

Metabolismo da Célula Tumoral - Câncer como um Problema da Bioenergética Mitocondrial: Impedimento da Fosforilação Oxidativa - Fisiopatologia e Perspectivas de Tratamento.

De uma maneira peculiar, as células cancerosas produzem energia preferentemente pela glicólise anaeróbica em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial (Warburg - 1926 ; Reitzer - 1979 ; Rossignol - 2004).

Das 3 principais funções da mitocondria: 1-produção de energia (ATP - trifosfato de adenosina) ; 2- geração de espécies reativas tóxicas de oxigênio e 3- regulação da morte celular programada , vamos nos ater na função bioenergética da mitocondria.

A fosforilação oxidativa fornece energia para o citoplasma e a glicólise anaeróbica para o núcleo. O núcleo parece ser o compartimento mais susceptível à deficiência de ATP, não somente nas células normais como nas células malignas.

A perda de ATP no núcleo de células malignas possui consequências drásticas provocando o impedimento de cruciais funções celulares como a transcrição e a replicação do DNA. Se isto acontecer, isto é, o predomínio da fosforilação oxidativa sobre a glicólise, o que provoca a queda do ATP nuclear, as consequências para o hospedeiro serão benéficas porque a diminuição da energia para o núcleo provocará drástica diminuição da proliferação celular e apoptose.

De fundamental importância é a relação entre o potencial transmembrana e a proliferação celular. Clarence Cone, Cameron e outros mostraram que a queda do potencial transmembrana a níveis inferiores a -15 milivolts , desencadeia a síntese de DNA e dispara a multiplicação celular : mitose. Normalmente o potencial transmembrana das células está ao redor de - 20 a -90mv, sendo mantido pela fosforilação oxidativa

A diminuição de produção de ATP via fosforilação oxidativa, impede o funcionamento da bomba de Na^+/K^+ e despolariza a membrana celular. Se a despolarização atingir os -15mv, dispara um mecanismo de síntese de DNA nuclear dependente da glicólise anaeróbica e a consequente mitose

Um grande estudioso francês do metabolismo tumoral afirma que as células cancerosas apresentam uma grande variedade de estados de diferenciação, indo de células altamente diferenciadas, perto da célula parente original, com uma glicólise anaeróbica normal e uma baixa taxa de crescimento; até células altamente indiferenciadas com alta glicólise anaeróbica e rápida velocidade de crescimento (Baggetto - 1992) .

As células cancerosas são metabolicamente adaptadas para o rápido crescimento e proliferação em condições de pH ácido e baixas tensões de oxigênio, condições nas quais as células normais pouco cresceriam ou mesmo não conseguiriam sobreviver (Griffiths - 2001).

As recentes técnicas genômicas e proteômicas, permitiram a análise do padrão de expressão de genes e proteínas associados com o fenotipo de um particular tipo de tumor, proporcionando o firme conhecimento da assim chamada "assinatura do câncer" (Ramaswamy - 2003 ; Liotta - 2003).

Recentemente autores espanhóis redescobriram e confirmaram a assinatura do câncer nos tumores humanos mais comuns: mama, pulmão, colo-retal, fígado, rins, estômago e esôfago demonstrando sem sombra de dúvida a existência de impedimento da fosforilação oxidativa mitocondrial, atestada experimentalmente pela diminuição da expressão da beta1 - F1 - ATPase nos mitocôndrios desses tumores. (Isidoro e Cuezva - 2004) .

Estes estudos de 2004 mostram que a alteração da função bioenergética da mitocondria é a pedra fundamental da carcinogênese, como foi escrito por Otto Warburg em 1926.

Mostraremos extensa literatura demonstrando que a célula maligna possui um defeito mitocondrial na fosforilação oxidativa e que este defeito pode ser reversível. E o mais importante, quando melhoramos a função mitocondrial da célula maligna e desviamos a produção de energia da via anaeróbica para a fosforilação oxidativa, o tumor pára de se proliferar e caminha para a diferenciação celular e posterior morte celular

programada ou parte diretamente para a apoptose. No final discutiremos as perspectivas de tratamento do câncer baseados na fisiopatologia exposta.

Breve Histórico

Foi há quase 80 anos atrás, que o famoso bioquímico alemão Otto Warburg enunciou uma das mais importantes teorias sobre o desenvolvimento e crescimento do câncer : impedimento respiratório (Warburg,1926).

Warburg fez duas observações experimentais e propôs uma hipótese. É necessário diferenciarmos a observação da hipótese e a hipótese da intuição.

A primeira observação foi que na ausência de oxigênio , tanto o tecido tumoral como o tecido normal, utilizam glicose e produzem ácido láctico no processo chamado de glicólise anaeróbia. Geralmente, mas não sempre, o tecido tumoral produz mais ácido láctico que o tecido normal.

A segunda observação foi que ambos os tecidos, normal e neoplásico, produzem menos ácido láctico na presença de oxigênio (glicólise aeróbia) do que na presença de nitrogênio (glicólise anaeróbia). Warburg , chamou este fenômeno de Efeito Pasteur, baseado na observação do famoso cientista francês, na qual a levedura cessa a fermentação quando exposta ao oxigênio .

Neste trabalho , Warburg utilizou 14 tipos de tecidos normais e 15 tipos diferentes de tumores sólidos, de vários animais .

Estas observações são fundamentais e de relevante importância, porém a hipótese de Warburg, logo a seguir descrita tem mais a ver com a intuição deste magnífico pesquisador.

Hipótese de Warburg

Transcrevemos aqui as palavras do prefácio do seu livro sobre metabolismo tumoral (1926) :

"Enquanto que as células normais morrem se forem mantidas em glicólise anaeróbia, as células tumorais não somente continuam a existir, mas são capazes de crescer a uma extensão sem limite, com a energia química proveniente da glicólise.

A glicólise anaeróbia da célula tumoral é derivada em qualquer caso de um distúrbio da respiração. Como regra, a respiração da célula tumoral é pequena, mas recentemente encontrou-se tumores com respiração elevada.

Seja a respiração tumoral pequena ou grande, a glicólise anaeróbia está sempre presente. A respiração está sempre perturbada e ela é incapaz de provocar o desaparecimento da fermentação (glicólise) . Assim os dois tipos de distúrbios da respiração que podem ser artificialmente produzidos nas células normais - limitar a extensão da respiração ou impedir o efeito da respiração - ocorrem naturalmente nos tumores "

Warburg concluiu que as células tumorais possuem um distúrbio da fosforilação oxidativa mitocondrial e que são perfeitamente viáveis e se reproduzem com a energia proveniente quase que exclusivamente da glicólise.

Weinhouse em 1976, escreve que apesar do maciço esforço despendido durante os 50 anos que antecedem 1976, na procura de alterações da função ou da estrutura da mitocondria, não se encontrou evidências substanciais que indiquem um defeito respiratório ou da cadeia de transporte de elétrons ou do acoplamento da respiração, na formação de ATP via fosforilação oxidativa. Weinhouse conclui o seu trabalho, de maneira desalegrante afirmando que o impedimento da fosforilação oxidativa e o aumento da glicólise anaeróbia é maneira muito simplista de enxergar algo de tão complexo como o câncer.

Mal sabia o arrogante autor que a intuição do mestre era mais forte que todo o raciocínio existente na década de 30 e toda técnica da década de 70 , porque nos últimos 20 anos com técnicas bioquímicas, ultra estruturais e genômicas mais refinadas de estudo dos mitocondrias comprovou-se as idéias de Warburg sobre o metabolismo energético no câncer: impedimento da fosforilação oxidativa.

O Efeito Pasteur e o Efeito Crabtree

As relações mútuas entre a glicólise e a fosforilação oxidativa são refletidas nos efeitos Pasteur e Crabtree.

O efeito Pasteur é a inibição da glicólise pela fosforilação oxidativa ou a inibição da fermentação pela adição de oxigênio. Este efeito ocorre na maioria dos tecidos.

O efeito Crabtree é a inibição da fosforilação oxidativa que ocorre quando se estimula a glicólise. Este efeito é observado somente nos tipos de células com alta atividade glicolítica como as leveduras e as células tumorais.

O ATP das células é derivado de duas fontes: glicólise e fosforilação oxidativa (FO). A FO é característica dos organismos aeróbios e fabrica 17 vezes mais ATP por mol de glicose, do que a glicólise anaeróbia. Essas duas vias estão localizadas em compartimentos celulares diferentes, a glicólise no citoplasma e a FO na mitocondria, porém ambas promovem a fosforilação do ADP pelo Pi (fósforo inorgânico), para gerar ATP.

Sussman em 1980, baseado em elegante trabalho sugeriu que tanto o fluxo glicolítico como a velocidade respiratória, são regulados primariamente pela relação $ATP/ADP \times Pi$, existente no citoplasma, por mecanismos bem diferentes.

A FO é regulada pela energia livre da hidrólise do ATP. Assim a FO aumenta se a relação $ATP/ADP \times Pi$ diminui e a FO diminui se a relação $ATP/ADP \times Pi$ aumenta.

As enzimas reguladoras da glicólise são ativadas pelo ADP, AMP e o Pi e inibida pelo ATP. Assim a glicólise aumenta se a relação $ATP/ADP \times Pi$ diminui e a glicólise diminui se a relação $ATP/ADP \times Pi$ aumenta..

O papel do fósforo inorgânico (Pi) intracelular como variável independente pode ser assim entendido.

Quando a concentração intracelular de Pi cai a níveis muito baixos (1 milimol) a utilização celular de ATP torna-se severamente inibida, aumentando o ATP disponível o que leva a um grande aumento da relação $ATP/ADP \times Pi$, por alteração no numerador e denominador, com a conseqüente inibição de ambas as vias produtoras de ATP, glicólise e FO. Essa depleção tão severa raramente ocorre em clínica.

Quando a concentração de Pi intracelular está elevada, ela estimula a velocidade de utilização do ATP. Quando o Pi intracelular é alto os níveis de ATP são baixos e coexistem com glicólise e FO elevados.

É muito importante sabermos para onde vai o ATP produzido pela glicólise anaeróbia e pela fosforilação oxidativa.

O ATP Gerado pela Glicólise e pela Fosforilação Oxidativa Alimentam Compartimentos Intracelulares Diferentes : A Glicólise Anaeróbia é o Motor da Mitose porque Fornece Energia para o Núcleo

Mesmo com os poucos recursos da década de 30, Dickens e Simer analisando o quociente respiratório de células cancerosas e células normais foram capazes de verificar que a energia para o crescimento do câncer era proveniente da glicólise anaeróbia e que não havia relação entre o crescimento tumoral e a glicólise aeróbia.

Hopkins e Elliott em 1931 e posteriormente Needham e Lehmann em 1937, demonstraram que as primeiras mitoses de um embrião apenas necessitam da energia proveniente da glicólise anaeróbia e isto somente acontece na presença da glutatona reduzida (GSH).

Estas foram as primeiras evidências que mostraram em biologia que o motor da mitose é o ATP produzido pela via anaeróbia. Todos estes trabalhos pioneiros foram confirmados recentemente.

Nos últimos 20 anos foi proposto que os compostos de alta energia são compartimentalizados nas células (Erickson - Viitanen -1982a e 1982b, Saks - 1994).

Em 2003, Carl Gajewski e colaboradores, da Universidade de Cornell nos lembraram novamente que os compostos de alta energia, como o ATP, são compartimentalizados dentro das células e as diferentes funções celulares são mantidas por diferentes "pools" de ATP. Parte deste ATP deriva da fosforilação oxidativa (F.O.) mitocondrial e o restante é proveniente da glicólise.

Desta forma uma disfunção da F.O. afeta diferentes compartimentos celulares em graus também diferentes.

Com a utilização dos substratos da glicólise, tanto as células com mitocondria normal ("wild") como as células com mitocondria mutante, mantêm o suprimento adequado de ATP para os principais compartimentos celulares: citoplasma, região sub plasmática da membrana, mitocondria e núcleo. Pelo contrário, com a utilização dos substratos da F.O. (neste trabalho, o piruvato) temos duas situações diferentes. Nas células mutantes., os níveis de ATP diminuem no núcleo e em todos os outros compartimentos e nas células normais os níveis de ATP se mantêm no citosol e na região subplasmática da membrana entretanto, surpreendentemente também diminuem drasticamente no núcleo.

A severa diminuição do ATP nuclear sob "somente fosforilação oxidativa", implica que a deficiência nuclear de ATP desempenha papel importante e não apreciado em

pacientes com disfunção mitocondrial como acontece no envelhecimento, doenças degenerativas e câncer.

Desta maneira, a distribuição do ATP não é uniforme nos compartimentos celulares, sugerindo que a partição das moléculas fosforiladas de alta energia na célula não ocorrem por difusão do ATP simplesmente obedecendo a gradientes de concentração.

Em células com mitocôndrias normais (não mutante) quando a F.O. mitocondrial é a única fonte de energia, o ATP é exportado preferencialmente da mitocôndria para o citosol e membrana subplasmática e não fornece energia para a mitose (núcleo) .

Em condições de fosforilação oxidativa , particularmente quando o suprimento de ATP se torna limitado, o núcleo parece ser o compartimento mais susceptível à deficiência de ATP , não somente nas células mutantes como também nas células normais ("wild") .

A perda de ATP no núcleo destas células possui conseqüências drásticas, resultando no impedimento de cruciais funções celulares , como a transcrição e a replicação do DNA.

Se isto acontecer em uma célula maligna, isto é, o predomínio da F.O. sobre a glicólise, as conseqüências serão benéficas para o hospedeiro pois, a diminuição de energia para o núcleo provocará drástica diminuição da proliferação celular e apoptose.

Alteração da Função e da Estrutura na Mitocôndria Tumoral

As células malignas apresentam várias alterações estruturais e de função mitocondrial , o que acarreta a diminuição da produção de ATP, via fosforilação oxidativa (F.O.)

- diminuição da liberação de Ca^{++} induzido por hidroperóxidos ou drogas desacopladoras (Fiskum and Cockrell-1985 , Fiskum and Pease- 1986)
- diminuição do efluxo de citrato do Ciclo de Krebs (Moreadith - 1984 , Parlo - 1984)
- diminuição da troca ATP - ADP (Eboli - 1979 , Barbour - 1983 , Lau and Chan - 1984)
- diminuição da atividade da ATPase (Pedersen - 1979 , Luciakoya - 1984 , Papa - 1988 , Chernyak - 1991)
- altos níveis de algumas enzimas , tais como glutaminase (Kovacevic - 1972 , Abou-Khalil - 1981 , Kovacevic -1991) e enzima málica (Sauer -1978 , Moreadith - 1984)
- aumento da expressão da síntese de acetoina (Baggeto and Lehninger - 1987 , Baggeto and Testa-Perussini - 1990)
- diminuição do número de mitocôndrias (Cuezva - 2002)
- alterações da ultra estrutura mitocondrial (Springer - 1980; Hoberman - 1975; Arcos - 1971)
- diminuição do conteúdo dos complexos da F.O. (Cuezva - 2002 ; Simonnet - 2002 ; Irwin - 1978 ; Senior - 1975 ; Stocco - 1980)
- diminuição da atividade da cadeia respiratória (Stocco-1980 ; Boitier - 1995)
- diminuição da expressão de genes dependentes da F.O. (Weber - 2002)
- diminuição da quantidade de DNA mitocondrial (Simonnet - 2002)
- alteração ultraestrutural da cadeia de transporte de elétrons com escape de elétrons (Arcos - 1971)
- diminuição da expressão de uma subunidade beta catalítica da H^{+} - ATP sintase a Beta1 - F1 - ATPase (Isidoro e Cuezva - 2004 ; Cuezva - 2002)

Altas concentrações de cálcio inibem tanto a fosforilação oxidativa das mitocôndrias tumorais como a das mitocôndrias normais. Concentrações micromolares de cálcio iônico possuem efeitos de estimulação em ambos os tipos de células, embora quantitativamente diferentes.

Arcos em 1971, sugere a alteração ultraestrutural da cadeia de transporte de elétrons com escape de elétrons como uma das explicações do "impedimento respiratório" de certos tumores. Inicialmente acontece considerável alteração ou mesmo a deleção do sistema efetor mecânico - químico, responsável pelo inchaço e contração da mitocôndria. O sistema efetor localizado na membrana está ligado à cadeia respiratória em uma posição adjacente à seqüência do acoplamento responsável pela fosforilação.

A seqüência de enzimas respiratórias que se localizam na membrana interna mitocondrial estão cobertas por lípidos para isolar o transporte de elétrons da fase aquosa e evitar "curto-circuito" e este sistema efetor mecânico - químico pode sofrer "lesão" devido às alterações metabólicas dos ácidos graxos, fosfolípidos e colesterol, componentes desta membrana interna.

Arcos propõe que por causa do escape de elétrons através desta "lesão", uma porção do fluxo de elétrons resultante da dehidrogenação do substrato não consegue alcançar o aceptor terminal, o oxigênio, desta forma mesmo que a velocidade de dehidrogenação possa permanecer inalterada, temos uma diminuição da velocidade respiratória.

Está bem estabelecido que o transporte de elétrons, o inchaço - contração da mitocondria e a fosforilação oxidativa são processos intimamente relacionados.

A mudança de volume mitocondrial pode ser passiva ou ativa. Nas mudanças passivas o volume simplesmente responde à osmolaridade do meio. Na forma ativa o inchaço depende do transporte de elétrons e ocorre com os "indutores de inchaço" : Ca^{++} , Hg^{++} , PO_4^{--} , tiroxina e hidrocortisona. O inchaço ativo é acompanhado pela queda do "pool" de ATP. Pelo contrário, na presença de Mg^{++} , aumenta o "pool" de ATP, o que contrai a mitocondria inchada.

Na mitocondria tumoral o sistema efector mecano - químico está ausente ou alterado gravemente, o que é indicado pela considerável perda da habilidade desta mitocondria inchar sob o efeito de diferentes indutores ou contrair pelo ATP- Mg^{++} (Arcos - 1969a e 1969b) e também pela inabilidade de se observar ao microscópio eletrônico as transições ultra estruturais dependentes do estado respiratório.

A perda de função do sistema efector mecano - químico ligado à cadeia de transporte de elétrons é devida à quebra da arquitetura do sistema transdutor de energia. Esta arquitetura da membrana interna mitocondrial é formada por camadas de lípidos que isolam a sequência de enzimas respiratórias da fase aquosa.

Sabemos muito bem das consideráveis alterações do metabolismo dos ácidos graxos, fosfolípidos e colesterol que ocorrem na célula tumoral (Busch - 1964 ; Carruthers ? 1967). Quando acontece alterações lipídicas na membrana interna mitocondrial a sua produção de energia diminui . Vários trabalhos indicam que drásticas modificações da ingestão de lípidos da dieta, como o deficit de ácidos graxos polinsaturados provocam alterações ultra estruturais e prejuízo da função mitocondrial (Johnson - 1963 ; Waite & Van Golde - 1968 ; Smithson - 1969) .

A possível existência de lesões ultra estruturais da cadeia de transporte de elétrons nos quais os transportadores são expostos à fase aquosa, fez surgir a hipótese do "curto-circuito" de Green, Mackler, Repaske e Mahler em 1954.

Como a quebra da arquitetura que envolve a região do sistema efector mecano - químico poupa o sistema de acoplamento, mitocondrias tumorais podem apresentar consumo de oxigênio normal ou levemente diminuído, coexistindo com a diminuição de produção de ATP.

Uma vez que a perda da habilidade do inchaço - contração mitocondrial, considerado como instrumental na glicólise aeróbia das células -"lesão" da camada lipídica isolante (Arcon - 1971).

O mais interessante para nós clínicos foi que Arcos mostrou que esta região mitocondrial lesada é susceptível de reparo nos seres humanos porque o impedimento respiratório, in vitro, é substancialmente diminuído ou até abolido pela adição de lípidos totais, obtidos de mitocondrias normais (Arcos - 1971).

Possivelmente esta sopa lipídica extraída de mitocondrias normais esteja "contaminada" com vit.B2, vitB3, Coenzima Q10 , carnitina, etc , isto é, com os fatores envolvidos no adequado funcionamento da mitocondria.

Quanto aos elétrons que escapam da cadeia respiratória, eles podem ser capturados pelas estruturas vizinhas produzindo espécies moleculares com elétrons não pareados na camada de valência : radicais livres. De fato Vithayathil em 1965, notou o aparecimento de radicais livres no fígado durante a administração de agentes carcinogênicos . Surge aqui a seguinte sequência de eventos : o carcinogênico lesa a membrana mitocondrial , provoca escape de elétrons, os quais aumentam a geração de radicais livres que vão lesar o DNA, é o que denominamos de fase de inicialização do câncer. A lesão do mitocondria diminuindo a fosforilação oxidativa faz surgir o predomínio da glicólise aneróbia, motor da mitose : proliferação celular maligna.

**carcinógeno químico---- lesão de ----->
escape de elétrons --> Radicais ----->
lesão DNA**

**vírus-----
livres**

membrana

**agente físico----- mitocondrial ----
---> diminuição da F.O. ----> proliferação
celular**

A H⁺ - ATPsintase é o complexo proteico mitocondrial responsável pela maravilhosa engenharia de produção de ATP (Yoshida - 2001) e também pela eficiente execução da morte celular programada (Harris - 2000 ; Dey - 2000 ; Matsuyama - 1998).

Em 2002 , José Cuezva - F1 - ATPase no carcinoma de fígado, rim e colo-retal, indicando a existência de uma assinatura bioenergética do câncer, já visualizada por Warburg em 1926.

Em 2004, Isidoro e Cuezva, analisaram marcadores da glicólise e da mitocondria em outros tipos de câncer: adenocarcinoma de mama, estômago e próstata; carcinoma de pulmão e carcinoma epidermoide de esôfago. Quando comparado com os tecidos normais correspondentes, os autores encontraram significante diferença na expressão dos marcadores glicolíticos e mitocondriais em todos esses tipos de câncer exceto no de próstata.

De um modo geral a expressão da beta1 - F1- ATPase estava significativamente reduzida no adenocarcinoma de mama e gástrico, no carcinoma de pulmão e no carcinoma epidermoide de esôfago, sugerindo fortemente que a alteração da função bioenergética da mitocondria é a pedra fundamental nestes tipos de câncer.

Desta forma os autores conseguiram demonstrar um marcador molecular da carcinogênese, operando nos tumores malignos humanos mais comuns : mama, pulmão, colo-retal, fígado, estômago, rins e esôfago.

A consequência metabólica do impedimento mitocondrial é o desvio de produção de ATP celular via glicólise anaeróbia. De fato foi observado pelos mesmos autores o aumento de dois marcadores da glicólise anaeróbia, o GAPDH (gliceraldeido-fosfato-dehidrogenase) no câncer de mama, pulmão, colo-retal, gástrico e rins e o PK (piruvato kinase) nos tumores de mama.

Será descrito mais adiante que é a via glicolítica que fornece ATP para o núcleo, sendo portanto a responsável pela síntese de DNA nuclear e portanto ela é considerada como o "motor da mitose" : proliferação celular maligna.

A descoberta da diminuição da expressão da beta1 - F1- ATPase na maioria dos tumores humanos nos mostra o papel da verdadeira contribuição do impedimento da fosforilação oxidativa mitocondrial na carcinogênese humana.

Presença de DNA Mutante na Mitocondria Tumoral

Mutações somáticas do DNA mitocondrial (mtDNA), foram identificadas em vários tumores humanos e linhagens de células malignas.

Estas mutações incluem:

- deleções intragênicas (Horton- 1996)
- erros na cadeia terminal (Polyak - 1998)
- alterações nas seqüências homopoliméricas (Habano - 1998) células tumorais.

Em princípio essas mutações podem diminuir a produção de ATP , via fosforilação oxidativa e contribuir para a transformação neoplásica. Elas também podem provocar um aumento do estresse oxidativo mitocondrial e a modulação da apoptose.

NAD+ (nicotinamida adenina dinucleotido oxidado) e a Fosforilação Oxidativa

A baixa captação de oxigênio pela mitocondria tem sido atribuída à deficiência de NAD⁺ e vários trabalhos têm mostrado que a oxidação do piruvato e dos substratos do ciclo do ácido cítrico são aumentadas pela adição de NAD⁺ (Wenner and Weinhouse - 1953 ; Hawtrey and Silk -1960) .

Quando os níveis de NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado ou piridino nucleotídeo oxidado) caem na célula, o metabolismo torna-se dependente de enzimas da glicólise anaeróbia, GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e outras desidrogenases contendo piridino nucleotídeos .

A perda de NAD⁺ mitocondrial na presença de NAD glicohidrolases ativas, provocam o aumento da glicólise anaeróbia e o aumento da acidez intracelular, por aumento de ácido láctico. A transformação de ácido láctico em piruvato requer a presença de NAD⁺ como cofator essencial.

O NAD⁺ é também cofator essencial da piruvato-dehidrogenase, isocitrato-dehidrogenase e alfaetoglutarato-dehidrogenase, enzimas do ciclo de Krebs.

O aumento da glicólise anaeróbia, freqüentemente associada com os tumores em fase de franco crescimento, pode ser causada em parte pela combinação do defeito mitocondrial e em parte pelos efeitos depletórios do NAD⁺ provocados pela ativação das NAD glicohidrolases ou das poli ADP-ribose polimerases.

Trabalhos que mostram diminuição do NAD⁺ nos tumores :

A diminuição do NAD⁺ intracelular observado nas células em proliferação maligna tem sido há muito tempo bem documentada (Von Euler-1938 , Bernheim-1940 , Kensler-1940 , Taylor-1942 , Schlenk-1946 , Carruthers-1953 , Strength-1954 , Jedeikin-1955 , Jedeikin-1956 , Narurkar-1957 , Glock-1957 , Briggs-1960 , Wintzerith-1961 , Clark-1966).

Estes trabalhos experimentais foram confirmados por pesquisadores clínicos, que encontraram diminuição dos níveis de NAD em pacientes com vários tipos de câncer.

Comes em 1976, dosou o NAD no sangue de 188 pacientes com câncer. O NAD estava significativamente diminuído nos pacientes com carcinoma de mama e de cervix e inalterado nos pacientes com câncer de pulmão e câncer metastático, quando comparado com pessoas normais.

Chung em 1982, mostrou a associação entre a carcinogênese humana e a diminuição do NAD celular, assinalando as seguintes evidências: 1- as concentrações de NAD e ATP estão baixas nas células com câncer ; 2- os carcinogênicos químicos e a radiação podem provocar a queda do NAD em células pré cancerosas; 3-o NAD está envolvido na regulação da síntese do DNA e 4-a queda da concentração do NAD facilita a carcinogênese porque, pode provocar a expressão de oncogenes e ou virogenes, de acordo com a hipótese do provírus .

Perspectivas de Tratamento

I- Substrato Energético Adequado Normaliza a Estrutura Mitocondrial e a sua Capacidade de Fosforilação Oxidativa nas Células Cancerosas

A análise comparativa de organelas citoplasmáticas de uma grande variedade de tumores em relação ao tecido normal correspondente revela uma forte diminuição do conteúdo mitocondrial e da capacidade de fosforilação oxidativa (Rossignol - 2004). Entretanto não sabemos a causa destas modificações e se o processo pode ser fisiologicamente reversível.

Rossignol, elegantemente demonstrou, em uma linhagem de câncer humano (células HeLa), que a diminuição da fosforilação oxidativa (F.O.) pode ser provocada pela carência de substrato.

A F.O. foi medida in vivo através de vários tipos de técnicas e o objetivo do autor, foi estudar: 1- a habilidade da célula usar a glicólise ou a F.O. de acordo com o substrato e 2- o efeito do tipo de substrato sobre a estrutura e função da mitocôndria.

Rosignol mostrou algo de inusitado: o sistema mitocondrial defeituoso existente nas células cancerosas pode ser dramaticamente melhorado unicamente pela mudança de substrato, isto é, o fenômeno é reversível do ponto de vista estrutural e funcional. E mais importante ainda a mudança de metabolismo anaeróbio para aeróbio (F.O.), promovida pela disponibilidade do substrato apropriado, promoveu a **diferenciação da célula maligna** em células não tumorais.

Na verdade o autor não deu importância, mas descreveu com todas as letras que após a adição do substrato glutamina e a passagem do metabolismo anaeróbio para quase exclusivamente fosforilação oxidativa : **"as células em cultura não mais se assemelhavam às células tumorais"** . Desta forma o autor demonstrou que a mudança da via de produção de ATP de glicólise anaeróbia para fosforilação oxidativa, provocou a diferenciação celular : passagem da célula maligna para célula normal.

Nas células HeLa, o substrato que modifica a estrutura e função da mitocôndria tumoral , é a glutamina.

Este trabalho abre as portas na busca do substrato apropriado para melhorar a função mitocondrial de cada tipo de célula maligna com a finalidade de provocar o desvio da produção de ATP via glicólise anaeróbia, motora da proliferação maligna, para a fosforilação oxidativa, motora da diferenciação celular.

II- Nutrientes Essenciais Constituintes da Cadeia Enzimática e do Acoplamento Químico-Energético Melhoram a Função Mitocondrial em Mitocondriopatias Hereditárias

Barbara Marriage da Universidade de Alberta no Canadá em 2003, fez revisão didática sobre o papel dos nutrientes essenciais na melhoria da função mitocondrial de vários tipos de mitocondriopatias que apresentavam defeitos da fosforilação oxidativa.

Mostrou 18 trabalhos na literatura descrevendo pacientes com mitocondriopatias hereditárias com defeitos nos complexos I ou II ou III que obtiveram melhoria clínica de graus variáveis com o emprego da Coenzima Q10 (ubiquinona.). Esta substância é a mais empregada no tratamento das mitocondriopatias hereditárias , nas doses de 30 a 300 mg ao dia.

A CoQ10 é uma quinona lipossolúvel que transfere elétrons dos complexos I e II para o complexo III, processo este acoplado com a síntese de ATP. Ela ajuda a estabilizar os complexos da FO dentro da membrana mitocondrial interna, mantendo uma adequada fluidez de membrana.

Para aumentar a eficácia terapêutica se emprega vários tipos de nutrientes que tomam parte na F.O. : Riboflavina (50 a 100 mg ao dia), Nicotinamida (200 a 3000 mg ao dia) , Vitamina K3 - menadiona (40 a 80 mg ao dia) , Vitamina C (2 a 4 gramas ao dia) , Carnitina (50 a 200 mg ao dia) , Creatina (10 g ao dia) e Ácido Lipóico (600 mg ao dia).

III - Administração de Nicotinamida e Recuperação da Fosforilação Oxidativa em Células Malignas

Os níveis tissulares dos NAD (NAD⁺ , NADH , NADP⁺ , NADPH) , são regulados primariamente pela concentração de nicotinamida do sangue, que por sua vez é regulada pelo fígado, sob influência hormonal.

Jacobson em 1993, verificou que mulheres com vários tipos de câncer apresentavam níveis menores de NAD no sangue, quando comparado com controles normais. Quando o aporte de nicotinamida da dieta diminuiu, o NAD prontamente declinou no intracelular.

A mitocôndria intacta é relativamente impermeável aos nicotinamida adenina dinucleotídeos, porém pode se tornar permeável em vários graus e perder NAD⁺. Nesta linha de raciocínio, Kielley-1952, Wenner e Weinhouse-1953 e Hawtrey-1960, mostraram que a mitocôndria isolada de diversos tumores são deficientes na sua capacidade oxidativa, porém a respiração normal pode ser restaurada pela suplementação com NAD⁺ .

Esses trabalhos sugerem que as mitocôndrias dos tumores não são integras e que prontamente podem perder ou ganhar o seu suprimento de NAD⁺. Desta forma, as mitocôndrias de diversos tumores perdem NAD⁺ , porém o processo é reversível. Este fato é mais uma evidência que nos faz acreditar na possibilidade de recuperação da célula maligna: diferenciação celular. Uma vez diferenciada as células seguirão o seu caminho biológico normal : morte celular programada.

As doses habituais de nicotinamida nestas condições são de 1000 mg ao dia. Dose diária de até 3000 mg de nicotinamida por alguns anos são seguras e não provocam hepatopatia.

IV- Reparo da Membrana Mitocondrial Interna com Lipídes

Sabemos muito bem das consideráveis alterações do metabolismo dos ácidos graxos, fosfolípidos e colesterol que ocorrem na célula tumoral (Busch - 1964; Carruthers -1967). Quando acontece alterações lipídicas na membrana interna mitocondrial a produção de energia diminui. Vários trabalhos indicam que drásticas modificações da ingestão de lípidos da dieta, como o déficit de ácidos graxos polinsaturados, provocam alterações ultra estruturais e prejuízo da função mitocondrial (Johnson - 1963; Waite & Van Golde - 1968 ; Smithson -1969) .

Arcos mostrou que esta região lesada da membrana mitocondrial interna pode ser susceptível de reparo porque o impedimento respiratório, in vitro, é substancialmente diminuído ou até abolido pela adição de lípidos totais, obtidos de mitocôndrias normais (Arcos?1971).

Possivelmente esta sopa lipídica extraída de mitocôndrias normais esteja "contaminada" com vit.B2, vitB3, Coenzima Q10 , carnitina, etc , isto é, com os fatores envolvidos no adequado funcionamento da mitocôndria.

No interior de São Paulo, alguns cancerologistas estão utilizando um lipídeo apolar, sintetizado no setor de Química da Universidade de São Carlos (USP), a fosfoetanolamina, como tratamento coadjuvante do câncer. Embora sem estatísticas, os resultados tem sido muito encorajadores e em alguns casos realmente surpreendentes.

Referência Bibliográficas

- Abou-Khalil, S.; Abou-Khalil, W.H.; Yunis, A.A.. Inhibition by Ca^{2+} of oxidative phosphorylation in myeloid tumor mitochondria . Arch. Biochem. Biophys. 209, 460-464, 1981.
- Aisenberg, A.C.. The glycolysis and respiration of tumors. London-New York: Academic Press 1961.
- Arcos, J.C. Ultrastructural Alteration of the Mitochondrial Electron Transport Chain Involving Electron Leak: Possible Basis of "Respiratory Impairment" - in Certain Tumors. J.Theor. Biol.; 30, 533-543,1971.
- Arcos, J.C.; Mathison, J.B.; Tison, M.J.; Mouledoux, A.M. Cancer Res. 29, 1288, 1969a.
- Arcos, J.C.; Tison, M.J.; Gosch, H.H.; Fabian, J.A. Cancer Res. 29, 1298, 1969b.
- Baggetto, L.G.; Lehninger, A.L.. Formation and utilization of acetoin, an unusual product of pyruvate metabolism by Ehrlich and AS-30D tumor mitochondria . J. Biol. Chem. 262, 9535-9541, 1987.
- Baggetto, L.G.; Testa-Parussini, R.. Role of acetoin on the regulation of intermediate metabolism of Ehrlich ascites tumor mitochondria . Arch. Biochem. Biophys. 283, 241-248, 1990.
- Baggetto,L.G. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. Biochimie. 74,959-974,1992.
- Barbour, R.L.; Chan, S.H.P.. Adenine nucleotide transport in hepatoma mitochondria and its correlation with hepatoma growth rates and tumor sizes . Cancer Res. 43,1511-1517, 1983.
- Bernheim, F.; Von Felsovanyi, A., Science, 91,p.76, 1940.
- Boitier, E.; Merad-Boudia, M.; Guguen-Guillouzo, C.; Defer, N.; Ceballos-Picot, I.; Leroux, J.; Marsac, C.. Impairment of the mitochondrial respiratory chain activity in diethylnitrosamine-induced rat hepatomas: possible involvement of oxygen free radicals. Cancer Res., 55:3028-3035, 1995.
- Briggs, M.H.. Nature, 187,249-250, 1960.
- Busch, H.; Starbuck, W.. A. Rev . Biochem. 33, 559, 1964.
- Cameron IL, Smith NK, Pool TB, Sparks RL: Intracellular concentration of sodium and other elements as related to mitogenesis and oncogenesis in vivo. Cancer Res 40: 1493-1500, 1980.
- Cone CD, Jr. The role of the surface electrical transmembrane potential in normal and malignant mitogenesis. Ann Ny Acad Sci. (238) 420-35, 1974.
- Cone CD, Jr. Variation of the transmembrane potential level as a basic mechanism of mitosis control. Oncology 24: 438-470, 1970.
- Carruthers, C. Cancer Res. 27, 1, 1967.
- Carruthers, C., Suntzeff, V. Arch. Biochem. Biophys., 45,140-148, 1953
- Chernyak, B.V., Dukhovic, V.P.; Khodjaev, E.Y.. Regulation of ATP hydrolysis in hepatoma 22 a mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 286, 604-609, 1991.
- Clark, J.B.; Greenbaum, A.L.; McLean, P.. Biochem. J., 98,546-556, 1966.
- Cuezva, J.M.; Krajewska, M.; López de Heredia, M. Krajewski, S.; Santamaria, G.; Kim, H.; Zapata, J.M.; Marusawa, H.; Chamorro, M.; Reed, J.C.. The bioenergetic signature of cancer : a marker of tumor progression. Cancer Res. 62, 6674-6681, 2002.
- Dey, R.; Moraes, C.T.. Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x L in osteosarcoma cells. J. Biol. Chem. 275, 7087-7094,2000.

- Dickens F, Simer F. The metabolism of normal and tumour tissue: the RQ in bicarbonate media. *Biochem J.* 25: 985-996,1931.
- Eboli, M.L.; Malmstrom, K.; Galeotti, T.; Lopez-Alarcon, L.; Carafoli, E.. calcium transport and translocation of adenine nucleotides in mitochondria from Morris hepatoma 3924 *Cancer Res.* 39, 2737-2742, 1979.
- Erickson-Viitanen, S.; Geiger, P.J.; Viitanen, P.; Bessman, S.P.. Compartmentation of mitochondrial creatine phosphokinase II. The importance of the outer mitochondrial membrane for mitochondrial compartmentation . *J.Biol. Chem.* 257, 14405-14411, 1982a.
- Erickson-Viitanen, S.; Viitanen, P.; Geiger, P.J.; Yang, W.C.; Bessman, S.P.. Compartmentation of mitochondrial creatine phosphokinase . I. Direct demonstration of compartmentation with the use of labeled precursors. *J. Biol. Chem.* 257, 14395-14404. 1982 b.
- Fiskum, G.; Cockrell, R.S.. Uncoupler-stimulated release of Ca^{2+} from Ehrlich ascites tumor cell mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 240, 723-733, 1985.
- Fiskum, G.; Pease, A.. Hydroxyperoxide-stimulated release of calcium from rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria . *Cancer. Res.* 46, 3459-3463, 1986.
- Gajewski, C.D.; Yang, L.; Schon, E.A.; Manfredi, G..New Insights into the Bioenergetics of Mitochondrial Disorders Using Intracellular ATP Reporters . *Molecular Biology of the Cell* 14,3628-3635, 2003.
- Glock, G.E. ; McLean, P.. *Biochem. J.*, 65, 413-416, 1957.
- Green, D.E.; Mackler, B.; Repaske, R.; Mahler, H.R.. *Biochim. Biophys.Acta* 15, 435, 1954.
- Griffiths, J.R.. Causes and consequences of hypoxia and acidity in tumour microenvironments . *Bioessays*, 23:295-296, 2001.
- Habano, W.; Nakamura, S.; Sugai, T.. *Oncogene* 17, 1931 , 1998.
- Harris, M.H.; Vander Heiden, M.G.; Kron, S.J.; Thompson, C.B.. Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3590-3596, 2000.
- Hawtrey,A.O. ; Silk, M.H. *Biochem, J.* 74, 21-26, 1960.
- Hoberman, H. . Is there a role for mitochondrial genes in carcinogenesis - *Cancer Res.*, 35:3332-3335, 1975.
- Hopkins F G, Elliott K A C. Relationship of glutathione to cell respiration with special reference to hepatic tissue. *Proceedings of the Royal Society London*; 109: 58-88,1931.
- Horton, T.M.. *Genes Chromosomes Cancer.* 15, 95, 1996.
- Irwin, C.; Malkin, L.; Morris, H.. Differences in total mitochondrial proteins and proteins synthesized by mitochondria from rat liver and Morris hepatomas 9618 A, 5123C, 5123tc. *Cancer Res.*, 38: 1584-1588, 1978.
- Isodoro, A.; Martinez, M.; Fernández, P.L.; Ortega, A.D.; Santamaría, G.; Chamorro, M.; Reed, J.C.; Cuezva, J.M.. Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, , gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J.* 378(17-20) 2004.
- Jedeikin, L. ; Weinhouse, S., *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 2, p.26, 1955.
- Jedeikin, L.; Thomas, A.J. ;Weinhouse, S., *Cancer Res.*, 16,867-872, 1956.
- Johnson, R.M.. *Expl Cell Res.*32, 118, 1963.
- Kensler, C.J.; Suguira, K.; Rhoads, C.P. *Science*, 91, p. 623, 1940.
- Kielley, R. K. *Cancer Res.*, 12, 124-128, 1952.
- Kovacevic, Z.; Brkljac, O.; Bajin, K.. Control and function of the transamination pathways of glutamine oxidation in tumor cells. *Biochem. J.* 273, 271-275, 1991.
- Kovacevic, Z.; Morris, H.P.. The role of glutamine in the oxidative metabolism of malignant cells. *Cancer Res.* 32, 326-333, 1972.
- Needham J, Lehmann H. Intermediary carbohydrate metabolism in embryonic life. V. The phosphorylation cycles. VI.Glycolysis without phosphorylation. *Biochem J*; 31: 1210-1238,1937.
- Lau, B.W.C.; Chan, S.H.P.. Efflux of adenine nucleotides in mitochondria from rat tumor cells of varying growth rates. *Cancer Res.* 44,4458-4464.
- Liotta, L.A.; Kohn, E.C.. Cancer?s deadly signature . *Nat. Genet* 33,10-11, 2003.
- López-Gómez, F.J.; Torres-Márquez 1, M.E.; Moreno-Sánchez 2 ,R. Control of oxidative phosphorylation in AS-30D hepatoma mitochondria. *J. Biochem.* Vol.25, nº 3 , pp. 373-377, 1993.
- Luciakova, K.; Kuzela, S.. Increased content of natural ATPase inhibitor in tumor mitochondria. *FEBS Lett.* 177, 85-88, 1984.
- Marriage, B ; Clandinin, T ; Glerum, M. Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders. *JAM Diet Assoc.* 103:1029-1038,2003.
- Matsuyama, S., Xu, Q.; Velours, J.; Reed, J.C.. The mitochondrial F_oF₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol.Cell* 1. 327-336, 1998.
- Moreadith, R.W.; Lehninger, A.L. . The pathways of glutamate and glutamine oxidation by tumor mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259, 6215-6221, 1984.
- Narurkar, M.V.; Kumta, U.S., Sahasrabudhe, M.B.. *Brit. J. Cancer* , 11,482-486, 1957.
- Papa, S. Capuano, F.. The H⁺ - ATP synthase of mitochondria in tissue regeneration and neoplasia . *Ann. NY Acad. Sci.* 551, 168-178, 1988.

- Parlo, R.A.; Coleman, P.S.. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. *J. Biol. Chem.* 259, 9997-10,003, 1984.
- Pedersen, P.L.. Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Prog. Expl Tumor Res.* 22, 190-274, 1979.
- Polyak, K.. *Nature Genet.* 20, 291, 1998.
- Ramaswamy, S.; Ross, K.N.; Lander, E.S.; Golub, T.R.. A molecular signatu of metastasis in primary solid tumors . *Nat. Genet.* 33,49-54, 2003.
- Reitzer, L.; Wice, B.; Kennel, D. Evidence that glutamine, not sugar, is the major energy source for cultured Hela cells. *J.Biol. Chem.*, 254:2669-2676, 1979.
- Rossignol, R.; Gilkerson, R.; Aggeler, R.; Yamagata, K.; Remington, S.J.; Capaldi, R.A.. Energy Substrate Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells. *Cancer Research* 64, 985-993, 2004.
- Saks, V.A.; Khuchua, Z.A.; Vasilyeva, E.V.; Belikova, O.; Kuznetsov, A.V.. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration-a synthesis . *Mol. Cell. Biochem.* 133-134,155-192, 1994.
- Sauer, L.A.; Dauchy, R.T.. Identification and properties of the nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) +- depende3nt malic enzyme in mouse ascites tumor mitochondria. *Cancer Res.* 38, 1751-1756.
- Schlenk, F.. *Cancer Res.*, 6, 495-496, 1946.
- Senior, A.; McGowan, S.; Hilf, R.. A comparative study of inner membrane enzymes and transport systems in mitochondria from R3230AC mammary tumor and normal rat mammary gland. *Cancer Res.*, 35:2061-2067, 1975.
- Simonnet, H.; Alazard, N.; Pfeiffer, K.; Gallou, C.; Beroud, C.; Demont, J.; Bouvier, R.; Schagger, H.; Godinot, C.. Low mitochondrial respiratory chain content correlates with tumor aggressiveness in renal cell carcinoma. *Carcinogenesis (Lond.)* 23: 759-768, 2002.
- Smithson, J.E.. *Lab. Invest.* 20, 207, 1969.
- Springer, E.. Comparative study of the cytoplasmic organelles of epithelial cell lines derived from human carcinomas and nonmalignant tissues. *Cancer Res.*, 40: 803-817, 1980.
- Stocco, D.; Hutson, J. . Characteristics of mitochondria isolated by rate zonal centrifugation from normal liver and Novikoff hepatomas . *Cancer Res.* 40:1486-1492, 1980.
- Strength, D.R.; Seibert, M.A.. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1, p. 47, 1954.
- Sussman, I.; Erecínska, M.; Wilson, D.F.. Regulation of cellular energy metabolism . *Biochimica et Biophysica Acta* , 591(1980) 209-223.
- Taylor, A.; Pollack, M.A. ; Hofer, M.J.; Williams, R. J. *Cancer Res.*, 2, 744-747, 1942.
- Vithayathil, A.J.; Ternberg, J.L.; Commoner, B.. *Nature* , Lond. 207,1246,1965.
- Von Euler, H.; Schlenk, F.; Heiwinkel, H.; Hogberg, B.. *Z. Physiol. Chem.*, 256,208-228, 1938.
- Wallace, D.C.. Mitochondrial Diseases in Man and Mouse . *Science* 283(5407)1482-8, 1999.
- Warburg, O.. *Metabolism of tumors* . Arnold Constable. London. 1930.
- Warburg, O.. Oxygen, the creator of differentiation. In: *Current aspects of biochemical energetics* (eds. N.O. Kaplan and E. Kennedy) pp.103-109. London-New York: Academic Press 1966.
- Warburg, O.. *Science*, N.Y. 123, 309, 1956.
- Warburg, O.. *Über den Stoffwechsel der Tumoren*, Berlin: Springer 1926. Translated: *The metabolism of tumors*. London: Arnold Constable 1930.
- Warburg, O.; Gawehn, K.; Geissler, A.; Schroder, W.; Gewitz, H.; Volker, W.. *Archs Biochem. Biophys.* 78, 573, 1958.
- Weber, K.; Ridderskamp, D.; Alfert, M.; Hoyer, S.; Wiesner, R.J.. Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells . *Biol Chem.*, 383:283-290, 2002.
- Weinhouse, S.. The Warburg Hypothesis Fifty Years Later. *Z. Krebsforsch.* 87, 115-126, 1976.
- Wenner, C.E.; Weinhouse, S..*Cancer Res.*, 13, 21-26,1953.
- Wintzerith, M.; Klein, N.; Mandel, L.; Mandel, P.. *Nature*, 191, 467-469, 1961.
- Yoshida, M.; Muneyuki, E.; Hisabori, T.. ATP synthase: a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2. 669-677, 2001.