



RELATÓRIO DE PROJETO DE BIOQUÍMICA

2019/2020

Sara Raquel Santos Ferreira

Nº 49035

Caracterização da expressão de Transportadores Catiónicos CAT-1 e ATB^{0,+} em linhas celulares tumorais.

Orientador: Dr. João Domingos Galamba Correia

Co-orientador: Rúben Diogo Marques da Silva

Local: Campus Tecnológico Nuclear, Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C²TN), Instituto Superior Técnico, Bobadela, Loures.

15 de Julho de 2020



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Departamento de Química

Resumo

A caracterização da expressão de transportadores catiónicos tem sido alvo de estudo devido à sua importância como potenciais alvos de agentes terapêuticos com o objetivo de inovar e criar novas e mais eficazes ferramentas no tratamento de tumores. O principal objetivo deste projeto baseou-se na caracterização dos níveis de expressão dos transportadores de aminoácidos catiónicos, CAT-1 e ATB^{0,+} em diversas linhas celulares tumorais de vários tipos de tecido pela aplicação de anticorpos policlonais com reconhecimento específico para estes transportadores. Para atingir este objetivo foi necessário inicialmente proceder à preparação de culturas seguidas das quais foi efetuado o teste de contaminação por *mycoplasma*. De modo a alcançar o objetivo deste trabalho, foram programados ensaios de extração e quantificação dos níveis de expressão proteica para cada uma das linhas celulares estudadas, assim como ensaios de Western-Blot para a verificação da presença de CAT-1 e ATB^{0,+}, resultando numa análise qualitativa dos seus níveis de expressão. Não foi possível realizar tais ensaios devido ao término abrupto da fase experimental deste trabalho. Ao avaliar estudos já realizados ao nível de expressão de outras proteínas semelhantes, seria de esperar o aumento da expressão proteica dos transportadores catiónicos nas doze linhas celulares tumorais em estudo, através da utilização de anticorpos policlonais.

Palavras-Chave: Transportadores catiónicos, CAT-1, ATB^{0,+}, linhas celulares tumorais.

Abstract

The characterization of the expression of cationic amino acid transporters has been subject of study due to their importance as a target of therapeutic agents in order to innovate and create new and more tools for tumors treatment. The main point of this project is to characterize the expression levels of the cationic amino acid transporters, CAT-1 and ATB^{0,+}, in several tumors cell lines of different types of tissue using polyclonal antibodies with specificity to these transporters. To achieve this goal it was necessary to carry out the preparation of cultures followed by *mycoplasma* contamination test. In order to achieve the purpose of this work, it was performed tests for the extraction and quantification of protein expression levels as well as Western-Blot tests to check the presence of CAT-1 and ATB^{0,+}. It was not possible to perform these tests due to the abrupt end of the experimental phase of this work. In order to predict the results of this study it was performed the analysis of several articles already published related to the protein level expression of these amino acid transporters in distinct tumors cell lines. It would be possible to predict the increase of the expression levels of cationic transporters in the twelve cell lines in study, using the polyclonal antibodies protocol.

Key-words: Cationic transporters; CAT-1; ATB^{0,+}; tumor cell lines.

Abreviaturas

Abs - Absorvância

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

FBS – Soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)

PBS – Tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*)

PCR- Reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*)

SLC – Transportador de Solute (*solute carrier*)

NO- Óxido Nítrico (*nitric oxid*)

TAAs- Transportadores de aminoácidos

GLUTs – Transportadores de Glucose (*glucose transporters*)

ODC – ornitina descarboxilase

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*)

Cit - citrulina

ASL – argininosuccinase liase

ASS – argininosuccinase sintetase

EGF - fator de crescimento epidérmico (*epidermal growth factor*)

TGF α – fator de crescimento transformador alfa (*transforming growth factor alpha*)

CRC – cancro coloretal (*colorectal cancer*)

HIF-1 α – fator induzível por hipóxia 1-alfa (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*)

PI3K – fosfoinosítídeo 3-cinase (*phosphoinositide 3-kinase*)

SREBP1 – fator de transcrição 1 ligado a elementos reguladores de estero (*Sterol regulatory element-binding transcription factor 1*)

TMs – Transmembranares

Lista de Figuras

- Figura 1** Via de sinalização do mTOR. As principais vias de sinalização que regulam os complexos mTORC1 e mTORC2 e a sua composição. Reconhecimento de fatores de crescimento, aminoácidos, energia celular e stress é efetuado pelo complexo mTORC1 através dos mecanismos presentes na figura, ao contrário do mTORC2 cujo mecanismo ainda é desconhecido. - 5 -
- Figura 2** exemplo representativo da estrutura da família de transportadores de soluto 6 e 7 como transportador de leucina. - 6 -
- Figura 3** Imagem obtida a partir do microscópio eletrónico da linha celular MDAMB-231 (ampliação da objetiva de 10 vezes) - 14 -
- Figura 4** Imagem obtida a partir do microscópio eletrónico da linha celular A549 (ampliação da objetiva de 4 vezes) - 14 -
- Figura 5** Imagem obtida a partir do microscópio eletrónico da linha celular HT29 (ampliação de objetiva 10 vezes) - 14 -
- Figura 6** Resultado do teste de deteção de contaminação por mycoplasma. - 15 -
- Figura 7** Análise do RNA total isolado por RT-PCR de forma a detetar a presença ou ausência das isoformas CAT-1, CAT-2A; CAT-2B e CAT-4 nas linhas celulares tumorais MCF-7, T47D e MDAMB-231. - 17 -
- Figura 8** PRL e E2 não têm efeito significativo na alteração dos níveis de mRNA do CAT-1. (A) RNA total isolado para análise de RT-PCR e (B) Análise por Western. - 18 -
- Figura 9** RT-PCR semi-quantitativa de tecido normal (N) e tecido CRC (C). Expressão de mRNA de ATB^{0,+} (A) e iNOS (B). - 19 -

Lista de Tabelas

Tabela 1 Principais características das linhagens celulares humanas utilizadas no presente trabalho - 10 -

Tabela 2 Preparação das alíquotas para PCR. As alíquotas foram preparadas de acordo com o boletim técnico do LookOut® Mycoplasma PCR Detection kit (SIGMA-ALDRICH®)..... - 13 -

Tabela 3 Perfil termocíclico para PCR. Perfil de acordo com o boletim técnico do LookOut® Mycoplasma PCR Detection kit (SIGMA-ALDRICH®)..... - 13 -

ÍNDICE

I.	Introdução	- 1 -
1.	Cancro: Causas e estratégias terapêuticas.....	- 1 -
2.	Aminoácidos: a sua importância na proliferação do tecido tumoral	- 3 -
2.1.	mTOR – Importância na sinalização e na proliferação celular	- 3 -
3.	Família SLC	- 5 -
3.1.	SLC6A14, ATB ^{0,+}	- 6 -
3.2.	SLC7A1, CAT-1	- 7 -
3.3.	Possíveis aplicações para o estudo do CAT-1 e ATB ^{0,+}	- 8 -
4.	Objetivo	- 9 -
II.	Materiais e métodos	- 10 -
1.	Materiais e equipamentos	- 10 -
1.1.	Crescimentos e proliferação de linhas celulares tumorais.....	- 10 -
1.2.	Manutenção das linhas celulares.....	- 11 -
1.3.	Deteção de mycoplasma	- 11 -
2.	Métodos.....	- 11 -
2.1.	Crescimento e proliferação de linhas celulares tumorais.....	- 11 -
2.2.	Deteção de <i>mycoplasma</i> por PCR.....	- 12 -
III.	Resultados e Discussão	- 14 -
1.	Preparação e crescimento das linhas celulares	- 14 -
2.	Deteção da contaminação por mycoplasma nas culturas celulares.....	- 14 -
3.	Quantificação da expressão proteica de CAT-1 e ATB ^{0,+}	- 16 -
3.1.	Extração proteica e identificação de CAT-1 e ATB ^{0,+} por Western-Blot.....	- 16 -
3.2.	Análise de casos-estudo	- 16 -
IV.	Conclusões	- 20 -
V.	Referências.....	- 1 -

I. Introdução

1. Cancro: Causas e estratégias terapêuticas

Atualmente, o cancro representa umas das principais causas de mortalidade, tratando-se de uma doença influenciável por fatores ambientais, sociais e individuais. [1] Apesar da instabilidade do genoma constituir um fator crucial para o desenvolvimento de cancro, originando diversidade genética que acelera sua aquisição e inflamação, este compreende diversas capacidades biológicas que se manifestam durante as várias etapas do seu desenvolvimento tais como, a sustentação da sinalização proliferativa, o bloqueio do crescimento de supressores resistindo à morte celular resultando numa imortalidade replicativa que conseqüentemente induz a angiogénese e a metástase do tecido tumoral.[2] Devido à carência de terapias e diagnósticos o metabolismo do cancro tem sido alvo de estudo de forma a desenvolver estratégias terapêuticas inovadoras e o aprimoramento das terapias oncológicas atuais. Estes carecem de afinidade e especificidade para o tecido tumoral, tendo como resultado efeitos secundários indesejados em tecidos saudáveis. Desta forma, existe um interesse particular na exploração de radio-marcadores de elevada especificidade, constituindo um potencial para imagiologia não invasiva e teranóstica do cancro.[3] A palavra teranóstica deriva do grego *therapeia* (terapia) e *gnosis* (conhecimento) e refere-se à possibilidade de combinar um biomarcador como ferramenta de diagnóstico e simultaneamente como agente terapêutico.[4] Este pode ser denominado por radiofármaco. É possível combinar múltiplas metodologias de imagem e funções terapêuticas, como o direcionamento passivo e ativo para a terapia do cancro e libertação de fármacos que respondem a estímulos (útil para terapias dependentes da temperatura e do pH).[5] Esta forma de atuar permite efetuar o diagnóstico, a administração do fármaco e a monitorização da resposta ao tratamento em simultâneo. Desta forma, torna-se possível traçar um tratamento adequado a cada utente. Através de um alvo molecular específico num tumor o agente terapêutico seria idealmente direcionado contra um recetor tumoral específico. [6][7][8][9][10] A maioria das células tumorais dependem da disponibilização de nutrientes tais como a glucose e ~~alguns~~ aminoácidos, para a obtenção de energia ~~metabólica~~ de forma a permitir a rápida proliferação celular.[11] Os tecidos quando recebem sinalização de fatores de crescimento (como por exemplo o *epidermal growth factor* – EGFR, diretamente envolvido na proliferação celular, e o *transforming growth factor alfa* – TGF α) [14] aumentam a captura de nutrientes, principalmente glucose e glutamina, satisfazendo os requisitos anabólicos do

crescimento e proliferação celular. Esta necessidade pode ser suportada a partir de várias estratégias tais como: a produção de fatores de crescimento, resultando numa proliferação autócrina, como também, recorrer ao envio de estímulos celulares a tecidos normais com o objetivo de estimular a produção de factores de crescimento para uso metabólico das células tumorais.[2] A biodisponibilidade dos fatores de crescimento é regulada pelo uptake de nutrientes, da matriz extracelular por ações de uma complexa rede de proteases, sulfatases e outras enzimas que os libertam e ativam de uma forma altamente específica e localizada.[12][13] Os transportadores de aminoácidos (TAAs) são proteínas de transporte que se encontram ligadas à membrana celular e que mediam o influxo/efluxo de aminoácidos ~~em organelos celulares~~. [14] Estes desempenham diversos papéis desde a neurotransmissão, metabolismo intracelular e reações anabólicas/ catabólicas. Uma vez que as células tumorais apresentam uma enorme necessidade de influxo de aminoácidos, entre outros nutrientes. Desta forma ocorre a sua acumulação nos tecidos tumorais, nomeadamente na fase inicial do ciclo de propagação.[6] Estudos realizados evidenciam o aumento da expressão de transportadores de nutrientes em tecidos tumorais, tais como os transportadores de aminoácidos catiónicos (ATB^{0,+}, CAT-1), constituindo um alvo promissor para o desenvolvimento de novos fármacos.[3] O transporte de aminoácidos através da membrana plasmática para o citoplasma das células cancerígenas é mediado por sistemas de transporte ativo que apresentam diferentes características e requerimentos, tais como, o substrato, pH e mecanismos de regulação.[15][16] Nas células tumorais a desregulação dos níveis de expressão dos TAAs conduz a uma reprogramação metabólica. Estes podem estar localizados na membrana plasmática, ou em compartimentos intracelulares facilitando assim o *uptake* de aminoácidos através da membrana. [14] Aminoácidos específicos apresentam relevância na produção de energia, no metabolismo de biomoléculas vitais (neurotransmissores, vitaminas e hormonas) e na regulação de processos celulares. Em células mamíferas, a concentração de aminoácidos intracelular é geralmente mais elevada do que em fluídos extracelulares, e tendo em conta que os TAAs necessitam de os concentrarem no espaço intracelular contra o gradiente eletroquímico. Portanto os transportadores necessitam de um sistema de transporte ativo secundário acoplado ao co-transporte de iões (Na⁺, H⁺, Cl⁻ e K⁺). [17] A maioria dos TAAs reconhecem vários aminoácidos como substrato, no entanto apresentam diferentes afinidades para cada um deles.

2. Aminoácidos: a sua importância na proliferação do tecido tumoral

Os aminoácidos possuem funções biológicas de grande relevância e representam uma classe importante dos principais nutrientes necessários para a sobrevivência e função celular. Alguns destes podem ser sintetizados pelas células a partir de diferentes blocos precursores, outros terão de ser obtidos de forma exógena devido à inexistência de uma via metabólica para a sua *síntese de novo*. [13] Todas as células de mamíferos devem obter aminoácidos essenciais (Treonina, Metionina, Fenilalanina, Triptofano, Valina, Isoleucina, Leucina e Lisina) de forma exógena, uma vez que o nosso organismo não consegue sintetizar estes aminoácidos. O transporte de aminoácidos através da membrana plasmática para o citoplasma das células cancerígenas é mediado por sistemas de transporte (dependentes e independentes de sódio) utilizados nos transportadores de aminoácidos catiónicos, CAT-1 e ATB⁰, + os quais apresentam diferentes especificidades, tais como, o substrato, pH e mecanismos de regulação. [16] As células tumorais têm uma elevada necessidade por nutrientes, quando comparadas com células saudáveis, de forma a suportar a sua elevada taxa de proliferação. Estas dependem principalmente da glucose e de alguns aminoácidos, especialmente a glutamina como fonte de energia. [18] O que foi corroborado pela sobre-expressão de transportadores de nutrientes associados à membrana plasmática, tais como transportadores de glucose (GLUTs) e alguns transportadores de aminoácidos tais como o ASCT2, LAT1 e o ATB⁰+. [19] A arginina intracelular é conhecida como um dos aminoácidos mais importantes para a ativação de mecanismos que envolvem a rapamicina (mTOR), tendo um impacto especial na via metabólica que envolve o complexo mTORC1 que necessita de uma ativação por translocação e promove o desenvolvimento tumoral, a imortalidade e a proliferação celular. [20][21][22].

2.1. mTOR – Importância na sinalização e na proliferação celular

A leucina e a arginina constituem sinalizadores e ativadores do mTOR que integra sinais de fatores de crescimento, estados de nutrição e energia. (Fig.1) A maioria dos organismos desenvolveram mecanismos para transitar de forma eficiente entre estados anabólicos e catabólicos, permitindo a sua sobrevivência em ambientes cuja disponibilização de nutrientes é variável. [21] O mTOR (oficialmente denominado por alvo mecanicista via de sinalização de rapamicina) produzido pela bactéria *Streptomyces Hygroscopicus* contém propriedades

antiproliferativas em mamíferos [23]. Este é uma proteína serina/treonina cinase atípica que pertence à família cinase e, desta forma, se encontra relacionada com a enzima fosfoinosítideo 3-cinase (PI3K). A sinalização da PI3K promove a ativação do fator pró-lipogénico, SREBP1 [24], que ativa a expressão de componentes da cadeia oxidativa da via metabólica das pentoses fosfato, que controlam a produção de poder redutor e ribose-5-fosfato, ambos necessários para a lipogénese e biossíntese de nucleótidos, respetivamente.[24] O mTOR compreende dois complexos estruturais e funcionais, o mTOR 1 (mTORC1) e o mTOR 2 (mTORC2)). A via mTORC1 integra *inputs* de pelo menos cinco dos principais sinais celulares e extracelulares, tais como, fatores de crescimento, *stress*, estado de energia e disponibilização de aminoácidos, com o objetivo de controlar processos celulares como a síntese proteica e lipídica.[21] (Fig.1) Um aumento na síntese *de novo* de lípidos é uma característica da proliferação em células tumorais dado que estas devem produzir ácidos gordos para a síntese de membranas. [25] Em contraste com o mTORC1, o mTORC2 não é sensível à rapamicina, embora o tratamento prolongado com rapamicina indiretamente, possa inibir o mTORC2. Em condições de abundância de nutrientes, o mTOR é ativado e estimula o crescimento celular, ativando uma série de processos anabólicos. No entanto em condições de privação de nutrientes é desencadeada a inibição do mTOR para limitar a sua atividade anabólica. (Fig.1) Desta forma, processos catabólicos são ativados para a produção de energia e o restabelecimento dos níveis de nutrientes disponíveis para assegurar os processos biológicos vitais. [26][27][28][29][30] No processo de divisão celular a glucose é a fonte de energia primária.[31] A glucose é inicialmente hidrolisada pela via metabólica da glicólise, que consiste numa série de reações enzimáticas cujo produto final são duas moléculas de três carbonos de piruvato por cada molécula de glucose hidrolisada. A privação de glucose induz a inibição da glicólise e da respiração mitocondrial o que conduz a uma rápida redução dos níveis intracelulares de ATP, levando a um aumento das razões de ADP/ATP e de cAMP/ATP. A proteína serina/treonina cinase é dependente da enzima AMP cinase (AMPK) que constitui um sinalizador eficaz do balanço energético celular.[32][33] (Fig.1 [34]).

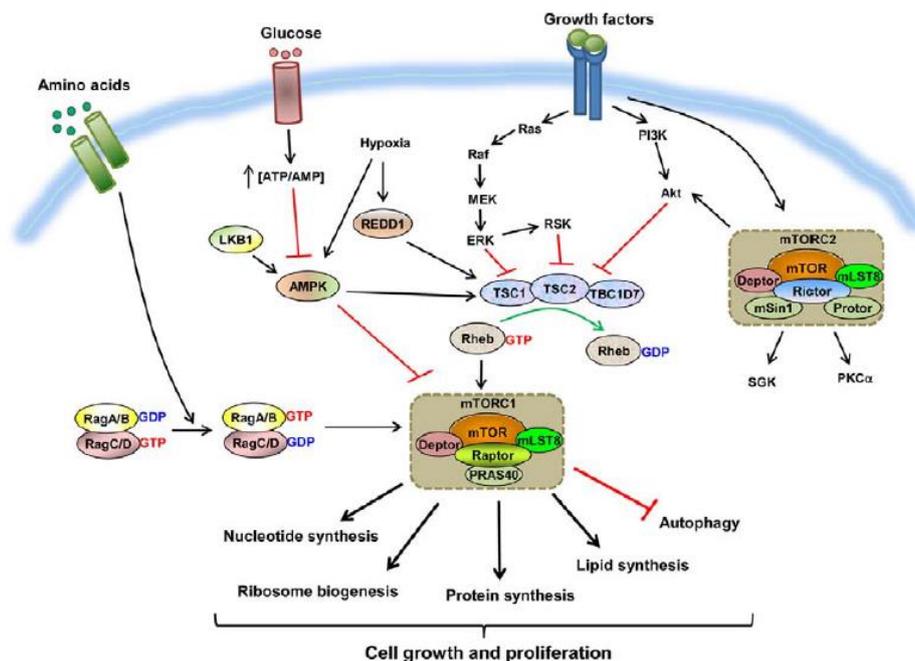


Figura 1 Via de sinalização do mTOR. As principais vias de sinalização que regulam os complexos mTORC1 e mTORC2 e a sua composição. Reconhecimento de fatores de crescimento, aminoácidos, energia celular e stress é efetuado pelo complexo mTORC1 através dos mecanismos presentes na figura, ao contrário do mTORC2 cujo mecanismo ainda é desconhecido.

3. Família SLC

As células expressam uma variedade de transportadores para o *uptake* de aminoácidos (essenciais e não essenciais), tendo sido a maioria identificados a nível molecular. Transportadores de soluto são proteínas membranares eucarióticas que controlam o influxo/efluxo de vários solutos [35], tornando-se essenciais para o desenvolvimento de importantes processos fisiológicos. (Fig.2 [14]) A superfamília humana de transportadores de soluto (SLC) compreende 386 proteínas, que estão envolvidas no transporte de vários substratos endógenos, tais como, nutrientes, toxinas e fármacos [36][35], que estão organizadas em 52 famílias.[37] As células tumorais apresentam uma elevada necessidade de nutrientes para assegurar a sua rápida proliferação e crescimento. No entanto, muitos nutrientes são polares demais para se difundirem nas membranas celulares e, desta forma, necessitam de proteínas transportadoras para a sua mobilização. Os transportadores SLC variam em especificidade, desde transportadores altamente seletivos que interagem com um grupo de substratos específicos (por exemplo: SLC7) [38][39], para transportadores que interagem com uma ampla variedade de substratos quimicamente distintos (por exemplo:

SLCO) [40][41]. Os mecanismos de transporte praticados pelos transportadores de soluto foram classificados como mecanismos passivos ou ativos. Os transportadores que efetuam transporte passivo, conhecido como transporte facilitado, permitem a difusão de solutos através das membranas a favor do seu gradiente eletroquímico. No entanto, o mecanismo de transporte maioritariamente utilizado pelos transportadores SLC classifica-se como transporte ativo secundário, isto é, um transporte acoplado ao co-transporte de iões (tais como: Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} e Cu^{2+}). Este processo é dependente da hidrólise de ATP uma vez que o transporte de solutos ocorre contra o gradiente de concentração.

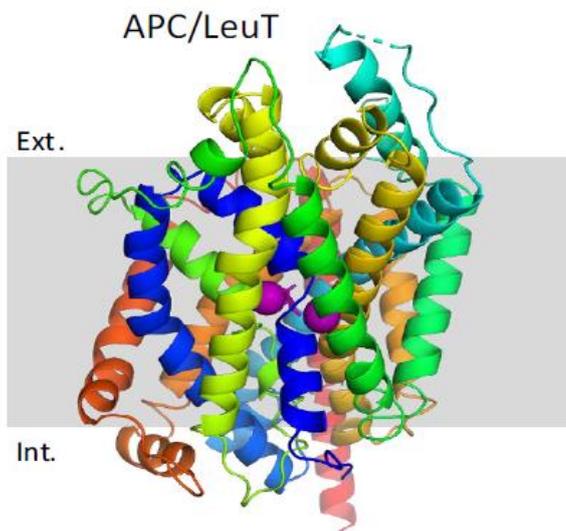


Figura 2 exemplo representativo da estrutura da família de transportadores de soluto 6 e 7 como transportador de leucina.

3.1. SLC6A14, $\text{ATB}^{0,+}$

SLC6A14 é o gene que codifica para o transportador catiónico conhecido como $\text{ATB}^{0,+}$ cujos substratos reconhecidos são aminoácidos neutros e positivos. A expressão do SLC6A14 é consideravelmente inferior nos tecidos saudáveis quando comparado com tecidos tumorais.[11][13] O $\text{ATB}^{0,+}$ tem um sistema de transporte maioritariamente unidirecional de aminoácidos, sendo que, os únicos aminoácidos que não são transportados por este são o glutamato e o aspartato. É um transportador de aminoácidos com características peculiares que apresenta especificidade para o substrato e cuja função é o influxo de aminoácidos, neutros e catiónicos, acoplado ao co transporte dos iões $2 \text{Na}^+ / 1 \text{Cl}^-$ na mesma direção do potencial de membrana.[42] A mobilização de aminoácidos para os tecidos tumorais, como por exemplo a glutamina, iria disponibilizar quantidade suficiente para estes serem utilizados

como substratos permutáveis com outros transportadores (tais como, os SLC1A5, SLC7A5 e SLC7A11) favorecendo assim as vias metabólicas que asseguram a rápida proliferação celular no tecido tumoral. Os substratos do transportador incluem todos os aminoácidos essenciais, tais como a glutamina (importante na biossíntese de nucleótidos), a leucina (ativador do mTOR) e a arginina que intervém na proliferação celular. Sugerindo assim que alguns tipos de cancro (cancro da mama, cólon, pâncreas e cervical) regulem positivamente a expressão do gene SLC6A4 de forma a satisfazer as suas necessidades elevadas de nutrientes para o seu metabolismo. [43][44][45][46].

3.2. SLC7A1, CAT-1

CAT-1 foi o primeiro transportador de aminoácidos a ser clonado e posteriormente caracterizado bioquimicamente e molecularmente. Atualmente existe pouca informação estrutural disponível para as proteínas CAT.[47] Prevê-se que as proteínas CAT tenham 14 hélices transmembranares (TMs) e N-/C- terminais intracelulares.[48] Além disso, dois resíduos de asparagina, 223 e 229, estão localizados no terceiro *loop* extracelular e demonstrou ser glicosilado.[49] Resíduos de aminoácidos essenciais para o transporte e função das proteínas CAT foram identificadas através da análise de determinadas mutações. A mutação conservadora do resíduo Glu 107 a Asp no mCAT-1 leva à perda da sua atividade de transporte. [50] Isso sugere que o resíduo de Glu 107 está localizado no espaço intracelular da terceira TM do mCAT-1. As proteínas 14 TM da família SLC7 exibem poucos polimorfismos, sugerindo que a normal função destas proteínas não tolera muitas alterações na sua sequência de aminoácidos. O gene SCL7A1 que codifica para o transportador CAT-1 é expresso em quase todos os tecidos, à exceção do fígado em adultos. No entanto, o seu nível de expressão varia consideravelmente dependendo do tipo de tecidos em que este se encontra.[51] Este participa no transporte bidirecional de aminoácidos catiónicos, tendo importantes funções metabólicas tais como o influxo de aminoácidos e a síntese proteica, óxido nítrico (NO) e poliaminas. Esta descoberta permitiu averiguar acerca da relação entre a disponibilidade de substrato e a regulação da expressão do transportador CAT-1. A L-arginina tem uma importante função biológica uma vez que esta se acumula nos tecidos de cancro colorretal resultando num aumento da expressão do gene SLC7A1.[11] Estes resultados impulsionaram o estudo dos transportadores catiónicos como ferramentas para a formulação de novas terapias direcionadas para o combate do cancro. A expressão do SLC7A1 sofre regulação por diversos estímulos tais como, a proliferação celular, fatores de crescimento, citocinas e hormonas. Independentemente do nível da sua expressão proteica, a atividade de

CAT-1 diminui após a ativação da proteína cinase C (PKC) em células endoteliais humanas, o que indica a existência de uma regulação pós-transducional.[52] A maioria das proteínas CAT têm um sistema de transporte classificado como y^+ , independente de Na^+ e pH [53][54][55], apresentando maior afinidade para aminoácidos catiónicos com uma longa cadeia carbonada.[54][56][57][58]. Numa situação de privação de aminoácidos a tradução do mRNA do CAT-1 é iniciada a partir de uma sequência interna ribossomal (IRES) dentro da região 5'UTR do mRNA do CAT-1. [59] A regulação negativa do CAT-1 que ocorre nos hepatócitos tem como objetivo a proteção da hidrólise da arginina pela ação da enzima arginase, que é altamente expressa neste tipo de células. A rápida ativação da regulação negativa sob determinadas condições é provavelmente necessária para assegurar funções vitais celulares neste tecido, tal como a biossíntese de hepatócitos. Até agora, o controlo translacional do CAT-1 foi estudados sob privação completa de um ou de todos aminoácidos e não se sabe em que nível de privação, esses mecanismos entram em ação e, se tais baixos níveis sempre ocorrem in vivo. Desta forma, uma das hipóteses colocadas implica que a célula que se encontra em privação tenha uma reserva a que possa recorrer para restabelecer o nível de aminoácidos disponíveis necessários para o seu funcionamento. Concentrações de aminoácidos no plasma, normalmente, são estáveis mesmo por períodos mais longos de jejum, tornando a privação total de aminoácidos bastante improvável. Os aminoácidos transportados pelas proteínas CAT estão envolvidos em processos de biossíntese e outras reações enzimáticas, incluindo a síntese de óxido nítrico (NO), ureia, creatina, síntese de poliaminas, prolina e glutamina a partir da ornitina.[60][61][62]

3.3. Possíveis aplicações para o estudo do CAT-1 e ATB^{0,+}

A expressão do transportador SLC6A14 é regulado em tumores de origem epitelial incluindo nos cancros do cólon, cervical, da mama e pancreático. Este destaca-se pelas suas funções específicas que asseguram as necessidades energéticas de células tumorais através da disponibilização de determinados aminoácidos, constituindo um grande potencial como alvo direto de fármacos utilizados na terapia tumoral. As células de tecidos saudáveis expressam este transportador em baixos níveis quando comparados com os tecidos tumorais. Uma possível estratégia terapêutica implica a utilização de pequenas moléculas ou anticorpos monoclonais, com elevada afinidade para este com o objetivo de bloquear a disponibilização de aminoácidos, tendo como consequência a inibição da proliferação celular dos tecidos tumorais, apresentando uma estratégia terapêutica altamente direcionada para estes. A formulação de possíveis bloqueadores seletivos para o SLC6A14 deveriam ser formulados

tendo em conta a informação estrutural acerca deste. Apesar de todos os transportadores de aminoácidos exibirem semelhanças significativas na sua função as suas estruturas tridimensionais provavelmente não serão semelhantes para todos uma vez que existem diferenças na seletividade de substratos entre eles tais como nos mecanismos de transporte utilizados. Tendo em conta que a sobreexpressão dos transportadores ocorre apenas em tecidos tumorais espera-se que os tecidos normais sejam resistentes às ações destes agentes terapêuticos, reduzindo assim efeitos secundários indesejáveis. Uma vez que as células tumorais dependem maioritariamente do SLC6A14, para a disponibilização de aminoácidos, bloquear sua função levaria à diminuição dos níveis intracelulares de todos os aminoácidos essenciais bem como glutamina, o que, conseqüentemente, iria diminuir as sínteses proteica, lipídica e nucleotídica. Em relação ao transportador CAT-1 acontece o mesmo uma vez que este apresenta elevada especificidade para aminoácidos catiónicos e os seus derivados, incluindo inibidores da enzima NOS (tais como N⁵- (1-iminoetil) -ornitina (L-NIO), N^G-monometilarginina (L-NMMA). Os substratos inibidores de NOS também podem provocar a depleção intracelular de arginina e, conseqüentemente, inibir a síntese de NO. Desta forma, este transportador também representa um potencial alvo de agentes terapêuticos que podem ser aplicados em situações patológicas cuja atividade de iNOS pode ser prejudicial.[51]

4. Objetivo

O principal objetivo deste projeto é a identificação da expressão dos transportadores CAT-1 e ATB^{0,+} em várias linhas celulares tumorais de diferentes tecidos. Para alcançar o objetivo proposto, preparar-se-á extratos celulares de vários tipos diferentes de tecidos tumorais de origens diferentes. A partir desses extratos irá ser feita a quantificação dos níveis totais de proteína e identificação dos transportadores CAT-1 e ATB^{0,+}, recorrendo a anticorpos específicos, por Western-Blot. Este trabalho é a fase inicial e serve como prefácio para um estudo que visa em desenvolver complexos metálicos marcados com metais radioativos para a teranóstica de diversos tipos de tumores. O resultado deste trabalho irá identificar quais as melhores linhas celulares para a avaliação de tais compostos.

II. Materiais e métodos

1. Materiais e equipamentos

1.1. Crescimentos e proliferação de linhas celulares tumorais.

As culturas celulares utilizadas (tabela 1) foram mantidas e suplementadas com meio de crescimento recomendado pelo fornecedor. Tendo estas sido mantidas em frascos de cultura de 75cm², incubadas a 37°C em atmosfera húmida com 5% (v/v) de CO₂.

Tabela 1 Principais características das linhagens celulares humanas utilizadas no presente trabalho

Linha Celular	Tecido	Morfologia	Meio de crescimento	Suplementação de meio (FBS)
HELA	cérvix	Epitelial	EMEM	10 %
HCT116	cólon/reto	Epitelial	McCoy's 5A	
HT29	colón/reto	Epitelial	McCoy's 5A	
Hep G2	fígado	Epitelial	EMEM	
MDA – MB 231	mamário	Epitelial	Leibovitz's L-15	
MCF7	mamário	Epitelial	EMEM	
A375	pele	Epitelial	DMEM	
PC3	próstata	Epitelial	McCoy's 5A	
A549	pulmão	Epitelial	McCoy's 5A	
H69	pulmão	-	RPMI-1640	
HEK293	Rim (embrião)	Epitelial	EMEM	

1.2. Manutenção das linhas celulares

Com o objetivo de preservar a viabilidade celular das linhas celulares estas são manipuladas numa câmara de fluxo laminar de forma a manter o ambiente de manipulação estéril. Todas as linhas celulares provenientes de outras instituições e que não tenham feito o teste de contaminação por mycoplasma são colocadas em cultura na estufa um. Todas as linhas celulares cujo teste de mycoplasma tenha sido negativo são colocadas na estufa dois de forma a garantir que não existe contaminação cruzada entre diferentes linhas celulares. A observação feita diariamente no microscópio eletrónico permite analisar a viabilidade celular das culturas celulares manipuladas, a percentagem de ocupação do T-flak e também o estudo/caracterização da fisiologia celular tal como também permite fazer uma análise das condições ótimas de crescimento das várias linhas celulares para potencializar a sua proliferação.

1.3. Deteção de mycoplasma

De modo a verificar a presença de possíveis contaminações nas linhas celulares em stock, foi realizado um ensaio de PCR baseado no *kit LookOut® Mycoplasma PCR Detection kit (SIGMA-ALDRICH®)*. Este *kit* era composto por tubos descartáveis de reação, controlos negativo e positivo e tampão de rehidratação. Este *kit* foi utilizado em combinação com o Termociclador [*Biometra/TPProfessional Basic Gradient*]. De seguida, de modo a verificar os resultados do ensaio da contaminação por mycoplasma, as amostras foram reveladas por eletroforese em gel de agarose de 1,2% e observadas na câmara de UV para que seja possível interpretar e concluir acerca do resultado do teste de contaminação por *mycoplasma*.

2. Métodos

2.1. Crescimento e proliferação de linhas celulares tumorais

2.1.1. Descongelamento

As linhas celulares de interesse (tabela das linhas) encontravam-se em stock conservadas sob azoto líquido. De modo a manter a viabilidade celular das amostras em

stock, estas precisam de ser descongeladas o mais rapidamente possível. Para isso, as alíquotas de linhas celulares foram descongeladas num banho a 37°C imediatamente após a sua remoção.

2.2.2. *Tripsinização*

Após atingir uma confluência superior a 90% à superfície do *T-flask* é necessário transpor a cultura para uma superfície onde possam continuar a proliferar e prevenir a perda de viabilidade celular. Para isso é necessário re-suspender e desaglomerar a cultura para diluir a densidade celular para novo(s) meio(s). O método mais comum para reduzir a confluência sem perda da viabilidade celular é a tripsinização. Este protocolo consiste em manipular as culturas celulares na câmara de fluxo laminar, retirando o meio gasto e posterior lavagem da placa com PBS de forma a retirar os vestígios de magnésio e cálcio para que estes não inibam a atividade da tripsina. A cultura com tripsina é então incubada cerca de dois minutos na estufa a 37°C em atmosfera húmida com 5% (v/v) de CO₂. Após a incubação é adicionado meio de cultura celular, já suplementado com FBS, com o triplo de volume utilizado de tripsina, de forma a que o magnésio e o cálcio presentes inibam a atividade da tripsina. Após a tripsinização procede-se à divisão da cultura celular em diferentes *T-flasks*, ou recolha das células para extratos celulares.

2.2.3. *Preparação de extratos celulares para stock*

De modo a manter um stock, por tempo indefinido de linhas celulares preservadas é necessário manter as células constantemente a temperaturas baixas. Para isso, alíquotas de células são preservadas submersas em azoto líquido. Em contraste com o processo de descongelação, o arrefecimento destas alíquotas celulares desde a temperatura de incubação (37°C) até à temperatura de stock (-195.79°C) deve ser feita o mais lentamente possível. Para tal é utilizado um contentor específico com isopropanol que permite um arrefecimento de -1°C/min.

2.2. *Deteção de mycoplasma por PCR*

De forma a detetar a presença de *mycoplasma* nas linhas celulares preparadas recorreu-se ao LookOut® Mycoplasma PCR Detection kit (SIGMA-ALDRICH®) que utiliza a reação de PCR estabelecido como o método mais sensível para a deteção de contaminação por *Mycoplasma* e *Acholeplasma*. No boletim técnico consta como se deve

efetuar a preparação das alíquotas (tabela 2) e o perfil termocíclico que deve ser utilizado (tabela 3) de modo a atingir altos níveis de sensibilidade e eliminar amplificação não específica.

Tabela 2 Preparação das alíquotas para PCR. As alíquotas foram preparadas de acordo com o boletim técnico do LookOut® Mycoplasma PCR Detection kit (SIGMA-ALDRICH®)

	Amostra (µL)	Controlo Positivo (µL)	Controlo Negativo (µL)
Dna polimerase	0,5	0,5	0,5
Buffer de reidratação	23	25	23
água	-	-	2
Amostra	2	-	-

Tabela 3 Perfil termocíclico para PCR. Perfil de acordo com o boletim técnico do LookOut® Mycoplasma PCR Detection kit (SIGMA-ALDRICH®)

ciclos	Tempo (s)	Temperatura (°C)
1	120	94
40	30	94
	30	55
	40	72
1	120	4-8

Para a análise de resultados procedemos à preparação de um gel de agarose de 1,2 % (p/v) onde adicionámos GelRed™ para atuar como corante fluorescente ultrasensível de ácidos nucleicos. A eletroforese correu durante uma hora a 60V e o gel foi analisado numa câmara de UV sendo possível verificar que o resultado do teste de contaminação por *mycoplasma* nas linhas celulares.

III. Resultados e Discussão

1. Preparação e crescimento das linhas celulares

A escolha das doze linhas celulares tumorais (tabela 1) teve em conta o objetivo deste projeto, caracterizar a expressão de transportadores catiónicos CAT-1 e ATB^{0,+}. Cada linha celular necessita de um meio de cultura com uma composição indicada para maximizar a sua proliferação celular. No caso da linha celular MDAMB-231 (Fig. 3) o meio de cultura indicado é o Leibovitz's L-15 apresentando um valor de pH entre 7,3 e 7,9. No caso da linha celular A549 (Fig.4) é estimado que atinja o dobro da sua confluência em aproximadamente 22 horas. O meio de cultura ideal para as linhas celulares A549 (Fig.4) e HT29 (Fig.5) é o McCoy's 5A cuja gama de pH se situa entre o valor 7,0 e 7,4. Todos os meios de cultura celular contêm L-glutamina e bicarbonato de sódio em diferentes proporções, sendo necessário ter em atenção que caso a percentagem de CO₂ da estufa seja superior a 5%, é necessário adicionar bicarbonato de sódio ao meio de cultura. Todos os meios de cultura são suplementados com 10% de FBS (soro fetal bovino). As restantes linhas celulares foram manipuladas por colegas de laboratório.

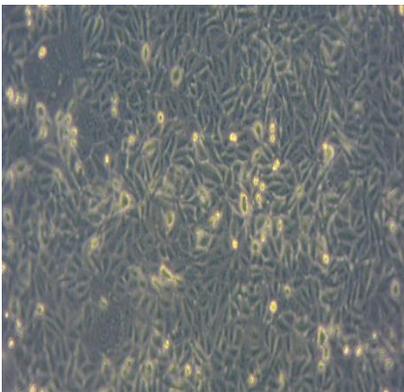


Figura 5 Imagem obtida a partir do microscópio eletrónico da linha celular MDAMB-231 (ampliação da objetiva de 10 vezes)

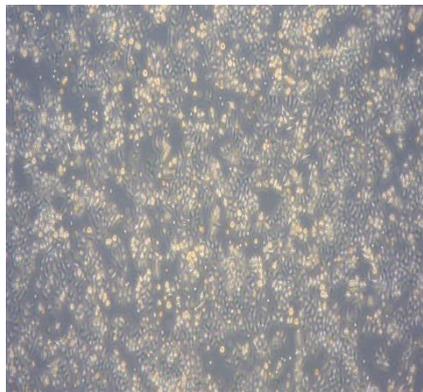


Figura 5 Imagem obtida a partir do microscópio eletrónico da linha celular A549 (ampliação da objetiva de 4 vezes)

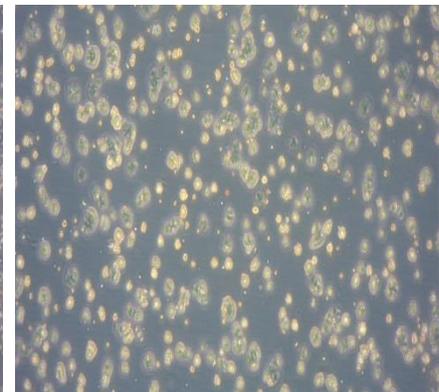


Figura 5 Imagem obtida a partir do microscópio eletrónico da linha celular HT29 (ampliação de objetiva 10 vezes)

2. Deteção da contaminação por mycoplasma nas culturas celulares

Uma das principais preocupações na cultura celular é a infeção por *mycoplasma*. Esta contaminação pode afetar a fisiologia e metabolismo celular resultando em inviabilidade

celular. A obtenção de resultados viáveis e boas condições da cultura celular são vitais, o que nos leva ao problema de estas se encontrarem contaminadas por *mycoplasma*. [63][64] O *mycoplasma* é um género de bactéria e o que o distingue de outras bactérias é a ausência de parede celular e a presença de uma membrana flexível que resulta em diferentes formas ajudando a fundir-se com a membrana celular hospedeira, dificultando a sua identificação.[63][65] A falta de parede celular nestes microorganismos além da sua aderência à superfície celular tornando-se invisíveis a olho nu constituem uma preocupação, tal como a sua resistência a antibióticos geralmente utilizados nas culturas celulares.[66] Desta forma, é importante que sejam utilizados métodos de deteção eficientes para esta contaminação.[67][68][69]. As principais fontes de contaminação por *mycoplasma* são várias começando na má conduta dos investigadores que estão a manipular as culturas celulares até à má utilização de equipamentos e reagentes. A forma mais eficiente de prevenir a contaminação por *mycoplasma* em culturas celulares é praticar regras de acordo com uma boa técnica asséptica. Desta forma foi efetuado o protocolo para a determinação da contaminação por *mycoplasma* nas seguintes culturas celulares, HEK293, H69, HCT116 e HepG2. A partir da análise do gel de agarose obtido por eletroforese foi possível concluir que o resultado do teste foi negativo a partir da comparação entre as bandas e o controlo negativo, situado a ~ 481 pb. (Fig. 4, obtida na câmara de UV). As culturas previamente nomeadas não se encontravam contaminadas por *mycoplasma*, podendo ser utilizadas para a seguinte fase de estudo.

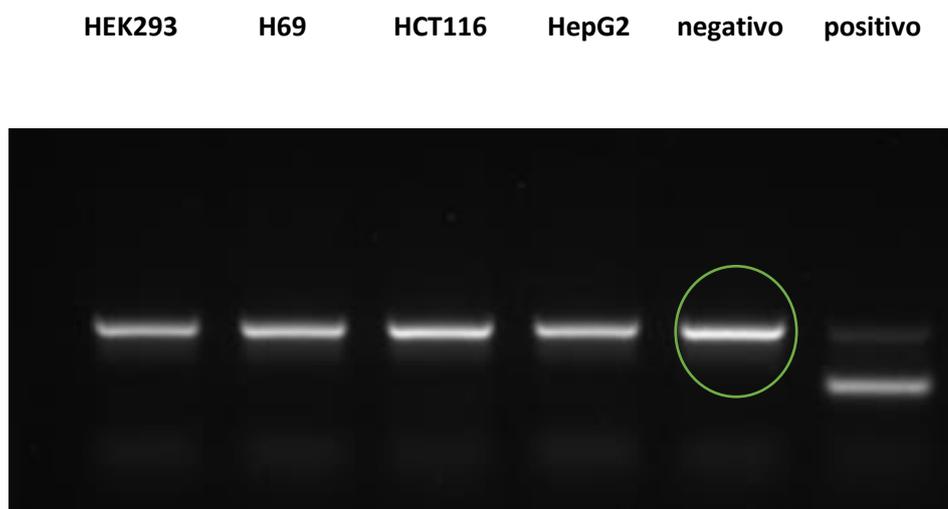


Figura 6 Resultado do teste de deteção de contaminação por *mycoplasma*.

3. Quantificação da expressão proteica de CAT-1 e ATB^{0,+}

3.1. Extração proteica e identificação de CAT-1 e ATB^{0,+} por Western-Blot

A partir dos resultados obtidos no teste de contaminação por mycoplasma o procedimento seguinte seria a preparação de extratos celulares para quantificar a expressão proteica geral e identificar a presença dos transportadores alvo.

3.1.1. *Quantificação Proteica*

Para determinar a quantidade de proteína nas amostras dos extratos celulares obtidos, foi realizado um ensaio colorimétrico baseado no *kit DC Protein Assay (BioRad)* que consiste na interação entre o corante azul de comassie e as proteínas permitindo uma quantificação rápida e simples.

3.1.2. *Identificação da presença dos transportadores CAT-1 e ATB^{0,+}*

A identificação da presença dos transportadores catiónicos em estudo é feita pela utilização de anticorpos policlonais. Estes apresentam alta especificidade para o CAT-1 e ATB^{0,+} não reagindo com outras proteínas.

3.2. Análise de casos-estudo

De modo a tentar perceber quais os possíveis resultados dos ensaios para a identificação dos transportadores, foram escolhidos dois casos de estudo.

3.2.1. CAT-1 – Mediated Arginine uptake and regulation of nitric oxide synthases for the survival of human breast cancer cell lines

O objetivo deste estudo realizado por *Salma A. Abdelmagid* foi investigar a relação entre os níveis de expressão de várias isoformas dos transportadores CAT, incluindo o CAT-1, os níveis de NOS, de prolactina e 17 β -estradiol em diversas linhas celulares do cancro mamário, incluindo as linhas celulares tumorais MCF7 e MDAMB-231. A partir da análise dos resultados da RT-PCR foi possível confirmar a expressão de CAT-1 nas linhas celulares estudadas. (Fig. 5).

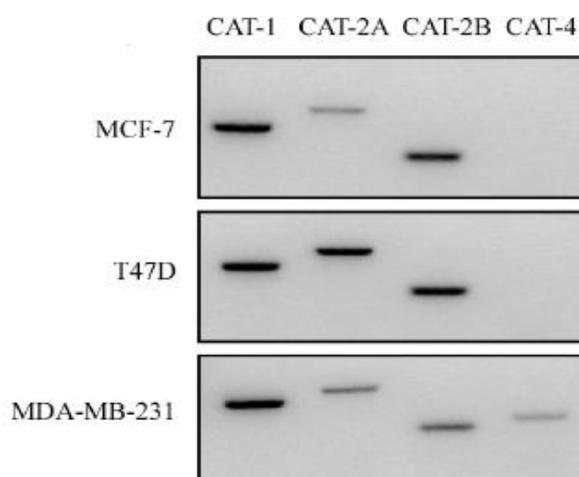


Figura 7 Análise do RNA total isolado por RT-PCR de forma a detetar a presença ou ausência das isoformas CAT-1, CAT-2A; CAT-2B e CAT-4 nas linhas celulares tumorais MCF-7, T47D e MDAMB-231.

O presente estudo investigou o papel das hormonas PRL e E2 na regulação positiva da expressão dos transportadores CAT em condições semelhantes às de cultura. As células MCF-7 e T47D expressam receptores para PRL e E2, enquanto que as células MDA-MB-231 são negativas para ER e apresentam níveis mais baixos de PRL do que as outras duas linhas celulares. As análise de semi-quantitativa RT-PCR demonstrou que não existia alteração significativa nos níveis de expressão do mRNA após tratamento hormonal (Fig. 7A). Da mesma forma que não mostrou alteração significativa nos níveis de expressão proteica do CAT-1 (Fig. 7B).

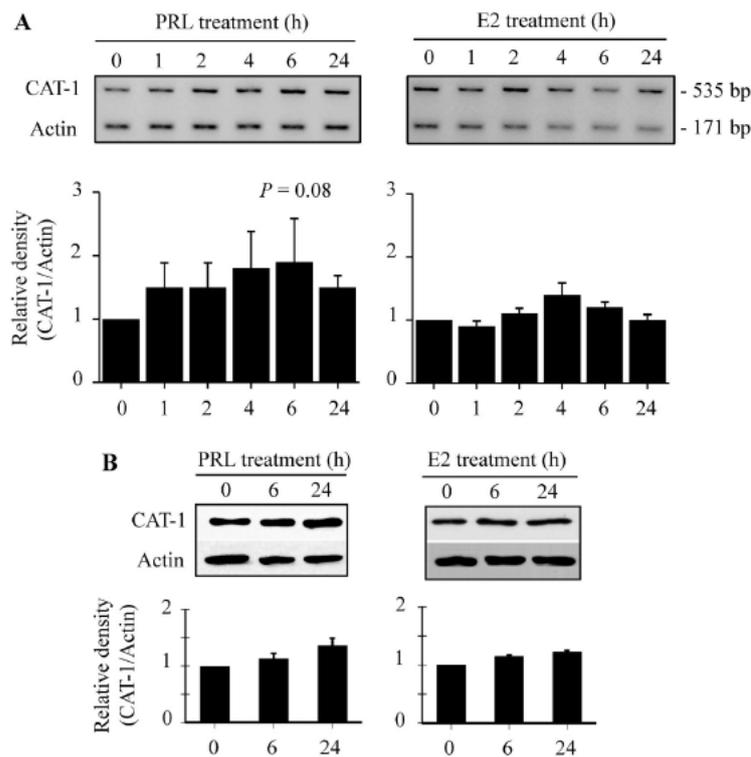


Figura 8 PRL e E2 não têm efeito significativo na alteração dos níveis de mRNA do CAT-1. (A) RNA total isolado para análise de RT-PCR e (B) Análise por Western.

3.2.2. *Upregulation of the amino acid transporter ATB⁰⁺ (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans*

O principal objetivo desta investigação recai sobre a análise dos níveis de expressão do transportador ATB⁰⁺ em pacientes de CRC. Inicialmente foram recolhidas amostras de tecidos tumorais de 11 pacientes (dez com CRC e um com cancro do fígado) em diferentes estágios de desenvolvimento. Foi realizado o procedimento de semi-quantitativa RT-PCR para analisar os níveis de expressão do mRNA do gene SLC6A14 (Fig. 7A) e dos iNOS (Fig. 7B), tendo sido feita a comparação com tecidos saudáveis do cólon e do fígado.

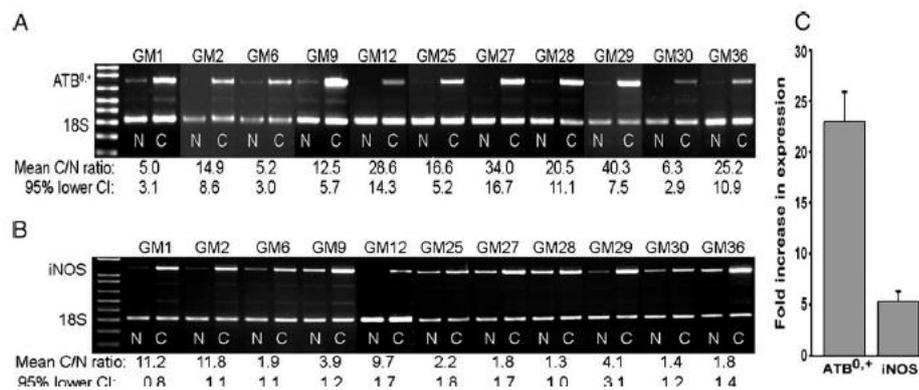


Figura 9 RT-PCR semi-quantitativa de tecido normal (N) e tecido CRC (C). Expressão de mRNA de ATB⁰⁺ (A) e iNOS (B).

Nos tecidos saudáveis foi possível detetar baixos níveis da expressão do mRNA que codifica para o ATB⁰⁺. Os pacientes de CRC demonstraram um aumento de *fold* de 22,9 ± 3,0 quando comparados com tecidos saudáveis. Ambos os resultados obtidos para a expressão de ATB⁰⁺ e iNOS foram confirmados através da análise dos resultados obtidos por Northern Blot. (Fig.8). A partir da análise de imunohistoquímica foi possível confirmar os níveis de expressão proteica do ATB⁰⁺ em tecidos tumorais CRC e saudáveis, chegando ao mesmo resultado anteriormente obtido. Em tecidos saudáveis a expressão proteica do transportador na membrana apical e no citoplasma era baixa, mas detetável e nos tecidos de CRC correspondentes os níveis de expressão proteica eram elevados, especialmente nas membranas apical e baso lateral das células epiteliais. (Fig.9).

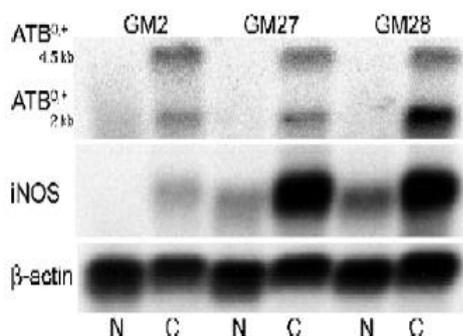


Figura 8 Análise de Northern blot da expressão de mRNA de ATB⁰⁺ e iNOS no tecido normal do cólon (N) e do câncer colorretal (C).

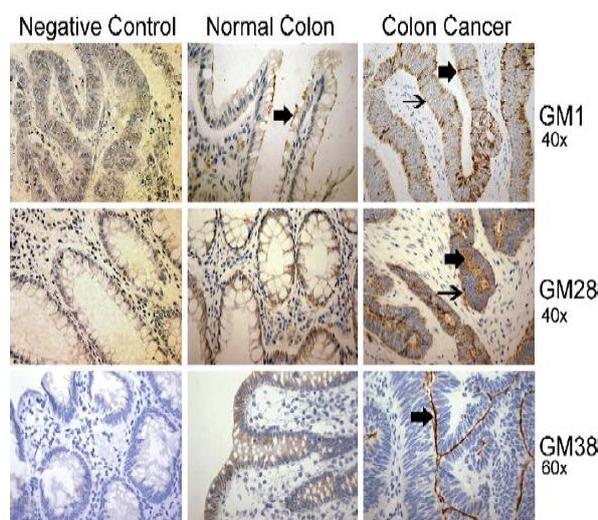


Figura 9 Análise imuno-histoquímica da expressão da proteína ATB⁰⁺ no cólon normal e no câncer de cólon usando anticorpos policlonais de coelho específicos para ATB⁰⁺.

Foi possível concluir que não existe correlação estatística significativa entre os níveis de expressão do ATB^{0,+} e dos iNOS nos tecidos saudáveis e tumorais. Também não existe correlação estatística significativa entre os níveis destes com a localização, estágio e grau do cancro nem com a idade, raça e sexo do paciente.

IV. Conclusões

Atualmente, existe um grande interesse em desenvolver estudos com potenciais agentes terapêuticos que possam ser aplicados na teranóstica do cancro. Um dos principais fatores para que este tipo de terapia ocorra com sucesso é a especificidade e seletividade dos transportadores para estes agentes. Desta forma o estágio inicial de estudo deve ser a caracterização e a expressão destes nos diferentes tecidos tumorais. O objetivo definido inicialmente neste projeto não foi atingido na íntegra devido à ocorrência da pandemia por COVID-19, no entanto a partir da análise de investigações já realizadas foi possível concluir que a expressão dos transportadores em estudo, CAT-1 e ATB^{0,+} é induzida em vários tecidos tumorais, nomeadamente ... Ambos os transportadores revelam ser grandes potenciais a serem explorados para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas anti tumorais. Num futuro mais próximo, a definição e compreensão da estrutura tridimensional é essencial para a formulação de agentes terapêuticos especificamente direcionados para estes transportadores. Este trabalho é um prefácio para um projeto que visa em desenvolver complexos metálicos com afinidade para os transportadores catiónicos CAT-1 e ATB^{0,+} e tem como objeto a escolha das melhores linhas celulares onde realizar ensaios de *uptake*.

V. Referências

- [1] L. Fusco *et al.*, “Graphene and other 2D materials: a multidisciplinary analysis to uncover the hidden potential as cancer theranostics,” *Theranostics*, vol. 10, no. 12, pp. 5435–5488, 2020, doi: 10.7150/thno.40068.
- [2] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] M. Morais *et al.*, “Technetium-99m complexes of l-arginine derivatives for targeting amino acid transporters,” *Dalt. Trans.*, vol. 46, no. 42, pp. 14537–14547, 2017, doi: 10.1039/c7dt01146f.
- [4] A. Farolfi *et al.*, “Theranostics for Advanced Prostate Cancer: Current Indications and Future Developments,” *Eur. Urol. Oncol.*, vol. 2, no. 2, pp. 152–162, 2019, doi: 10.1016/j.euo.2019.01.001.
- [5] X. Wang, H. Tang, C. Wang, J. Zhang, W. Wu, and X. Jiang, “Phenylboronic acid-mediated tumor targeting of chitosan nanoparticles,” *Theranostics*, vol. 6, no. 9, pp. 1378–1392, 2016, doi: 10.7150/thno.15156.
- [6] Y. D. Bhutia, E. Babu, S. Ramachandran, and V. Ganapathy, “Amino acid transporters in cancer and their relevance to ‘glutamine addiction’: Novel Targets for the design of a new class of anticancer drugs,” *Cancer Res.*, vol. 75, no. 9, pp. 1782–1788, 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-3745.
- [7] F. Kiessling, M. E. Mertens, J. Grimm, and T. Lammers, “Nanoparticles for imaging: Top or flop?,” *Radiology*, vol. 273, no. 1, pp. 10–28, 2014, doi: 10.1148/radiol.14131520.
- [8] T. Lammers, S. Aime, W. E. Hennink, G. Storm, and F. Kiessling, “Theranostic nanomedicine,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 10, pp. 1029–1038, 2011, doi: 10.1021/ar200019c.

- [9] E. K. Lim, T. Kim, S. Paik, S. Haam, Y. M. Huh, and K. Lee, "Nanomaterials for theranostics: Recent advances and future challenges," *Chem. Rev.*, vol. 115, no. 1, pp. 327–394, 2015, doi: 10.1021/cr300213b.
- [10] H. Chen, W. Zhang, G. Zhu, J. Xie, and X. Chen, "Rethinking cancer nanotheranostics," *Nat. Rev. Mater.*, vol. 2, no. May, 2017, doi: 10.1038/natrevmats.2017.24.
- [11] Y. Lu *et al.*, "Overexpression of Arginine Transporter CAT-1 Is Associated with Accumulation of L-Arginine and Cell Growth in Human Colorectal Cancer Tissue," vol. 8, no. 9, pp. 1–8, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0073866.
- [12] N. Cheng, A. Chytil, Y. Shyr, A. Joly, and H. L. Moses, "Transforming growth factor- β signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion," *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 1521–1533, 2008, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2203.
- [13] Y. D. Bhutia, E. Babu, P. D. Prasad, and V. Ganapathy, *The amino acid transporter SLC6A14 in cancer and its potential use in chemotherapy*, vol. 9, no. 6. Elsevier Ltd, 2014.
- [14] P. Kandasamy, G. Gyimesi, Y. Kanai, and M. A. Hediger, "Amino acid transporters revisited: New views in health and disease," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 43, no. 10, pp. 752–789, 2018, doi: 10.1016/j.tibs.2018.05.003.
- [15] J. McConathy, W. Yu, N. Jarkas, W. Seo, D. M. Schuster, and M. M. Goodman, "Radiohalogenated nonnatural amino acids as PET and SPECT tumor imaging agents," *Med. Res. Rev.*, vol. 32, no. 4, pp. 868–905, Jul. 2012, doi: 10.1002/med.20250.
- [16] E. I. Closs, J. P. Boissel, A. Habermeier, and A. Rotmann, "Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs)," *J. Membr. Biol.*, vol. 213, no. 2, pp. 67–77, 2006, doi: 10.1007/s00232-006-0875-7.

- [17] S. Bröer, "Adaptation of plasma membrane amino acid transport mechanisms to physiological demands," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 444, no. 4, pp. 457–466, 2002, doi: 10.1007/s00424-002-0840-y.
- [18] P. S. Ward and C. B. Thompson, "Metabolic Reprogramming : A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate," *Cancer Cell*, vol. 21, no. 3, pp. 297–308, 2012, doi: 10.1016/j.ccr.2012.02.014.
- [19] M. Scalise, L. Pochini, M. Galluccio, L. Console, and C. Indiveri, "Glutamine transport and mitochondrial metabolism in cancer cell growth," *Front. Oncol.*, vol. 7, no. DEC, pp. 1–9, 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00306.
- [20] Z. Kanaan *et al.*, "Differential MicroRNA expression tracks neoplastic progression in inflammatory bowel disease-associated colorectal cancer," *Hum. Mutat.*, vol. 33, no. 3, pp. 551–560, 2012, doi: 10.1002/humu.22021.
- [21] M. Laplante and D. M. Sabatini, "mTOR signaling in growth control and disease," *Cell*, vol. 149, no. 2, pp. 274–293, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [22] R. Zoncu, L. Bar-Peled, A. Efeyan, S. Wang, Y. Sancak, and D. M. Sabatini, "mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase," *Science (80-.)*, vol. 334, no. 6056, pp. 678–683, 2011, doi: 10.1126/science.1207056.
- [23] E. J. Brown, P. A. Beal, C. T. Keith, J. Chen, T. B. Shin, and S. L. Schreiber, "Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo," *Nature*, vol. 377, no. 6548, pp. 441–446, 1995, doi: 10.1038/377441a0.
- [24] K. Düvel *et al.*, "Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1," *Mol. Cell*, vol. 39, no. 2, pp. 171–183, 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.06.022.
- [25] J. A. Menendez and R. Lupu, "Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype

- in cancer pathogenesis,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, no. 10, pp. 763–777, 2007, doi: 10.1038/nrc2222.
- [26] C. C. Dibble and B. D. Manning, “Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 555–564, 2013, doi: 10.1038/ncb2763.
- [27] P. M. Taylor, “Role of amino acid transporters in amino acid sensing,” *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 99, no. 1, 2014, doi: 10.3945/ajcn.113.070086.
- [28] J. J. Howell and B. D. Manning, “mTOR couples cellular nutrient sensing to organismal metabolic homeostasis,” *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 22, no. 3, pp. 94–102, 2011, doi: 10.1016/j.tem.2010.12.003.
- [29] J. L. Jewell and K. L. Guan, “Nutrient signaling to mTOR and cell growth,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 38, no. 5, pp. 233–242, 2013, doi: 10.1016/j.tibs.2013.01.004.
- [30] S. Wullschleger, R. Loewith, and M. N. Hall, “Review TOR Signaling in Growth and Metabolism,” pp. 471–484, 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.01.016.
- [31] R. J. Deberardinis, J. J. Lum, G. Hatzivassiliou, and C. B. Thompson, “Review The Biology of Cancer : Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation,” no. January, pp. 11–20, 2008, doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- [32] D. G. Hardie, F. A. Ross, and S. A. Hawley, “F O C U S O N m e t a o l l R b E is AMPK : a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 13, no. 4, pp. 251–262, 2012, doi: 10.1038/nrm3311.
- [33] D. B. Shackelford and R. J. Shaw, “The LKB1 – AMPK pathway : metabolism and growth control in tumour suppression,” vol. 9, no. AuguST, pp. 563–575, 2009, doi: 10.1038/nrc2676.
- [34] S. G. Kim, G. R. Buel, and J. Blenis, “Nutrient regulation of the mTOR complex

- 1 signaling pathway.," *Mol. Cells*, vol. 35, no. 6, pp. 463–473, 2013, doi: 10.1007/s10059-013-0138-2.
- [35] M. A. Hediger, M. F. Romero, J. Bin Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, and E. A. Bruford, "The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 447, no. 5, pp. 465–468, 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1192-y.
- [36] A. Schlessinger *et al.*, "Comparison of human solute carriers," *Protein Sci.*, vol. 19, no. 3, pp. 412–428, 2010, doi: 10.1002/pro.320.
- [37] A. Schlessinger, S. W. Yee, A. Sali, and K. M. Giacomini, "SLC classification: An update," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 94, no. 1, pp. 19–23, 2013, doi: 10.1038/clpt.2013.73.
- [38] E. G. Geier *et al.*, "Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110, no. 14, pp. 5480–5485, 2013, doi: 10.1073/pnas.1218165110.
- [39] D. Fotiadis, Y. Kanai, and M. Palacín, "The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters," *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, no. 2–3, pp. 139–158, 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.10.007.
- [40] S. Izumi *et al.*, "Substrate-dependent inhibition of organic anion transporting polypeptide 1B1: Comparative analysis with prototypical probe substrates estradiol-17 β -glucuronide, estrone-3-sulfate, and sulfobromophthalein," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 41, no. 10, pp. 1859–1866, 2013, doi: 10.1124/dmd.113.052290.
- [41] B. Hagenbuch and B. Stieger, "The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters," *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, no. 2–3, pp. 396–412, 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.10.009.

- [42] M. E. Ganapathy and V. Ganapathy, "Amino acid transporter ATB_{0,+} as a delivery system for drugs and prodrugs," *Curr. Drug Targets Immune, Endocr. Metab. Disord.*, vol. 5, no. 4, pp. 357–364, 2005, doi: 10.2174/156800805774912953.
- [43] L. Kou *et al.*, "Dual targeting of carnitine-conjugated nanoparticles to OCTN2 and ATB_{0,+} to deliver chemotherapeutic agents for colon cancer therapy," *Drug Deliv.*, vol. 24, no. 1, pp. 1338–1349, 2017, doi: 10.1080/10717544.2017.1377316.
- [44] N. Gupta *et al.*, "Upregulation of the amino acid transporter ATB_{0,+} (SLC6A14) in colorectal cancer and metastasis in humans," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1741, no. 1–2, pp. 215–223, 2005, doi: 10.1016/j.bbadis.2005.04.002.
- [45] N. Gupta *et al.*, "Up-regulation of the amino acid transporter ATB_{0,+} (SLC6A14) in carcinoma of the cervix," *Gynecol. Oncol.*, vol. 100, no. 1, pp. 8–13, 2006, doi: 10.1016/j.ygyno.2005.08.016.
- [46] S. Karunakaran *et al.*, "Interaction of tryptophan derivatives with SLC6A14 (ATB_{0,+}) reveals the potential of the transporter as a drug target for cancer chemotherapy," *Biochem. J.*, vol. 414, no. 3, pp. 343–355, 2008, doi: 10.1042/BJ20080622.
- [47] M. Hatzoglou, J. Fernandez, I. Yaman, and E. Closs, "REGULATION OF CATIONIC AMINO ACID TRANSPORT: The Story of the CAT-1 Transporter," *Annu. Rev. Nutr.*, vol. 24, no. 1, pp. 377–399, 2004, doi: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120.
- [48] L. M. Albritton, L. Tseng, D. Scadden, and J. M. Cunningham, "A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection," *Cell*, vol. 57, no. 4, pp. 659–666, 1989, doi: 10.1016/0092-8674(89)90134-7.

- [49] Jung Woo Kim and J. M. Cunningham, "N-linked glycosylation of the receptor for murine ecotropic retroviruses is altered in virus-infected cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 268, no. 22, pp. 16316–16320, 1993.
- [50] H. Wang, M. P. Kavanaugh, R. A. North, and D. Kabat, "Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter," *Nature*, vol. 352, no. 6337, pp. 729–731, 1991, doi: 10.1038/352729a0.
- [51] F. Verrey, E. I. Closs, C. A. Wagner, M. Palacin, H. Endou, and Y. Kanai, "CATs and HATs: The SLC7 family of amino acid transporters," *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, vol. 447, no. 5, pp. 532–542, 2004, doi: 10.1007/s00424-003-1086-z.
- [52] P. Gräf, U. Förstermann, and E. I. Closs, "The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 132, no. 6, pp. 1193–1200, 2001, doi: 10.1038/sj.bjp.0703921.
- [53] M. F. White and H. N. Christensen, "The two-way flux of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells is largely explained by a single transport system," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 17, pp. 10069–10080, 1982.
- [54] R. Devés and C. A. R. Boyd, "Transporters for cationic amino acids in animal cells: Discovery, structure, and function," *Physiol. Rev.*, vol. 78, no. 2, pp. 487–545, 1998, doi: 10.1152/physrev.1998.78.2.487.
- [55] M. F. White and H. N. Christensen, "Cationic Amino Acid Transport into Cultured Animal Cells," *J. Biol. Chem.*, vol. 257, no. 8, pp. 4450–4457, 1982.
- [56] M. P. Kavanaugh *et al.*, "Control of cationic amino acid transport and retroviral receptor functions in a membrane protein family," *J. Biol. Chem.*, vol. 269, no. 22, pp. 15445–15450, 1994.

- [57] N. Vékony, S. Wolf, J. P. Boissel, K. Gnauert, and E. I. Closs, "Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues," *Biochemistry*, vol. 40, no. 41, pp. 12387–12394, 2001, doi: 10.1021/bi011345c.
- [58] K. Ito and M. Groudine, "A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 42, pp. 26780–26786, 1997, doi: 10.1074/jbc.272.42.26780.
- [59] J. Fernandez *et al.*, "Internal Ribosome Entry Site-mediated Translation of a Mammalian mRNA Is Regulated by Amino Acid Availability," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 15, pp. 12285–12291, 2001, doi: 10.1074/jbc.M009714200.
- [60] E. I. Closs, A. Simon, N. Vékony, and A. Rotmann, "Plasma Membrane Transporters for Arginine," *J. Nutr.*, vol. 134, no. 10, pp. 2752S-2759S, 2004, doi: 10.1093/jn/134.10.2752s.
- [61] R. San Martín and L. Sobrevia, "Gestational diabetes and the adenosine/L-arginine/nitric oxide (ALANO) pathway in human umbilical vein endothelium," *Placenta*, vol. 27, no. 1, pp. 1–10, 2006, doi: 10.1016/j.placenta.2005.01.011.
- [62] G. E. Mann, D. L. Yudilevich, and L. Sobrevia, "Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells," *Physiol. Rev.*, vol. 83, no. 1, pp. 183–252, 2003, doi: 10.1152/physrev.00022.2002.
- [63] H. G. Drexler and C. C. Uphoff, "Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention," *Cytotechnology*, vol. 39, no. 2, pp. 75–90, 2002, doi: 10.1023/A:1022913015916.
- [64] S. Razin and L. Hayflick, "Highlights of mycoplasma research-An historical perspective," *Biologicals*, vol. 38, no. 2, pp. 183–190, 2010, doi: 10.1016/j.biologicals.2009.11.008.
- [65] S. Razin, "Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells," *Biosci. Rep.*,

vol. 19, no. 5, pp. 367–372, 1999, doi: 10.1023/A:1020204020545.

- [66] S. Coecke *et al.*, “Guidance on good cell culture practice: A Report of the Second ECVAM Task Force on good cell culture practice,” *ATLA Altern. to Lab. Anim.*, vol. 33, no. 3, pp. 261–287, 2005, doi: 10.1177/026119290503300313.
- [67] H. Harlin and T. F. Gajewski, “Diagnosis and treatment of mycoplasma-contaminated cell cultures,” *Curr. Protoc. Cytom.*, no. SUPPL. 43, pp. 1–7, 2008, doi: 10.1002/0471142956.cya03cs43.
- [68] R. J. Hay, M. L. Macy, and T. R. Chen, “Mycoplasma infection of cultured cells,” *Nature*, vol. 339, no. 6224, pp. 487–488, 1989, doi: 10.1038/339487a0.
- [69] C. C. Uphoff, S. M. Gignac, and H. G. Drexler, “Mycoplasma contamination in human leukemia cell lines: I. Comparison of various detection methods,” *J. Immunol. Methods*, vol. 149, no. 1, pp. 43–53, 1992, doi: 10.1016/S0022-1759(12)80047-0.