascularização deficiente de muitos tumores malignos de crescimento rápido associa-se com níveis reduzidos de glutamina intratumoral, o que pode levar a uma diminuição do crescimento celular e à observação clínica de necrose no centro do tumor. Embora a vascularização, nem o consumo de glutamina pelos carcinomas mamários fossem estudados, os relatos acima são opostos aos dados obtidos, com base na atividade da glutaminase no centro do tumor (Tabela 6).

VAUPEL et al.(1989) observaram que as condições de oxigenação do tecido determinam o fluxo distinto de metabólitos no tumor. Num estudo posterior (VAUPEL et al., 1991), relacionado à distribuição de oxigênio em cânceres de mama, também verificou-se heterogeneidade na oxigenação das áreas do centro e periferia dos tumores, com valores médios reduzidos em 50% quando comparados à mama. Não havia diferença estatística quando considerado o grau histológico do tumor.

De modo similar, de acordo com o modelo proposto por SUTHERLAND (1988), os tumores sólidos, caracteristicamente, apresentam gradientes de metabólitos como oxigênio, glicose, lactato, íons e, provavelmente, fatores de crescimento. Desse modo, à medida que o tumor cresce, o número de células proliferativas diminui e a proporção de células quiescentes, que localizam-se mais centralmente, aumenta. Estas observações poderiam associar com áreas compactas no centro e maior número de vasos na periferia.

Tomando-se por base essas considerações, pode supor-se que tumores sólidos, como carcinomas ductais infiltrativos, apresentam um metabolismo diferenciado de acordo com a região, com base na deficiência de angiogênese, embora os estudos ainda sejam restritos. As áreas calcificadas, e provavelmente

deficientes em vasos sangüíneos em comparação com os neoplasmas não sólidos, poderiam ser os fatores que relacionam à elevada atividade das enzimas glicolíticas nas áreas centrais do tumor, em consequência da deficiência de oxigenação, de modo que as células tumorais se adaptariam à condição de anaerobiose, com aumento na produção de lactato (Tabela 2). Embora estas observações não justifiquem o consumo aumentado de glicose nas áreas centrais, em estudos recentes ZELZER et al. (1998) demonstraram que, tanto o estresse hipóxico, quanto a insulina e IGF-I induzem genes que contêm elementos responsivos à hipóxia, através da formação do complexo HIF-1 α /ARNT. Esta indução causa aumento na transcrição de genes para aldolase A, PGK, no nível de RNA_m para transportadores GLUT1 e GLUT3 e, também, induz expressão de VEGF em células de hepatoma Hep-G2 e carcinoma ductal de mama T47D.

As alterações observadas na glutaminólise também associaram-se diretamente com o comportamento biológico do tumor, principalmente ao grau histológico. Tumores diferenciados apresentaram diminuição na atividade da glutaminase em relação aos carcinomas de menor diferenciação (Figura 7). Embora diversos estudos destaquem a função deste aminoácido como o principal substrato energético tanto para tumores malignos, como células tumorais *in vitro*, na comparação entre o metabolismo de glicose e glutamina dos carcinomas ductais infiltrativos, observou-se elevação concomitante tanto na atividade das enzimas glicolíticas quanto da glutaminase, principalmente nas áreas centrais do tumor.

Não houve relação entre a atividade da glutaminase e o tamanho do tumor. Entretanto, vários trabalhos relatam que a oxidação de glutamina é regulada pelo suprimento de oxigênio e, indiretamente, pelo fluxo sangüíneo no tecido. Segundo VAUPEL (1977), nos tumores humanos transplantados em camundongos nude, há um declínio no fluxo de sangue com o crescimento da massa tumoral, o que contribui para áreas de hipóxia e anóxia no ambiente tumoral e limita a glutaminólise, via que produz ATP sob condições aeróbias.

Estes dados, associados aos estudos relacionando a menor angiogênese no centro do tumor que na sua periferia (BORGES, 1998), são contraditórios aos resultados obtidos nas áreas dos carcinomas estudados.

KALLINOWSKI et al (1987) também analisaram a importância do consumo de glutamina e do fluxo sangüíneo na taxa de crescimento tumoral de 65 cânceres mamários humanos transplantados em camundongos nude. Do total analisado, somente 13 tumores captavam glutamina, enquanto que a maioria liberava o aminoácido ou não apresentava qualquer alteração. A concentração de glutamina arterial representou o parâmetro mais importante para indicar a utilização de glicose pelas células cancerosas. A relação entre o consumo de oxigênio e o tamanho tumoral também foi destacado como o fator limitante para a proliferação das células tumorais, através do metabolismo da glutamina. Com base nesses dados, a glutamina pode ser um substrato importante para tumores sólidos somente nas áreas perivasculares, de modo que a glutaminólise deveria ser mais intensa nas áreas aeróbias do tumor, ao redor dos vasos, que parecem distribuir-se na periferia dos tumores, segundo a maioria dos estudos.

A heterogeneidade entre regiões tumorais também é demonstrada em relação ao pH. Alguns estudos demonstram que o ambiente tumoral mostra-se ácido, em determinadas áreas, influenciando o metabolismo. De acordo com WILHELM (1971), há diminuição da taxa de glicólise com a redução do pH. Por outro lado, sabe-se que a glutaminase ocorre na forma de duas isoenzimas principais, sendo a forma renal ativada por pH ácido, o que poderia justificar sua maior atividade nas áreas próximas ao centro do tumor.

Não foram observadas correlações entre as determinações quando considerada a idade reprodutiva das pacientes, estando estas na menacme ou menopausa. As alterações hormonais desta fase representam um dos fatores associados ao prognóstico do câncer de mama, e são mediadas através dos receptores hormonais. Sabe-se que 1/3 dos tumores malignos da mama é dependente de estrógeno, que atua como um mitógeno que induz a síntese de DNA nos estágios iniciais da doença (VAN DER BURG et al., 1990). Em

linhagens tumorais de mama, T47D e MCF-7, que caracterizam-se por apresentar baixo e elevado número de receptores estrogênicos, respectivamente, NAGAI et al. (1988), demonstraram que a ligação de estradiol ao seu receptor estimula a glicólise de carcinomas ductais infiltrativos através da isoenzima da LDH-5, de modo que a mesma poderia representar um marcador de tumores dependentes de estrógeno. NEEMAN et al. (1989) também observaram que o tratamento com estrógeno aumenta as taxas de consumo de glicose, produção de lactato e síntese de glutamato através do ciclo de Krebs, em linhagens de câncer mamário humano. Analisando-se os dados obtidos, em comparação aos estudos descritos, não foram observadas relações entre as atividades enzimáticas e alterações hormonais, tomando-se por base a idade das pacientes.

Na análise das enzimas glicolíticas, observou-se aumento mais significativo das enzimas reguladoras (HK, PFK-1 e PK), embora este também fosse verificado em relação à GAPDH, PGK, LDH e aldolase. Embora a glicólise aeróbia elevada represente o maior fenótipo das neoplasias malignas (WARBURG, 1956), verifica-se que nos tumores sólidos esta via metabólica torna-se essencial na manutenção do metabolismo tumoral sob condições de oxigenação deficiente, o que pode justificar o aumento no consumo de glicose para formação de lactato. Os resultados relativos aos carcinomas foram também comparados à linhagem de carcinoma mamário humano, MCF-7, que caracteriza-se por apresentar alta taxa glicolítica (Tabela 5). Os resultados foram significativamente maiores nas células cultivadas, mesmo quando comparados aos tumores menos diferenciados. Contudo, observou-se o mesmo padrão de comportamento das enzimas glicolíticas quando comparada a atividade entre elas. Com base nesses dados, as células foram também utilizadas na análise eletroforética da piruvato quinase como padrão de referência de malignidade.

Diversos estudos têm evidenciado a modulação da expressão gênica de vários fatores de tumores sólidos, por um fator induzível por hipóxia (HIF-1) que influencia a angiogênese, através da expressão de VEGF, além de contribuir para induzir a glicólise e a eritropoiese (MAXWELL et al., 1997). CARMELIET et

al. (1998) também demonstraram que a ação desse fator resulta na ativação do transporte de glicose e da atividade de várias enzimas glicolíticas, como aldolase, fosfoglicerato quinase, enolase, lactato desidrogenase e piruvato quinase, o que está associado com o aumento do fluxo glicolítico e inibição da apoptose por citocinas. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos no consumo de glicose e atividade das enzimas glicolíticas dos carcinomas ductais infiltrativos do presente estudo.

A purificação parcial da piruvato quinase tumoral e posteriormente seu estudo cinético (Tabela 8 e Figuras 16 a 20), basearam-se na determinação preliminar da atividade das enzimas glicolíticas. Comparando-se a razão estabelecida entre a atividade das enzimas reguladoras da via glicolítica, hexoquinase, fosfofrutoquinase-1 e piruvato quinase, observou-se maior atividade da piruvato quinase em relação às outras enzimas (HK e PFK-1).

No estudo das características cinéticas da piruvato quinase purificada, a partir do carcinoma P₄₀, observou-se discreta ativação da enzima pela frutose 1,6-bifosfato (36%). Este metabólito, que representa um produto da reação catalisada pela PFK-1, atua como um regulador alostérico positivo da piruvato quinase. O aumento na concentração deste produto, no metabolismo das células normais, induz alostericamente a ativação da isoenzima (L e M₂) (HALL & COTTAM, 1978), de modo a aumentar o fluxo glicolítico no tecido. O mecanismo envolvido na ativação da enzima relaciona-se à reassociação das suas sub-unidades para formar tetrâmeros (EIGENBRODT, 1997), enquanto que a privação de glicose, como ocorre na inanição, reduz as concentrações de FDP, induzindo a inativação da piruvato quinase, por formar dímeros (ASHIZAWA et al., 1992; MAZUREK, 1997). Sabe-se que a enzima apresenta quatro isoformas que diferem entre si nas propriedades cinéticas, imunológicas e na distribuição pelos tecidos (IMAMURA & TANAKA, 1972). Estudos mostram que as isoenzimas M₁ e M₂ são produzidas a partir do mesmo gene por “splicing” alternativo, enquanto que as formas L e R são produzidas por um único gene, através do uso de diferentes promotores (NOGUCHI et al., 1987).

A isoforma M_2 , que representa o protótipo fetal, é substituída progressivamente pelas isoenzimas tecido-específicas durante o desenvolvimento. Nas neoplasias malignas observa-se reincidência da isoforma fetal, M_2 , na maioria dos tecidos atingidos. Nos tumores sólidos, ressalta-se a expressão dessa isoforma através da ativação de genes induzíveis por hipóxia (HIF-1), o que está de acordo com a presença da enzima na maioria dos tumores malignos (KRESS et al., 1998).

Embora a isoenzima M_2 seja descrita como a forma predominante nos tumores malignos, deve-se ressaltar que a curva de saturação para fosfoenolpiruvato, da piruvato quinase purificada, não apresenta essas características, conforme descrito na literatura. De acordo com a cinética de saturação de enzimas com sítios únicos ou múltiplos, que associam-se com curvas hiperbólica ou sigmoidal, os resultados obtidos não obedecem os modelos clássicos propostos (Figura 16). No extrato bruto dos carcinomas porém, essas características cinéticas apresentaram-se menos evidentes que a curva obtida na enzima purificada. A partir desses dados, determinou-se a equação da reta adequada à curva obtida, conforme demonstrado pelo valor do coeficiente de correlação linear ($R^2=0.98$) na Figura 16a, embora a isoforma M_2 seja a principal forma expressa nas neoplasias malignas e apresente curva caracteristicamente sigmoidal. IBSEN et al (1977) e BALINSKY et al.(1983) constatarem diferenças na expressão de isoenzimas de piruvato quinase em tecidos normais, benignos e malignos de mama e correlacionaram a atividade da enzima com a malignidade tumoral. De acordo com esses relatos, os neoplasmas tendem a expressar uma isoforma de características híbridas, com subunidades K (M_2) e M associadas, denominada K^{pm} (pseudo tipo M), que apresenta propriedades cinéticas distintas do protótipo M_2 . Há também uma correlação entre a expressão dessa enzima e a hipóxia tecidual, conforme observado no comedocarcinoma mamário de características mais sólidas e ausência dessa manifestação no carcinoma lobular infiltrativo mais vascularizado. Tais resultados poderiam explicar parcialmente o comportamento cinético diferenciado da enzima purificada, cujas

características cinéticas são similares a isoenzimas M_1 e M_2 . Estudos posteriores da enzima purificada até a homogeneidade poderiam esclarecer esses dados.

MAZUREK et al (1997) demonstraram que a piruvato quinase tem importância na regulação da etapa final do fluxo glicolítico, determinando a concentração de glicose que é direcionada para os processos sintéticos ou para produção energética. A expressão da isoenzima M_2 , tanto na forma tetramérica, ativa, ou dimérica, menos ativa, nas células em proliferação, representa um mecanismo para controle desses processos, embora nas células neoplásicas seja relatado super-expressão da forma dimérica.

A piruvato quinase purificada foi parcialmente inibida por alanina, fenilalanina e ATP na presença de concentrações saturantes de substrato (PEP). No entanto, quando adicionado o ativador alostérico (FDP) ao meio de reação, observou-se que o mesmo reverte parcialmente a inibição causada por alanina e ATP, sendo menos significativa para este último modulador, mas reverte totalmente a inibição por fenilalanina. Supõe-se que o efeito do ATP seja pouco significativo nos tumores, uma vez que a concentração deste deve ser baixa.

A inibição da piruvato quinase por cálcio ($CaCl_2$), na concentração máxima de 10 mM, não foi revertida por FDP. Cálcio é, sabidamente, um dos moduladores negativos da enzima (IMAMURA & TANAKA, 1972). Neste aspecto, cabe ressaltar que as características sólidas dos carcinomas ductais infiltrativos associam-se com áreas de microcalcificação, que têm importância como fator de diagnóstico das neoplasias mamárias. Na comparação desse dado clínico com as características cinéticas da enzima purificada, observa-se que cálcio induziu inibição de 50% da atividade total da enzima na concentração de 1,5 mM. No entanto, não houve reversão da inibição enzimática por frutose 1,6-bifosfato 1 mM. Estes dados mostram-se importantes quando comparados às condições de calcificação do tumor, um dos aspectos comuns entre carcinomas mamários, levando a supor que a enzima está

associada com a malignidade e deve manter-se ativa, mesmo nos carcinomas calcificados, contribuindo com o suprimento energético em meio hipóxico. De fato, estudos recentes têm mostrado a importância do cálcio intracelular como sinalizador da hipóxia que é requerido para induzir VEGF (MUKHOPADHYAY & AKBARALI, 1996), fator de vascularização associado ao crescimento de tumores malignos. Pode supor-se que no tecido tumoral o cálcio possa estar numa forma não ionizada, de modo que a concentração, mesmo elevada devido à calcificação, não inibe a piruvato quinase. Cabe ainda ressaltar, que o íon utilizado nas análises estava na forma de cloreto de cálcio, enquanto que nos tecidos o fosfato de cálcio representa a forma mais abundante. Estudos posteriores são necessários para esclarecer a importância e associação do íon Ca^{2+} com a regulação da atividade da piruvato quinase nos carcinomas sólidos da mama.

Dentre as características cinéticas da enzima purificada, evidenciou-se o padrão eletroforético distinto de outros tecidos analisados como padrão de referência (Figura 14). Dentre os padrões conhecidos, ressaltam-se as isoenzimas do fígado, caracterizadas pela presença das formas K (M_2) e L, enquanto que o rim e músculo esquelético apresentam as isoenzima M_2 e M_1 , respectivamente. Foram também analisados dois tumores humanos distintos, sendo um deles o fibroadenoma, tumor mamário benigno e melanoma, tumor maligno de pele. Conforme observa-se na Figura 14, a enzima em estudo apresentou mobilidade eletroforética em direção ao polo negativo (catodo), enquanto que a maioria dos padrões utilizados mostrou migração oposta. Cabe evidenciar que a mobilidade observada nos tumores benignos, principalmente naqueles de crescimento rápido, foram opostos aos resultados observados na eletroforese dos carcinomas, embora as atividades enzimáticas observadas fossem equivalentes àsquelas de carcinomas ductais de grau II.

MARCHUT et al. (1988) também identificaram uma isoforma distinta de piruvato quinase em gliomas, a qual caracterizou-se por apresentar inibição por cisteína. Do mesmo modo, a enzima descrita por aqueles autores apresentou

padrão eletroforético semelhante ao observado nos carcinomas estudados, com migração em direção ao catodo. Tal resultado diferiu da mama normal ou dos tecidos com isoformas conhecidas, como fígado e músculo de rato, mas foi semelhante ao do melanoma. Os resultados obtidos também foram comparados aos tumores benignos, como fibroadenomas de crescimento lento e rápido (juvenil). Em ambos os tumores benignos, a atividade das enzimas glicolíticas foi maior que na glândula mamária normal. No entanto, a atividade das enzimas da via glicolítica dos fibroadenomas de crescimento lento foi menor que nos carcinomas e fibroadenomas de crescimento rápido (juvenil). Por outro lado, nos fibroadenomas de crescimento rápido (fibroadenoma juvenil), a atividade das enzimas glicolíticas foi tão elevada quanto nos carcinomas ductais infiltrativos de grau II (moderadamente diferenciados), de modo que poderia representar um tipo tumoral metabolicamente pré-neoplásico. A importância destas observações é evidenciada por alguns autores, os quais mostram que pacientes portadoras de alguns tumores benignos, como fibroadenomas, têm maior probabilidade de apresentar câncer de mama (DUPONT et al., 1994). A diferença no padrão de migração eletroforética da piruvato quinase entre tumores benignos e malignos, no entanto, pode representar um fator de diferenciação da malignidade tumoral. De fato, BALINSKY et al (1983) também evidenciaram o mesmo padrão em tumores histologicamente benignos, indicando que a ausência de isoenzimas anormais exclui a possibilidade de estágio pré-neoplásico destes tumores. Desse modo, a enzima do fibroadenoma de crescimento rápido foi utilizada no estudo comparativo das isoformas de piruvato quinase como padrão de referência. De fato, observou-se neste tumor benigno (fibroadenoma juvenil) mobilidade eletroforética oposta àquela observada nos carcinomas ductais infiltrativos, embora a atividade das enzimas glicolíticas, principalmente da piruvato quinase, fossem muito elevadas. Estes dados indicam a importância da enzima para distinguir células ou tecidos neoplásicos, resultado que está de acordo com as observações de BOARD et al. (1990), que também evidenciaram papel essencial da enzima

para diferenciar linhagens tumorais com potencial tumorigênico daquelas com potencial metastático. Estas observações podem representar um indicador a mais para caracterizar tumores benignos e malignos em estágios mais precoces.

Representação esquemática indicando o gradiente de metabólitos nos carcinomas ductais infiltrativos. Esquema adaptado do trabalho de DANG & SEMENZA (1999)

Nas áreas centrais, com características sólidas, a hipóxia tecidual pode levar à ativação de várias enzimas glicolíticas e fatores associados ao crescimento tumoral pelo fator induzível por hipóxia (HIF-1). Assim, GLUT1 e as enzimas glicolíticas, associadas à glicólise anaeróbia, VEGF e outros fatores associados à angiogênese, contribuem com a adaptação metabólica do tumor.

Na periferia, o metabolismo aeróbio parece ser favorecido pela oxigenação mais eficiente, contribuindo com a proliferação das células dessa região. Há uma tendência da glutaminólise diminuir nas áreas menos oxigenadas do tumor e aumentar nas áreas com maior vascularização.

6. CONCLUSÕES

O estudo do metabolismo glicolítico e glutaminolítico de carcinomas ductais infiltrativos, com base na atividade das enzimas relacionadas a estas vias, leva a concluir o que segue abaixo.

1. O consumo de glicose pelo CDI é maior que na glândula mamária e independe da ação da insulina. Não houve relação entre o consumo de glicose pelo tumor e os fatores prognósticos.
2. A glicólise e glutaminólise dos CDI distribuem-se em microrregiões metabólicas: nas áreas centrais, de maior solidez, o metabolismo é predominantemente glicolítico, como também mostra glutaminólise evidente. A glutaminólise foi maior nas áreas periféricas.
3. O metabolismo de glicose e glutamina associou-se com a agressividade do tumor: carcinomas menos diferenciados e com comprometimento de linfonodos corresponderam com maior atividade destas vias metabólicas.
4. O tamanho tumoral não apresentou relação com a atividade das enzimas estudadas. Tumores de pequeno volume apresentaram-se, algumas vezes, metabolicamente mais ativos que os tumores de grande tamanho, o que poderia associar com a evolução clínica distinta entre as pacientes.
5. A piruvato quinase pode representar um marcador da malignidade tumoral.
6. A atividade da glutaminase correlacionou-se com o grau histológico do tumor, enquanto que a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase associou-se ao comprometimento de linfonodos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIB, A.R., FRANCO, E.B., ABREU, E., REBELO, M.S. **Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1996**. Pro Onco, Rio de Janeiro, 1996, p.3-16.

ALP, P.R., NEWSHOLME, E.A., ZAMMIT, V.A. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.**, London, v.154, p.689-700, 1976.

ARDAWI, M.S.M., NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. **Biochem. J.**, London, v.212, p.835-842, 1983.

ARGILÉS, J.M., AZCÓN-BIETO, J. The metabolic environment of cancer **Mol. Cell. Biochem.**, The Hague, v.81, p.3-17, 1988.

ARGILÉS, J.M., LÓPEZ-SORIANO, F.J. Why do cancer cells have such a high glycolytic rate? **Med. Hypotheses**, Edinburgh, v.32, p.151-155, 1990.

BABA, M., YAMAMOTO, R., IISHI, H., TATSUTA, M., WADA, A. Role of glucose-6-phosphate on enhanced proliferation of pre-neoplastic and neoplastic cells in rat liver induced by N-nitromorpholine. **Int. J. Cancer**, Geneva, v.43, p.892-895, 1989.

BAGGETTO, L.G. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. **Biochimie**, Paris, v.74, p.959-974, 1992.

De acordo com a NBR 6023/90 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 1997.

BAGGETTO, L.G. Biochemical, genetic, and metabolic adaptations of tumor cells that express the typical multidrug-resistance phenotype. Reversion by new therapies. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.29, n.4, p.401-413, 1997.

BALINSKY, D., PLATZ, C.E., LEWIS, J.W. Isozyme patterns of normal, benign, and malignant human breast tissues. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.43, p.5895-5901, 1983.

BARTOW, S.A. The breast. In: RUBIN, E., FARBER, J.L., eds. **Essential pathology**, 2ed. Philadelphia: J B Lippincott, 1995, 814 p.

BAULIDA J., ONETTI, R., BASSOLS, A. Effects of epidermal growth factor on glycolysis in A431 cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.183 p.1216-1223, 1992.

BHARGAVA, P.M. Regulation of cell division and malignant transformation: a new model for control by uptake of nutrients. **Biosci. Rep.**, New York, v.8., p.519-529, 1988.

BECKNER, M.E., STRACKE, M.L., LIOTTA, L.A. SCHIFFMANN, E. Glycolysis as a primary energy source in tumor cell chemotaxis. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.82, p.1836-1840, 1990.

BEREITER-HAHN, J., STÚBIG, C., HEYMANN, V. Cell cycle-related changes in F-actin distribution are correlated with glycolytic activity. **Exp. Cell. Res.**, Orlando, v.218, p.551-560, 1995.

BERGMEYER, H.U. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. In: BERGMEYER, H.U., ed. **Methods enzymatic analysis.**, 2ed., New York: Academic Press, 1974, v.1, p.466-468.

- BIRCHMEIER, W., BEHRENS, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cells junctions and the prevention of invasiveness. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1198 p.11-26, 1994.
- BLOCH, A. Growth and differentiation signals as determinants of cancer cell proliferation. In: **Adv. Enz. Regul.**, Oxford: Pergamon Press, 1989 v.28, p.359-374.
- BLOSTEIN, R., RUTTER, W.J. Comparative studies of liver and muscle aldolase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.238, p.3280-3285, 1963.
- BOARD, M., HUMM, S., NEWSHOLME, E.A. Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate pathway and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. **Biochem. J.**, London, v.265, p.503-509, 1990.
- BODE, B. P. & SOUBA, W.W. Modulation of cellular proliferation alters glutamine transport and metabolism in human hepatoma. **Ann. Surg.**, Hagerstown, v.220, p.411-424, 1994.
- BORGES, J.B.R. **O doppler colorido como fator prognóstico do câncer de mama**. São Paulo, 1998, 105 p. (Tese de Doutorado- Faculdade de Medicina- USP).
- BOSARI, S., LEE, A.K.C., De LELLIS, R.A., WILEY, B.D., HEATLEY, G.J., SILVERMAN, M.L. Microvessel quantitation and prognosis in invasive breast carcinoma. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.23, p. 755-761, 1992.
- BOUCK, N. p53 and angiogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1287, p.63-66, 1996.
- BOXER, G.E., DEVLIN, T.M. Pathways of intracellular hydrogen transport. **Science**, Washington, v.134, p.1495-1501, 1961.

- BROWN, R.S. & WAHL, R.L. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. **Cancer**, Philadelphia, v.72, n.10, p.2979-2985, 1993.
- BUCCHERI, V. Fármacos antineoplásicos. In: VALLE, L.B.S., OLIVEIRA-FILHO, R.M.O., DeLUCIA, R., OGA, S. **Farmacologia Integrada**, São Paulo: Ateneu, 1991, p.769-803.
- BÜCHNER, R., PFLEIDERER, G. Pyruvate kinase from muscle. **Methods Enzymol.**, New York, v.11, p.435-440, 1955.
- BUSTAMANTE, E. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with propensity for mitochondrial binding. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.256, p.8699-8704, 1981
- CARMELIET, P. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediate apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. **Nature**, London, v.394, p.485-490, 1998.
- CASCIARI, J.J., SOTIRCHOS, S.V., SUTHERLAND, R.M. Glucose diffusivity in multicellular tumor spheroids. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.48, p.3901-3905, 1988.
- CASCIARI, J.J., SOTIRCHOS, S.V., SUTHERLAND, R.M. Variations in tumor cell growth rates and metabolism with oxygen concentration, glucose concentration, and extracellular pH. **J. Cell. Physiol.**, New York, v.151, p.386-394, 1992.
- CHAGAS, C.R. Demographics aspect of breast cancer. In: FIGUEIRA, A.S., DIAS, E.N., SILVA, H.M.S., BARROS, A.C.S. **Mastology Breast Diseases**, Amsterdam, Elsevier Science, 1995, p.145-147.
- CHRISTOFORI, G., SEMB, H. The role of the cell-adhesion molecule e-cadherin as a tumour-suppressor gene. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v.24, p.73-76, 1999.

- COLQHOUN, A. & NEWSHOLME, E. Aspects of glutamine metabolism in human tumour cells. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, Marrickville, v.41, p.583-596, 1997.
- COLLINS, C.L., WASA, M., SOUBA, W.W., ABCOUWER, S.F. Regulation of glutamine synthetase in human breast carcinoma cells and experimental tumors. **Surgery**, St. Louis, v.122, n.2, p.451-464, 1997.
- COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. The breast. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. **Pathologic basis of disease** 5ed., Philadelphia: Saunders, 1994, p.1089-1111.
- CURI, R. Metabolism of lymphocyte and its regulation. **Ciênc. Tecnol.**, Rio de Janeiro, v.3, p.43-46, 1994.
- CURI, R., KOWALCHUCK, J.M., NEWSHOLME, E.A Glutamine metabolism in white adipocytes incubated in vitro. **Biochem. Soc. Trans**, London, v.15, p.1071, 1987.
- CURI, R., NEWSHOLME, P., PITHON-CURI, T.C., PIRES-DE-MELO, M., GARCIA, C., HOMEM-DE-BITTENCOURT JR, P.I., GUIMARÃES, A.R.P. Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v.32, p.15-21, 1999.
- CURTHOYS, N.P., LOWRY, O.H. The distribution of glutaminase isoenzymes in the various structures of the nephron in normal acidotic and alkalotic rat kidney. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.248, p.162-168, 1992.
- DANG, C.V., LEWIS, B.C., DOLDE, C., DANG, G., SHIM, H. Oncogenes in tumor metabolism, tumorigenesis, and apoptosis. **J. Bioenerg. Membr.**, New York, v.29, n.4., p.345-354, 1997.

- DANG, C.V., SEMENZA, G.L. Oncogenic alterations of metabolism. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v.24, p.68-76, 1999.
- DESHPANDE, N., MITCHELL, I., MILLIS, R. Tumour enzymes and prognosis in human breast cancer. **Eur. J. Cancer**, Amsterdam, v.17, p.443-448, 1981.
- DI LEONARDO, A., LINKE, S.P., YIN, Y., WAHL, G.M. Cell cycle regulation of gene amplification. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, New York, v.58, p.655-667, 1993.
- DICKSON, R.B. Regulation of tumor-host interactions in breast cancer. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.41, n.3-8, p.389-400, 1992.
- DUFFY, M.J., DUFFY, G.J. Estradiol receptors and glucose 6 phosphate dehydrogenase. **Clin. Chim. Acta**, Amsterdam, v.74, p.167-171, 1977.
- DUPONT, W.D., PAGE, D.L. Risk factors for breast cancer in women with proliferative breast disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.312, p.146-151, 1985.
- DUPONT, W.D., PAGE, D.L., PARL, F.F., VNENCAK-JONES, C.L., PLUMMER, W.D. Jr, RADOS, M.S., SCHLUYER, P.A. Long-term risk of breast cancer in women with fibroadenoma. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.331, p.10-15, 1994.
- DURAND, R.E. The influence of microenvironmental factors on the activity of radiation and drugs. **Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.**, New York, v.20, p.253-258, 1991.
- EIGENBRODT, E., GERBRACHT, U., MAZUREK, S., PRESEK, P., FRIIS, R. Carbohydrate metabolism and neoplasia: new perspectives for diagnosis and therapy. In: **Biochem and Molecular Aspects of Selected Cancers**. Academic Press, 1994, v.2, p.311-385.

- EIGENBRODT, E., KALLINOWSKI, F., OTT, M., MAZUREK, S., VAUPEL, P. Pyruvate kinase and the interaction of amino acid and carbohydrate metabolism in solid tumors. **Anticancer Res.**, Athens, v.18, p.3267-3274, 1998.
- ENGLE, P.C., JONES, J.B. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assay of L-glutamate. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.88, p.474-484, 1978.
- EPNER, D.E., PARTIN, A.W., SCHALKEN, J.A., ISAACS, J.T., COFFEY, D.S. Association of glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase expression with cell motility and metastatic potential of rat prostatic adenocarcinoma. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.53, p.1995-1997, 1993.
- EVANS, C.E., WARD, C., BRAIDMAN, I. P. Breast carcinomas synthesize factors which influence osteoblast-like cells independently of osteoclasts in vitro. **J. Endocrinol.**, London, v.128, p.R5-R8, 1991.
- FARINA, F.A., SHATTON, J.B., MORRIS, H.P., WEINHOUSE, S. Isozymes of pyruvate kinase in liver and hepatomas of the rat. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.34, p.1439-1446, 1974.
- FEARON, K.C. Failure of systemic ketosis to control cachexia and the growth of the Walker 256 carcinosarcoma in rats. **Br. J. Cancer**, London, v.52, p.87-92, 1985.
- FELDMAN, J.M., HILF, R. Effect of estradiol-17 β on glucose and proline uptake in plasma membrane vesicles from the R3230 AC rat mammary carcinoma. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.845, p.265-271, 1985.

- FERNANDES, L.C. **Papel da insulina na caquexia e no crescimento do tumor de Walker 256 in vivo.** São Paulo, 1989, 111 p. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biomédicas, USP).
- FOLKMAN, J., MERLER, E., ABENARTH, C., WILLIAMS, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **J. Exp. Med.**, New York, v.33, p.275-288, 1971.
- FOLKMAN, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.82, p.4-6, 1989.
- FOLKMAN, J., D'AMORE, M. Blood vessel formation: what is its molecular basis? **Cell**, Cambridge, v.87, p. 1153-1155, 1996.
- FRANCO, J.M. **Mastologia. Formação do especialista.** São Paulo: Editora Atheneu, 1997, p.305.
- FREITAS, i., BONO, B., BERTONE, V., GRIFFINI, P., BARONZIO, G.F., BONANDRINI, L., GERZELI, G. Characterization of the metabolism of perinecrotic cells in solid tumors by enzyme histochemistry. **Anticancer Res.**, Athens, v.16, p.1491-1502, 1996.
- FRITTITTA, L., CERRATO, A., SACCO, M.G., WEIDNER, N., GOLDFINE, I.D., VIGNERI, R. The insulin receptor content is increased in breast cancers initiated by three oncogenes in transgenic mice. **Breast Cancer Res. Treat.**, v.45, p.141-147, 1997.
- GALASKO, C.S.B. The anatomy and pathways of skeletal metastases. In: Weiss, I. & Gilbert, A.H. **Bone Metastasis**, Boston, 19, 1997, p. 49-63.
- GIARELLI, L., MELATO, M., ANTONUTTO, G. **Color atlas of pathology**, London: Butterworths, 1987, 721p.

- GOLSHANI-HEBRONI, S.G., BESSMAN, S.P. Hexokinase binding o mitochondria: a basis for proliferative energy metabolism. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.29, n.4, p.331-338, 1997.
- GRAY, H. Anatomy of the human body. In: GRAY, H., CLEMENTE, C.D, eds. **Gray's Anatomy**, 13ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1985, p.1581-1594.
- GREINER, E.F., GUPPY, M., BRAND, K. Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.269, p.31484-31490, 1994.
- GRIFFTHS, M., KEAST, D., PATRICK, G., CRAWFORD, M., PALMER, T.N. The role of glutamine and glucose analogues in metabolic inhibition of human myeloid leukaemia *in vitro*. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.25, n.12, p.1749-1755, 1993.
- GROVER-McKAY, M., WALSH, S.A., SEFTOR, E.A., THOMAS, P.A., HENDRIX, M.J.C. Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer. **Pathol. Oncol. Res.**, Budapest, v. 4, n.2, p. 115-120, 1998.
- GUDNASON, V., INGVARSSON, S., JONASDOTTIR, A., ANDRESDOTTIR, V., EGILSSON, V. Isoenzyme pattern and subcellular localization of hexokinases in human breast cancer and nonpathological breast tissue. **Int. J. Cancer.**, Geneva, v. 34, p. 63-66, 1984.
- GUMIN'SKA, M., STACHUSKA, V., CHRISTENSEN, B., TROMHOLT, V., KIELER, J., RADZIKOWSKI, Cz., DUS'D. Pyruvate kinase inhibited by L-cysteine as a marker of tumorigenic human urothelial cell lines. **Experientia**, Basel, v.45, p.571-574, 1989.

- HALL, E.R., COTTAM, G.L. Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.9, p.785-793, 1978.
- HANAHAN, D., FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v.86, p.353-364, 1996.
- HARMON, J.T., HILF, R. Effect of insulin to decrease glucose transport in dissociated cells from the R3230 AC mammary adenocarcinoma of diabetic rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.443, p. 114-125, 1976.
- HEBER, D., BYERLEY, L.O., CHLEBOWSKI, R. Metabolic abnormalities in the cancer patients. **Cancer**, Philadelphia, v.55, p. 225-233, 1985.
- HOLLEY, R.W. Unifying hypothesis concerning the nature of malignant growth. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, Washington, v.69, p. 225-233, 1985.
- IBSEN, K.H., ORLANDO, R.A., GARRATT, K.N., HERNANDEZ, A.M., GIORLANDO, S., NUNGARAY, G. Expression of multimolecular forms of pyruvate kinase in normal, benign and malignant breast tissue. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.42, p. 888-892, 1982.
- IMAMURA, K., TANAKA, T. Multimolecular forms of pyruvate kinase from rat and other mammalian tissues. **J. Biochem.** Tokyo, v 71, p.1043-1051, 1972.
- KAIBARA, A., YOSHIDA, S., YAMASAKI, K., ISHIBASHI, N., KAKEGAWA, T. Effect of glutamine and chemotherapy on protein metabolism in tumor-bearing rats. **J. Surg. Res.**, Orlando, v.57, p.143-149, 1994.
- KALLINOWSKI, F., VAUPEL, P., RUNKEL, S., BERG, G., FORTMEYER, S.W., BAESSLER, K.H., WAGNER, K., MUELLER-KLIESER, W., VALENTA, S. Glucose uptake, lactate release, ketone body turnover, metabolic

micromilieu, and pH distributions in human breast cancer xenografts in nude rats. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.48, p.7264-7272, 1988.

KALLINOWSKI, F., SCHLENDER, K.H., KLOES, M., STORHRER, M., VAUPEL, P. Tumor blood flow: the principal modulator of oxidative and glycolytic metabolism, and of the metabolic micromilieu of human tumor xenografts in vivo. **Int. J. Cancer**, Geneva, v.44, p.266-272, 1989.

KAWAMOTO, M. Breast cancer diagnosis by lactate dehydrogenase isozymes in nipple discharge. **Cancer**, Philadelphia, v.73, p.1836-1841, 1994.

KENNEDY, K.A., TEICHER, B.A., ROCKWELL, S., SARTORELLI, A.C. The hypoxic tumor cell: a target for selective cancer chemotherapy. **Biochem. Pharmacol.**, Oxford, v.29, p.1-8, 1980.

KLIMBERG, V.S., NWOKEDI, E., HUTCHINS, L.F., PAPPAS, A.A., LANG, N.P., BROADWATER, J.W., READ, R.C., WESTBROOK, K.C. Glutamine facilitates chemotherapy while reducing toxicity. **J. Parent. Enteral Nutr.**, Copenhagen, v.16, p.83S-87S, 1994.

KLIMBERG, V.S., KORNBLUTH, J., CAO, Y., DANG, A., BLOSSOM, S., SCHAEFFER, R. Glutamine supresses PGE₂ synthesis and breast cancer growth. **J. Surg. Res.**, Orlando, v.63, p.293-297, 1996.

KOPANS, D.B. Epidemiology, etiology, risk factors, survival, and prevention of breast cancer. In: **Breast Imaging** 2.ed., Lippincott Publishers – Philadelphia, 1998.

KOVACEVIC', Z.', MORRIS, H.P. The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.32, p.326-333, 1972.

- KOVACEVIC', Z., MCGIVAN, J.D. Mitochondrial metabolism of glutamine and glutamate and its physiological significance. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.63, p.547-605, 1983.
- KOWALCHUK , J.M., CURI, R., NEWSHOLME, E.A. Glutamine metabolism in isolated incubated adipocytes of the rat. **Biochem. J.**, London, v.249, p.705-708, 1987.
- KRESS, S., STEIN, .A., MAURER, P., WEBER, B., REICHERT, J., BUCHMANN, A., HUPPERT, P., SCHWARZ, M. Expression of hypoxia-inducible genes in tumor cells. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, Heidelberg, v.124, n.6, p.315-320, 1998.
- KUHN, N. J. Glucose as a fuel for the mammary gland. **Biochem. Soc. Trans.**, Essex, v.6, n.3, p.539-543, 1978.
- KURTZ, J.M., JACQUEMIER, J., AMALRIC, R., BRANDONE, H., AYME, Y., HANS, D., BRESSAC, C., SPITALIER, J.M., Why are local recurrences after breast-conserving therapy more frequent in youger patients? **J. Clin. Oncol.**, Orlando, v.8, p.591-598, 1990.
- LANDIS, S.H., MURRAY, T., BOLDEN, S., WINGO, P.A Cancer statistics. **CA Cancer J. Clin.**, Hagerstown, v.48, p.6-29, 1998.
- LAVIETES, B.B., REGAN, D.H., DEMOPOULOS, H.B. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. 71, p.3993-3997, 1974.
- LAZO, P.A. Aminoacids and glucose utilization by different metabolic pathways in Ascites-tumor cells. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.117, p.19-25, 1981.
- LEEK, R., LEWIS, C.E., WHITEHOUSE, R., GREENAL, M., CLARKE, J., HARRIS, A.L. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and

prognosis in invasive breast carcinoma. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.56, p.4625-4629, 1996.

LEWIS, B.J. Câncer de mama. In: WYNGAARDEN, J.B., SMITH Jr., L.H., BENNETT, J.C., CECIL, R.F., eds. **CECIL Tratado de medicina interna**. 19ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 1993, v.2, p.1409-1414.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, L., RANDALL, R. Protein measurement with the folin phenol reagents. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.193, p.265-275, 1951.

LYON, R.C., COHEN, J.S., FAUSTINO, P.J., MEGNIN, F., MYERS, C.E. Glucose metabolism in drug-sensitive and drug-resistant human breast cancer cells monitored by resonance spectroscopy. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.48, p.870-877, 1988.

LYONS, S.D., SANT, M.E., CHRISTOPHERSON, R.I. Cytotoxic mechanisms of glutamine antagonists in mouse L1210 leukemia. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.265, p.11377-11381, 1990.

MacDONALD, F., FORD, C.H.J. General principles. In: MacDONALD, F., FORD, C.H.J. **Molecular Biology of Cancer**, 1st ed., 1997, p.1-11, Bios Scientific Publishers, Oxford.

MANSOUR, T.E. Studies on heart phosphofructokinase: purification, inhibition, and activation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.238, p.2285-2292, 1963.

MARCHANT, D.J. Doenças não-malignas da mama. In: **CECIL Tratado de Medicina Interna**. Wyngaarden, J.B., Smith Jr., L.H., Bennett, J.C. 19ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, 1993, p.1406-1409.

- MARCHUT, E., GUMIN'SKA, KEDRINA, T., RADZIKOWSKI, Cz, KUSNIERCZYK, H. A pyruvate kinase variant in different mouse transplanted tumors. **Experientia**, Basel, v.44, p. 25-27, 1988.
- MATSUNO, T. Bioenergetics of tumor cells: glutamine metabolism in tumor cell mitochondria. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.19, p. 303-307, 1987.
- MATSUNO, T. Oxidation of cytosolic NADH by the malate-aspartate shuttle in HuH13 human hepatoma cells. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.24, p.313-315, 1992.
- MAXWELL, P.H., DACHS, G.U., GLEADLE, J.M., NICHOLLS, L.G., HARRIS, A.L., STRATFORD, I.J., HANKINSON, O., PUGH, C.W., RATCLIFFE, P.J. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.94, p.8104-8109, 1997.
- MAZUREK, S., BOSCHEK, C.B., EIGENBRODT, E. The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.29, n.4, p.315-330, 1997.
- MCCARTY, K.S., TUCKER, A.T. Breast. In: STERNBERG, S.S., ed. **Histology for pathologists**, New York: Raven Press, 1992.
- MEDINA, M.A., SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. QUESADA, A.R. MÁRQUEZ, J., NUÑEZ DE CASTRO, I. Glutamine and glucose as energy substrates for Ehrlich ascites tumor cells. **Biochem. Int.**, v.16, p.339-34, 1988
- MEDINA, M.A., CASTRO, I.N. Glutaminolysis and glycolysis interactions in proliferant cells. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.22, p. 681-683, 1990.
- MILAZZO, G., YIP, C.C., MADDUX, B.A., VIGNERI, R., GOLDFINE, I.D. High affinity insulin binding to an atypical insulin-like growth factor-I receptor in

human breast cancer cells. **J. Clin. Invest.**, New York, v.89, p.899-908, 1992.

MOULE, S.K., McGIVAN, J.F. Epidermal-growth factor stimulation of gluconeogenesis in isolated rat hepatocytes involves the inactivation of pyruvate kinase. **Biochem. J.**, London, v.255, p.361-364, 1988.

MOTOKURA, T., ARNOLD, A. Cyclins and oncogenesis. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam. v.1155, p.63-78, 1993.

NAGAI, M.A., SONOHARA, S., BRENTANI, M.M. Estrogen control of lactate dehydrogenase isozyme-5 in human breast cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v.41, p.10-16, 1988.

MUKHOPADHYAY, D., AKBARALI, H.I. Depletion of $[Ca^{2+}]_i$ inhibits hypoxia-induced vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New York, v.229, p.733-738, 1996.

NEEMAN, M., ELDAR, H., RUSHKIN, E., DEGANI, H. Chemotherapy-induced changes in the energetics of human breast cancer cells, ^{31}P - and ^{13}C - NMR studies. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1052, p.255-263, 1990.

NEWELL, K.J., TANNOCK, I.F. Reduction of intracellular pH as a possible mechanism for killing cells in acidic regions of solid tumors: effects of carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.49, p.4477-4482, 1989.

NEWSHOLME, E.A., NEWSHOLME, P., CURI, R. Role of citric acid cycle in cells of the immune system and its importance in sepsis, trauma and burns. **Biochem. Soc. Symp.**, Essex, v.54, p.145-161, 1988.

- NICHOLSON, R. I. , McCLELLAND, R. A., GREE, J. M. W., MANNING, P. C., OKADA, F., RAK, J. W., St CROIX, B., LIEUBEAU, B., KAYA, M., RONCARI, L., SHIRASAWA, S., SASAZUKI, T., KERBEL, R.S. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.95, p.3609-3614, 1998.
- NG, P., KALLINOWSKI, F., OKUNIEFF, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.49, p. 6449-6465, 1989.
- NOLTMAN, E.A. Phosphoglucose isomerase . **Methods Enzymol.**, New York, v.9, p. 557-565 1966.
- OKADA, F. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant k-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but no sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.95, p. 3609-3614, 1998.
- OVERGAARD, J. Sensitization of hypoxic tumour cells - clinical experience. **Int. J. Radiat. Biol.**, Basingstoke, v.56, p. 801-811, 1989.
- PARKIN, D.M., PISANI, P., FEERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers. **Int. J. Cancer**, New York, v.54, p.594-606, 1993.
- PARRY-BILLINGS, M., LEIGHTON, B., DIMITRIADIS, G.D., CURI, R. The effect of tumour bearing on skeletal muscle glutamine metabolism. **Int. J. Biochem.**, Oxford, v.23, p. 933-937, 1991.

- PEDERSEN, P.L. Bioenergetics of cancer cells. **J. Bioenerg. Biomembr.**, New York, v.29, n.4, p.301-302, 1997.
- PLAXTON, W.C., STOREY, K.B. Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from hepatopancreas of the channelled whelk, *Busycotypus canaliculatum*. **Arch. Biochem. Biophys**, New York, v.243, n.1, p.195-205, 1985.
- PUPA, S.M., MENARD, S., ANDREOLA, S., COLNAGHI, M.I. Antibody response against the c-erbB2 oncoprotein in breast carcinoma. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.53, p.5864-5866, 1993.
- QUINN, K.A., TRESTON, A.M., UNSWORTH, E.J., MILLER, M.J., VOS, M., GRIMLEY, C., BATTEY, J., MULSHINE, J.L., CUTTITA, F. Insulin-like growth factor expression in human cancer cell lines. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n.19, p.11477-11483, 1996.
- ROBERTSON, J.F.R., ELLIS, I.O. Transforming growth factor- α and endocrine sensitivity in breast cancer. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.54, 1684-1689, 1994.
- ROSA, C.D. **Estudo da atividade metabólica e das enzimas glicolíticas do linfossarcoma de Sticker**. São Paulo, 1979, 125 p. (Tese de Doutorado – Instituto de Química, USP).
- ROTIN, D., ROBINSON, B., TANNOCK, I. F. Influence of hypoxia and an acidic environment on the metabolism and viability of cultured cells: potential implications for cell death in tumors. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.46, p.2821-2826, 1986.

- ROUSE, K., NWOKEDI, E., WOODLIFF, J. E., EPTEIN, J. Glutamine enhances selectivity of chemotherapy through changes in glutathione metabolism. **Ann. Surg.**, Hagerstown, v.221, p.420-426, 1995
- SARTORELLI, A.C. Therapeutic attack of hypoxic cells of solid tumors. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.48, p.775-778, 1988.
- SARTORELLI, A.C., BELCOURT, M.F., HODNICK, F., KEYES, S.R., PRITSOS, C.A., ROCKWELL, S. Preferential kill of hypoxic EMT6 mammary tumor cells by bioreductive alkylating agent porfiromycin. **Adv. Enzyme Regul.**, Oxford: Pergamon Press, v.35, p.117-130, 1995.
- SCHEIN, P., KISNER, D., BLECHER, M., HAMOSH, M. Cachexia of malignancy: potencial role of insulin in nutritional management. **Cancer**, Philadelphia, v.43, p.2070-2076, 1979.
- SCHELLENS, J.H.M., PRONK, L.C., VERWEIJ, J. Emerging drug treatments for solid tumours. **Drugs**, Auckland, v.51 n.1, p.45-72, 1996.
- SCHNIPPER, L.E. Clinical implications in tumor-cell heterogeneity. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.314, p.1423-1430, 1986.
- SCHWEIKI, D. NEEMAN, M., ITIN, A., KESHET, E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, Washington, v.92, p.768-772, 1995.
- SEBASTIAN, S., KENKARE, U. W. Insulin-like growth factor I induces tumor hexokinase RNA expression in cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, New york, v.235, p.389-393, 1997.
- SHAPOT, V.S. On the multiform relationships between the tumor and the host. In: **Adv. Cancer Res.**, New York, v.30, p.89-150, 1979.

- SHU, S., PLAUTZ, G. E., KRAUSS, J.C., CHANG, A.E. Tumor immunology. **Jama**, Chicago, v.278 n.22, p.1972-1981, 1997.
- SIRIS, E.S. Breast cancer and osteolytic metastases: can biphosphonates help? **Nature Med.**, New York, v.3, n.2, p. 151-154, 1997.
- SLAMON, D.J., GODOLPHIN, W., JONES, L.A, HOLT, J.A., WONG, S.G., KEITH, D.E., LEVIN, W.J. Studies of the HER/neu proto-oncogene in human breast cancer and ovarian cancer. **Science**, Washington, v.244, p.707-712, 1989.
- SMITH, H.S., WOLMAN, S.R., HACKETT, A.J. The biology of breast cancer at the cellular level. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 738, p. 103-123, 1984.
- SNELL, R.S. **Histologia Clínica**, Rio de Janeiro, Ed. Interamericana, p.71-86, 1985.
- SOUBA, W.W. Glutamine and cancer. **Ann. Surg.**, Hagerstown, v.218 n.6, p.715-728, 1993.
- SOUZA, A.Z., SALVATORE, C.A. **Mastologia Prática**, São Paulo: Manole, 1979, p. 361.
- SPYRATOS, F., OGLOBINE, J., LIDEREAU, R., HACENE, K., BRAULT, C., DESPLACES. Tissue glycolytic enzymes in primary breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy. **Eur. J. Cancer Clin. Oncol.**, Oxford, v.22, n.1, p.21-27, 1986.
- STEWART, T.H. M., HEPPNER, G.H. Immunological enhancement of breast cancer. **Parasitology**, Cambridge, v.115, p.S141-S153, 1997.

- STUBBS, M., VEECH, R.L., GRIFFITHS, J. R. Tumor metabolism: the lessons of magnetic resonance spectroscopy. **Adv. Enzyme Regul.**, Oxford: Pergamon Press, v.35, p.101-115, 1995.
- SUNDERLAND, M.C., McGUIRE, .L. Indicadores prognósticos no câncer de mama invasivo. **Clin. Cirurg. Am. Norte**, v.5, p.1041-1057, 1990.
- SUSOR, W.A., RUTTER, W.J. Method for detection of pyruvate kinase, aldolase and other pyridine nucleotide linked enzymes activities after electrophoresis. **Anal. Biochem.**, Baltimore, v.43, p.147-155, 1971.
- SUTHERLAND, R.M. Cell and environment interactions in tumor microregions: the spheroid model. **Science**, Washington, v.240, p.177-184, 1988.
- TAVASSOLI, F.A. **Pathology of the breast**. Appleton and Lange eds., Norwalk, Connecticut, 1992.
- TLSTY, T.D., JONCZYK, J., WHITE, A., SAGE, M., HALL, I., SCHAEFER, A., BRIOT, A., LIVANOS, E., ROELOFS, H., POULOSE, B., SANCHEZ, J. Loss of chromosomal integrity in neoplasia. **Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol.**, Cold Spring Harbor, v.58, p. 645-654, 1993.
- TOROSIAN, M. H., CHARLAND, S., LAPPIN, J. A. Biochemical modulation of tumor growth metastasis and host metabolism. **Oncol. Rep.**, Athens, v.2, p. 1141-1145, 1995.
- UNTERBURG, P., SINOP, A., NODER, W., BERGER, M.R., FINK, M., EDLER, L., SCHMÄHL, D., ERHART, H. Diabetes mellitus und mammarkarzinom (Eine retrospektive verlaufsstudie). **Onkologie**, Basel, v.13, p.17-20, 1990.
- UYEDA, K., RACKER, E. Regulatory mechanisms in carbohydrate metabolism (Hexokinase and Phosphofructokinase). **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.240, p.4682-4688, 1965.

- VAN DER BURG, B., DE GROOT, R.P., ISBRÜCKER, L., KRUIJER, W., DE LAAT, S.W. Stimulation of TPA-responsive element activity by a cooperative action of insulin and estrogen in human breast cancer cells. **Mol. Endocrinol.**, Baltimore, v.4, p.1720-1726, 1990.
- VAN DER VIJVER, M., NUSSE, R. The molecular biology of breast cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1072, p.33-50, 1991.
- VAUPEL, P.W. FRINAK, S., BICHER, H. I. Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.41, p.2008-2013, 1981.
- VAUPEL, P., KALLINOWSKI, F., OKUNIEFF, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors. **Cancer Res.**, Philadelphia, v.49, p.6449-6465, 1989.
- VAUPEL, P., SCHLENGER, K., KNOOP, C., HÖCKEL, M. Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O₂ tension measurements. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 51, p.3316-3322, 1991.
- VIEIRA, R., VECCHIA, M.G., BITTENCOURT JR., P.I.H., ALMEIDA, A.F., FERNANDES, L.C., CURI, R. Development of high speed homogenizer for tissues. **Arq. Biol. Technol.**, Curitiba, v.32 n.3, p.495-505, 1987.
- VILLELA, G.G., BACILA, M., TASTALDI, H. **Técnicas e experimentos de bioquímica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1973, 552p.
- VITOLO, D., ZERBE, T., KANBOUR, A., DAHL, C., HEBERMAN, R.B., WHITESIDE, T.L. Expression of mRNA for cytokines in tumor-infiltrating mononuclear cells in ovarian adenocarcinoma and invasive breast cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v.51, p.573-580, 1992.

- WALKER, R.A., JONES, J.L., CHAPPELL, S., WASH, T., SHAW, J.A.
Molecular pathology of breast cancer and its application to clinical management. **Cancer Metastasis Rev.**, Dordrecht, v. 16, p.5-27, 1997.
- WALTER, G. & MUMBY, M. Protein serine/threonine phosphatases and cell transformation. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1155, p.207-226, 1993.
- WARBURG, O. , WIND, F., NEGELEIN, E. Über den Stoffwechsel von tumoren in korper. **Klin. Woch.**, v.5, p.829-832, 1930, apud BAGGETTO, 1992.
- WARBURG, O.The metabolism of tumors. London: Constable, 1930, apud KALLINOWSKI, 1988.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, Washington, v. 123 n.3191, p. 309-314, 1956.
- WASA, M., BODE, B.P., ABCOUWER, S.F., COLLINS, C.L., TANABE, K.K., SOUBA, W.W. Glutamine as a regulator of DNA and protein biosynthesis in human solid tumor cell lines. **Ann. Surg.** Philadelphia, v.224, n.2, p.189-197, 1996.
- WEBER, G. Enzymology of cancer cells. First part. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 296, p. 486-493, 1977.
- WEBER, G. Enzymology of cancer cells. Second part.. **N. Engl. J. Med.**, Boston, 296, v.541-551, 1977.
- WEIDNER, N., SEMPLE, J.P., WELCH, W.R., FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis and metastasis- correlation in invasive breast carcinoma. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.324, p.1-8, 1991.

- WEINHOUSE, S., SHATTON, J.B., CRISS, W.E. Molecular forms of enzymes in cancer. **Biochimie**, Paris, v.54, p. 685-693, 1972.
- WEINHOUSE, S. New dimensions in the biology of cancer. **Cancer**, Philadelphia, v.45, p. 2975-2980, 1980.
- WILLIAMSON, D.H. Integration of metabolism in tissues of the lactating rat. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.117, p.K93-K 105, 1980.
- WILLIAMSON, D., EVANS, R.D., WOOD, S.C. Tumor growth and lipid metabolism during lactation in the rat. **Adv. Enzyme Regul.**, Oxford: Pergamon Press, v. 27, p. 93-104, 1987.
- ZELZER, E., LEVY, Y., KAHANA, C., ZHION-SILO, RUBINSTEIN, M., COHEN, B. Insulin reduces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 α /ARNT. **Embo J.**, Oxford, v.17, p.5085-5094, 1998.
- ZIELKE, H.R., OZAND, P.T., TILDON, J.T., SEVDALIAN, D.A., CORNBLATH, M. Reciprocal regulation of glucose and glutamine utilization by cultured human diploid fibroblasts. **J. Cell. Physiol.**, New York, v.95, p.41-48, 1978.