

Mestrado Integrado em Medicina

Metabolismo glicídico das células neoplásicas e a sua aplicação no tratamento oncológico

Maria Inês Sequeira Leal

M

2020



Metabolismo glicídico das células neoplásicas e a sua aplicação no tratamento oncológico

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina, submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Estudante: Maria Inês Sequeira Leal

Aluna do 6º ano profissionalizante de Mestrado Integrado em Medicina

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Correio eletrónico: mariaines.sequeiraleal@gmail.com

Orientador: Drª Joana Febra

Assistente Hospitalar de Oncologia do Centro Hospitalar Universitário do Porto

Afiliação: Hospital Geral Santo António - Centro Hospitalar Universitário do Porto

Coorientador: Prof. Dr António Araújo

Diretor do Serviço de Oncologia do Centro Hospitalar Universitário do Porto

Professor Catedrático Convidado do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar

Afiliação: Hospital Geral Santo António - Centro Hospitalar Universitário do Porto

Porto, Junho de 2020

Assinatura do estudante

Maria Inês Azeite

Assinatura do orientador

[Assinatura]

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo apoio incondicional ao longo de todas as etapas da minha vida e nesta em especial. Agradeço-vos profundamente toda a força, todos os conselhos, o imenso carinho... mas sobretudo por me incentivarem a seguir sempre os meus sonhos!

Agradecimentos

Agradeço à Dr^a Joana por ter aceite fazer parte deste projeto e por toda a confiança transmitida desde o primeiro momento. Por todos os esclarecimentos, conselhos e preocupação. Mas sobretudo, agradeço por me ter feito interessar tanto pela Oncologia.

Agradeço às minhas amigas e futuras colegas Mariana, Sofia Miranda, Ludovina e Inês Palhinhas por serem os meus pilares ao longo destes 5 anos. Obrigada por todos os momentos inesquecíveis que vivemos.

Agradeço ao Tiago pela partilha de momentos, sonhos e emoções. Obrigada por acreditares em mim e pela força e apoio nos momentos mais difíceis.

Agradeço a toda a minha família e amigos pela força em momentos de dúvida, pela paciência em momentos de stress e apoio incondicional.

Resumo

Introdução - O metabolismo energético celular é um dos principais mecanismos afetados pelo processo carcinogénico, nomeadamente o metabolismo glicídico. De facto, a reprogramação metabólica da célula tumoral é atualmente considerada um *hallmark* do cancro e resulta da sobreexpressão de genes envolvidos na via glicolítica, como os transportadores transmembranares de glicose, os GLUTs, e de enzimas envolvidas na glicólise aeróbia. Estas alterações permitem satisfazer as necessidades energéticas aumentadas associadas ao rápido crescimento e proliferação das células neoplásicas.

Por esta razão, as células neoplásicas são mais sensíveis a alterações na concentração de glicose do que as células normais e o reconhecimento desta vulnerabilidade levou à criação de novas estratégias terapêuticas anti-cancerígenas que têm o transporte e metabolismo da glicose como alvos. A restrição do suprimento glicídico através da utilização de inibidores dos GLUTs ou de inibidores da glicólise pode ser, então, uma estratégia de tratamento anti-cancerígeno.

Objetivo - Analisar sistematicamente as informações disponíveis relativas ao desenvolvimento de agentes com ação antiglicolítica (inibidores dos transportadores de glicose e inibidores da glicólise) que possam ser utilizados na prática clínica no tratamento de doenças oncológicas.

Desenvolvimento - Foram desenvolvidos diversos inibidores da via glicolítica e do transporte através dos GLUT que demonstraram eficácia *in vitro* e *in vivo*, no entanto, assegurar a eficácia clínica e segurança dos mesmos tem sido um desafio, existindo, neste momento vários ensaios clínicos a decorrer. Existem diversas moléculas em estudo para se tornarem fármacos com alvos na via glicolítica, entre elas destacamos a 2-desoxiglicose, o 3-bromopiruvato, o dicloroacetato e a silibinina, as quais são aprofundadas neste trabalho.

Conclusão - Estudos pré-clínicos realizados a estes compostos revelaram resultados muito promissores quer *in vitro*, quer *in vivo*, enquanto que os resultados de ensaios clínicos demonstraram apenas eficácia moderada ou sem eficácia quando usados em monoterapia. No entanto, estudos pré-clínicos e ensaios clínicos mostram que estes inibidores apresentam um grande potencial quando combinados com outras terapêuticas dado que promovem a sensibilização das células tumorais à ação de outros tratamentos anti-cancerígenos, aumentando, desta forma, a sua eficácia e seletividade. É necessária investigação adicional acerca da utilização de terapia combinada de fármacos quimioterápicos ou técnicas de radiação convencionais com agentes antiglicolíticos, com o objetivo de fornecer novas estratégias terapêuticas no tratamento oncológico.

Palavras-Chave: metabolismo do cancro, efeito Warburg, tratamento do cancro, inibidores glicolíticos.

Abstract

Introduction - Cancer cell metabolism have been recognized as one of the main factors affected by the tumorigenesis. In fact, the reprogrammed metabolism of glucose in tumor cells is currently considered a hallmark of cancer which results from upregulation of genes involved in glycolysis, such as transmembrane glucose transporters (GLUTs) and enzymes. It is believed that these changes are required to meet the increased energy needs involved in supporting rapid tumor progression and proliferation, characteristics common to all types of cancer.

For this reason, cancer cells are more sensitive than normal cells to changes in glucose concentration, and the recognition of this vulnerability has led to targeting glucose transport and metabolism as a new anticancer strategy. Therefore, restricting glucose supply with glucose transport or glycolysis inhibitors can be used as an anticancer strategy.

Objective - Examine and discuss the information available regarding the development of anti-glycolytic agents (inhibitors of glucose transporters and glycolytic inhibitors) which can be used in clinical practice for the treatment of cancer.

Development - Several inhibitors of the glycolytic pathway and GLUT transport have been shown to be effective in vitro and in vivo. However, ensuring their clinical efficacy and safety has been a challenge, and there are currently several clinical trials ongoing. Several molecules are being studied to become drugs with targets in glycolytic pathway, such 2-deoxyglucose, 3-bromopyruvate, dichloroacetate and silybinin, which are further analyzed in this work.

Conclusion - Pre-clinical studies carried out with these molecules have shown very promising results both in vitro and in vivo, while results of clinical trials have shown only moderate or no efficacy when used as monotherapy. However, preclinical studies and clinical trials show that these inhibitors have a great potential when combined with other therapies since they promote the sensitization of tumor cells to the action of other anti-cancer treatments, thus increasing their effectiveness and selectivity. Further research is needed on the use of combined therapy with chemotherapy drugs or conventional radiation techniques with anti-glycolytic agents, in order to provide new therapeutic strategies in cancer treatment.

Keywords: cancer metabolism, Warburg effect, cancer treatment, glycolytic inhibitors.

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
DCA	Dicloroacetato
DTL	Dose Toxicidade Limitante
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
HK II	Hexoquinase II
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
IARC	Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro
IDH	Isocitrato desidrogenase
LDH	Lactato desidrogenase
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDH	Piruvato desidrogenase
PDK	Piruvato desidrogenase quinase
PET	<i>Positron Emission Tomography</i>
PGK	Fosfoglicerato cinase
PSA	Antígeno prostático específico
SDH	Succinato desidrogenase
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
αKD	α-Cetoglutarato desidrogenase
2-DG	2-desoxi-D-Glicose
2-DG-6-P	2-desoxi-D-Glicose-6-Fosfato
3BP	3-bromopiruvato

Índice

Agradecimentos	i
Resumo	ii
<i>Abstract</i>	iii
Lista de Abreviaturas.....	iv
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vi
Introdução	1
Metodologia.....	2
Vias Glicolíticas.....	3
Efeito Warburg.....	4
Glicólise - Alvo no tratamento do cancro.....	6
Inibidores da Glicólise	8
2-Desoxi-D-Glicose	8
3-Bromopiruvato	10
Dicloroacetato	13
Inibidores dos GLUTs.....	16
Silibinina	18
Conclusão.....	19
Apêndice	21
Bibliografia	28

Lista de Figuras

Figura I - Via glicolítica e enzimas envolvidas.....	21
Figura II - Metabolismo da glicose em células normais e células neoplásicas.....	22
Figura III - Via glicolítica e respectivos locais de atuação dos inibidores da glicólise e dos GLUT.....	23
Figura IV - Mecanismo de ação do 2-Desoxiglicose	24
Figura V - Mecanismos de ação do 3-Bromopiruvato	25

Lista de Tabelas

Tabela I - Inibidores glicolíticos	26
Tabela II - Inibidores dos transportadores GLUT	27

Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cancro é um termo genérico para um conjunto de doenças que se caracterizam por um crescimento celular anormal e capacidade de invasão dos tecidos adjacentes e outros órgãos à distância.^[1]

As doenças neoplásicas são uma das principais causas de morte a nível mundial, sendo que, segundo as estatísticas globais de cancro de 2018 da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Cancro (IARC), foram diagnosticados 18,1 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo e 9,6 milhões de mortes relacionadas com esta doença, em 2018.^[1] Atualmente, as doenças oncológicas são a segunda causa de morte em Portugal, depois das doenças cardiovasculares, e o seu peso percentual no total de mortes revela um aumento constante e progressivo.^[2]

A carcinogénese é um processo complexo, que ocorre em vários passos e que se caracteriza pela eliminação de mecanismos de proteção celular, como a resposta antiproliferativa e mecanismos de morte celular programada. Este processo ocorre devido a mutações no genoma celular, com ativação de oncogenes e diminuição dos genes de supressão tumoral.^[3]

O metabolismo energético celular é um dos principais mecanismos afetados pelo processo carcinogénico, nomeadamente o metabolismo glicídico. De facto, a reprogramação metabólica da célula tumoral é atualmente considerada um *hallmark* do cancro.^[4]

Estas alterações metabólicas resultam da sobreexpressão de genes envolvidos na via glicolítica, como os transportadores transmembranares de glicose, os GLUTs, e de enzimas envolvidas na glicólise aeróbia.^[5] Desta forma, o metabolismo da glicose no cancro é maioritariamente caracterizado por dois eventos bioquímicos: aumento da captação celular de glicose e glicólise aeróbia.^[6] Acredita-se que estas alterações permitam satisfazer as necessidades energéticas aumentadas e, assegurando o crescimento e proliferação celulares rápidos e descontrolados, características comuns a todos os tipos de cancro.^[7]

Por esta razão, as células neoplásicas são mais sensíveis a alterações na concentração de glicose do que as células normais e o reconhecimento desta vulnerabilidade levou à criação de novas estratégias terapêuticas anti-cancerígenas que têm o transporte e metabolismo da glicose como alvos. A restrição do suprimento glicídico através da utilização de inibidores dos GLUTs ou de inibidores da glicólise pode ser, então, uma estratégia de tratamento anti-cancerígeno.^[8-10] O metabolismo tumoral alterado já é explorado na prática clínica através da utilização de análogos da glicose radioativos, como a 18-fluoro-desoxiglicose, no diagnóstico de doença neoplásica através de Tomografia por Emissão de Positrões (PET).^[11] Contudo, a utilização destes compostos como estratégia terapêutica não é uma prática comum na oncologia. Embora estes inibidores tenham

demonstrado apenas eficácia moderada quando usados isoladamente, estudos mostram que apresentam um grande potencial quando combinados com outras terapêuticas ao promoverem a sensibilização das células tumorais à ação de outros tratamentos anti-cancerígenos, aumentando, desta forma, a sua eficácia e seletividade.^[5]

O aumento da incidência e da mortalidade associados às doenças oncológicas conferem um carácter urgente à pesquisa de novas formas de tratamento.

Assim, este trabalho tem como objetivo analisar sistematicamente as informações disponíveis relativas ao metabolismo glicídico nas células tumorais e ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas com base no mesmo, nomeadamente desenvolvimento de agentes com ação antiglicolítica (inibidores dos transportadores de glicose e inibidores da glicólise) que possam ser utilizados na prática clínica no tratamento de doenças oncológicas.

Metodologia

A metodologia para a realização da revisão incluiu uma pesquisa bibliográfica, realizada entre o dia 1 de setembro de 2019 e o dia 8 de Janeiro de 2020, através da plataforma PubMed, utilizando as seguintes palavras-chave: metabolismo do cancro, efeito Warburg, tratamento do cancro, inibidores glicolíticos. Os critérios de inclusão foram artigos científicos escritos na língua inglesa, referentes à temática, completos e publicados nos últimos 10 anos. Cumprindo esta premissa, foram encontrados 222 artigos pelo título, a partir dos quais se seleccionaram 41 tendo em conta o abstract.

Depois do estudo inicial sobre o tema, foram seleccionados 4 fármacos para análise mais detalhada, com base no volume de investigação e informação disponível acerca dos mesmos. Assim, foi realizada nova pesquisa bibliográfica, entre o dia 1 de Fevereiro e o dia 30 de Março de 2020, desta vez recorrendo também à plataforma ClinicalTrial.gov e com os seguintes termos: 2-desoxi-D-Glicose, 3-bromopiruvato, dicloroacetato, silibinina e cancro. Apenas foram incluídos artigos escritos na língua inglesa, completos e publicados nos últimos 15 anos.

Vias Glicolíticas

A glicólise é um processo catabólico que inclui uma sequência de reacções enzimáticas que ocorrem no citoplasma e que convertem 1 molécula de glicose em 2 de piruvato, sendo a energia libertada nesta reacção armazenada em 2 moléculas de ATP e 2 moléculas NADH (Fig.1). Seguidamente, e na presença de oxigénio, o piruvato é oxidado a dióxido de carbono e água na mitocôndria, através de um processo designado de fosforilação oxidativa, com produção de 36 moléculas de ATP.^[3, 12] Na ausência de oxigénio, o piruvato é transformado a ácido láctico através da glicólise anaeróbia, com produção de 2 moléculas de ATP (Fig.2).^[3, 12] Esta via metabólica alternativa é muito importante no cancro, dado que, devido ao rápido crescimento e proliferação, grande parte das células dentro de um tumor encontram-se em hipóxia, precisando da fermentação láctica para obter energia.^[4] Todavia, a fermentação láctica também pode ocorrer na presença de oxigénio, designando-se, neste caso, glicólise aeróbia.^[3, 12]

Sendo a glicólise aeróbia um processo 18 vezes menos eficiente na produção de ATP quando comparado com a fosforilação oxidativa, as células neoplásicas precisam de aumentar significativamente a taxa de glicólise para compensar a menor eficiência energética desta via metabólica.^[4] Acelerando a conversão de glicose a ácido láctico, é possível a produção de maiores quantidades de ATP em menos tempo.^[13] De facto, a taxa de produção de ATP pode ser 100 vezes mais rápida com a glicólise aeróbia quando comparada com a fosforilação oxidativa, permitindo às células neoplásicas a produção de energia suficiente para assegurar as suas necessidades energéticas.^[14] Para assegurar este metabolismo acelerado, as células tumorais aumentam a expressão de genes intervenientes na via glicolítica, nomeadamente dos GLUTs de forma a aumentar a captação de glicose; bem como das enzimas que catalisam a cascata de reacções da glicólise aeróbia e que, assim, permitem a rápida transformação da glicose a ácido láctico.^[5]

Efeito Warburg

A importância do metabolismo no cancro foi reconhecida há muitos anos, quando em 1920 Otto Warburg estudou o metabolismo da glicose em amostras celulares tumorais.^[15] Warburg observou que, em condições de concentração normal de oxigénio, as células normais produzem a maior parte da sua energia pela respiração mitocondrial,^[16] ao contrário das células neoplásicas, que utilizavam maioritariamente a fermentação láctica, mesmo na presença de oxigénio (Fig.2).^[15] A alteração observada no metabolismo glicídico das células tumorais designa-se de “Efeito de Warburg” e, embora este fenómeno tenha sido observado há mais de 80 anos, a sua interpretação foi alvo de muita controvérsia e evolução ao longo dos anos.^[4] Warburg acreditava que esta alteração metabólica se devesse a disfunção mitocondrial e que a utilização da glicólise citosólica consistisse numa alternativa forçada para a produção de energia.^[4] No entanto, vários estudos demonstraram que muitas células cancerígenas utilizam a glicólise aeróbia mesmo sem nenhuma alteração mitocondrial detetada, enquanto outros comprovaram que células tumorais são capazes de realizar fosforilação oxidativa em caso de inibição glicolítica,^[8] provando que a hipótese de Warburg não estava correta.^[4]

Inicialmente alguns investigadores assumiram, ainda, que a hipóxia seria o evento desencadeante deste efeito, dado que, durante a carcinogénese, a proliferação celular descontrolada afasta uma parte das células tumorais dos vasos sanguíneos, os quais garantem a disponibilidade de nutrientes e oxigénio necessários ao crescimento celular.^[3] Porém, atualmente acredita-se que esta alteração metabólica ocorra numa fase inicial do processo de carcinogénese, antes do tumor ser sujeito a condições de hipóxia.^[17] E, de facto, o metabolismo alterado da glicose nas células tumorais mantém-se mesmo na presença de oxigénio, o que significa que este não é apenas uma simples adaptação à hipóxia, mas provavelmente uma parte integrante do processo de carcinogénese que confere vantagem proliferativa, crucial no desenvolvimento de um fenótipo maligno.^[8] Recentemente, foram descobertos uma grande variedade de oncogenes, presentes em vários tipos de cancro, os quais têm a capacidade de ativar diretamente componentes do metabolismo glicídico. Um desses oncogenes é o *Akt*, uma serina/treonina quinase responsável pela modulação de vários processos celulares, nomeadamente a regulação positiva de enzimas marca passo da glicólise como a hexocínase e a fosfofrutocinase, bem como de GLUT1. Por esta razão, *Akt* é, inclusivé, apelidada de “a cinase de Warburg” por ser capaz de promover as mudanças metabólicas que as células têm de sofrer durante o processo de malignização.^[18, 19] Outro oncogenes é o *K-Ras*, responsável pelo aumento da expressão de GLUT1 em células tumorais.^[20]

Foi recentemente descoberto que a produção de ATP não é a única prioridade da reprogramação metabólica das células tumorais, mas tem também como objetivo a produção de intermediários metabólicos para a síntese de biomassa.^[21, 22] Assim, e embora a glicólise aeróbia se revele um processo pouco eficiente do ponto de vista energético, a sua utilização preferencial pelas células tumorais, aparentemente contra-produtiva, confere-lhes vantagem adaptativa. Por um lado, torna as células neoplásicas insensíveis a condições transitórias ou permanentes de hipóxia; por outro contribui para a produção de nucleosídeos e aminoácidos, precursores de ADN, proteínas, e outras macromoléculas essenciais para crescimento e proliferação celular, bem como de NADPH, um potente antioxidante essencial para a eliminação de espécies reativas de oxigénio (ERO). Constitui, ainda, uma forma rápida de produção energética, devido ao aumento de captação de glicose.^[5, 21-24] Por fim, o lactato resultante da glicólise aeróbia tem a capacidade de promover a invasão tumoral favorecendo a migração celular, angiogénese, o escape ao sistema imunológico e, ainda, radioresistência.^[25] Tal deve-se ao facto das quantidades elevadas de lactato secretadas pelas células neoplásicas serem responsáveis pela acidificação do ambiente extracelular tumoral.^[3] Estudos *in vitro* demonstram que a invasão tumoral é estimulada por um baixo pH do meio, efeito atribuído ao aumento da libertação de cathepsina B, uma protease envolvida na remodelação da matrix extracelular.^[26] Recentemente, descobriu-se que alta taxa de lactato pode suprimir a proliferação de linfócitos T citotóxicos humanos, além de diminuir a sua atividade citotóxica. Esses efeitos podem contribuir para o escape das células neoplásicas à ação do sistema imunológico.^[27] A acidificação do microambiente tumoral contribui, ainda, para a aquisição de resistência a fármacos pelas células tumorais. Estudos mostram que fármacos anti-cancerígenos como a doxorubicina, mitoxantrona e a vincristina, por serem bases fracas, ficam protonados em meio ácido, e assim impedidos de atravessar a membrana celular.^[3] Atualmente, o efeito Warburg é uma área de investigação ao nível do cancro muito ativa uma vez que o transporte e metabolismo glicídico alterados podem ser utilizados como uma estratégia terapêutica eficaz contra as doenças neoplásicas.^[4]

Glicólise - Alvo no tratamento do cancro

O efeito de Warburg já é explorado na prática clínica através da utilização da técnica imagiológica PET com 18-fluoro-desoxiglicose no diagnóstico de doença neoplásica.^[11] Esta técnica baseia-se no aumento da captação de glicose pelas células tumorais, comparativamente às células normais. Uma vez que o análogo de glicose radioativo usado como contraste não é metabolizado, este acumula-se nos tecidos facilitando a identificação dos tumores.^[28]

Além da sua utilização para diagnóstico clínico, a glicólise aeróbica pode constituir uma importante ferramenta no tratamento oncológico. Esta abordagem baseia-se no facto das células tumorais serem mais sensíveis ao tratamento com inibidores do metabolismo energético do que as células normais.^[29]

A constatação de que as células tumorais dependem de um metabolismo glicídico aumentado quando comparadas com as células normais para sobreviver e proliferar, deu origem ao conceito de que a privação de glicose poderia ser uma abordagem anticancerígena eficaz.^[4] De facto, a privação de glicose limita a produção de ATP, forçando as células a desacelerar a proliferação e a entrar em apoptose.^[30] Atualmente, existem várias linhas de investigação que têm como alvo o metabolismo tumoral alterado, com o objetivo de identificar pequenas moléculas capazes de inibir especificamente passos chave na glicólise, contribuindo assim para um estado de privação de glicose.^[31-33] A glicólise pode ser inibida através do bloqueio do transporte transmembranar, impedindo a entrada de glicose na célula tumoral;^[10, 34] ou mesmo através da inibição das enzimas responsáveis por pela via glicolítica, como por exemplo a hexocinase, fosfofrutocínase, quinase do piruvato, entre outras.^[4, 35-37]

A seletividade para destruir células cancerígenas, sem afetar as células normais é uma das preocupações a ter em consideração no desenvolvimento de novos tratamentos para o cancro. Uma forma de alcançar a seletividade é tirar partido das diferenças metabólicas entre células normais e tumorais, como é o caso do aumento da glicólise aeróbica e da dependência das células da via glicolítica para obter ATP.^[38] Assim, direcionar a terapia para a via glicolítica pode matar preferencialmente as células tumorais, pelo que estas moléculas antiglicolíticas são desenvolvidas para afetar proteínas específicas do tumor ou que estejam com expressão aumentada nas células tumorais.^[38, 39]

Além disso, os estudos têm demonstrado que inibição da glicólise, além de induzir a apoptose nas células neoplásicas, tem, também, a capacidade de reverter processos de resistência a outros fármacos. Acredita-se que tal se deva ao facto das células com resistência a múltiplos fármacos expressarem nas suas membranas um transportador dependente de ATP, a glicoproteína-P, que

desloca muitos dos fármacos para o meio extracelular. Assim, ao diminuir os níveis de ATP, diminuimos a atividade deste transportador e, conseqüentemente, a resistência.^[39] Por outro lado, a evidência mostra que a taxa de glicólise aeróbia aumentada, com conseqüente acidificação do meio extracelular, contribui para a aquisição de resistência do cancro a múltiplos fármacos. E por este motivo, a diminuição de produção de ácido láctico, resultante da inibição da glicólise permite a reversão destas resistências a vários fármacos utilizados no tratamento oncológico.^[3] Desta forma, a combinação de inibidores do metabolismo com outros fármacos antitumorais poderia aumentar a eficácia do tratamento.^[40]

Já foram desenvolvidos diversos inibidores que demonstraram eficácia *in vitro* e *in vivo*, no entanto, assegurar a eficácia clínica e segurança dos mesmos tem sido um desafio, existindo, neste momento vários ensaios clínicos a decorrer.^[4] Existem diversas moléculas em estudo para se tornarem fármacos com alvos na via glicolítica, entre elas a 2-desoxiglicose, o 3-bromopiruvato, a oxitiamina, a lonidamina ou o imatinib (tabela 1).^[41]

Inibidores da Glicólise

❖ 2-Desoxi-D-Glicose

2-desoxi-D-Glicose (2-DG) é um análogo sintético da glicose, que apresenta um grupo hidrogénio em vez de um grupo hidroxilo na posição 2 da glicose.^[42] Devido a esta semelhança estrutural com a glicose, o 2-DG compete com a mesma pela ligação aos GLUTs e às hexocínases, diminuindo a sua captação celular e inibindo a glicólise.^[4] Tal como a glicose, o 2-DG entra nas células principalmente através dos GLUTs por difusão facilitada, embora uma pequena parte seja captada de forma ativa pelos transportadores SGLT.^[43, 44] Uma vez dentro das células, o 2-DG compete com a glicose pela ligação à hexocinase, sendo assim fosforilado a 2-desoxi-D-Glicose-6-Fosfato (2-DG-6-P).^[45] Contudo, devido à ausência do grupo hidroxilo, este composto não sofre isomerização a frutose-6-fosfato, o que resulta na acumulação intracelular de 2-DG-6-P e consequente inibição da glicólise, com depleção de ATP (Fig.4).^[45, 46] Uma vez que o 2-DG inibe o passo limitante inicial de todo o mecanismo glicídico, quer a glicólise quer a fosforilação oxidativa vão ser afetadas pela sua ação.^[47] Este bloqueio é mais efetivo em condições de hipóxia, dado que na presença de oxigénio a produção de ATP ocorre por vias alternativas a partir de ácidos gordos e aminoácidos.^[42]

O 2-DG não atua apenas como inibidor da glicólise, interferindo com múltiplas vias celulares, pelo que a toxicidade que lhe está associada não resulta apenas de um mecanismo, mas sim de um conjunto de efeitos metabólicos. Além de promover a depleção celular de ATP, o 2-DG aumenta o stress oxidativo (pela diminuição do NADPH), impede a glicosilação das proteínas e induz autofagia.^[42, 48, 49]

Estes efeitos são observados principalmente nas células tumorais, sem afetarem de forma significativa a viabilidade das células normais. Além disso, a capacidade única de afetar as células tumorais sob condições de hipóxia, o que normalmente limita a ação dos agentes citotóxicos tradicionais, torna o 2-DG um candidato promissor não apenas para monoterapia, mas também para terapia combinada com outros fármacos e radioterapia.^[42]

Estudos *in vitro* e *in vivo* realizados numa grande variedade de linhas celulares comprovaram o seu efeito antitumoral.^[50] Vários estudos *in vitro* demonstraram diminuição do crescimento de células tumorais de vários tipos de cancro na presença de 2-DG, nomeadamente células tumorais de cancro da mama^[51, 52], próstata^[53], cólon^[54], pâncreas^[55], ovário^[46], de células escamosas da cabeça e pescoço^[46] e, ainda, células de mesoteliomas e glioblastomas^[46].

Os resultados dos estudos *in vivo* realizados com o 2-DG não foram tão satisfatórios, revelando que, em modelos animais, alguns dos tumores acima descritos não eram sensíveis à sua ação citotóxica.^[50] Apesar de não conseguirem comprovar a sua eficácia em monoterapia, estes estudos demonstraram a capacidade do 2-DG para sensibilizar os vários tipos de cancros à ação de agentes quimioterápicos e da radiação, quando em combinação com outras formas de tratamento.^[50]

Assim, embora os efeitos nocivos desta molécula nas células neoplásicas isolada não sejam suficientes para induzir morte celular, quando aliados à ação de agentes citotóxicos ou à radiação exercem um efeito sinérgico que aumenta significativamente a eficácia de cada agente.^[56]

São exemplos de combinações com ação sinérgica comprovadamente eficaz os seguintes: 2-DG e doxorubicina no osteosarcoma^[57], 2-DG e paclitaxel no cancro do pulmão não pequenas células^[57], 2-DG e cisplatina, doxorubicina e gemcitabina no cancro da bexiga^[58], 2-DG e 5-Fluorouracil no cancro do pâncreas^[59], 2-DG e STX140 nos cancros da mama e próstata^[60] e 2-DG e etoposídeo nos linfomas^[61]. Estes resultados podem ser explicados por vários mecanismos: os agentes quimioterápicos desempenham uma atividade anti-angiogénica, promovendo um microambiente tumoral de hipóxia, que sensibiliza as células tumorais à ação do 2-DG; a depleção de ATP assegurada pela inibição da glicólise impede a reparação do ADN danificado pelos agentes quimioterápicos; a depleção de ATP limita, ainda, a atividade dos transportadores transmembranares dependentes de energia, o que resulta na acumulação intracelular dos agentes citotóxicos.^[57]

O efeito adjuvante do 2-DG no aumento da sensibilidade celular à radiação ionizante foi, igualmente, demonstrado em vários tipos de cancro, como o da mama, próstata, pulmão, colo do útero e glioblastoma.^[62-64] De facto, um dos principais mecanismos envolvidos na radioresistência é a hipóxia celular e o consequente aumento da glicólise aeróbia^[64], devido à diminuição da produção de ERO, que assim reduz deterioração do ADN induzida pela radiação.^[42] Vários estudos demonstraram que a administração prévia ou imediatamente após a radioterapia aumenta a morte celular induzida pela radiação ionizante devido ao aumento da produção de ERO e diminuição da reparação de ADN dependente de ATP.^[42]

Relativamente ao perfil de segurança, os estudos realizados comprovaram que o 2-DG não é tóxico nem em animais nem em humanos, e bem tolerado pelos participantes, apresentando como efeitos adversos mais comuns fadiga, sudorese, tonturas, agitação e náusea, mimetizando os sintomas de hipoglicemia, e, em alguns casos, prolongamento assintomático do intervalo QT.^[65, 66]

Um ensaio clínico de fase I foi realizado com o objetivo de determinar a dose de toxicidade limitante (DTL) e a dose máxima tolerada da administração oral de 2DG em combinação com docetaxel em tumores sólidos avançados.^[66] Foram igualmente avaliadas a farmacocinética, segurança, tolerabilidade e eficácia preliminar deste regime, bem como o efeito do tratamento na captação de

contraste pelo tumor no PET. Os resultados deste ensaio clínico mostraram que 2DG a 63 mg/kg em combinação com docetaxel semanal foi bem tolerado pelos doentes, sem evidência de interações farmacocinéticas e com os seguintes efeitos secundários reportados: fadiga, sudorese, tontura e náusea. Obteve-se a resposta parcial de um doente com cancro da mama metastático, com redução dos valores de captação tumoral na PET, após uma semana de 2DG, bem como 12 doentes apresentaram doença estável por, pelo menos 8 semanas. Estes resultados apoiam investigações adicionais dos benefícios clínicos da combinação dos regimes quimioterápicos atuais com 2DG.^[66]

Atualmente, estão a decorrer ensaios clínicos de fase II e III sobre a utilização do 2-DG como adjuvante em protocolos de quimioterapia, com o objetivo de obter evidência científica de qualidade que possa comprovar a sua utilidade no tratamento oncológico.^[67]

❖ 3-Bromopiruvato

O 3-bromopiruvato (3BP) é um análogo do piruvato halogenado, o qual se caracteriza por uma forte capacidade alquilante de grupos tiol (-SH) de resíduos de cisteínas, podendo interagir com diversas macromoléculas (ex.: enzimas e proteínas).^[68] Grande parte dos seus efeitos antineoplásicos são atribuídos a esta capacidade de alquilação, que consiste na ligação covalente da fração pirúvica do 3-BP ao grupo SH das moléculas alvo, com libertação do radical bromo. Desta reação resulta a alteração estrutural das proteínas alvo, que, assim, ficam inativas e sem funcionalidade.^[68] Uma vez que muitas destas moléculas-alvo do 3-BP são enzimas envolvidas no metabolismo energético, este composto atua revertendo o efeito de Warburg nas células neoplásicas, induzindo a morte celular das mesmas, o que faz dele um potencial candidato a fármaco anti-tumoral.^[69-71]

O primeiro estudo realizado para investigar os efeitos anti-cancerígenos do 3-BP ocorreu em 2001, na Universidade Johns Hopkins, e demonstrou que o composto induziu a morte celular em células de hepatocarcinoma, através da inibição da produção de ATP via glicólise aeróbia e fosforilação oxidativa.^[72] *Ko et al.* demonstraram que o 3-BP causava a inibição direta de hexocinase II isolada a partir de hepatócitos neoplásicos de coelhos implantados com tumor hepático (VX2). Neste estudo, uma dose de 2,4mM induziu uma redução de 50% na glicólise, enquanto uma dose de 5mM provocou a inibição completa da atividade da enzima.^[72] Assim, desde os primeiros estudos realizados, acreditava-se que a hexocinase II era o principal alvo do 3-BP.^[68]

No ano seguinte, a mesma equipa de investigação, observou que a administração intravenosa de de 3-BP em coelhos com tumores VX2 causava morte celular seletiva de quase todas as células

neoplásicas, sem danificar as células hepáticas normais.^[73] Estudos posteriores revelaram que o 3-BP entra nas células através dos transportadores de lactato, MCT1 e MCT4, os quais estão significativamente aumentados nas células tumorais, comparativamente às células normais, o que pode explicar em parte a seletividade do composto para as células neoplásicas.^[74, 75] Por outro lado, a afinidade do 3-BP pelos transportadores MCT revelou-se superior em pH ácido, e assim, o microambiente tumoral ácido também parece favorecer a captação desta molécula.^[68, 75]

Atualmente, sabe-se que o 3-BP interfere com várias enzimas envolvidas em múltiplas vias metabólicas: hexoquinase II (HK II), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e fosfoglicerato cinase (PGK) e lactato desidrogenase (LDH), na glicólise; piruvato desidrogenase (PDH), succinato desidrogenase (SDH), isocitrato desidrogenase (IDH) e α -cetoglutarato desidrogenase (α KD) no ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa; glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), na via das pentoses fosfato.^[68, 69, 76] Assim, ao contrário do que se verifica com outros inibidores metabólicos, o 3-BP afeta não só a produção de energia proveniente de glicólise, mas também o metabolismo mitocondrial, induzindo uma completa depleção de ATP e consequente morte das células tumorais(Fig.5).^[68]

Vários estudos revelam um aumento de ERO nas células neoplásicas submetidas ao 3-BP, o que pode estar associado a vários mecanismos, como à depleção de glutatona também observada nestas células quando expostas ao composto, bem como à diminuição da produção de NADPH pela inibição da G6PDH, e à inibição da SDH na cadeia de respiração mitocondrial.^[68] A depleção da glutatona observada pode ser explicada por dois processos: a glutatona esgota-se ao tentar eliminar os níveis elevados de ERO produzidos pelo 3-BP^[77-79] e/ou o 3-BP tem a capacidade de alquilação direta da glutatona, inativando-a.^[80-82] Por outro lado, ao promover a depleção de ATP, o 3-BP também contribui para a diminuição da síntese deste antioxidante, uma vez que este se trata de um processo dependente de energia.^[68] Segundo várias linhas de investigação, a glutatona intracelular é um determinante essencial da toxicidade do 3-BP, uma vez que a inibição da sua síntese, através da administração de butionina sulfoximina, aumentou significativamente a citotoxicidade causada pelo 3-BP. Estes resultados indicam que a depleção de glutatona associada a produção aumentada de ERO são mecanismos essenciais para o efeito anti-neoplásico do 3-BP.^[83] Além dos efeitos citotóxicos já descritos, o 3-BP tem a capacidade de desencadear a morte celular mitocondrial, uma vez que a inibição da HK II promove a sua dissociação da mitocôndria, com consequente libertação do citocromo c e do fator indutor de apoptose para o citoplasma, e ativação das caspases, proteases responsáveis pelo processo apoptótico

.^[68, 83] De facto, foram observados em vários estudos uma diminuição dos níveis de proteínas antiapoptóticas como o *Bcl-2* e *Mcl-1* e aumento das proteínas pró-apoptóticas, como a *BAX*, em células tumorais submetidas à ação do 3-BP.^[84-86] Assim, o 3-BP conduz a morte celular, quer por

apoptose, quer por necrose.^[83] Dado que a apoptose é um processo dependente de ATP, quando é utilizada uma dose baixa de 3-BP, a depleção de ATP é moderada, e, assim, a célula ainda dispõe de energia para a apoptose.^[68] Contudo, perante concentrações mais altas do composto, a depleção de ATP é completa, a morte celular ocorre apenas por necrose celular.^[87, 88]

O 3-BP atua como agente anti-neoplásico numa grande diversidade de linhas tumorais, nomeadamente: mieloma, hepatocarcinoma, glioblastoma, mesotelioma, leucemia, linfoma, cancro do pulmão, da mama, da próstata, colo do útero, ovário, pâncreas, renal e colorretal.^[83]

Além disso, verificou-se também que o 3-BP potencia o efeito citotóxico de fármacos quimioterápicos como cisplatina, doxorubicina, oxiplatina^[87, 89] ou 5-fluoruracilo^[90, 91], podendo vir a ser utilizado como coadjuvante em tratamentos que utilizem estes compostos.

Hernlund et al demonstraram que, quando associado a cisplatina ou oxiplatina, o 3-BP aumentava significativamente os efeitos antiproliferativos destes dois agentes quimioterápicos em células de carcinoma de cólon HCT116, bem como permitia reversão da resistência a estes fármacos.^[89]

Xu et al verificaram que a associação de 3-BP e rapamicina tinha efeito sinérgico, com potenciação significativa dos efeitos citotóxicos associada a este agente em células de linfomas e leucemia.^[92]

Um estudo *in vivo* realizado em ratos com tumores pancreáticos, demonstrou que a administração intraperitoneal de 3-BP potencia os efeitos anti-tumorais da geldanamicina, verificando-se uma diminuição de 75% do crescimento e proliferação de células tumorais e um aumento da taxa de sobrevivência.^[93] Acredita-se que os efeitos de sensibilização à quimioterapia do 3-BP resultem, à semelhança do 2-DG, da depleção de ATP, com consequente diminuição da reparação de danos no ADN e inibição das bombas de efluxo ABC, com acumulação intracelular dos agentes citotóxicos; bem como da promoção de stress oxidativo celular.^[68]

A toxicidade associada ao 3-BP é dose-dependente, sendo que uma baixa concentração (1,75 mM) é eficaz na indução de morte celular em animais, sem toxicidade sistémica observada;^[94] por outro lado com uma dose alta (25 mM) verificou-se efeitos tóxicos significativos a nível hepático e gastrointestinal.^[95]

Atualmente, ainda não foram iniciados ensaios clínicos com o 3-BP, apesar de já existir aprovação para a realização de ensaios de fase I pela FDA.^[68] Existem dois casos clínicos que descrevem a utilização do 3-BP no tratamento de doença oncológica em Humanos. Em 2012, um adolescente com 16 anos diagnosticado com carcinoma hepatocelular em estadio avançado, foi tratado com 3-BP. Durante os vários meses de tratamento, não foram observados efeitos de toxicidade no doente, o qual apresentou uma sobrevida bastante superior e com maior qualidade de vida relativamente ao esperado para a situação clínica.^[96] Em 2014, um homem de 28 anos diagnosticado com melanoma em estadio IV também recebeu tratamento com 3-BP endovenoso (1–2.2 mg/kg).^[97] A progressão tumoral foi, então, monitorizada através dos níveis plasmáticos de LDH, um marcador

utilizado como preditor de atividade tumoral em ensaios clínicos. Após a administração de 7 doses de 3-BP ao longo de 10 dias, os níveis de LDH reduziram para metade do valor inicial. Neste caso clínico não foram observados efeitos adversos maior, apenas uma sensação de ardor e flebite associada à administração endovenosa.^[97]

Embora um vasto número de estudos sobre a utilização do 3-BP no combate ao cancro, quer *in vivo* quer *in vitro*, demonstra o seu potencial uso clínico como agente antitumoral, são necessários ensaios clínicos de forma a comprovar a sua eficácia e segurança no tratamento oncológico.^[98]

❖ Dicloroacetato

O dicloroacetato (DCA) é um análogo do piruvato cujas propriedades anti-cancerígenas foram descritas pela primeira vez em 2007 por *Bonnet et al.*^[99] Desde então tem sido muito estudado pela sua capacidade de bloquear a produção de lactato e o crescimento celular neoplásico.^[4]

O mecanismo de ação do DCA consiste na inibição da enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), através da ligação ao local de ligação do piruvato, com consequente ativação da PDH mitocondrial.^[100] A PDH promove a descarboxilação irreversível do piruvato a acetil-CoA, atuando como a ponte entre a glicólise citoplasmática e o ciclo de Krebs e, consequentemente, a fosforilação mitocondrial.^[101] A ação desta enzima é, por sua vez, inibida pela PDK e, assim, da ação da PDK resulta a diminuição da fosforilação oxidativa. A inibição da PDK pelo DCA, mantém a PDH na sua forma desfosforilada e, por isso, ativa.^[101] Desta forma, o DCA induz a reprogramação do metabolismo energético nas células neoplásicas, substituindo o estado glicolítico pela fosforilação oxidativa mitocondrial, com consumo de piruvato e diminuição da acumulação de lactato.^[102] A restauração da função mitocondrial e reversão do efeito de Warburg suprime as vantagens metabólicas das células tumorais.^[103] Por exemplo, ao reduzir a produção de lactato, o DCA neutraliza o estado de acidose do microambiente tumoral, contribuindo para a inibição do crescimento e disseminação do tumor. Contudo, o aumento da produção de ERO associado ao aumento da fosforilação oxidativa mitocondrial, parece ser o mecanismo principal responsável pelos efeitos anti-tumorais deste composto.^[101] Através da restauração da função mitocondrial e consequente produção de ERO, o DCA induz a apoptose celular, com libertação de fatores apoptóticos, como o citocromo c e o fator indutor de apoptose da mitocôndria para o citoplasma.^[101]

O DCA demonstrou ser eficaz na supressão do crescimento celular em estudos *in vitro* e *in vivo* em vários tipos de cancro.^[4] No estudo inicial de *Bonnet et al.*, o DCA foi administrado a culturas de células neoplásicas humanas de cancro do pulmão não pequenas células, glioblastoma e cancro da mama e os resultados evidenciaram um aumento da fosforilação oxidativa da glicose.^[99] Estudos *in*

vitro posteriores evidenciaram uma diminuição da produção de lactato e aumento simultâneo da produção mitocondrial de NADPH, ERO e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) em resposta ao DCA; bem como a indução da apoptose em vários tipos de neoplasias, como cancro do pulmão não pequenas células, glioblastoma, cancro da mama, cancro endometrial e cancro da próstata.^[99, 104-108]

Uma vez que tem a capacidade de eliminar a resistência à apoptose das células neoplásicas, o DCA pode atuar como um agente sensibilizador de agentes quimioterápicos e de radiação. A sensibilização a vários agentes anticancerígenos na presença de DCA foi atribuída à modulação do microambiente tumoral, perturbações nos níveis de pH, indução de ERO e modulação das vias de sobrevivência.^[109]

Estudos *in vitro* demonstraram que a associação de DCA e capecitabina induzem apoptose em células neoplásicas de melanoma e de cancro do pulmão não pequenas células.^[110] Outro estudo realizado em cancro do pulmão não pequenas células mostrou, *in vitro* e *in vivo*, que a co-administração de DCA com paclitaxel aumentou a eficiência da morte celular por inibição da autofagia.^[111]

A combinação de DCA e 5-fluorouracilo tem, também, um efeito sinérgico demonstrado na inibição da proliferação celular e na indução da apoptose em células tumorais de cancro colorretal.^[112]

A associação de DCA e doxorrubicina foi testada, também, em células neoplásicas de hepatocarcinoma, demonstrando a capacidade do DCA de interromper as defesas antioxidantes celulares, favorecendo danos oxidativos, desencadeados pelo tratamento com doxorrubicina.^[113]

Da mesma forma, o DCA potenciou a morte celular de células de hepatocarcinoma induzida pela adriamicina, através do aumento da produção de ERO.^[114]

Um estudo *in vivo* realizado em cancro da bexiga demonstrou que o tratamento conjunto de DCA e cisplatina reduziu drasticamente o volume tumoral em comparação com o DCA ou a cisplatina isoladamente.^[115] O mesmo efeito sinérgico entre o DCA e a cisplatina foi igualmente evidenciado em células tumorais de hepatocarcinoma.^[116]

Toda esta evidência mostra que o DCA pode ser utilizado como tratamento adjuvante de protocolos de quimioterapia e radioterapia, com o objetivo de diminuir as doses de fármacos utilizados e, assim, reduzir a toxicidade dos tratamentos standard instituídos, assegurando a eficácia do tratamento.^[117]

Nos últimos 40 anos, o DCA tem sido utilizado no tratamento de crianças com doenças metabólicas causadas por defeitos mitocondriais congénitos^[118], bem como para aliviar os sintomas e as consequências hemodinâmicas da acidose láctica, associada a condições clínicas graves como sépsis, insuficiência cardíaca congestiva, queimaduras, cirrose, entre outras.^[119] A ausência de evidência de toxicidade hematológica, hepática, renal ou cardíaca grave confirma a segurança do DCA,^[103] embora alguns efeitos laterais gastrointestinais sejam comuns nos doentes tratados com DCA.^[120]

A limitação mais conhecida associada à administração de DCA, observada em estudos pré-clínicos e clínicos, é a neuropatia periférica.^[103] No entanto, a sua ocorrência está associada à administração oral crónica de DCA e é um efeito reversível, limitado ao tempo de tratamento.^[121]

No seguimento de toda a evidência *in vitro* e *in vivo* a suportar os efeitos anti-neoplásicos do DCA, vários ensaios clínicos fase I e II foram iniciados para avaliar sua toxicidade e dosagem.^[122]

Um ensaio clínico realizado em 15 adultos com gliomas malignos recorrentes e metástase tumoral cerebral, teve como objetivo a definição de uma dose de DCA segura e sem toxicidade associada.^[123]

Neste ensaio clínico foi administrada uma dose de 25 mg/kg/d de DCA e 8 pacientes completaram pelo menos 1 ciclo de 4 semanas, período durante o qual apenas 2 indivíduos referiram parestesias distais (grau 1).^[123] Estes dados indicam que o DCA oral, administrado na dosagem já estabelecida para doenças metabólicas, é seguro, bem tolerado e viável para uso em adultos com este tipo de tumores.^[122]

Outro ensaio clínico incluiu 24 pacientes com tumores sólidos que receberam tratamento oral com 6,25 mg/kg de DCA. Neste estudo foram observados sintomas como fadiga, vômitos e diarreia por 3 doentes com uma dose de 12,5 mg/kg. A resposta tumoral avaliada pela PET revelou doença estável em oito pacientes, sem nenhuma resposta nos restantes.^[120]

Um ensaio clínico de fase II foi realizado com o objetivo de determinar a taxa de resposta, segurança e tolerabilidade do DCA oral em doentes com cancro de mama e do pulmão não pequenas células, em estadios de doença avançada. Neste estudo foi administrada uma dose de 6,25 mg/kg de DCA, via oral, duas vezes ao dia. Os resultados não demonstraram melhoria clínica em 7 indivíduos tratados com DCA, sendo que 2 deles morreram subitamente uma semana após o início do DCA, um por embolia pulmonar e o outro por causa desconhecida (presumível AVC). Embora a relação destas mortes com o DCA seja incerta, a sua ocorrência aliada à ausência de benefício clínico observado levou ao encerramento do estudo. Contudo, os autores defendem que os ensaios clínicos relativos ao DCA devem ser realizados em doentes com maior esperança média de vida, nos quais as doses terapêuticas podem ser alcançados. De facto, o estudo mais aprofundado acerca dos efeitos e segurança do DCA são essenciais dado que este composto está comercialmente disponível e é atualmente muito utilizado por doentes oncológicos por automedicação, frequentemente em doses superiores às doses habitualmente estudadas.^[124]

Em 2012, um relato de caso descreveu a situação clínica de um homem de 46 anos com recidiva documentada após quimioterapia para linfoma não-Hodgkin. O doente foi submetido a DCA 1 g/dia, via oral, em monoterapia, com uma resposta positiva significativa e remissão completa da doença, durante pelo menos 4 anos.^[125]

Assim, os resultados iniciais dos estudos clínicos realizados com o DCA reforçam a necessidade de aprofundar o estudo deste fármaco em ensaios clínicos para vários tipos de tumores, usando doses

já estabelecidas para doenças metabólicas e em doentes com sobrevida esperada de pelo menos vários meses.^[122, 124]

Inibidores dos GLUTs

Segundo estudos realizados com PET, cerca de 90% dos tumores demonstram uma captação de glicose aumentada, resultante do aumento da expressão dos GLUTs.^[4]

Os GLUTs são transportadores membranares que permitem a difusão da glicose através da membrana celular em função de um gradiente de concentração de glicose.^[4] Atualmente estão identificadas 14 isoformas destes transportadores nas células humanas, os quais apresentam semelhanças estruturais e funcionais entre si.^[126] Estes transportadores apresentam um modelo conformacional com 12 α hélices transmembranares e terminais amina e carboxílicos citosólicos. São proteínas de ligação nucleotídica com três domínios de ligação a ATP, os quais são bastante importantes para a sua conformação e afinidade, dado que a glicose é retida pelos domínios citosólicos do GLUT, após ligação do ATP aos mesmos.^[127]

A distribuição das isoformas pelos tecidos depende das necessidades fisiológicas distintas de glicose de cada tipo celular.^[128] O GLUT 1 é um transportador de glicose universal e encontra-se aumentado em quase todos os tipos de cancro estudados.^[4] Estudos demonstraram que o nível da sua expressão correlaciona-se com o grau de diferenciação, proliferação e outros marcadores de prognóstico em vários tipos de cancro.^[129] Em 2011, *Young et al* verificaram, num estudo *in vivo*, que a supressão da expressão de GLUT 1 em células neoplásicas conduzia a um crescimento significativamente mais lento do tumor em comparação com a linha celular controlo; e por outro lado, células tumorais com sobreexpressão do mesmo gene demonstraram um crescimento tumoral mais acelerado do que a linha celular parental.^[130]

O GLUT 3 é habitualmente expresso em tecidos de necessidades energéticas aumentadas, como o cérebro, atuando como um suplemento à atividade do GLUT 1. O GLUT 3 encontra-se igualmente aumentado em vários tipos de cancro, nomeadamente cancro do endométrio, da mama e da tireóide.^[128] O GLUT 2 encontra-se expresso preferencialmente no fígado, nos ilhéus pancreáticos e nas células da retina, e níveis elevados destes transportador têm, também, sido encontrados em cancros gástricos, pancreáticos, da mama e cólon.^[128]

O transporte de glicose do meio extracelular para o citoplasma é o primeiro passo-limitante da glicólise, e assim, alguns investigadores acreditam que a inibição da glicólise através do bloqueio da captação de glicose pode revelar-se mais eficaz do que a inibição direta de enzimas glicolíticas.^[4]

De facto, devido à sua expressão aumentada em muitos tipos de tumores, os GLUTs favorecem o crescimento e proliferação celular, sobrevivência das células neoplásicas e, ainda, a resistência a inúmeros fármacos, pelo que se tornam alvos terapêuticos a explorar no tratamento anti-cancerígeno.^[4]

Existem vários compostos naturais e sintéticos que atuam inibindo a capacidade de transporte de GLUT,^[131, 132] cujo efeito é mediado pela sua ligação direta aos diferentes domínios dos transportadores (tabela2).^[133]

WZB117^[10] e o STF-31^[134] são duas moléculas com grande capacidade de inibição do GLUT 1, com comprovado efeito no crescimento e proliferação das células tumorais, quer *in vitro* quer *in vivo*. No entanto, a investigação acerca destes compostos é, ainda, muito recente pelo que apenas foram realizados estudos animais, não existindo ensaios clínicos sobre a sua aplicação em humanos.^[4]

Vários compostos flavonoides revelaram-se potentes inibidores do influxo de glicose, tendo sido demonstrado que inibem as tirosinas cinases de ligação de ATP e, por consequência, são capazes também de inibir competitivamente os GLUTs.^[4, 127]

Por fim, vários estudos demonstraram que alguns antirretrovirais da classe dos inibidores da protease, utilizados no tratamento de infeções por vírus da imunodeficiência humana (VIH), exibem, também, efeitos inibitórios do GLUT-4. Destes fármacos, o ritonavir é o que apresenta um efeito inibitório mais potente e por esta razão tem vindo a ser estudado como fármaco anti-cancerígeno.^[4] Os efeitos antitumorais do ritonavir foram demonstrados em estudos *in vitro* com células de mieloma múltiplo.^[135] Neste estudo foi demonstrado que os efeitos inibitórios do ritonavir foram mediados pela inibição do GLUT4 nas células do mieloma múltiplo, bem como uma redução da proliferação e viabilidade destas linhas celulares tumorais.^[135] Os resultados deste e outros estudos, destacam o potencial terapêutico do ritonavir no tratamento do mieloma múltiplo através da inibição do GLUT4.^[135, 136] Os efeitos antineoplásicos do ritonavir foram também demonstrados em vários estudos *in vitro* noutros tipos de cancro, nomeadamente cancro do pulmão não pequenas células^[137], cancro da mama^[138], leucemia^[139] e glioblastoma multiforme^[140]. Atualmente, existem três ensaios clínicos em fase de recrutamento para o estudo da aplicação do ritonavir no tratamento de cancro de mama e próstata.^[140]

❖ Silibinina

Silibinina (ou silibina) é um flavonóide natural derivado de cardo-mariano (*Sylbum marianum*) e atua como inibidor do GLUT-4,^[141] com inúmeros estudos publicados acerca das suas diferentes atividades antineoplásicas decorrentes de vários mecanismos, entre os quais a inibição de GLUTs e consequente bloqueio da captação de glicose.^[141] Vários estudos pré-clínicos, *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que este composto tem a capacidade de inibição do crescimento e a proliferação tumoral, bloqueio do ciclo celular e de várias vias de sinalização intracelular (*Akt*, *ERK1/2*, *Notch-1*, *MAPK* e *STAT3*), inibição da angiogénese e da capacidade de invasão e metastização e indução da morte celular por apoptose e autofagia.^[142]

Existem estudos que mostram que a terapia combinada de silibinina com doxorrubicina apresenta um efeito sinérgico na inibição do crescimento e apoptose em linhas celulares de cancro de próstata.^[143] A associação a compostos de platina, como a cisplatina e carboplatina, demonstram igualmente uma inibição adicional significativa do crescimento de células neoplásicas de cancro da próstata em comparação com células tratadas apenas com compostos de platina.^[144]

Este composto foi testado num ensaio clínico de fase I em pacientes com cancro da próstata, mas demonstrou ter baixa penetração no tecido após duas semanas de terapia.^[145] Contudo, outro ensaio clínico demonstrou boa tolerabilidade da silibinina oral em altas doses em doentes com cancro de próstata. Este estudo tinha como objetivo avaliar a toxicidade de altas doses de silibina, reunir dados relativos à sua farmacocinética e determinar um esquema de dosagem para ensaios de fase II. Assim, neste estudo, a toxicidade mais significativa observada foram alterações hepáticas assintomáticas, principalmente hiperbilirrubinemia não conjugada, associada a uma administração crónica. A dose oral recomendada para estudos de fase II de silbinina é de 13g por dia, em 3 doses.^[146] Embora não fosse o objetivo principal deste estudo, a resposta tumoral ao composto foi monitorizada através medições mensais de PSA, não tendo sido observada uma resposta significativa (redução superior a 50% nos valores de PSA). No entanto, os investigadores salientam o facto de que as experiências pré-clínicas com células de cancro de próstata mostrarem atividade sinérgica quando a silibinina é combinada com fármacos quimioterápicos, realçando a importância da realização de mais ensaios clínicos com a silibina em associação com outros fármacos.^[146]

Conclusão

Quase um século depois da descoberta de Otto Warburg, a alteração do metabolismo glicídico característica das células neoplásicas é já utilizada com sucesso no diagnóstico de doença oncológica há muitos anos, através da técnica imagiológica PET. Contudo o potencial terapêutico do efeito de Warburg não foi ainda explorado, não existindo nenhuma aplicação prática no tratamento oncológico até ao momento. Nas últimas décadas, a investigação concentrou os seus esforços no estudo do metabolismo tumoral da glicose como alvo no tratamento oncológico, dado que este difere significativamente do metabolismo da glicose nas células normais. Assim, o metabolismo tumoral tornou-se um campo promissor para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos. Inúmeros análogos de metabolitos, foram identificados como inibidores das várias etapas da via glicolítica, bem como dos GLUT, estando atualmente a ser testados como potenciais fármacos a aplicar no tratamento dos vários tipos de cancro.

Estas moléculas emergentes foram intensamente testadas em estudos pré-clínicos, com resultados muito promissores quer *in vitro*, quer *in vivo*. Todavia, os resultados de ensaios clínicos revelaram-se contraditórios e desanimadores, sendo que a maioria destes inibidores demonstraram apenas eficácia moderada ou sem eficácia quando usados em monoterapia. Tal poderá dever-se ao facto das células cancerígenas exibirem plasticidade metabólica e, assim, conseguirem ultrapassar a inibição de uma via metabólica específica através da sobreexpressão de genes e regulação positiva de vias alternativas. Por esta razão, o tratamento combinado com dois ou mais agentes antiglicolíticos, que inibam diferentes vias metabólicas simultaneamente, poderá ser uma estratégia alternativa para aumentar a eficácia destes fármacos.

Por outro lado, estudos mostram que o metabolismo tumoral alterado desempenha um papel importante no desenvolvimento de resistências a fármacos quimioterápicos e a radioterapia. Assim, os agentes antiglicolíticos podem ser úteis na sensibilização das células tumorais, contribuindo para uma maior eficácia e seletividade do tratamento em tumores resistentes, como demonstrado em modelos pré-clínicos e ensaios clínicos. Embora tenha sido já demonstrado que esta pode ser uma estratégia promissora para superar as resistências tumorais, é necessária investigação adicional acerca da utilização de terapia combinada de fármacos quimioterápicos ou técnicas de radiação convencionais com agentes antiglicolíticos, com o objetivo de fornecer novas estratégias terapêuticas no tratamento oncológico.

Por fim, e à semelhança do que acontece com a maioria dos agentes antineoplásicos estudados e utilizados na prática clínica, outra das principais dificuldades na aplicação prática da inibição da glicólise anaeróbia são os efeitos adversos decorrentes da toxicidade sistémica. Esta toxicidade

deve-se à natureza ubiquitária das enzimas e transportadores envolvidos no metabolismo glicídico. Estratégias que permitem contornar este problema incluem a utilização de formas de administração seletivas e direcionadas, com recurso a tecnologia imagiológica de forma a conseguir aplicar o fármaco diretamente no tumor ou numa artéria próxima ao tumor.

O fármaco anti-neoplásico ideal é aquele que exerce efeitos adversos mínimos nas células normais com capacidade máxima para induzir apoptose em células tumorais. Os agentes antiglicolíticos, embora longe deste conceito, demonstraram um potencial terapêutico promissor que justifica mais investigação científica, de forma a que estes inibidores possam, um dia, fazer parte de protocolos de tratamento oncológico.

Apêndice

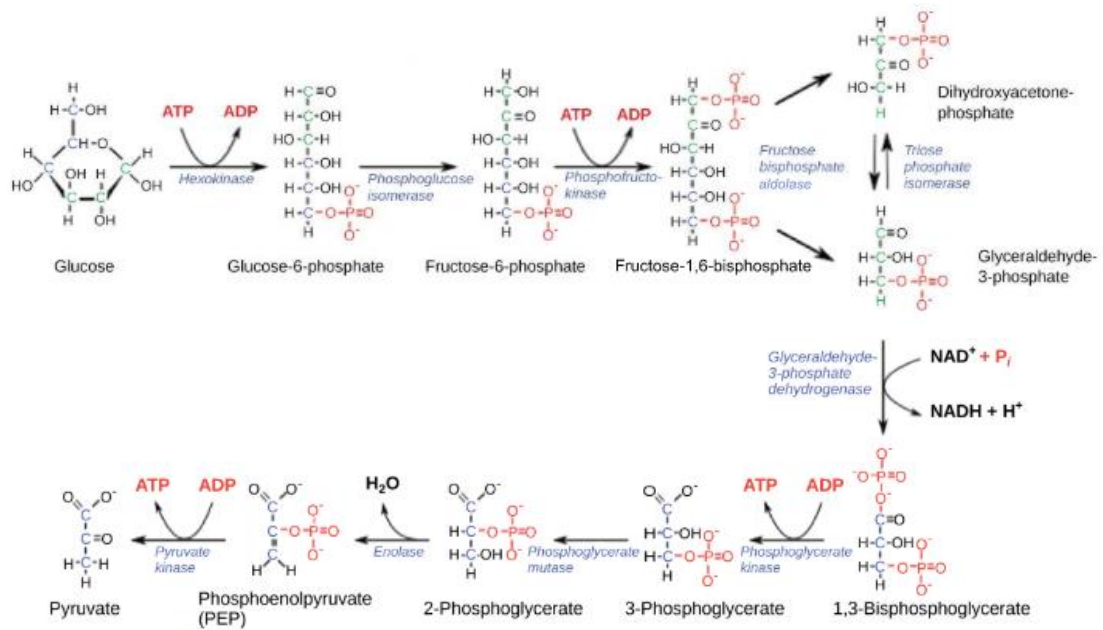


Figura I - Via glicolítica e enzimas envolvidas

Imagem adaptada de "[Glycolysis: Figure 2](#)," de OpenStax College, Biology ([CC BY 3.0](#)).

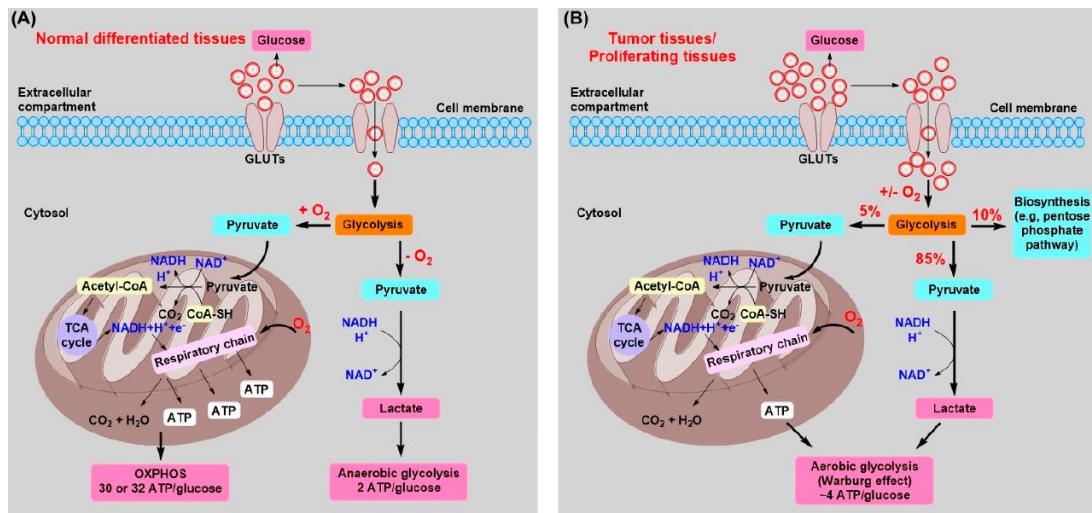


Figura II - Metabolismo da glicose em células normais e células neoplásicas [68]

A imagem A representa o metabolismo glicídico nas células normais. Nestas, e na presença de oxigénio, as 2 moléculas de piruvato resultantes da glicólise citoplasmática, entram na mitocôndria onde são submetidas ao ciclo de Krebs. Este processo designa-se fosforilação oxidativa e deste resultam a produção de 36 moléculas de ATP, água e dióxido de carbono. Na ausência de oxigénio, o piruvato é transformado a ácido láctico através da glicólise anaeróbia, com produção de apenas 2 moléculas de ATP. A imagem B representa o metabolismo glicídico alterado nas células neoplásicas. Nestas, embora a mitocôndria esteja funcional, e mesmo na presença de oxigénio, a maioria das moléculas de glicose sofrem fermentação láctica no citoplasma, processo designado de glicólise aeróbia. Esta preferência das células tumorais pela glicólise aeróbia, em detrimento da respiração mitocondrial, denomina-se “Efeito de Warburg”.

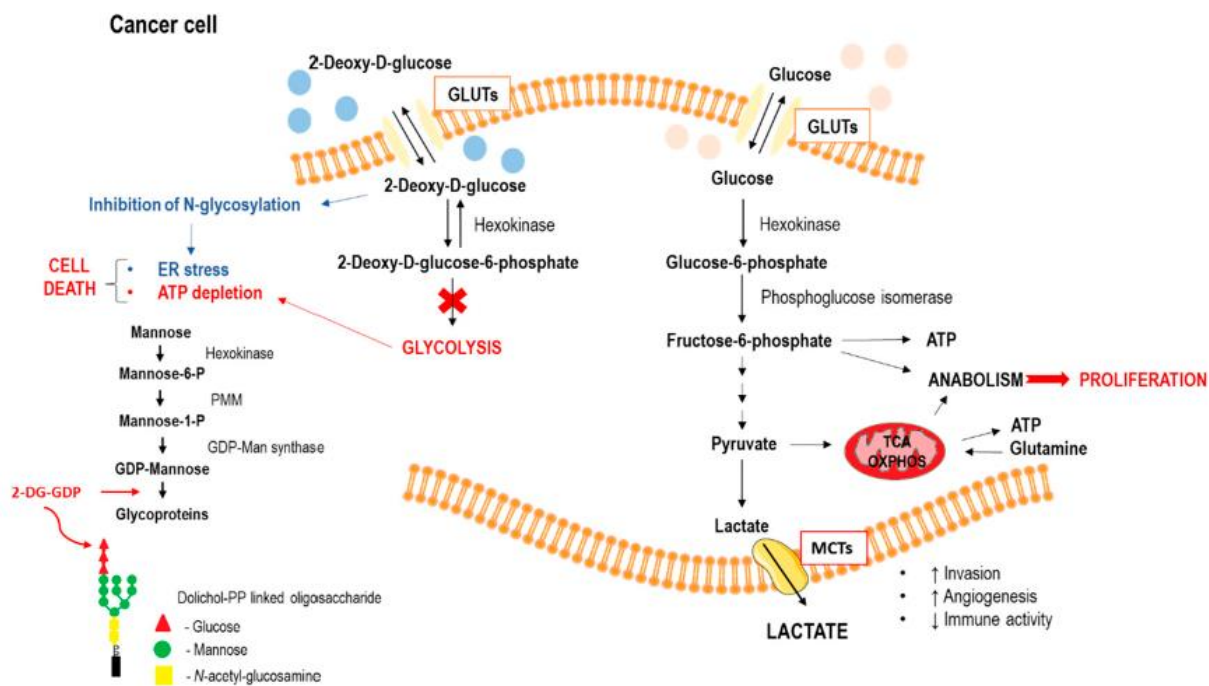


Figura IV - Mecanismo de ação do 2-Desoxiglicose^[42]

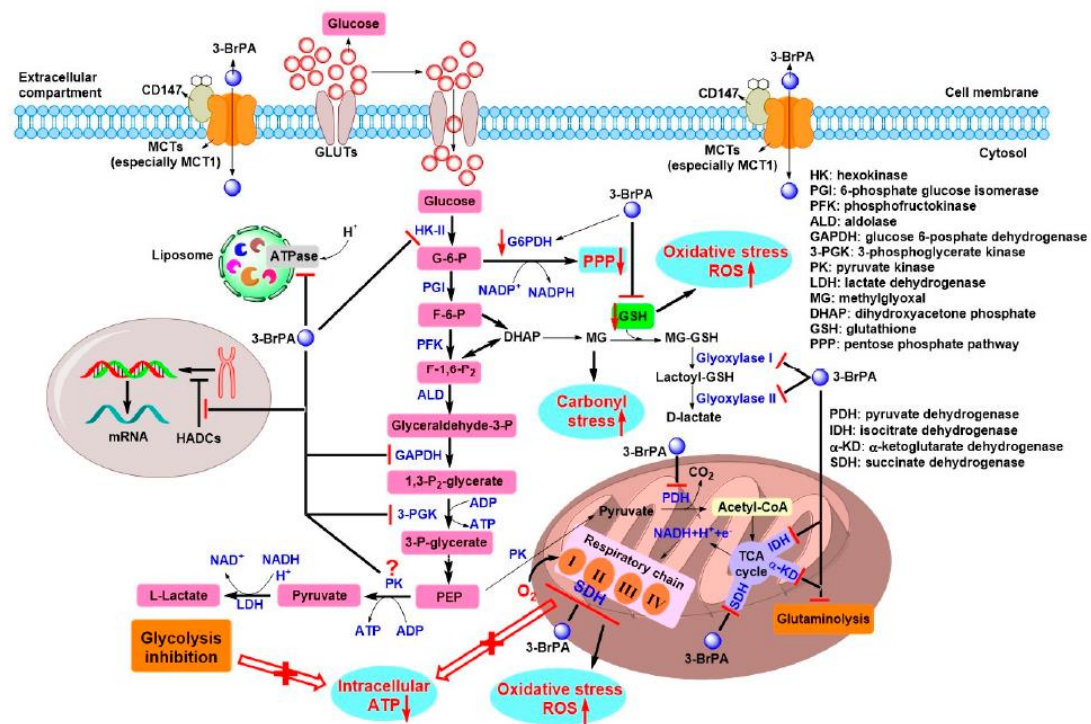


Figura V - Mecanismos de ação do 3-Bromopiruvato^[68]

Tabela I - Inibidores glicolíticos^[4]

Compound name	Target protein	Status	Ref.
2-DG	Inhibits HK	Phase I -completed (Jul 2008)	NCT00096707
3-BP	Inhibits HK	Phase I / II -terminated (Mar 2011)	NCT00633087
Lonidamine	Inhibits mitochondrial HK2	Pre-clinical	[66-74]
		Phase II / III -terminated (Aug/Dec 2006)	NCT00237536
			NCT00435448
3PO	Inhibits PFK2	Pre-clinical	[90]
N4A, YZ9	Inhibits PFK2	Pre-clinical	[91]
PGMI-004A	Inhibits PGAM1	Pre-clinical	[96]
MJE3	Inhibits PGAM1	Pre-clinical	[98]
TT-232	Inhibits PKM2	Phase II -completed (Mar 2008)	NCT00422786
		Phase II -terminated (Oct 2010)	NCT00735332
Shikonin/alkannin	Inhibits PKM2	Pre-clinical	[108]
ML265 (TEPP-46)	Activates PKM2	Pre-clinical	[116,117]
FX11	Inhibits LDHA	Pre-clinical	[126]
Quinoline 3-sulfonamides	Inhibit LDHA	Pre-clinical	[141]
DCA	Inhibits PDK	Phase I -ongoing	NCT00566410
		Phase I -ongoing	NCT01111097
		Phase II -completed (Aug 2009)	NCT00540176
6-AN	Inhibits G6PD	Pre-clinical	[159-161]
Oxythiamine	Inhibits TKTL1	Pre-clinical	[170-173]

Agentes inibidores da via glicolítica e estado da evidência científica acerca dos mesmos. 2-DG: 2-desoxiglicose; 3-BP: 3-bromopiruvato; DCA: Dicloroacetato; 6-AN: 6-aminonicotinamida; HK: Hexocinase; PFK: fosfofrutocinase; PGAM: fosfoglicerato mutase; PKM2: Piruvato cinase M2; LDH: Lactato desidrogenase; PDK: Piruvato desidrogenase cinase; G6PD: Glicose-6-fosfato desidrogenase; TKTL1: enzima Transcetolase-like 1.

Tabela II - Inibidores dos transportadores GLUT^[4]

Inhibitor	Target GLUT	Status	Ref.
WZB117	GLUT1	Animal study	Liu <i>et al</i> ^[28] , 2012
STF-31	GLUT1	Animal study	Chan <i>et al</i> ^[240] , 2011
Fasentin	GLUT1	<i>In vitro</i>	Wood <i>et al</i> ^[242] , 2008
Apigenin	GLUT1	Phase II	NCT00609310
Genistein	GLUT1	Phase II / III	NCT00118040; NCT00584532
Oxime-based GLUT1 inhibitors	GLUT1	Animal study	Tuccinardi <i>et al</i> ^[255] , 2013
Pyrrolidinone derived GLUT1 inhibitors	GLUT1	<i>In vitro</i>	Ulanovskaya <i>et al</i> ^[257] , 2011
Phloretin	GLUT2	Animal study	Wu <i>et al</i> ^[256] , 2009
Quercetin	GLUT2	Phase I	NCT01912820
DNA-damaging anticancer agents	GLUT3	<i>In vitro</i>	Watanabe <i>et al</i> ^[269] , 2010
GSK-3 inhibitors	GLUT3	<i>In vitro</i>	Watanabe <i>et al</i> ^[270] , 2012
Ritonavir	GLUT4	Phase I / II	NCT01009437; NCT01095094
Silibinin	GLUT4	Phase I / II	Flaig <i>et al</i> ^[280] , 2007; NCT00487721

Agentes inibidores dos transportadores transmembranares GLUT e estado da evidência científica acerca dos mesmos.

Bibliografia

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. 68(6): p. 394-424.
2. Saúde, D.-G.d., *Programa nacional para as doenças oncológicas 2017*. 2017, DGS Lisboa.
3. Annibaldi, A. and C. Widmann, *Glucose metabolism in cancer cells*. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care, 2010. 13(4): p. 466-470.
4. Qian, Y., X. Wang, and X. Chen, *Inhibitors of glucose transport and glycolysis as novel anticancer therapeutics*. World J. Transl. Med, 2014. 3: p. 37-57.
5. Granchi, C., D. Fancelli, and F. Minutolo, *An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2014. 24(21): p. 4915-4925.
6. Ganapathy-Kanniappan, S. and J.-F.H. Geschwind, *Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: progress and prospects*. Molecular cancer, 2013. 12(1): p. 152.
7. Tanasova, M., V.V. Begoyan, and L.J. Weselinski, *Targeting sugar uptake and metabolism for cancer identification and therapy: an overview*. Current topics in medicinal chemistry, 2018. 18(6): p. 467-483.
8. Gatenby, R.A. and R.J. Gillies, *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* Nature reviews cancer, 2004. 4(11): p. 891-899.
9. Kim, J.-w. and C.V. Dang, *Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect*. Cancer research, 2006. 66(18): p. 8927-8930.
10. Liu, Y., et al., *A small molecule inhibitor of glucose transporter 1 (Glut1) down-regulates glycolysis, induces cell cycle arrest, and inhibits cancer cell growth in vitro and in vivo*. 2012, AACR.
11. Kelloff, G.J., et al., *Progress and promise of FDG-PET imaging for cancer patient management and oncologic drug development*. Clinical Cancer Research, 2005. 11(8): p. 2785-2808.
12. Fadaka, A., et al., *Biology of glucose metabolism in cancer cells*. Journal of Oncological Sciences, 2017. 3(2): p. 45-51.
13. de Souza, A.C.S., et al., *Defining the molecular basis of tumor metabolism: a continuing challenge since Warburg's discovery*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2011. 28(5): p. 771-792.
14. Locasale, J.W. and L.C. Cantley, *Altered metabolism in cancer*. BMC biology, 2010. 8(1): p. 88.
15. Bayley, J.-P. and P. Devilee, *The Warburg effect in 2012*. Current opinion in oncology, 2012. 24(1): p. 62-67.
16. Diaz-Ruiz, R., M. Rigoulet, and A. Devin, *The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 2011. 1807(6): p. 568-576.
17. Vander Heiden, M.G., L.C. Cantley, and C.B. Thompson, *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. science, 2009. 324(5930): p. 1029-1033.
18. Manning, B.D. and L.C. Cantley, *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell, 2007. 129(7): p. 1261-1274.
19. Jin, S., et al., *Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death*. Journal of cell science, 2007. 120(3): p. 379-383.
20. Yun, J., et al., *Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells*. Science, 2009. 325(5947): p. 1555-1559.

21. Upadhyay, M., et al., *The Warburg effect: insights from the past decade*. Pharmacology & therapeutics, 2013. 137(3): p. 318-330.
22. DeBerardinis, R.J., et al., *The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation*. Cell metabolism, 2008. 7(1): p. 11-20.
23. Anastasiou, D., et al., *Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses*. Science, 2011. 334(6060): p. 1278-1283.
24. Locasale, J.W., et al., *Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis*. Nature genetics, 2011. 43(9): p. 869.
25. Draoui, N. and O. Feron, *Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments*. Disease models & mechanisms, 2011. 4(6): p. 727-732.
26. Glunde, K., et al., *Extracellular acidification alters lysosomal trafficking in human breast cancer cells*. Neoplasia (New York, NY), 2003. 5(6): p. 533.
27. Zhou, S., C. Huang, and Y. Wei, *The metabolic switch and its regulation in cancer cells*. Science China Life Sciences, 2010. 53(8): p. 942-958.
28. Kherlopian, A.R., et al., *A review of imaging techniques for systems biology*. BMC systems biology, 2008. 2(1): p. 74.
29. Moreno-Sánchez, R., et al., *Energy metabolism in tumor cells*. The FEBS journal, 2007. 274(6): p. 1393-1418.
30. Krętowski, R., A. Stypułkowska, and M. Cechowska-Pasko, *Low-glucose medium induces ORP150 expression and exerts inhibitory effect on apoptosis and senescence of human breast MCF7 cells*. Acta Biochimica Polonica, 2013. 60(2).
31. López-Lázaro, M., *Does hypoxia really control tumor growth?* Analytical Cellular Pathology, 2006. 28(5-6): p. 327-329.
32. Gatenby, R.A., et al., *Acid-mediated tumor invasion: a multidisciplinary study*. Cancer research, 2006. 66(10): p. 5216-5223.
33. López-Lázaro, M., *Why do tumors metastasize?* Cancer biology & therapy, 2007. 6(2): p. 141-144.
34. Macheda, M.L., S. Rogers, and J.D. Best, *Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer*. Journal of cellular physiology, 2005. 202(3): p. 654-662.
35. Robey, R.B. and N. Hay, *Akt, hexokinase, mTOR: Targeting cellular energy metabolism for cancer therapy*. Drug Discovery Today: Disease Mechanisms, 2005. 2(2): p. 239-246.
36. Zhai, X., et al., *Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells*. Oncology reports, 2013. 30(6): p. 2983-2991.
37. Jang, M., S.S. Kim, and J. Lee, *Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets*. Experimental & molecular medicine, 2013. 45(10): p. e45-e45.
38. Pelicano, H., et al., *Glycolysis inhibition for anticancer treatment*. Oncogene, 2006. 25(34): p. 4633-4646.
39. Szakács, G., et al., *Targeting multidrug resistance in cancer*. Nature reviews Drug discovery, 2006. 5(3): p. 219-234.
40. Kroemer, G. and J. Pouyssegur, *Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel*. Cancer cell, 2008. 13(6): p. 472-482.
41. Porporato, P.E., et al., *Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review*. Frontiers in pharmacology, 2011. 2: p. 49.
42. Pajak, B., et al., *2-Deoxy-d-Glucose and Its Analogs: From Diagnostic to Therapeutic Agents*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. 21(1): p. 234.
43. Navale, A.M. and A.N. Paranjape, *Glucose transporters: physiological and pathological roles*. Biophysical reviews, 2016. 8(1): p. 5-9.
44. Cura, A.J. and A. Carruthers, *Role of monosaccharide transport proteins in carbohydrate assimilation, distribution, metabolism, and homeostasis*. Comprehensive Physiology, 2011. 2(2): p. 863-914.

45. Jin, T., et al., *Glucose metabolism-weighted imaging with chemical exchange-sensitive MRI of 2-deoxyglucose (2DG) in brain: Sensitivity and biological sources*. Neuroimage, 2016. 143: p. 82-90.
46. Zhang, X.D., et al., *Effect of 2-deoxy-D-glucose on various malignant cell lines in vitro*. Anticancer research, 2006. 26(5A): p. 3561-3566.
47. Robinson, G., et al., *Switching from aerobic glycolysis to oxidative phosphorylation modulates the sensitivity of mantle cell lymphoma cells to TRAIL*. Oncogene, 2012. 31(48): p. 4996-5006.
48. Bandugula, V.R. and R. Prasad, *2-Deoxy-D-glucose and ferulic acid modulates radiation response signaling in non-small cell lung cancer cells*. Tumor Biology, 2013. 34(1): p. 251-259.
49. Giammarioli, A.M., et al., *Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response*. International journal of cancer, 2012. 131(4): p. E337-E347.
50. Kuntz, S., et al., *Energy restriction mimetic agents to target cancer cells: comparison between 2-deoxyglucose and thiazolidinediones*. Biochemical pharmacology, 2014. 92(1): p. 102-111.
51. Ciavardelli, D., et al., *Breast cancer stem cells rely on fermentative glycolysis and are sensitive to 2-deoxyglucose treatment*. Cell death & disease, 2014. 5(7): p. e1336-e1336.
52. Zhu, Z., et al., *2-Deoxyglucose as an energy restriction mimetic agent: effects on mammary carcinogenesis and on mammary tumor cell growth in vitro*. Cancer research, 2005. 65(15): p. 7023-7030.
53. Ahmad, I.M., et al., *2-Deoxyglucose combined with wild-type p53 overexpression enhances cytotoxicity in human prostate cancer cells via oxidative stress*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. 44(5): p. 826-834.
54. Lea, M.A., et al., *Addition of 2-deoxyglucose enhances growth inhibition but reverses acidification in colon cancer cells treated with phenformin*. Anticancer research, 2011. 31(2): p. 421-426.
55. Coleman, M.C., et al., *2-deoxy-D-glucose causes cytotoxicity, oxidative stress, and radiosensitization in pancreatic cancer*. Free Radical Biology and Medicine, 2008. 44(3): p. 322-331.
56. Zhang, D., et al., *2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy*. Cancer letters, 2014. 355(2): p. 176-183.
57. Maschek, G., et al., *2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo*. Cancer research, 2004. 64(1): p. 31-34.
58. Valera, V., et al., *Is targeting glycolysis with 2-deoxyglucose a viable therapeutic approach to bladder cancer*. Int. J. Cancer Ther. Oncol, 2017. 5: p. 511.
59. Cheng, Y., et al., *High glucose-induced resistance to 5-fluorouracil in pancreatic cancer cells alleviated by 2-deoxy-D-glucose*. Biomedical reports, 2014. 2(2): p. 188-192.
60. Tagg, S., et al., *2-Methoxyoestradiol-3, 17-O, O-bis-sulphamate and 2-deoxy-D-glucose in combination: a potential treatment for breast and prostate cancer*. British journal of cancer, 2008. 99(11): p. 1842-1848.
61. Gupta, S., R. Mathur, and B. Dwarakanath, *Modifications of etoposide induced toxicity by 2-deoxy-D-glucose in Ehrlich ascites tumor bearing mice*. Cancer Biol. Ther, 2005. 4: p. 87-94.
62. Singh, D., et al., *Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-D-glucose*. Strahlentherapie und Onkologie, 2005. 181(8): p. 507-514.
63. Rae, C., C. Sey, and R. Mairs, *Radiosensitization of prostate cancer cells by 2-deoxyglucose*. Madridge Journal of Oncogenesis, 2018. 2(1): p. 30-34.
64. Barker, H.E., et al., *The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence*. Nature reviews Cancer, 2015. 15(7): p. 409-425.

65. Stein, M., et al., *Targeting tumor metabolism with 2-deoxyglucose in patients with castrate-resistant prostate cancer and advanced malignancies*. The Prostate, 2010. 70(13): p. 1388-1394.
66. Raez, L.E., et al., *A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2013. 71(2): p. 523-530.
67. Koltai, T., *FINDING A ROLE FOR 2-DEOXYGLUCOSE IN CANCER TREATMENT*. 2017.
68. Fan, T., et al., *Tumor energy metabolism and potential of 3-bromopyruvate as an inhibitor of aerobic glycolysis: Implications in tumor treatment*. Cancers, 2019. 11(3): p. 317.
69. Azevedo-Silva, J., et al., *The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2016. 48(4): p. 349-362.
70. Shoshan, M.C., *3-Bromopyruvate: targets and outcomes*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2012. 44(1): p. 7-15.
71. Lis, P., et al., *The HK2 dependent "Warburg effect" and mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer: targets for effective therapy with 3-bromopyruvate*. Molecules, 2016. 21(12): p. 1730.
72. Ko, Y.H., P.L. Pedersen, and J. Geschwind, *Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase*. Cancer letters, 2001. 173(1): p. 83-91.
73. Geschwind, J.-F.H., et al., *Novel therapy for liver cancer: direct intraarterial injection of a potent inhibitor of ATP production*. Cancer research, 2002. 62(14): p. 3909-3913.
74. Queirós, O., et al., *Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2012. 44(1): p. 141-153.
75. Silva, J.S.A.L., et al., *The cytotoxicity of 3-bromopyruvate in breast cancer cells depends on extracellular pH*. Biochemical Journal, 2015. 467(2): p. 247-258.
76. Yadav, S., et al., *Molecular docking studies of 3-bromopyruvate and its derivatives to metabolic regulatory enzymes: Implication in designing of novel anticancer therapeutic strategies*. PloS one, 2017. 12(5).
77. Valenti, D., R.A. Vacca, and L. de Bari, *3-Bromopyruvate induces rapid human prostate cancer cell death by affecting cell energy metabolism, GSH pool and the glyoxalase system*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2015. 47(6): p. 493-506.
78. Kwiatkowska, E., et al., *Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2016. 48(1): p. 23-32.
79. Qin, J.-Z., H. Xin, and B. Nickoloff, *3-Bromopyruvate induces necrotic cell death in sensitive melanoma cell lines*. Biochemical and biophysical research communications, 2010. 396(2): p. 495-500.
80. Chen, T.C., et al., *A perillyl alcohol-conjugated analog of 3-bromopyruvate without cellular uptake dependency on monocarboxylate transporter 1 and with activity in 3-BP-resistant tumor cells*. Cancer letters, 2017. 400: p. 161-174.
81. Sadowska-Bartoszyńska, I., et al., *Anticancer agent 3-bromopyruvic acid forms a conjugate with glutathione*. Pharmacological Reports, 2016. 68(2): p. 502-505.
82. El Sayed, S.M., et al., *The promising anticancer drug 3-bromopyruvate is metabolized through glutathione conjugation which affects chemoresistance and clinical practice: an evidence-based view*. Medical hypotheses, 2017. 100: p. 67-77.
83. Yadav, S., et al., *Antitumor and chemosensitizing action of 3-bromopyruvate: implication of deregulated metabolism*. Chemico-biological interactions, 2017. 270: p. 73-89.
84. Sun, Y., et al., *Mechanisms underlying 3-bromopyruvate-induced cell death in colon cancer*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2015. 47(4): p. 319-329.

85. Philippe, I., et al., *Experimental results using 3-bromopyruvate in mesothelioma: in vitro and in vivo studies*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2012. 44(1): p. 81-90.
86. Liu, Z., et al., *3-Bromopyruvate induces apoptosis in breast cancer cells by downregulating Mcl-1 through the PI3K/Akt signaling pathway*. Anti-cancer drugs, 2014. 25(4): p. 447-455.
87. Xu, R.-h., et al., *Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia*. Cancer research, 2005. 65(2): p. 613-621.
88. Calviño, E., et al., *Regulation of death induction and chemosensitizing action of 3-bromopyruvate in myeloid leukemia cells: energy depletion, oxidative stress, and protein kinase activity modulation*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014. 348(2): p. 324-335.
89. Ihrlund, L.S., et al., *3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs*. Molecular oncology, 2008. 2(1): p. 94-101.
90. de Lima Lopes, G., et al., *Final results of a prematurely discontinued Phase 1/2 study of eniluracil with escalating doses of 5-fluorouracil administered orally in patients with advanced hepatocellular carcinoma*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2011. 68(4): p. 1067-1073.
91. Chong, D., et al., *Synergistic antitumor effect of 3-bromopyruvate and 5-fluorouracil against human colorectal cancer through cell cycle arrest and induction of apoptosis*. Anti-cancer drugs, 2017. 28(8): p. 831-840.
92. Xu, R.-H., et al., *Synergistic effect of targeting mTOR by rapamycin and depleting ATP by inhibition of glycolysis in lymphoma and leukemia cells*. Leukemia, 2005. 19(12): p. 2153-2158.
93. Cao, X., et al., *Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor*. Clinical Cancer Research, 2008. 14(6): p. 1831-1839.
94. Buijs, M., et al., *Antiglycolytic therapy combined with an image-guided minimally invasive delivery strategy for the treatment of breast cancer*. Journal of Vascular and Interventional Radiology, 2013. 24(5): p. 737-743.
95. Chang, J.M., et al., *Local toxicity of hepatic arterial infusion of hexokinase II inhibitor, 3-bromopyruvate: In vivo investigation in normal rabbit model*. Academic radiology, 2007. 14(1): p. 85-92.
96. Ko, Y., et al., *A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2012. 44(1): p. 163-170.
97. El Sayed, S.M., et al., *Safety and outcome of treatment of metastatic melanoma using 3-bromopyruvate: a concise literature review and case study*. Chinese journal of cancer, 2014. 33(7): p. 356.
98. Baghdadi, H.H., *Targeting cancer cells using 3-bromopyruvate for selective cancer treatment*. Saudi journal of medicine & medical sciences, 2017. 5(1): p. 9.
99. Bonnet, S., et al., *A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth*. Cancer cell, 2007. 11(1): p. 37-51.
100. James, M.O. and P.W. Stacpoole, *Pharmacogenetic considerations with dichloroacetate dosing*. Pharmacogenomics, 2016. 17(7): p. 743-753.
101. Kankotia, S. and P.W. Stacpoole, *Dichloroacetate and cancer: new home for an orphan drug?* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 2014. 1846(2): p. 617-629.
102. Birsoy, K., et al., *MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors*. Nature genetics, 2013. 45(1): p. 104.
103. Tataranni, T. and C. Piccoli, *Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. 2019.

104. Robey, I.F. and N.K. Martin, *Bicarbonate and dichloroacetate: evaluating pH altering therapies in a mouse model for metastatic breast cancer*. BMC cancer, 2011. 11(1): p. 235.
105. Sun, R.C., P.G. Board, and A.C. Blackburn, *Targeting metabolism with arsenic trioxide and dichloroacetate in breast cancer cells*. Molecular cancer, 2011. 10(1): p. 142.
106. Wong, J.Y., et al., *Dichloroacetate induces apoptosis in endometrial cancer cells*. Gynecologic oncology, 2008. 109(3): p. 394-402.
107. Cao, W., et al., *Dichloroacetate (DCA) sensitizes both wild-type and over expressing Bcl-2 prostate cancer cells in vitro to radiation*. The Prostate, 2008. 68(11): p. 1223-1231.
108. Park, J.M., et al., *Metabolic response of glioma to dichloroacetate measured in vivo by hyperpolarized ¹³C magnetic resonance spectroscopic imaging*. Neuro-oncology, 2013. 15(4): p. 433-441.
109. Kumar, A., S. Kant, and S.M. Singh, *Novel molecular mechanisms of antitumor action of dichloroacetate against T cell lymphoma: Implication of altered glucose metabolism, pH homeostasis and cell survival regulation*. Chemico-biological interactions, 2012. 199(1): p. 29-37.
110. Zheng, M.-f. and S.-y. Shen, *DCA increases the antitumor effects of capecitabine in a mouse B16 melanoma allograft and a human non-small cell lung cancer A549 xenograft*. Cancer chemotherapy and pharmacology, 2013. 72(5): p. 1031-1041.
111. Lu, X., et al., *Dichloroacetate enhances the antitumor efficacy of chemotherapeutic agents via inhibiting autophagy in non-small-cell lung cancer*. Cancer management and research, 2018. 10: p. 1231.
112. Tong, J., et al., *Synergistic antitumor effect of dichloroacetate in combination with 5-fluorouracil in colorectal cancer*. BioMed Research International, 2011. 2011.
113. Korga, A., et al., *Inhibition of glycolysis disrupts cellular antioxidant defense and sensitizes HepG2 cells to doxorubicin treatment*. FEBS open bio, 2019. 9(5): p. 959-972.
114. Dai, Y., et al., *Dichloroacetate enhances adriamycin-induced hepatoma cell toxicity in vitro and in vivo by increasing reactive oxygen species levels*. PLoS One, 2014. 9(4).
115. Woolbright, B.L., et al., *The role of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) in bladder cancer and chemoresistance*. Molecular cancer therapeutics, 2018. 17(9): p. 2004-2012.
116. Xie, J., et al., *Dichloroacetate shifts the metabolism from glycolysis to glucose oxidation and exhibits synergistic growth inhibition with cisplatin in HeLa cells*. International journal of oncology, 2011. 38(2): p. 409-417.
117. Cairns, R.A., et al., *Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can enhance cytotoxic chemotherapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. 104(22): p. 9445-9450.
118. Abdelmalak, M., et al., *Long-term safety of dichloroacetate in congenital lactic acidosis*. Molecular genetics and metabolism, 2013. 109(2): p. 139-143.
119. Michelakis, E., L. Webster, and J. Mackey, *Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer*. British journal of cancer, 2008. 99(7): p. 989-994.
120. Chu, Q.S.-C., et al., *A phase I open-labeled, single-arm, dose-escalation, study of dichloroacetate (DCA) in patients with advanced solid tumors*. Investigational new drugs, 2015. 33(3): p. 603-610.
121. Brandsma, D., et al., *Severe encephalopathy and polyneuropathy induced by dichloroacetate*. Journal of neurology, 2010. 257(12): p. 2099-2100.
122. Bhat, T.A., et al., *Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy*. Drug discovery today, 2015. 20(5): p. 635-643.
123. Dunbar, E., et al., *Phase 1 trial of dichloroacetate (DCA) in adults with recurrent malignant brain tumors*. Investigational new drugs, 2014. 32(3): p. 452-464.
124. Garon, E.B., et al., *Dichloroacetate should be considered with platinum-based chemotherapy in hypoxic tumors rather than as a single agent in advanced non-small cell lung cancer*. Journal of cancer research and clinical oncology, 2014. 140(3): p. 443-452.

125. Strum, S.B., et al., *Case report: Sodium dichloroacetate (DCA) inhibition of the "Warburg Effect" in a human cancer patient: complete response in non-Hodgkin's lymphoma after disease progression with rituximab-CHOP*. Journal of bioenergetics and biomembranes, 2013. 45(3): p. 307-315.
126. Mueckler, M. and B. Thorens, *The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters*. Molecular aspects of medicine, 2013. 34(2-3): p. 121-138.
127. Amann, T., et al., *GLUT1 expression is increased in hepatocellular carcinoma and promotes tumorigenesis*. The American journal of pathology, 2009. 174(4): p. 1544-1552.
128. Medina, R.A. and G.I. Owen, *Glucose transporters: expression, regulation and cancer*. Biological research, 2002. 35(1): p. 9-26.
129. Cho, H., et al., *Overexpression of glucose transporter-1 (GLUT-1) predicts poor prognosis in epithelial ovarian cancer*. Cancer investigation, 2013. 31(9): p. 607-615.
130. Young, C.D., et al., *Modulation of glucose transporter 1 (GLUT1) expression levels alters mouse mammary tumor cell growth in vitro and in vivo*. PloS one, 2011. 6(8).
131. Barron, C.C., et al., *Facilitative glucose transporters: implications for cancer detection, prognosis and treatment*. Metabolism, 2016. 65(2): p. 124-139.
132. Gao, J.-L. and Y.-G. Chen, *Natural compounds regulate glycolysis in hypoxic tumor microenvironment*. BioMed research international, 2015. 2015.
133. Tuccinardi, T., et al., *Oxime-based inhibitors of glucose transporter 1 displaying antiproliferative effects in cancer cells*. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2013. 23(24): p. 6923-6927.
134. Chan, D.A., et al., *Targeting GLUT1 and the Warburg effect in renal cell carcinoma by chemical synthetic lethality*. Science translational medicine, 2011. 3(94): p. 94ra70-94ra70.
135. McBrayer, S.K., et al., *Multiple myeloma exhibits novel dependence on GLUT4, GLUT8, and GLUT11: implications for glucose transporter-directed therapy*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2012. 119(20): p. 4686-4697.
136. Vyas, A.K., et al., *Effects of the HIV protease inhibitor ritonavir on GLUT4 knock-out mice*. Journal of Biological Chemistry, 2010. 285(47): p. 36395-36400.
137. Srirangam, A., et al., *The human immunodeficiency virus protease inhibitor ritonavir inhibits lung cancer cells, in part, by inhibition of survivin*. Journal of Thoracic Oncology, 2011. 6(4): p. 661-670.
138. Srirangam, A., et al., *Effects of HIV protease inhibitor ritonavir on Akt-regulated cell proliferation in breast cancer*. Clinical Cancer Research, 2006. 12(6): p. 1883-1896.
139. Dewan, M.Z., et al., *An HIV protease inhibitor, ritonavir targets the nuclear factor-kappaB and inhibits the tumor growth and infiltration of EBV-positive lymphoblastoid B cells*. International journal of cancer, 2009. 124(3): p. 622-629.
140. Armando, R.G., D.L. Mengual Gómez, and D.E. Gomez, *New drugs are not enough-drug repositioning in oncology: An update*. International Journal of Oncology, 2020. 56(3): p. 651-684.
141. Zhan, T., et al., *Silybin and dehydrosilybin decrease glucose uptake by inhibiting GLUT proteins*. Journal of cellular biochemistry, 2011. 112(3): p. 849-859.
142. Jahanafrooz, Z., et al., *Silibinin to improve cancer therapeutic, as an apoptotic inducer, autophagy modulator, cell cycle inhibitor, and microRNAs regulator*. Life sciences, 2018. 213: p. 236-247.
143. Tyagi, A.K., et al., *Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G2-M arrest, and apoptosis*. Clinical cancer research, 2002. 8(11): p. 3512-3519.
144. Dhanalakshmi, S., et al., *Silibinin sensitizes human prostate carcinoma DU145 cells to cisplatin-and carboplatin-induced growth inhibition and apoptotic death*. International journal of cancer, 2003. 106(5): p. 699-705.
145. Flaig, T.W., et al., *A study of high-dose oral silybin-phytosome followed by prostatectomy in patients with localized prostate cancer*. The Prostate, 2010. 70(8): p. 848-855.

146. Flaig, T.W., et al., *A phase I and pharmacokinetic study of silybin-phytosome in prostate cancer patients*. Investigational new drugs, 2007. 25(2): p. 139-146.