

Ação do complexo enzimático da piruvato desidrogenase em células neoplásicas sob efeito do ácido Dicloroacético: uma revisão

Action of the enzyme pyruvate dehydrogenase complex in neoplastic cells under effect of Dichloroacetic acid: a review

Ângelo Soares Castro¹, Ryane Silva Oliveira¹, Elielson Souza Rodrigues², José Lázaro Lins Ribas³

¹Especialista em Biologia Celular, Universidade Estadual de Feira de Santana; ³Professor Auxiliar do DCBIO/UEFS, Pesquisador do LAMASP/UEFS, Doutor em Patologias Celulares da Universidade de Barcelona (2005); ⁴Professor Assistente do DCBIO/UEFS, Coordenador do LAMASP/UEFS, Mestre em Imunologia (UFBA).

Resumo

As células de um organismo multicelular podem deixar de realizar seu metabolismo normal e se comportar de maneira desordenada, originando tumores e, posteriormente, se desenvolver para um câncer. Otto Warburg identificou que células tumorais apresentavam preferência pela via glicolítica em detrimento da fosforilação oxidativa (efeito Warburg). Não realizando esta via metabólica, a apoptose pode não ocorrer e as células se multiplicarem sem controle. Uma alternativa para essa situação vem sendo proposta com mais intensidade desde o início deste século, é o uso do ácido dicloroacético (DCA) como quimioterápico mais eficiente e menos invasivo para as células saudáveis. Este composto restabelece o controle do complexo piruvato desidrogenase (PDC) que participa do processo apoptótico em células normais. O tratamento de diversos tipos de câncer pode ser viabilizado pelo DCA, uma vez que estudos que propõem a administração oral dessa substância.

Palavras-chave: Acetil Coenzima A. Apoptose. Efeito Warburg. Glicólise aeróbica. Metabolismo energético.

Abstract

Cells of a multicellular organism can no longer perform their normal metabolism and behave disorderly, causing tumors and later develop into a cancer. Otto Warburg identified that tumor cells had a preference for glycolytic pathway to the detriment of oxidative phosphorylation (Warburg effect). Not performing this metabolic pathway, apoptosis may not occur and the cells multiply without control. An alternative for this situation is being proposed with more intensity since the beginning of this century, is the use of dichloroacetic acid (DCA) as more efficient chemotherapy and less invasive to the healthy cells. This re-establishes control of pyruvate dehydrogenase complex (PDC) that participates in the apoptotic process in normal cells. The treatment of various types of cancer can be made viable by DCA and already there are studies that suggest the oral administration of that substance.

Key Words: Acetyl Coenzyme A. Apoptosis. Warburg effect. Aerobic glycolysis. Energy metabolism.

INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de alterações genéticas que afeta uma em cada três pessoas e, no momento, uma em cada quatro delas morrerá. As células cancerígenas (ou neoplásicas) diferem das células normais, basicamente, por não terem o controle sobre sua divisão mitótica e desencadear outras características que auxiliam seu desenvolvimento (PURVES et al., 2002). Uma forma de controle da população celular no indivíduo é a morte celular programada, ou simplesmente, apoptose, que nestas células está reduzida ou inibida. Pesquisas sobre apoptose revelam que há relação entre atividade metabólica das mitocondrias e o reestabelecimento da via apoptótica nestas células. Uma intervenção na via

apoptótica da célula neoplásica, teoricamente, poderia reverter esta característica e controlar a população celular (BERENDZEN, 2006).

Os trabalhos relacionados com o tratamento de células neoplásicas pelo ácido dicloroacético não são muito recentes, sendo que na última década, houve um rápido crescimento de publicações. Com base em um dos portais de divulgação científica, o Science Direct, um levantamento realizado em 30 de abril de 2010 revelou que de 1994 até o fim do século XX, havia 117 ocorrências para o verbete "dichloroacetate" (dicloroacetato), sendo 19 delas relacionadas diretamente com o complexo enzimático da piruvato desidrogenase no combate ao câncer. Muitas dessas publicações também foram encontradas no portal do NCBI, com 113 ocorrências para o mesmo verbete, sendo 22 delas relacionadas diretamente com o tratamento do câncer. Entre os anos de 2000 e 2009, o número de

Recebido em 27 de julho de 2011; revisado em 12 de agosto de 2011.
Correspondência / Correspondence: Ângelo Soares Castro
Universidade Estadual de Feira de Santana. Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Km 03, BR116, 44031-460. (angelo.castro@gmail.com).

publicações contendo estes verbetes apresentou um crescimento significativo registrando 874 publicações até a data da realização desta pesquisa (Tabela 1). Entretanto, no site na SciELO, a busca por artigos com as palavras-chaves "Dichloroacetate" e "Pyruvate Dehydrogenase" não forneceu publicação alguma, nem mesmo quando procurados em português.

Tabela 1 – Levantamento das publicações sobre o ácido dicloroacético relacionadas com a atuação no complexo piruvato desidrogenase realizado em 30 de abril de 2010.

Ano	Ocorrência	Nº de Publicações Válidas
1995	19	3 válidas – (3 jornais)
1996	22	5 válidas – (3 periódico, 2 jornais)
1997	26	5 válidas – (3 periódico, 2 jornais)
1998	20	2 válidas – (2 periódico)
1999	17	1 válida – (1 periódico) (Início das publicações relacionando ao câncer)
2000 - 2009	874	> 100 válidas*
TOTAL	991	19 válidas entre 1994 e 1999

* Nota: O nº de publicações válidas no período entre 2000 e 2009 supera o valor de 100 publicações e por este o motivo foi indicado o valor estimado.

Fonte: Portal Science Direct (www.sciencedirect.com).

O objetivo desta revisão é estudar a ação do ácido dicloroacético sobre o complexo enzimático da piruvato desidrogenase em células neoplásicas, descrever o complexo da piruvato desidrogenase quanto à sua forma estrutural, função e modos de regulação e relacionar o mecanismo de ação (e as vantagens) do uso do ácido dicloroacético em células neoplásicas como possível tratamento quimioterápico.

Metabolismo Energético Celular

Alguns organismos, incluindo os seres humanos, utilizam o oxigênio como comburente para as reações de catálise na obtenção de energia. Trata-se de uma molécula extremamente reativa, que pode interagir com a maioria dos constituintes citoplasmáticos e se tornar tóxico para organismos que não conseguem neutralizá-lo. No entanto, tal reatividade pode fornecer energia química oxidando completamente moléculas orgânicas até CO₂ e H₂O como produtos finais, processo denominado respiração celular. Em eucariotos, esta reação ocorre em uma organela conhecida como mitocôndria e o processo é denominado, fosforilação oxidativa (ALBERTS et al., 2004).

A mitocôndria é uma organela, presente na maioria dos organismos eucariotos, é limitada por duas membranas altamente especializadas e possui características vitais para seu metabolismo. A membrana externa é permeável às moléculas de até 5,0 kDa (quilodaltons), e a membrana interna é dobrada em inúmeras cristas aumentando assim sua área superficial que são chamadas de cristas mitocondriais. A membrana interna é a mais rica em proteínas como,

por exemplo, enzimas e proteínas que constituem a cadeia transportadora de elétrons, proteínas da ATP-sintase e proteínas que fazem parte do sistema de transporte ativo. Cada membrana possui características próprias determinadas pelos seus constituintes lipoprotéicos. O espaço interno é chamado de matriz mitocondrial onde estão contidos filamentos de DNA, RNA, ribossomos, enzimas, proteínas, água, dentre outros. Entre as membranas, há o espaço intermembrana que auxilia no armazenamento de prótons para a fosforilação oxidativa pela ATP-sintase (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005).

Os produtos finais da glicólise (ou via E.M.P. - Embden-Meyerhof-Parnas) - composta por dez etapas - são dois mols de NADH + H⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzido), dois mols de ATP (em realidade são quatro mols, muito embora dois mols sejam utilizados para fosforilar inicialmente a glicose) e dois mols de piruvato. Ao final desta via, o piruvato pode ser fermentado até etanol, lactato ou pode sofrer uma descarboxilação e produzir acetil coenzima-A (acetil-CoA) que participará do Ciclo de Krebs-Sant Giorgio-Johnson (ou apenas ciclo de Krebs), sendo completamente oxidado (BERG, 2008).

Esta descarboxilação do piruvato e sua transformação em acetil-CoA ocorrem na mitocôndria pela ação de um conjunto de enzimas denominado complexo enzimático da piruvato desidrogenase (PDC - Pyruvate Dehydrogenase Complex), localizado na matriz mitocondrial dos eucariotos e no citosol dos procariotos (LEHNINGER; NELSON; FOX, 2003). Berendzen e colaboradores (2006) sugerem que sua localização está no espaço intermembrana e não na matriz das mitocôndrias. Este complexo consiste em três enzimas distintas denominadas de piruvato descarboxilase (E1), diidrolipoil transacetilase (E2) e diidrolipoil desidrogenase (E3), e cinco coenzimas - tiamina pirofosfato (TPP - Thiamine PyroPhosphate) para E1, lipoato (grupo lipoil) e CoA-SH para E2, FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) e NAD⁺ (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo) para E3 (LEHNINGER; NELSON; FOX, 2003).

A subunidade E1 (piruvato descarboxilase) contém massa molecular de 154 kDa e tem dois sítios catalíticos, cada um apresentando TPP (tiamina pirofosfato) e íon magnésio (Mg²⁺) como cofatores, formando cada um, uma interface entre as subunidades α e β. A enzima E1 tem quatro subunidades, duas subunidades α e duas β com aparente peso molecular de 41 kDa e 36 kDa, respectivamente, é, portanto, um hetrotetrâmero; seus homólogos foram pareados e identificados por cristalografia (CISZAK, 2003). O gene para a subunidade E1α está localizado no cromossomo X e todas as outras subunidades do complexo, nos cromossomos somáticos (BERENDZEN et al., 2006).

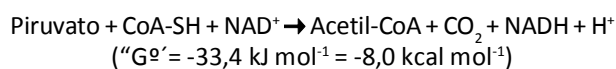
Esta subunidade catalisa a descarboxilação do piruvato acoplado ao redutor de acetilação do grupo lipoil, este por sua vez, está ligado à E2. A taxa de

acetilação redutiva do grupo lipoil foi medida com misturas de atenuação química rápida, utilizando piruvato 2-14C como substrato. Essa taxa é comparável à velocidade da reação global, o que sugere que hidroquinonas acetiladas representam o passo limitante na reação global (SEYDA, 2001).

Diidrolipoil transacetilase (E2) é o componente central do PDC na conversão do piruvato à acetil-CoA. O domínio globular externo de E2 consiste de dois grupos lipoil (L1 e L2) e um pequeno domínio de ligação de E1, ligados por alanina e prolina, ricos nas regiões de dobradiça que são de 20-30 resíduos de comprimento. Cada trímero de E2 possui três canais de sítio ativo localizados nas três interfaces de E2. Estes canais vão desde a superfície externa (entrada do grupo lipoil) até o interior do dodecaedro (entrada da CoA-SH) e servem como canais através dos quais grupos acetil podem passar (YU, 2008).

A E3 (diidrolipoil desidrogenase) consiste em duas subunidades idênticas com dois sítios ativos localizados em sua interface. Cada monômero é composto por quatro domínios: o domínio FAD-ligante, o domínio NAD-ligante, o domínio central e o domínio de interface. Os sítios catalíticos envolvem alguns resíduos no domínio de interface (isto poderia explicar porque uma associação em dímeros é necessária para a atividade da proteína) e consiste no anel de isoaloxazina do FAD, uma ponte dissulfeto redox-ativo em um monômero e um resíduo de histidina no outro monômero (FAURE; BOURGUIGNON, 2000).

Um dos produtos resultantes da ação do PDC, a acetil-CoA, é um tioéster, com um átomo de enxofre substituindo o de oxigênio de um éster carboxílico normal (grupo -SH na molécula da CoA). Essa diferença é importante, pois os tiosésteres são compostos de "alta energia" e quando hidrolisados esta energia é liberada. Para este composto a quantidade de energia que é liberada equivale a 8,0 kcal (reação exergônica: $\Delta G^{\circ} = -33,4 \text{ kJ mol}^{-1} = -8,0 \text{ kcal mol}^{-1}$) possibilitando assim outras reações. As subunidades E2 e E3 catalisam reações do ácido lipóico, um composto que tem um grupo dissulfeto na forma oxidada podendo evoluir para dois grupos sulfidrila em sua forma reduzida. Esta substância pode agir como um agente oxidante, formando uma ligação tioéster com o grupo acetila antes de ser transferido à CoA-SH, ou participar de duas reações simultaneamente, uma reação de redox e a transesterificação de um grupo de acetila (CAMPBELL, 2000). A reação global é descrita da seguinte forma:



Em resumo, a piruvato descarboxilase E1 catalisa, juntamente com a coenzima TPP e íons Mg^{2+} , a descarboxilação da piruvato. A união covalente da TPP à unidade resultante, o hidroxietil, forma o hidroxietil-TPP.

O lipoato está unido à diidrolipoil transacetilase (E2) por uma ligação amida, um grupo ϵ -amino da cadeia lateral composta por lisina, formando a lipolisina. Esta substância é parcialmente reduzida pela hidroxietil e uma hidroxila é oxidada, formando a acetila. A E_2 promove a transferência da acetila para a coenzima A, produzindo a acetil-CoA e o lipoato se torna totalmente reduzido.

O FAD oxidado, presente na E3, promove a oxidação do lipoato, permitindo que a E2 volte ao estado oxidado para iniciar novamente a reação. O FADH_2 , por sua vez, é oxidado e NAD^+ é reduzido, permitindo assim que a função do complexo enzimático restabeleça suas atividades metabólicas, o NAD reduzido será utilizado na cadeia respiratória para a produção de ATP (SEYDA, 2001).

A rápida regulação do PDC é realizada, em sua maior parte, pela fosforilação reversível da subunidade $\text{E1}\alpha$ mediada pela família da piruvato desidrogenase cinase (PDK, Pyruvate Dehydrogenase Kinase) e pela piruvato desidrogenase fosfatase (PDP, Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase) (BERENDZEN et al. 2006). Bioquimicamente, a regulação mais importante ocorre pela fosforilação de três resíduos de serina (Ser264; Ser271; Ser203) localizados na subunidade $\text{E1}\alpha$, catalisada pela PDK. A desfosforilação é catalisada pela PDP (KLYUYEVA; TUGANOVA; POPOV, 2007). O PDC é fortemente inibido através de mecanismos alostéricos pela presença de ATP, acetil-CoA e $\text{NADH} + \text{H}^+$. Outro mecanismo de inibição deste complexo é pela fosforilação reversível de um resíduo específico de serina em uma das subunidades de E1 pela PDK (KATO, et al.).

Várias cópias do complexo enzimático PDC são distribuídas dentro de cada mitocôndria, embora a distribuição celular e propriedade cinética individual das quatro PDK conhecidas e das duas PDP conhecidas em seres humanos possam contribuir para a regulação tecido-específica do complexo. A isoforma PDK2 é expressa abundantemente em tecidos e é muito sensível à ativação ou inativação pela regulação molecular endógena ou exógena, tal como o dicloroacetato (DCA). Esta droga experimental é um agente altamente eficaz na redução de lactato em organismos saudáveis, bem como em uma série de causas congênitas e adquiridas de acidose láctica em virtude da sua capacidade de inibir a PDK, mantendo assim o PDC na sua forma não fosforilada cataliticamente ativa (GLUSHAKOVA et al., 2009).

Estudo recente mostrou que a atividade da PDK em linhagens celulares cancerígenas pode ser regulada pelo dicloroacetato (ou DCA dichloroacetate). Esta substância pode se ligar à PDK e inibir de forma atenuada a atividade da E1. O aumento da atividade desta subunidade enzimática modifica o metabolismo da glicose e diminui o potencial de membrana mitocondrial (ou MMP - mitochondrial membrane potential)

hiperpolazando-a, o que abre os poros de transição mitocondrial (MTPs). Isto permite a translocação de espécies reativas de oxigênio e citocromo c da mitocôndria para o citoplasma, posteriormente induzindo apoptose através da ativação de caspases (WONG, 2008).

Características Gerais do Câncer

Até então, existem seis alterações essenciais conhecidas na fisiologia da célula que, coletivamente, definem sua transformação para um estado maligno: 1) a auto-suficiência em sinais de crescimento, 2) insensibilidade aos sinais inibitórios do crescimento, 3) potencial de replicação sem limites, 4) angiogênese sustentada, 5) invasão tecidual e metástase, e 6) desvio da morte celular programada (apoptose). A resistência das células cancerosas ao tratamento é muitas vezes associado com as falhas no seu programa apoptótico. Mitocôndrias são alternativas promissoras para tal abordagem. Agentes que atuam na supressão da respiração celular ou que desestruturam a fosforilação oxidativa têm sido demonstrados como desencadeadores da morte celular (GOGVADZE et al., 2008).

A maioria dos tipos de câncer depende de maneira desproporcional da energia gerada na via glicolítica, mesmo na presença adequada de oxigênio, mencionado anteriormente como efeito “Warburg”. Farmacologicamente, a reversão desse efeito tem sido demonstrada para promover a apoptose seletiva de células cancerosas, presumivelmente, estimulando a ativação da cadeia respiratória e a produção de espécies reativas a oxigênio que, por sua vez, induz uma série de caspases-mediadas da principal reação de morte celular (GLUSHAKOVA et al., 2009).

As caspases são um grupo de proteases baseadas em cisteína, enzimas com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico, uma especificidade incomum entre proteases. O nome “caspase” é derivado dessa função molecular característica: *cysteine-aspartic-acid-proteases*. Caspases são enzimas essenciais na apoptose celular. Falhas na apoptose são uma das contribuições principais para o desenvolvimento de tumores e doenças auto-imunes; somando-se isto à apoptose indesejada que ocorre na isquemia ou mal de Alzheimer, despertou-se rapidamente o interesse nas caspases como alvos terapêuticos desde que foram descobertas em meados da década de 90 (MCFATE et al., 2008).

No processo de obtenção de energia pela fosforilação oxidativa alterações podem ocorrer como observado em células neoplásicas. Nestas células, a conversão de glicose em lactato pode ocorrer mesmo na presença de oxigênio, este fenômeno é conhecido como “efeito Warburg” (BONNET et al., 2007). Otto Warburg fez a surpreendente descoberta que as células tumorais, ao contrário das células normais, utilizam a glicólise em vez da fosforilação oxidativa mitocondrial para oxidar glicose, mesmo em condições aeróbicas.

Ele propôs que defeitos no metabolismo energético, especialmente na mitocôndria, podem ser a raiz do câncer (SHAW, 2006).

A hipótese metabólica do câncer foi recentemente reacendida. Gatenby e Gillies (2004) propuseram recentemente que células neoplásicas, inicialmente, utilizam a glicólise para produção de energia devido a ocorrência de um microambiente hipóxico. No entanto, esta adaptação metabólica precoce parece oferecer uma vantagem proliferativa, suprimindo a apoptose. Além disso, os resultados da glicólise (isto é, produção de lactato e possível acidose) contribuem para a degradação da matriz extracelular, facilitam a mobilidade das células e aumentam o potencial metastático. Portanto, embora os tumores se tornem eventualmente vascularizados e aumentem os níveis de O_2 , o fenótipo glicolítico persiste, resultando no efeito Warburg. Vias apoptóticas e metabólicas que convergem nas mitocôndrias não são independentes e levam a crer que o fenótipo glicolítico é de fato associado a um estado de resistência à apoptose.

Pesquisas sugerem que há um fator de hipóxia-induzida (HIF) e a ativação desse fator é uma consequência comum de uma variada rede de tipos comuns de tumores humanos. O HIF estimula a expressão da enzima glicolítica e diminui a fosforilação oxidativa mitocondrial em células tumorais, isso ocorre mesmo sob condições aeróbicas (Brahimi-Horn, 2007). Recentemente, estudos vêm mostrando que vários oncogenes e mutações nos supressores de tumor podem ativar diretamente o HIF e outros componentes do metabolismo glicolítico em hipóxia (CUEZVA, 2009). Além disso, recentes esforços também têm conectado o regulador metabólico, AMP-proteína cinase (AMPK) em vários supressores tumorais humanos (SHAW, 2006).

Coincidindo com estes achados, a visualização de uma grande variedade de tipos de tumores humanos revelaram que o metabolismo da glicose é funcionalmente modificado em uma grande variedade de tipos de câncer humano (GAMBHIR, 2002).

Segundo Berendzen e colaboradores (2006), a inibição da atividade do PDC impede a oxidação mitocondrial do piruvato e promove sua redução citoplasmática a lactato. A diminuição do fluxo através do PDC também reduz a disponibilidade da acetil-CoA ao ciclo de Krebs. Por sua vez, a redução de ambos os ciclos diminui a geração dos equivalentes redutores $NADH + H^+$ e $FADH_2$ que doam elétrons à cadeia respiratória para a redução do oxigênio molecular em água pelo citocromo c oxidase (complexo IV) e a síntese de ATP a partir do ADP e fosfato inorgânico pela ATP-sintase (complexo V). Assim, defeitos no PDC podem dar origem à acidose láctica e a falha na produção energética celular.

Estes pesquisadores complementam argumentando que o DCA aumenta a atividade do PDC por dois mecanismos estabelecidos. O primeiro, e o mais

investigado, é pela inibição da atividade dos PDKs, mantendo assim, o PDC em estado desfosforilado, cataliticamente ativo. O PDK2 é mais sensível à inibição por DCA do que a isoforma tecido-específico do PDK3. O DCA atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica e, aparentemente, entra nas células através do sistema de transporte que também facilita a absorção através da membrana plasmática do piruvato, lactato, acetoacetato e β -hidroxibutirato. O DCA pode entrar na mitocôndria pelo sistema transportador piruvato dessas organelas.

O segundo mecanismo pelo qual o DCA ativa o PDC é pela estabilização da enzima que regula sua taxa de degradação. Estudos em cultura de fibroblastos com poucos pacientes com deficiência em E1 α sugerem que estas mutações que diminuem a estabilidade protéica mostram o aumento residual da atividade do PDC em incubação *in vitro* em poucos dias com DCA, enquanto mutações que diminuem a atividade catalítica não são afetadas pela exposição à droga. Foi especulado que este efeito seletivo pelo DCA reflete em mudanças no estado de fosforilação de E1 α pela atividade proteolítica ou em conformidade e semelhança com outras subunidades do complexo. Não obstante, estes dados indicam que o intrigante DCA pode exercer uma dupla ação sobre a atividade residual PDC, dependendo da natureza da mutação no gene da subunidade E1 α .

O ácido dicloroacético inibe a PDK, desloca o metabolismo da via glicolítica para a fosforilação oxidativa, diminui o potencial de membrana (ψ_m) e ativa os canais de voltagem em todo tumor, mas não nas células normais. O DCA acaba promovendo a indução da apoptose celular, diminuindo o crescimento de células neoplásicas. (WAHR, 1994).

Bonnet e colaboradores (2007) afirmam que as mitocôndrias de células tumorais apresentam alto potencial de membrana e baixo nível e expressão do canal de potássio quando comparadas com células normais. Esta situação contribui para uma resistência dessas células a apoptose. Com a aplicação do ácido dicloroacético, as mudanças no metabolismo energético promoveram a diminuição deste potencial de membrana, aumentaram os níveis de peróxido de hidrogênio e a atividade dos canais de potássio, induzindo assim a apoptose e redução do tumor. O interessante é que as células normais não foram afetadas e aparentemente não apresentaram toxicidade.

Berendzen e colaboradores (2006) publicaram artigo sobre o tratamento com uso oral do dicloroacetato (DCA) em crianças com acidose láctica congênita causada por mutação no complexo da piruvato desidrogenase (PDC). Os casos de câncer foram registrados em 46 pacientes analisados através do diagnóstico, preservação clínica e resposta ao DCA. O DCA diminuiu a concentração de lactato no sangue e no fluido cérebro-espinhal e foi, geralmente, bem tolerado.

Ele pode ser, particularmente, efetivo em crianças com deficiência em PDC por estimulação residual da atividade enzimática e, conseqüentemente, do metabolismo energético celular.

A ativação do PDC pelo DCA aumenta a oxidação da glicose em função da entrada de acetil-CoA no ciclo de Krebs, restabelecendo a função normal da cadeia respiratória. Isso aumenta a produção de superóxido (O_2^{-2}) que, na presença de MnSOD (mangânese superóxido dismutase), retorna aos níveis mais estáveis. O aumento sustentado da produção de ROS (Espécie de oxigênio reativo) pode danificar o complexo redox inibindo o efluxo de H^+ e o decréscimo da $\Delta\psi_m$ (Potencial de Membrana). A abertura do poro de transição mitocondrial $\Delta\psi_m$ -sensível (MTP) permite o efluxo de citocromo c e o fator de indução de apoptose (AIF). Ambos, citocromo c e O_2^{-2} , abrem os canais de potássio K^+ redox-sensíveis na membrana plasmática e hiperpolariza a célula, inibindo a entrada de Ca^{2+} voltagem-dependente. A diminuição da $[Ca^{2+}]_i$ suprime uma ativação tônica dos NFAT (Fator Nuclear de ativação dos linfócitos T), resultando em seu afastamento do núcleo, aumentando a expressão dos canais voltagem-dependentes Kv1.5. O aumento do efluxo de K^+ da célula diminui a inibição tônica da $[K^+]_i$ em caspases, aumentando ainda mais a apoptose. A seletividade de DCA é baseada em sua capacidade de direcionar o único perfil metabólico que caracteriza a maioria dos tumores, e sua eficácia é explicada pelo seu mecanismo duplo de indução de apoptose, tanto pela despolarização mitocondrial (via proximal) quanto pela ativação e regulação dos canais voltagem-dependentes Kv1.5 (via distal) (BONNET et al., 2007).

Recentemente, pesquisas têm demonstrado que o metabolismo peculiar da célula cancerosa permite traçar uma meta e desenvolver estratégias que possam impedir a progressão da doença. Neste sentido, várias pequenas moléculas estão sendo testadas, isoladamente ou em quimioterapia combinada, como fatores de interferência nas vias metabólicas específicas de diversos tipos de câncer.

Os trabalhos relacionados com o tratamento de células neoplásicas pelo ácido dicloroacético não são muito recentes, mas na última década, houve um rápido crescimento nas publicações. Com base em um dos portais de divulgação científica, o *Science Direct*, um levantamento realizado em 30 de abril de 2010 revelou que de 1994 até o fim do século XX haviam 117 ocorrências para o verbete "dichloroacetate" (dicloroacetato), sendo 19 delas relacionadas diretamente com o complexo enzimático da piruvato desidrogenase.

O uso do DCA não serve apenas para o tratamento do câncer, mas também para corrigir defeitos metabólicos envolvendo a atividade do PDC. A acidose láctica, por exemplo, pode ser revertida com a aplicação do DCA nos pacientes em tratamento desta patologia (BERENDZEN et al., 2006). Especula-se que doenças como

a Síndrome MERRF (SPANENBERG, 2001), doença mitocondrial que junto com as outras citopatias mitocondriais constituem um grupo de doenças de expressão clínica heterogênea decorrente de alterações do metabolismo energético celular, e doenças relacionadas com o metabolismo do piruvato e sua formação em acetil-CoA, podendo ser tratadas com a administração do DCA no PDC.

Ação do DCA

O ácido dicloroacético (DCA) pode contaminar ambientes aquáticos, sendo muito tóxico para animais de vida marinha e lacustre. Sua fórmula química é Cl_2CHCOOH , sua massa molar é de 128.94 g/mol, é solúvel em água a 20 °C, seu ponto de fusão é a -4°C e seu ponto de ebulição é de 192°C. Sua densidade é em torno de 1.57 g/cm³ (a 20 °C) e dissolvido em água na mesma temperatura à concentração de 129 g/L, seu pH é de 1,2. É uma substância não é inflamável e relativamente corrosiva em contato direto com a pele.

De acordo com o GSH (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals), Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, o DCA pode provocar queimaduras na pele e lesões oculares graves se administrados sem os equipamentos de proteção individual (EPI). Em caso de ingestão é recomendável enxaguar a boca e não provocar o vômito. E em casos de contacto com os olhos, enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retira-las, se tal for possível, e continuar a enxaguar. Por ser um contaminante, recomenda-se que seja evitada a libertação desse produto para o ambiente.

Contudo, nos trabalhos realizados com o uso do DCA *in vivo* ou *in vitro*, este produto é administrado com diluições entre 0,1µM a 100µM, reduzindo os riscos de contaminação e danos às células. Tratamentos de patologias relacionadas ao metabolismo das mitocôndrias são realizados a cerca de 50 anos, mas apenas na última década, as pesquisas foram direcionadas à compreensão do mecanismo da apoptose (ou a falta dela) em células neoplásicas e as possíveis intervenções desse quadro com o uso do ácido dicloroacético.

Trabalhos mais significativos

Han e colaboradores (2008) publicaram um trabalho no qual fizeram uma comparação entre dois métodos para o tratamento de deficiência no complexo da piruvato desidrogenase (PDC) em fibroblastos utilizando um vetor viral auto complementar adenoassociado (scAAV) e o dicloroacetato (DCA). Pacientes com deficiência na E1 α foram tratados combinando estes dois métodos. Parte da amostra apresentou resultados favoráveis no restabelecimento da atividade enzimática da subunidade E1 α , e quando

associado com o DCA, o resultado se mostrou mais satisfatório. Expostos ao DCA numa concentração de 5,0 mM por 24 h, a atividade residual do PDC aumentou tanto no grupo controle (uma média de 37% de aumento) e em todas as linhagens celulares com deficiência no PDC (média de 44% de aumento). Quando as células foram acompanhadas por subsequente administração de DCA, a mudança na atividade do PDC foi, de maneira geral, positiva, se comparada aos efeitos produzidos com qualquer um dos dois meios, o gene vetor ou a droga sozinha. Algumas células demonstraram um aumento de 80 a 91% na atividade do PDC quando comparadas àquelas após o tratamento combinado de um vetor tipo sorológico scAAV e o DCA.

Klyuyeva e colaboradores (2007) publicaram um artigo que identificava os resíduos de aminoácidos na PDK2 responsáveis pela identificação do DCA usando *primers* de oligonucleotídeos como vetores. Estudos recentes conduzidos por Knoechel e seu grupo de pesquisa identificaram um sítio de ligação de DCA entre as quatro hélices do domínio PDK2 R. Foi a partir dessas informações que a pesquisa de Klyuyeva fundamentou a análise fisiológica sobre a identificação da piruvato DCA-ligante e estabeleceu o mecanismo responsável pelo reconhecimento do DCA pela PDHK2. Com esta finalidade, estes pesquisadores removeram uma unidade de alanina por mutagênese da proteína PDK2 de ratos referente à região DCA-ligante, fazendo a posterior identificação por cromatografia. Os efeitos do DCA na atividade enzimática das proteínas de PDK2 mutantes foram testados numa grande variação de concentrações do DCA, entre 0.1 µM a 100 µM. Os autores conseguiram demonstrar a atividade enzimática da PDK2, sendo que em mais duas variantes mutantes constataram um decréscimo de sua atividade em função do aumento na concentração da DCA. Saber o local onde o DCA se liga à PDK é importante já que este complexo regula a atividade da PDC que por sua vez, reestabelece a via apoptótica normal da célula.

Kato et al. (2007) relacionaram a inibição da PDK utilizando o DCA. Inativações seletivas nas isoformas de PDK por inibidores específicos como o DCA têm sido demonstradas pela alteração nos canais de potássio, reestabelecendo a apoptose em células cancerosas e inibindo o desenvolvimento do câncer. Em uma concentração ideal, o DCA presente no meio se liga ao domínio da hélice N-terminal do PDK promovendo uma mudança conformacional na PDK e a inativação da atividade cinética da PDK. Essa mudança conformacional pode ser explicada pelo movimento do resíduo de Histidina 149 que promove o desenrolar da estrutura helicoidal em um pequeno segmento entre os resíduos 148 de Arginina e 151 de Asparagina. Estes pesquisadores afirmam que, de acordo com o modelo utilizado de DCA-ligante, o resíduo 114 de Arginina e 115 de Histidina em PDK2 (que corresponde aos resíduos 148 de Arginina e 149 de Histidina no PDK1), são cruciais na interação do PDK2 com o DCA.

Estudos com diversas linhagens e tipos celulares com alterações neoplásicas, basicamente, apresentaram um comportamento similar: 1) substituição da fosforilação oxidativa pela fermentação aeróbica (efeito Warburg) como via metabólica preferencial na obtenção de energia (mesmo na presença de oxigênio), 2) diminuição na atividade do complexo piruvato desidrogenase, o PDC e 3) desvio da via apoptótica (Heiden, 2009). Em uma pesquisa com células neoplásicas endometriais, Wong (2008) identificou que o uso do ácido dicloroacético (DCA) pode promover a morte celular programada por duas vias principais: uma que é regulada pela atividade mitocondrial (na regulação da atividade do complexo piruvato desidrogenase, o PDC, e da piruvato desidrogenase cinase, a PDK, que regula o PDC) e a outra, determinada pela abertura do canal de íons potássio na membrana plasmática acoplada ao que ele chamou de via NFAT-Kv1.5 (nuclear fator of activated T lymphocytes ligado ao canal de potássio voltagem-dependente Kv1.5). Na via regulada pela atividade mitocondrial, o DCA se liga ao PDK, diminuindo sua ação sobre o PDC. Esse aumento na atividade metabólica do PDC reestabelece o uso da glicose pela fosforilação oxidativa, reduzindo o efeito Warburg e hiperpolarizando a membrana mitocondrial. Isso causa uma translocação de espécies reativas de oxigênio como o H₂O₂ (chamados de ROS - reactive oxygen species) e citocromo c da mitocôndria para o citoplasma celular, induzindo assim a apoptose pela ativação das caspases (WANG, 2001).

As informações sobre a relação da hiperpolarização da membrana mitocondrial na morte celular programada também foi identificada nos trabalhos de Bonnet et al. (2007) que propuseram que a eliminação de íons potássio pela dilatação dos canais de potássio voltagem-dependente Kv1.5 hiperpolarizando a célula, evita a entrada de Ca²⁺ na célula. Essa diminuição intracelular dos níveis de Ca²⁺ inibe a ativação do NFAT que promove o aumento da expressão de Kv1.5, criando um ciclo de *feedback* positivo (níveis baixos de íons potássio intracelular / despolarizam a membrana plasmática / entra menos número de íons Ca²⁺ na célula / promovem diminuição do [Ca²⁺] intracelular/ desencadeando, então, a inativação do NFAT / que resulta no aumento da expressão de canais Kv1.5 / diminuindo, novamente, a concentração intracelular de íons potássio). Esse aumento na quantidade de canais de potássio voltagem-dependente faz diminuir a concentração intracelular desse íon. Associado com a liberação de citocromo c para o citoplasma e com o fator apoptose-induzido (AIF, apoptosis inducing factor), as caspases são ativadas, promovendo a indução da apoptose. Em células neoplásicas, o NFAT atua no núcleo inibindo a expressão do Kv1.5, mesmo na presença do AIF. Com a falta de produção dos canais de potássio voltagem-dependente, os níveis desse íon não diminuem e não ocorre ativação

das caspases. O DCA atuou em células neoplásicas, sem toxicidade aparente para as células sadias.

Li et al. (2008) analisaram a evolução cinética do dicloroacetato em humanos baseados em investigação farmacocinética. Esse tipo de pesquisa se mostra importante para o tratamento de doenças mitocondriais ou relacionadas às mitocôndrias, tendo em vista que os efeitos do DCA serão mais eficientes se o caminho fisiológico no corpo humano for conhecido, podendo melhorar sua ação, reduzir os possíveis efeitos colaterais e difundir para o maior número de pessoas. Trabalhando com dois modelos de administração da droga, uma por via intravenosa e outro por via oral, estes pesquisadores identificaram as formas de absorção e rota metabólica do DCA em humanos. Doses farmacológicas de DCA variaram entre 10 e 50mg/kg ao dia, aplicados por via intravenosa com intervalos alternados. Já por via oral, 2mg do DCA diluído em meio litro de água. Foi observado que o DCA foi absorvido pelo trato gastrointestinal e apenas 1% do total da dose foi excretada pela urina. O foco das pesquisas em geral, tem se voltado para a identificação de enzimas responsáveis pela biotransformação do DCA e o mecanismo envolvido na inibição de seu metabolismo. Sendo assim, o modelo de metabolismo do DCA pesquisado por Li e colaboradores, sugere que em doses baixas, administrado por via oral (em concentração medida em µg/L de água) tem uma menor contribuição à farmacocinética do DCA, contudo, ligado a proteína sérica, tem uma importante participação. Em altas doses, o DC produz inibição de seu próprio metabolismo resultando numa lenta distribuição pelo corpo.

Michelakis (2009) (*Pulmonary Hypertension Program and Vascular Biology Group*) desenvolve um projeto pioneiro no uso terapêutico do ácido dicloroacético em células neoplásicas de fígado em ratos de laboratório. Juntamente com seus colaboradores, obteve bons resultados na redução de tumores de cobaias e em alguns casos, a eliminação total da neoplasia. Suas pesquisas no uso desse ácido na cura do câncer podem ser consideradas revolucionárias sob diversos aspectos, mas é justamente no setor financeiro seu maior impacto. Desde o produtor de fármacos até quem os comercializa, passando, inclusive, pelo médico que indica o melhor tratamento e, conseqüentemente, os medicamentos que serão utilizados, todos poderão ser afetados por essa descoberta.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram encontrados 991 artigos publicados no período de 1995 e 2009 relacionando o dicloroacetato e o complexo piruvato desidrogenase. Nos últimos anos do século XX, apenas 104 artigos foram considerados relevantes para o trabalho e um aumento significativo no número de publicações foi possível identificar 874 no período de 2000 e 2009. Isso mostra o avanço nas pesquisas que relacionam o ácido dicloroacético com

a atividade do complexo piruvato desidrogenase. Dentre os 72 artigos selecionados para compor esta revisão, apenas 36 foram selecionados.

As pesquisas revelam que existe uma característica comum entre as linhagens de células neoplásicas quanto ao seu metabolismo energético, o efeito Warburg que desvia a fosforilação oxidativa para a glicólise aeróbica, mesmo em meio contendo oxigênio. A modificação do piruvato em acetil-CoA é realizada pelo PDC que por sua vez, é regulado pela PDK. Sua participação no efeito Warburg é diminuir a atividade do PDC e desorganizar a cascata de eventos que precedem a apoptose. O DCA atua na PDK, permitindo que o PDC realize a modificação do piruvato em acetil-CoA e a fosforilação oxidativa se reestabeleça.

A apoptose ocorre sob a influência de diversos fatores tais como a liberação de citocromo c para o citoplasma, liberação do fator de apoptose-induzido, níveis diminutos de potássio intracelular, metabolismo energético das mitocôndrias e das caspases. Em células neoplásicas este equilíbrio é desfeito e estas passam a “burlar” a apoptose e se mantêm indefinidamente.

O DCA, por reestabelecer o metabolismo da glicose por sua atuação no PDK (consequentemente, no PDC), a via apoptótica pode ser refeita e a célula neoplásica realizar a morte programada. Pesquisas relacionadas ao uso em humanos do DCA indicaram que, em doses adequadas esta substância não apresenta toxicidade às células normais. Dessa forma, o uso do DCA pode ser uma alternativa para o tratamento do câncer, considerada menos invasiva, de custo reduzido e de fácil acesso.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2004. 1463 p.
- BERENDZEN, K. et al. Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency. **Mitochondrion**, Amsterdam v. 6, n. 3, p. 126-135, Jun. 2006.
- BERG, J. M. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 114 p.
- BONNET, S. et al. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. **Cancer Cell**, Cambridge, v.11, n. 1, p. 37-51, jan. 2007.
- BRAHIMI-HORN, M. C. et al. Hypoxia signalling controls metabolic demand. **Curr. Opin. Cell Biol.**, London, v. 19, n. 2, p. 223-229, apr. 2007.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.
- CISZAK, E. M. Structural basis for flip-flop action of thiamin pyrophosphate-dependent enzymes revealed by human pyruvate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, n. 23, p. 21240-21246, mar. 2003.
- CUEZVA, J. M. The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1792, n. 12, p. 1145-1158, dec. 2009.
- FAURE, M.; BOURGUIGNON, J. Interaction between the lipoamide-containing H-protein and the lipoamide dehydrogenase (L-protein) of the glycine decarboxylase multienzyme system: crystal structures of H- and L-proteins. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 267, n. 10, p. 2890-2898, may. 2000.
- GAMBHIR, S. S. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. **Nat. Rev., Cancer**, London, v. 2, n. 9, p. 683-693, sept. 2002.
- GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis? **Nat. Rev., Cancer**, London, v. 4, n. 11, p. 891-899, nov. 2004.
- GLUSHAKOVA, L. G. et al. AAV3-mediated transfer and expression of the pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit gene causes metabolic remodeling and apoptosis of human liver cancer cells. **Mol. Genet. Metab.**, Orlando v. 98, n. 3, p. 289-299, nov. 2009.
- GOGVADZE, V. et al. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? **Trends Cell. Biol.**, Cambridge, v. 18, n. 4, p.165-173, mar. 2008.
- HAN, Z. et al. A combined therapeutic approach for pyruvate dehydrogenase deficiency using self-complementary adeno-associated virus serotype-specific vectors and dichloroacetate. **Mol. Genet. Metab.**, Orlando v. 93, p. 381-387, feb. 2008.
- HEIDEN, M. G. V. et al. Understanding the warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science (Wash.)**, Washington, v. 324, n. 5930, p. 1029-1033, may. 2009.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Papel das mitocôndrias na transformação e armazenamento de energia. In: _____. **Biologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 63-75.
- KATO, M. et al. Distinct structural mechanisms for inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms by AZD7545, dichloroacetate and radicicol. **Structure (Lond.)**, London, v. 15, n. 8, p. 992-1004, aug. 2007.
- KLYUYEVA, A.; TUGANOVA, A.; POPOV, K. M. Amino acid residues responsible for the recognition of dichloroacetate by pyruvate dehydrogenase kinase 2. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 581, p. 2988-2992, Apr. 2007.
- LEHNINGER, A.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2003. 975 p.
- LI, T. Quantitative evaluation of dichloroacetic acid kinetics in human-a physiologically based pharmacokinetic modeling investigation. **Toxicology**, Amsterdam, v. 245, n. 1-2, p. 35-48, mar. 2008.
- MCFATE, T. et al. Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 283, n. 33, p. 22700-22708, aug. 2008.
- MICHELAKIS, E. DCA Evangelos Michelakis University of Alberta. University Alberta, Department of Medicine. Disponível em: <<http://www.youtube.com/watch?v=HMGL1LiLzWw>>. Acesso em: 14 out. 2009
- PURVES, W. K. et al. **Vida: a ciência da Biologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
- SEYDA, A. **pyruvate dehydrogenase complex correlation between structure and function**. 2001. 197 f. Tese (Doutorado) - University of Toronto, Canada, 2001.
- SHAW, R. J. Glucose metabolism and cancer. **Curr. Opin. Cell Biol.**, London, v. 18, n. 6, p. 598-608, dec. 2006.
- SPANEMBERG, L. 2001. **Doenças mitocondriais: uma revisão sobre MERRF**. Disponível em: <[http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture33/Lecture 33.htm](http://www.mikeblaber.org/oldwine/BCH4053/Lecture33/Lecture%2033.htm)>. Acesso em: 09 out. 2009.
- WAHR, J. A.; ULLRICH, K.; BOILING, S. F. Dichloroacetate enhances myocardial functional and metabolic recovery following global ischemia. **J. Cardiothoracic Vasc. Anest.**, Philadelphia, v. 8, n. 2, p. 192-197, apr. 1994.
- WANG, X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor NY, v. 15, n. 22, p. 2922-2933, nov. 2001.
- WONG, J. Y. Y. Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells. **Gynecol. Oncol.**, New York, v. 109, n. 3, p. 394-402, june. 2008.
- YU, X. Structures of the human pyruvate dehydrogenase complex cores: a highly conserved catalytic center with flexible

n-terminal domains. **Structure (Lond.)**, London, v. 16, n. 1, p. 104-114, jan. 2008.