

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE TECNOLOGIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

ESTUDO SOBRE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO
INTERMEDIÁRIO E INDUÇÃO DE MORTE EM CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO INDUZIDAS PELO ÓLEO
DE SEMENTE DE ROMÃ

Desirée Lopes Reis

Orientação: Tatiana El-Bacha Porto

Rio de Janeiro
2019

Desirée Lopes Reis

ESTUDO SOBRE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO
INTERMEDIÁRIO E INDUÇÃO DE MORTE EM CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO INDUZIDAS PELO ÓLEO
DE SEMENTE DE ROMÃ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Tatiana El-Bacha Porto

Rio de Janeiro
2019

CIP - Catalogação na Publicação

R375e Reis, Desirée Lopes
Estudo sobre alterações no metabolismo intermediário e indução de morte em células de carcinoma mamário humano induzidas pelo óleo de semente de romã / Desirée Lopes Reis. -- Rio de Janeiro, 2019.
63 f.

Orientadora: Tatiana El-Bacha Porto.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos, 2019.

1. Óleo de semente de romã. 2. Câncer de mama. 3. Metabolismo energético. 4. Metaboloma. I. Porto, Tatiana El-Bacha, orient. II. Título.

Desirée Lopes Reis

ESTUDO SOBRE ALTERAÇÕES NO METABOLISMO
INTERMEDIÁRIO E INDUÇÃO DE MORTE EM CÉLULAS DE
CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO INDUZIDAS PELO ÓLEO
DE SEMENTE DE ROMÃ

Prof.^a Dr.^a Tatiana El-Bacha Porto

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Aprovada por:

Presidente, Prof.^a Tatiana El-Bacha Porto, INJC/UFRJ

Prof.^o Gilson Costa dos Santos Junior, Ibrag/UERJ

Prof.^o Julio Beltrame Daleprane, INU/UERJ

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, pela oportunidade de ter chegado até aqui e ter tido a sorte de conhecer muita gente boa nessa vida.

Ao longo desses anos no mestrado eu tive a oportunidade de conhecer e estreitar laços com pessoas que me ajudaram de diversas formas durante essa caminhada, seja auxiliando em algum experimento, seja tirando dúvidas, ou simplesmente fazendo com que os dias ficassem mais leves com cada gargalhada que me proporcionaram.

Dentre tantas pessoas importantes, não posso e nem quero deixar de dedicar esse trabalho à Rosa Maria, minha mãe, pessoa mais importante e que sempre esteve ao meu lado, que sempre foi minha maior incentivadora na vida e nos estudos, meu suporte e porto seguro. E, junto a ela, meus familiares maternos que me incentivam tanto e acreditam muito na minha capacidade, em especial à minha vó (*in memoriam*), a dona do melhor colo do mundo.

Sem troca não há relação, não há aprendizado e a vida não teria sentido, a ciência não se sustenta. Ainda bem que eu tenho o privilégio de fazer parte de dois grupos de pesquisa com cientistas comprometidos e pessoas divertidas e agradeço a cada um por cada momento especial.

Ao grupo Lebiome: Gabi, Deborah, Vanessa, Marcos, Larissa, Matheus pela parceria. E, em especial gostaria de agradecer às minhas amigas que vem comigo desde o meu estágio de IC: Carol, com quem aprendo a cada dia, que tem sempre um abraço quando eu preciso e com quem eu tive o prazer de conhecer as Cataratas do Iguaçu; Nath, minha madrinha científica, amiga que sempre estava disposta a ajudar nos experimentos, mandar energia azul e me fazer rir; Talita, parceira que sempre esteve disposta a ajudar e a me escutar quando eu precisava, a dar uma palavra amiga e um conselho. Obrigada pelas trocas e por tornarem meus dias no laboratório mais divertidos.

Ao grupo do LBNA, agradeço a receptividade e a acolhida. Agradeço ao "grupo do óleo": Laís, Aline, Emília e André por se disporem e terem a paciência de me ensinar, foi realmente muito importante esse aprendizado dessa forma fraterna e ao professor Alexandre Torres. Minha gratidão também àqueles que, de alguma forma, marcaram significativamente essa etapa da jornada acadêmica: Ellen, Ana Beatriz, Vanessa Di Sarli, Genilton, Kim, Fabrício, Nathalia Martins e Suellen.

Aos demais amigos e colegas que durante minha jornada acadêmica que me incentivam, trocam ideias e que tornaram este caminho mais leve. Minha gratidão à Daniela Minuzzo, Leandro, Camila Coura, Thadia, Any, Gabi Moratelli, Ju Lima, Karla e Nayara.

Ao Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear e aos laboratórios parceiros, grupo da professora Andrea Da Poian, grupo da professora Irania Miranda.

Aos componentes da banca, agradeço pelo tempo e energia despendidos na correção deste trabalho. Esse movimento é sobremaneira importante para a melhoria da pesquisa científica e da formação de pessoas.

À agência de fomento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pelo apoio financeiro essencial para realização dessa pesquisa.

Finalizo agradecendo a minha orientadora, Tatiana El-Bacha, uma das minhas principais inspirações acadêmicas e que tem influência direta na realização deste trabalho. A pessoa que nesses 5 anos de convivência, desde a Iniciação científica até esse momento de finalização do mestrado, foi tão importante pra minha construção profissional, tão generosa na troca de conhecimento e tão acolhedora. Quem me mostrou o quanto é bom quando se faz o que se ama, simplesmente observando seu entusiasmo e o brilho nos seus olhos quando fala das possibilidades de um projeto. Agradeço o tempo e a paciência investidos na minha formação, a cada correção, a cada discussão de artigo ou de um resultado de experimento. Agradeço a confiança nesses anos de trabalho em conjunto, cada palavra de reconhecimento era um gás a mais para continuar a jornada. Todos nós deixamos marca na vida das pessoas à nossa volta e elas são consequência das nossas atitudes, da relação e da troca com o outro. E eu tenho a sorte de ter tido você como professora, orientadora e inspiração. Estamos juntas, né? Obrigada por tudo isso.

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de câncer que mais causa morte em mulheres em todo mundo, portanto, avançar no conhecimento sobre a ação anti-proliferativa de matrizes alimentares sobre o câncer de mama é relevante. Células tumorais, em geral, são reprogramadas metabolicamente e para sustentar sua alta taxa de proliferação, requerem fornecimento elevado de ATP e precursores biossintéticos. A romã (*Punica granatum L.*) é um fruto cujos efeitos benéficos à saúde humana têm sido muito estudados, pois já foi mostrado que os isômeros conjugados do ácido alfa-linolênico (CLnA) - ácidos punícico e alfa-eleosteárico - presentes no óleo da semente de romã (OSR), apresentam efeitos anti-proliferativos e pró-apoptóticos em células de câncer em cultura e *in vivo*, entretanto, os mecanismos moleculares relacionados aos efeitos anti-câncer do OSR ainda são pouco conhecidos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do OSR sobre o metabolismo intermediário de linhagens de carcinoma mamário humano, MCF-7, com fenótipo mais oxidativo, e MDA-MB-231, com fenótipo mais glicolítico, e comparar com os efeitos em uma linhagem de mama não tumoral, MCF10-A. As linhagens celulares foram incubadas com 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/mL de OSR por 24 h ou 48 horas para avaliar seus possíveis efeitos citotóxicos e associá-los a alterações no perfil de metabólitos avaliado por ressonância magnética nuclear e sobre a composição de ácidos graxos das membranas celulares por cromatografia gasosa. O OSR foi caracterizado quimicamente quanto ao conteúdo de ácidos graxos e apresentou alto teor de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente isômeros do CLnA (aproximadamente 80 %), sendo o ácido punícico o majoritário. O OSR apresentou um efeito citotóxico em todas as linhagens estudadas, de forma concentração e tempo dependente, sendo a linhagem não tumoral a mais afetada, seguida da MDA-MB-231 e a menos afetada MCF-7. As principais alterações no perfil de metabólitos foram o aumento do consumo de glicose e da produção de lactato, indicando um aumento do fluxo glicolítico, sugestivo de disfunção mitocondrial. Adicionalmente, a incubação com OSR induziu um aumento do conteúdo de succinato na linhagem não tumoral e uma diminuição de glutamato, na linhagem tumoral MDA-MB-231, ambos sugestivos de disfunção mitocondrial. Os ácidos graxos do óleo de semente de romã não foram encontrados nas células, porém o tratamento causou alterações no perfil destes compostos, destacando uma diminuição de ácido palmitoleico na linhagem não tumoral, dos ácidos oleico e vacênico na linhagem tumoral MDA-MB-231 e um aumento do ácido graxo lignocérico, de 24 carbonos, em ambas as linhagens supracitadas. O OSR promoveu, portanto, alterações no metabolismo oxidativo e de ácidos graxos das células, sugestivas de alterações na função mitocondrial. Essas alterações pontuais e distintas, promovidas pelo OSR, podem refletir os diferentes fenótipos metabólicos das linhagens utilizadas neste estudo. Mais experimentos, portanto, se fazem necessários para elucidar melhor e ampliar o conhecimento acerca das vias de ação do óleo de semente de romã, focando na bioenergética mitocondrial e possível disfunção peroxissomal.

Palavras-chave: óleo de semente de romã; câncer de mama; metabolismo energético; metabóloma

ABSTRACT

Breast cancer is the type of cancer that causes the most death in women worldwide, therefore, advancing knowledge about the anti-proliferative action of food matrices on breast cancer is relevant. Tumor cells, in general, are reprogrammed metabolically and to sustain their high rate of proliferation, they require a high supply of ATP and biosynthetic precursors. Pomegranate (*Punica granatum L.*) is a fruit whose beneficial effects on human health have been widely studied, as It has already been shown that conjugated isomers of alpha-linolenic acid (CLnA) - punicic and alpha-eleosearic acids - present in pomegranate seed oil (OSR), have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in cancer cells in culture and in vivo, however, the molecular mechanisms related to the anti-cancer effects of OSR are still poorly understood. This study aimed to evaluate the effect of PSO on the intermediate metabolism of human mammary carcinoma strains, MCF-7, with more oxidative phenotype, and MDA-MB-231, with more glycolytic phenotype, and compare with effects on a non-tumor breast strain, MCF10-A. Cells were incubated with 0.5, 1.0 or 2.0 mg / mL OSR for 24 h or 48 hours to assess their possible cytotoxic effects and to associate them with changes in the metabolite profile assessed by nuclear magnetic resonance and on fatty acid composition of cell membranes by gas chromatography. The OSR was chemically characterized by fatty acid content and presented a high content of polyunsaturated fatty acids, mainly isomers of CLnA (approximately 80 %), being the punicic acid the majority. The OSR showed a cytotoxic effect in all strains studied, concentration and time dependent, being the non-tumor lineage the most affected, followed by MDA-MB-231 and the least affected MCF-7. The main changes in the metabolite profile were the increase in glucose consumption and lactate production, indicating an increase in glycolytic flow, suggestive of mitochondrial dysfunction. Additionally, incubation with OSR induced an increase in succinate content in the non-tumor lineage and a decrease in glutamate in the MDA-MB-231 tumor lineage, both suggestive of mitochondrial dysfunction. The fatty acids from pomegranate seed oil were not found in the cells, but the treatment caused changes in the profile of these compounds, highlighting a decrease of palmitoleic acid in non-tumor lineage, oleic and vaccenic acid in MDA-MB-231 and an increase in 24-carbon lignoceric fatty acid in both aforementioned strains. Therefore, PSO promoted alterations in oxidative and fatty acid metabolism of cells, suggestive of alterations in mitochondrial function. These punctual and distinct changes, promoted by OSR, may reflect the different metabolic phenotypes of the strains used in this study. More experiments, therefore, are needed to better elucidate and broaden the knowledge about the ways of action of pomegranate seed oil, focusing on mitochondrial bioenergetics and possible peroxisomal dysfunction.

Keywords: pomegranate seed oil; breast cancer; energy metabolism; metabolome

Lista de Figuras

Figura 1 - Estimativa das taxas de incidência e mortalidade por câncer em todo o mundo em 2018, em ambos os sexos e em todas as idades.....	14
Figura 2 - Estimativa de incidência de câncer exceto de pele não melanoma 2018 no Brasil	15
Figura 3 – Representação esquemática do metabolismo energético das células tumorais.....	17
Figura 4 – Catabolismo dos lipídios	23
Figura 5 - Alvos moleculares da <i>Punica Granatum</i>	26
Figura 6 - Cromatograma representativo da análise de ácidos graxos do óleo de semente de romã	34
Figura 7 - OSR diminuiu a viabilidade celular e o número de células de forma concentração e tempo dependente	35
Figura 8 - OSR afetou o consumo de glicose e o acúmulo de lactato no meio de cultura pela célula MCF-7	36
Figura 9 - OSR afetou o consumo de glicose e o acúmulo de lactato no meio de cultura pela célula MDA-MB-231	37
Figura 10 - OSR afetou o consumo de glicose e o acúmulo de lactato no meio de cultura pela célula MCF-10A	38
Figura 11 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade dos metabólitos piruvato, succinato, fumarato e glutamato na linhagem MCF-7	39
Figura 12 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de piruvato, succinato, fumarato e glutamato na linhagem MDA-MB-231	40
Figura 13 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a integral de piruvato, succinato e glutamato na linhagem MCF-10A.....	41
Figura 14 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de metabólitos do metabolismo de um-carbono na linhagem MCF-7	42
Figura 15 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de metabólitos do metabolismo de um-carbono na linhagem MDA-MB-231	43
Figura 16 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de metabólitos do metabolismo de um-carbono na linhagem MCF-10A	44
Figura 17 - OSR levou ao acúmulo de 3-Hidroxiacetato (3-OHB) nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A	44
Figura 18 - Análise PLS-DA 2D para componentes 1 e 2 das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A	45

Figura 19 – Distribuição das classes de ácidos graxos das linhagens celulares em percentual do total dos ácidos graxos identificados.....	46
Figura 20 - Perfil de ácidos graxos saturados das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A controle e incubadas com OSR	47
Figura 21 - Perfil de ácidos graxos monoinsaturados das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A controle e incubadas com OSR	48
Figura 22 - Perfil de ácidos graxos poli-insaturados das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A controle e incubadas com OSR	49
Figura 23 - Razão de ácidos graxos nas células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A tratadas com OSR relativo ao controle	50
Figura 24 - Correlação entre os ácidos graxos 18:1 n-7 e 18:2 n-6	51
Figura 25 – Correlação entre os ácidos graxos 18:1 n-7 e 20:4 n-6	52

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Efeito do óleo de semente de romã em diferentes tipos de câncer	28
Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos do óleo de semente de romã	33

Lista de abreviações

1C – Um carbono

3-OHB – Beta hidroxibutirato / 3-hidroxibutirato

α -KG – α -Cetogluturato

ADP – Adenosina difosfato

AG – ácido graxo

AGMI – ácido graxo monoinsaturado

AGPI – ácido graxo poli-insaturado

AGS – ácido graxo saturado

AMP – Adenosina monofosfato

AR – receptor de andrógeno

ATP – Adenosina trifosfato

CLA – Ácido linoleico conjugado

CLnA – Ácido linolênico conjugado

DHA – Ácido docosaheptaenóico

DMEM – Dulbecco Modified Eagle Medium

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPA – ácido docosapentenoico

EPA – Ácido eicosapentenoico

F1,6BF – Frutose-1,6-bifosfato

F6F – Frutose-6-fosfato

FC – Fosfocolina

FCCP – Carbonyl cyanide p-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone

G6F – Glicose-6-fosfato

Gln – Glutamina

Glu – Glutamato

SFB – Soro fetal bovino

GLUT – Transportador de glicose

GFC – Glicerofosfocolina

HCl – Ácido hidrocloreídrico

HER2+ – Receptor epidermal humano 2 positivo

HIF – Fator de transcrição induzido por hipóxia

HK – Hexoquinase

LDH – Lactato desidrogenase

MCT - transportador de ácidos monocarboxílicos

MHz – Megahertz

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NAD – Nicotinamida adenina dinucleotideo

NADP – Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato

OAA – Oxaloacetato

OXPPOS – Fosforilação oxidativa

PFK1 – fosfofrutoquinase

PSA – antígeno prostático específico

RMN – Ressonância magnética nuclear

UV – Ultra violeta

VDAC – do inglês: *Voltage dependent anion channel*

VEGF – do inglês: *vascular endothelial growth factor*

Sumário

1. Revisão de literatura	14
1.1. Epidemiologia do câncer	14
1.2. O câncer de mama	15
1.3. Metabolismo das células tumorais	16
1.3.1. Metabolismo de glicose	17
1.3.2. Metabolismo mitocondrial	20
1.3.3. Metabolismo de um carbono	21
1.3.4. Metabolismo de lipídios	22
1.4. Aplicação da metabolômica em estudos com câncer	24
1.5. A romã, sua composição e bioatividade	25
1.6. Óleo de semente de romã e efeitos anticâncer	27
2. Objetivos	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos	29
3. Materiais e métodos	30
3.1. Cultura de células e tratamento com óleo de semente de romã	30
3.2. Quantificação de ácidos graxos do óleo da semente da romã e de ácidos graxos incorporado aos fosfolipídios na membrana plasmática das linhagens celulares	30
3.3. Viabilidade celular	30
3.4. Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear	31
3.5. Análises estatísticas	31
4. Resultados	32
4.1. Óleo de semente de romã como uma fonte de ácidos graxos bioativos, principalmente de ácidos linolênicos conjugados	32
4.2. OSR exerceu efeito citotóxico sobre as linhagens celulares, com maior efeito na linhagem não tumoral	33
4.3. Óleo de semente de romã induz alteração sutil de metabólitos nas células	34
4.4. Tratamento com OSR modifica o perfil de ácidos graxos das células tumorais e não tumoral	44
Discussão	50
Conclusão	57
Referências bibliográficas	59

1. Revisão da literatura

1.1. Epidemiologia do câncer

O câncer é uma doença multifatorial e de alta complexidade, cujas células crescem rápida e desordenadamente, algumas podendo ter a capacidade invasiva (World Health Organization, WHO, 2007). A incidência desta doença tem sido crescente, principalmente em países em desenvolvimento e a Organização Mundial da Saúde estima que de cerca de 18,1 milhões de novos casos em 2018, passarão para 29,5 milhões de novos casos de câncer em 2040 (GLOBOCAN, 2018), indicando ser um problema de saúde pública mundial. Concomitantemente, a mortalidade por câncer chegará a cerca de 16,3 milhões de casos em 2040. No Brasil, foi estimado a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer para cada ano do biênio 2018-2019, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer José de Alencar (2017).

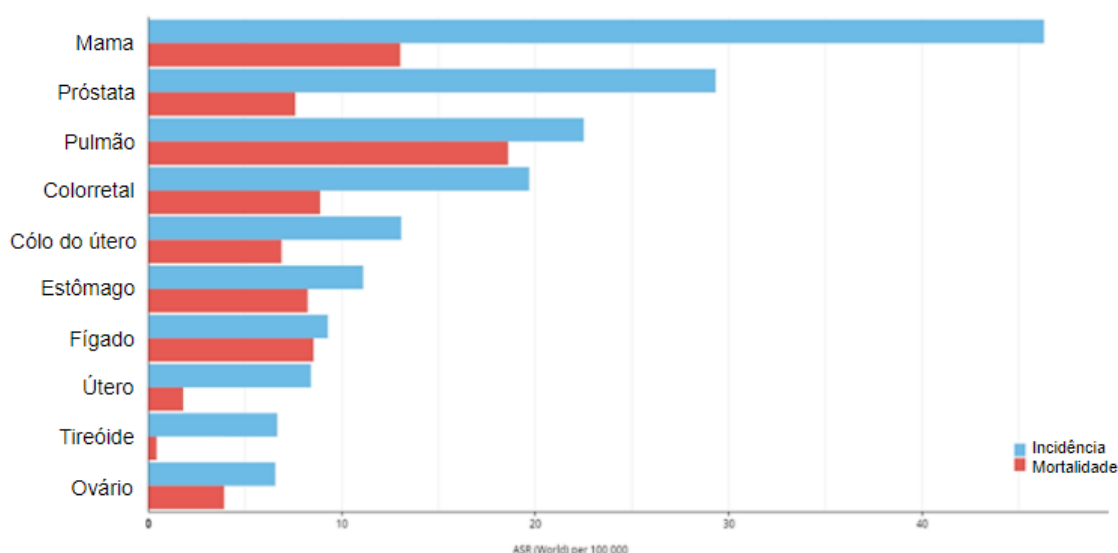



Figura 1 - Estimativa das taxas de incidência e mortalidade por câncer em todo o mundo em 2018, em ambos os sexos e em todas as idades. (World Health Organization, WHO | Cancer, acessado em 22 de maio de 2019).

Dentre os mais de 18 milhões de casos de câncer em 2018, os tipos mais incidentes mundialmente, para ambos os sexos e todas as idades, são de pulmão (11,6 %), mama (11,6 %), colorretal (10,2 %) e próstata (7,1 %), sendo o de pulmão também a maior causa de morte por câncer no mundo, considerando ambos os sexos. O câncer de mama é o que mais acomete o sexo feminino e também a principal causa de morte por câncer em mulheres mundialmente (World Health Organization, WHO, 2018). Estimativa de incidência de câncer no Brasil mostra que os cânceres mais incidentes permanecem sendo o de mama (29,5 %), em mulheres, e o de próstata (31,7 %) em homens, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (2017).

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 2 - Estimativa de incidência de câncer exceto de pele não melanoma 2018 no Brasil. (World Health Organization, WHO | Cancer, acessado em 22 de maio de 2019).

Dentre os maiores fatores de risco para o desenvolvimento de câncer, estão a exposição a carcinógenos e radiação, obesidade, envelhecimento, história familiar de câncer, desregulações hormonais, bem como fatores relacionados ao estilo de vida, como hábitos alimentares, sedentarismo, tabagismo e consumo de álcool, além de infecções virais, como a hepatite B e pelo papilomavírus (World Health Organization, WHO, 2007).

1.2. O câncer de mama

O câncer que mais acomete as mulheres é o de mama, sendo também a principal causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (Instituto Nacional do Câncer, 2018), sendo, portanto, um problema de saúde pública. Estimativa do Instituto Nacional do Câncer para o ano de 2018 foi que a incidência desta patologia em mulheres no Brasil seria de 59.700 novos casos.

Os fatores de risco que levam ao desenvolvimento deste tipo de câncer são subdivididos em grupos causais, sendo eles: fatores ambientais e comportamentais, que incluem sedentarismo e inatividade física, obesidade e sobrepeso após a menopausa, consumo de bebida alcoólica e exposição frequente a raios-X; fatores da história reprodutiva e hormonal, que leva em conta a idade da primeira menstruação e da menopausa, ter ou não filhos, a idade da primeira gestação, uso de contraceptivos e/ou reposição hormonal; ou fatores genéticos e hereditários, como história familiar de câncer de mama e ovário e alterações genéticas nos genes BRCA1 e BRCA2 (INCA, 2018).

Nas células da glândula mamária, os níveis séricos de estrogênio, bem como de progesterona, são os responsáveis pela sinalização e indução da proliferação celular, que se inicia através da ligação dos hormônios aos seus respectivos receptores. Assim como descrito

para células tumorais em geral, o metabolismo de células de câncer de mama sofre reprogramação metabólica, o que influencia tanto no desenvolvimento como na agressividade do tumor. Essas variadas alterações, seja no metabolismo intermediário, na sensibilidade à ação de fatores de crescimento, hormônios ou em alterações específicas em genes, são critérios utilizados para subclassificar os tumores de mama mais frequentes. Desta forma, os principais subtipos moleculares de tumor de mama são diferenciados por serem positivos ou negativos para os receptores de estrogênio (ER), de progesterona (PR) e do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). As células que são negativas para os três receptores, ou seja, que não expressa os receptores, é o mais agressivo por ser mais resistente a quimioterápicos convencionais, uma vez que os fármacos usados normalmente, tem os receptores como alvos (SCHNITT, 2010; TANG *et al.*, 2014; HARRELSON & LEE, 2016).

No presente estudo, foram utilizadas três linhagens celulares humanas de mama com metabolismos diferentes a fim de entender os efeitos, bem como inferir mecanismo de ação dos compostos do óleo de semente de romã nessas células. Foram usadas as seguintes linhagens: MDA-MB-231, linhagem de adenocarcinoma mamário, de subtipo triplo-negativo, com um perfil mais glicolítico, a linhagem MCF-7, linhagem com perfil mais oxidativo, receptor de estrogênio-positivo e a linhagem MCF-10A, oriunda de epitélio mamário não tumoral.

1.3. Metabolismo de células tumorais

As células tumorais sofrem alterações moleculares e metabólicas, gerando descontrole nos supressores tumorais e em algumas proteínas importantes para o controle proliferativo de uma célula, levando então a uma alta taxa proliferativa, o que requer um suprimento elevado de energia e de precursores biossintéticos, além da manutenção do estado redox celular. Para suprir essa demanda, as células tumorais sofrem, como é chamada por alguns autores, uma reprogramação metabólica (HAY, 2016). Esta reprogramação metabólica favorece a captação e utilização de esqueletos de carbono, principalmente de glicose e glutamina, para suprir sua alta demanda de precursores biossintéticos, como ácidos graxos, fosfolipídios de membrana, proteína e ácidos nucléicos e de ATP (CAIRNS *et. al.* 2011; HSU & SABATINI, 2008) (Figura 4). Sendo assim, observa-se um perfil anabólico nas células tumorais para que se tenha substrato para a formação de novas células (alta taxa proliferativa), e o catabolismo para manter a sobrevivência das células quando em deficiência de nutrientes. Algumas dessas alterações metabólicas e moleculares, intrínsecas ou extrínsecas, são comuns na maioria das células tumorais, o que faz com que essa reprogramação seja uma característica do câncer,

alta disponibilidade de oxigênio, tinham o fluxo glicolítico aumentado, sugerindo a troca da fosforilação oxidativa pela glicólise aeróbica, devido a uma ineficiência ou dano mitocondrial dessas células (WARBURG, 1925). Apesar da glicólise render menos ATP do que a oxidação completa da glicose na fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*), os estudos de Warburg mostraram que células tumorais apresentam um aumento da velocidade de produção de lactato, indicando aumento do fluxo através da via aeróbica de utilização de glicose. Este aumento do fluxo compensaria o menor rendimento da produção de ATP, além de favorecer o desvio dos carbonos da glicose, a partir da glicose-6-fosfato (G6P), para a síntese de precursores biosintéticos, como a de ácidos nucleicos, ao final da via das pentoses fosfato, proteínas e ácidos graxos que serão utilizados como blocos de construção para as novas células, e via da hexosamina, importante para a glicosilação protéica. De modo geral, tem-se a visão de que, quanto mais agressivo o tumor, maior e mais veloz é o fluxo glicolítico.

Entretanto, estudos ao longo dos anos têm mostrado que, apesar da glicólise aeróbica estar aumentada, tanto o ciclo de Krebs (CK) quanto a fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês *oxidative phosphorylation*) não são completamente inibidos, não sendo menos importante para o metabolismo de células tumorais quando comparados com células não tumorais (HAY, 2016). No entanto, o papel dessas vias metabólicas parece estar tanto relacionado a disponibilização de intermediários metabólicos como à produção de ATP mitocondrial, indicando alta diversidade e flexibilidade bioenergética e metabólica dos diferentes tipos de tumor, para suportar a variação de disponibilidade de glicose, oxigênio e aminoácidos (JOSE *et al.*, 2011).

As alterações na expressão e ação de algumas enzimas do metabolismo de glicose são importantes marcadores tumorais e, os estudos sobre essas possíveis alterações buscam elucidar as alterações no metabolismo de células tumorais e possíveis alvos terapêuticos (DEBERARDINIS & CHANDEL, 2016). Essas alterações nessas enzimas podem ser causadas pela expressão aumentada de receptores de fatores de crescimento, o que estimula cascatas de sinalização (PI3K-Akt-mTOR), assim como o fator induzido por hipóxia (HIF-1, do inglês, *hypoxia-inducible factor 1*), ambos estimulando a atividade das enzimas da via glicolítica, bem como da lactato desidrogenase (LDH), e o transportador de ácidos monocarboxílicos (MCT), que converte piruvato em lactato e que transporta o lactato produzido para fora da célula, respectivamente, o que favorece o fluxo da glicólise aeróbica (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; TARRADO-COSTELLARNAU *et al.*, 2016).

Estudos mostram que os receptores de glicose são altamente expressos em células tumorais (SHINOHARA *et al.* 1994; MORENO-SÁNCHEZ *et al.*, 2007), bem como sua atividade, fazendo com que haja aumento na captação de glicose por essas células. Existem várias isoformas de GLUT, que são mais ou menos expressas de acordo com o tecido, com exceção do GLUT 1 que está presente em todos os tecidos e é o tipo que tem a expressão aumentada nas células de câncer (MORENO-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

A primeira etapa da via glicolítica, ou seja, a fosforilação da glicose, convertendo-a em glicose-6-fosfato (G6F) é a que determina a dimensão e direção do fluxo glicolítico nas células, uma vez que o produto dessa reação é o ponto de convergência que pode ser encaminhada não só para a glicólise, mas também a via das pentoses fosfato – importante para a produção de NADPH e nucleotídeos –, glicogênese e as vias da hexosamina (PATRA & HAY, 2013b). Foram relatadas quatro isoformas de hexoquinase (HK) que apresentam algumas particularidades entre si. A HK do tipo 4 é a que apresenta menor afinidade dentre todas. A HK 3 é inibida por concentrações fisiológicas de glicose, enquanto a HK 1 e 2 são inibidas pelo seu produto, G6F, e são encontradas ancoradas às mitocôndrias através do canal aniônico dependente de voltagem (VDAC, do inglês *voltage dependent anion channel*) (WILSON, 2003; PATRA *et al.*, 2013a). Entretanto, Shinohara *et al.* (1994) observaram que a HK do tipo 1 é normalmente expressa em células não tumorais e pouco expressa nas células tumorais, enquanto o contrário ocorre com o tipo 2, ou seja, em estudo publicado, eles mostraram a expressão aumentada da HK2 em células HepG2, enquanto em células não tumorais, a quantidade era tão pequena, que não foi possível detectar pelo método utilizado.

Outra reação irreversível da glicólise é a conversão de Frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bifosfato, onde há consumo de ATP, convertida pela PFK1, enzima que está aumentada nas células de câncer (CHESNEY, 2006). O fosfoenolpiruvato (PEP, do inglês *phosphoenolpyruvate*) é um dos inibidores alostéricos dessa enzima, porém, em células de câncer, a PFK1 parece ter menor afinidade com o PEP, aumentando o fluxo glicolítico. A última etapa da glicólise também é uma etapa limitante realizada pela piruvato quinase nas isoformas M2 (PKM2) que, além de ser cineticamente mais lenta, é inibida pela cascata de sinalização da tirosina quinase, o que propicia que os intermediários glicolíticos, em maiores concentrações, sejam desviados para outras vias, favorecendo a biossíntese de precursores biossintéticos (ANDERSON *et al.*, 2018).

1.3.2. Metabolismo mitocondrial

A mitocôndria é uma organela bioenergética e biossintética, nela ocorre, por exemplo, a síntese de ATP em maior quantidade no organismo humano, principalmente no catabolismo celular da glicose, mas também lipídios e proteínas (OBRE & ROSSIGNOL, 2015) todos eles tendo em comum, o ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Assim como no catabolismo, as reações de síntese dos precursores biossintéticos são convergentes com relação aos intermediários do ciclo de Krebs. Entretanto, o papel da mitocôndria engloba, ainda, sinalizações de morte celular programada (apoptose) (ARMSTRONG, 2006), regulação do status redox das células, é o lugar onde ocorre produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e controle dos níveis de cálcio citosólico, além de mediar a síntese de precursores biossintéticos (DEBERARDINIS *et al.*, 2008; WALLACE, 2012; TARRADO-COSTELLARNAU *et al.*, 2016).

Ao contrário do exposto por Warburg, em que dizia que mitocôndrias em células de câncer eram disfuncionais, pois levou em conta apenas o papel da mitocôndria no catabolismo de glicose. Em contrapartida a essa teoria, Cavalli *et al.* (1997) mostraram ao depletar o DNA mitocondrial de células tumorais de cérebro e mama, elas perderam de capacidade de crescer de um modo independente a ancoragem, mostrando importância dessa organela para a sobrevivência e desenvolvimento das células tumorais, mesmo que sofra algumas alterações metabólicas. Neste contexto, é possível ver que entender o papel da mitocôndria no câncer, tanto no metabolismo quanto nas sinalizações de morte celular, pode elucidar terapias alvo nos estudos anticâncer.

Um papel importante das mitocôndrias, como supracitado, é o seu envolvimento nas sinalizações de morte celular programada, e entendendo como funcionam essas sinalizações e encontrar compostos que possam agir nessas vias, é possível encontrar novos alvos para a terapia anticâncer. A membrana interna mitocondrial tem uma permeabilidade muito seletiva, inclusive a prótons, para manter o potencial transmembrana. Já foi mostrado que o comprometimento da permeabilidade das membranas mitocondriais pode ser causado pela desregulação da expressão da família Bcl-2, ou seja, quando há um aumento das pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bak) e diminuição da anti-apoptótica Bcl-2, principalmente. Esse comprometimento da permeabilidade das membranas mitocondriais permite a liberação do citocromo c da membrana interna, o que desencadeia várias sinalizações pró-apoptóticas, a começar pela formação do apoptossomo e a ativação/clivagem das caspases, levando a uma cascata de

sinalizações. Outro elemento importante na sinalização de morte é o fator induzido por hipóxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible factor*) que é ativado quando há deficiência de oxigênio e (ARMSTRONG, 2006; TSUJIMOTO & SHIMIZU, 2007; NAVANEETHAKRISHNAN *et al.*, 2018).

1.3.3. Metabolismo de um carbono

Sabendo que as células tumorais sofrem uma reprogramação metabólica, pesquisadores seguem investigando vias envolvidas com etapas do metabolismo energético e vias de proliferação de células. Um deles é o metabolismo de 1 carbono, que envolve os ciclos de metionina e folato, onde ocorre a transferência de unidades de 1 carbono (metila e formila) de metabólitos como formato, serina, glicina, colina e suas variações (fosfocolina e glicerofosfocolina) e betaína, contribuindo para a síntese de purinas e pirimidinas, bem como reações de metilação do DNA e histonas e síntese de fosfolípidos, por exemplo (AMELIO *et al.*, 2014).

Na conversão de serina em glicina é gerada uma unidade de 1C que é transferido para o tetra-hidrofolato, gerando o 5, 10-metileno-tetrahidrofolato, que por sua vez, é utilizado, majoritariamente, na síntese de pirimidinas. Além disso, a síntese *de novo* de serina fornece precursores para várias vias biossintéticas e serina parece interagir com o oncogene p53 e ativando a piruvato quinase, induzindo a um aumento do fluxo glicolítico, quando em maior quantidade. A clivagem da glicina representa um papel fundamental para as mitocôndrias no apoio à rápida proliferação de células cancerígenas, onde ocorre a clivagem do grupo metileno da glicina, que é transferido para o tetrahidrofolato, gerando 5,10-metileno-tetrahidrofolato que também será usado para a síntese de pirimidinas e regenerando o NADH (AMELIO *et al.*, 2014; NEWMAN & MADDOCKS, 2017). A colina é outra fonte de unidade de 1C para as reações nas células, função que ocorre através da betaína. Ou seja, no processo de regeneração da metionina a partir da homocisteína, a betaína se faz necessária como co-fator e, neste processo, ela é convertida a dimetilglicina, que sofre clivagem e transfere a unidade de 1C para o tetrahidrofolato, assim seguindo a via anteriormente descrita. A metionina, por sua vez, pode gerar S-adenosil-metionina que doa um grupo metil para vias que requerem essas moléculas, metilando as histonas do DNA, por exemplo (NEWMAN & MADDOCKS, 2017).

Tendo em vista os produtos gerados a partir do metabolismo de um carbono, ou seja, síntese de purinas e pirimidinas – ácidos nucleicos importantes na síntese de DNA, metilação de

histonas, regeneração do NADH, estímulo a enzimas da via glicolítica e síntese de mais aminoácidos, é possível perceber que este metabolismo e o teor desses aminoácidos doadores de unidades de 1C é importante para a sobrevivência e proliferação das células de câncer. Células altamente proliferativas, como é o caso de células de câncer, requerem um suprimento exógeno de alguns aminoácidos não-essenciais para seu crescimento, uma vez que pode haver ineficiência na síntese de novo de alguns aminoácidos não essenciais, não acompanhando a taxa proliferativa (YANG & VOUSDEN, 2016). Sendo assim, entender melhor sobre esse metabolismo e suas regulações, pode contribuir, além de ampliar o conhecimento acerca do metabolismo celular, mas também identificar pontos importantes como alvos terapêuticos.

1.3.4. Metabolismo de lipídeos

Lipídios correspondem a um grupo de compostos que têm como característica principal a insolubilidade em água, cujas funções biológicas variam entre a função estrutural, compondo as membranas das células e organelas, a de armazenamento de energia e agindo como sinalizadores e cofatores enzimáticos. Nas células há vários tipos de lipídios, e sua estrutura indica sua respectiva função, sendo, por exemplo, os glicerofosfolipídios e os esteróis, os majoritários nas membranas celulares (HARAYAMA & RIEZMAN, 2018).

As membranas celulares são compostas por uma bicamada lipídica e sua composição varia e impacta diretamente na fluidez e funcionalidade da mesma. Os ácidos graxos saturados conferem a membrana maior rigidez devido à forte ligação lipídio-lipídio, ao passo que ácidos graxos insaturados conferem maior fluidez a essa bicamada. É possível observar então que os lipídios com composição e conformação química diferentes, exercem funções diferentes, o mesmo ocorre quando a susceptibilidade a modificações adversas, ou seja, lipídios saturados são menos susceptíveis a oxidação do que lipídios insaturados que apresentam maior vulnerabilidade a ação de espécies reativas de oxigênio. Portanto um equilíbrio entre os ácidos graxos saturados, mono e poli-insaturados é importante para um bom funcionamento das membranas, funcionando como uma barreira para grandes moléculas e permitindo uma conformação adequada das proteínas transmembrana (ABEL *et al.*, 2014; HARAYAMA & RIEZMAN, 2018). Assim como citado anteriormente, as células captam ácidos graxos exógenos, ou seja, proveniente da alimentação, sendo assim, a qualidade de lipídios na dieta pode afetar também a produção de eicosanóides e a sinalização celular ao se ligarem a receptores nucleares como o PPAR γ (ABEL *et al.*, 2014).

O metabolismo de lipídios envolve a captação, síntese, armazenamento e degradação, vias que são reguladas por enzimas distintas. Os ácidos graxos captados pelas células podem ser endógenos, como o acetato, ou exógenos, como o palmitato. A biossíntese de ácidos graxos ocorre no citoplasma das células a partir de acetil-CoA e malonil-CoA, provenientes da mitocôndria (Figura 3), através da atividade do sistema da ácido graxo-sintase (CHEN & LI, 2016). O catabolismo de lipídios é muito rentável energeticamente e ocorre na mitocôndria das células passando por quatro etapas, a se iniciar com a entrada desse ácido graxo para a matriz mitocondrial, feita através da ligação do ácido graxo à carnitina, para que o mesmo possa ser transferido pela carnitina-acil-transferase I e II. Uma vez na matriz mitocondrial, o ácido graxo se desliga da carnitina e recebe uma coenzima A. A segunda etapa é a β -oxidação, onde há a quebra estrutura do ácido graxo a cada dois carbonos (um acetil-CoA). O acetil-CoA entra, então, no ciclo de Krebs e, posteriormente, fosforilação oxidativa, gerando moléculas de ATP e espécies reativas de oxigênio (EROs), como mostrado na figura 4.

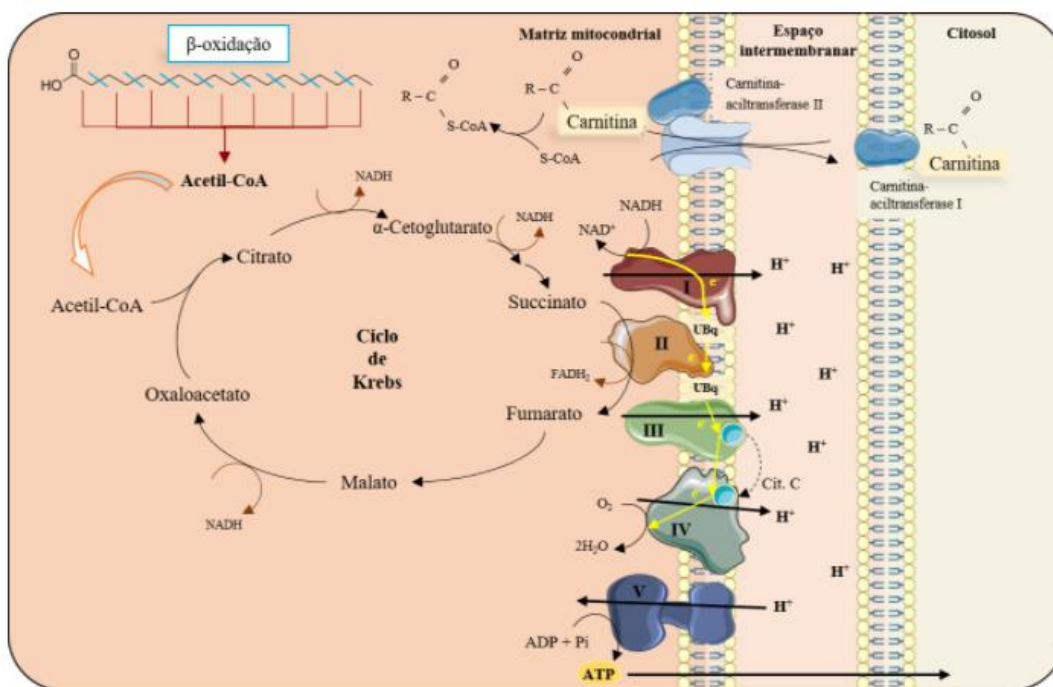


Figura 4 – Catabolismo dos lipídios.

Têm crescido os estudos mostrando que além do metabolismo de glicose e glutamina, a reprogramação no metabolismo de lipídios é outra modificação que ocorre nas células tumorais, sendo utilizados como substrato tanto para síntese de energia e de precursores biossintéticos, quanto como agente sinalizador. Hopperton *et. al.* (2014) mostrou que células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) captaram de 2 a 3 vezes mais lipídio endógeno - acetato ^{14}C - do que a linhagem não tumoral (MCF-10A). Em adição, estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que câncer

de ovário (NIEMAN *et al.*, 2011) e de mama (DIRAT *et al.*, 2011) se desenvolvem próximos a adipócitos, o que possibilita a captação de ácidos graxos mais facilmente. Os ácidos graxos captados pelas células tumorais são utilizados tanto para a síntese de ATP na mitocôndria, uma vez que o catabolismo de uma molécula de ácido graxo é bem rentável, quanto seus substratos são utilizados no citosol para biossíntese de novos ácidos graxos que serão importantes para a formação de novas células, contribuindo, assim, para a progressão tumoral.

Em contrapartida ao fato de células tumorais usarem ácidos graxos em seu benefício, tem sido estudado na literatura científica o efeito anti-cancer de ácidos graxos poli-insaturados conhecidos pela sua bioatividade biológica em diferentes doenças (BERQUIN *et al.*, 2008). Estudos *in vivo* já demonstraram que ao administrar uma dieta enriquecida com ácidos graxos da série *n-3* em animais com tumor induzido quimicamente ou xenoenxerto foi observada uma supressão do câncer e redução do crescimento tumoral em câncer de mama (CHEN *et al.*, 2004; JOURDAN *et al.*, 2007), próstata (BERQUIN *et al.*, 2007) e cólon. Melo *et al.* (2018) mostrou que, ao suplementar ratos com 1 %, 2 % e 4 % de óleo de semente de romã – uma das principais fontes de ácido linolênico conjugado (CLnA) – os ácidos graxos do óleo foram absorvidos no fígado, coração e rim na forma de isômeros conjugados do ácido linoleico (CLA), sugerindo uma bioconversão de CLnA em CLA.

1.4. Aplicação da Metabolômica em estudos com câncer

A reprogramação é uma característica do câncer, diferenciando-o das células não-tumorais e, essas diferenças metabólicas e biomarcadores das células tumorais pode e já tem sido usada para auxiliar na prática clínica e pesquisas acerca do tema. Nos últimos tempos tem-se pesquisado cada vez mais sobre as ciências ômicas – genômica, proteômica, lipidômica, metabolômica – e sobre a utilização delas no diagnóstico, prognóstico, entendimento de doenças e resposta ao tratamento. Dentre estas, a ciências ômicas que identifica e quantifica substâncias de baixo peso molecular, a metabolômica, é a que mais tem sido utilizada no estudo do câncer por ser a que melhor mostra as características e metabolismo tumoral, uma vez que metabólitos podem ser biomarcadores do câncer. Esta análise pode ser feita por ressonância magnética nuclear (^1H RMN) ou por espectrometria de massas (MS) a partir de diferentes amostras, como fluidos corporais (p.ex. sangue, urina, saliva), bem como células e tecidos. Embora MS seja mais sensível, a reprodutibilidade por ^1H RMN e os dados, mais robustos, além de poder ser feito em amostras sólidas com o uso da técnica de rotação de ângulo mágico (HR-MAS) (SPRATLIN *et al.*, 2010; ARMITAGE & BARBAS, 2014; PATEL & AHMEDB, 2015).

Alguns biomarcadores já têm sido usados no diagnóstico do câncer de mama, dentre eles, estão os genes BRCA1 e 2, e os receptores (HER/neu, ER e PR). Entretanto, através da análise dos metabólitos de células de câncer como aqueles de uma via específica, como a glicólise – que geralmente tem fluxo aumentado em células tumorais –, bem como aqueles necessários para a síntese de DNA, como a colina, fosfocolina e glicerofosfocolina, também é possível distinguir uma célula entre tumoral e não-tumoral. Após os dados serem processados, geralmente se faz a análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal components analysis*) para ver o panorama geral, metabólitos-chave (biomarcadores) e observar perfis metabólicos distintos entre um tratamento e o controle ou entre células diferentes (BEGER, 2013; PATEL & AHMEDB, 2015).

1.5. A romã, sua composição e bioatividade

A romã (*Punica granatum L.*) é um fruto nativo do Irã, constituído de casca, pericarpo, polpa e semente, e é rico em compostos bioativos como flavonoides e taninos hidrolisáveis (DA-SILVA *et al.*, 2013), saponinas, triterpenóides, esteróides, glicosídeos e ácidos graxos conjugados (KHAN *et al.*, 2017). Um composto muito presente na polpa deste fruto é a punicalagina, um elagitanino que tem mostrado um promissor efeito antioxidante. Estudos mostram que devido a quantidade e variedade destes compostos bioativos, extratos da romã tem a capacidade de exercer funções biológicas importantes, como efeito anti-inflamatório, antioxidante, e anti-tumoral (KHWAIRAKPAM *et al.*, 2018).

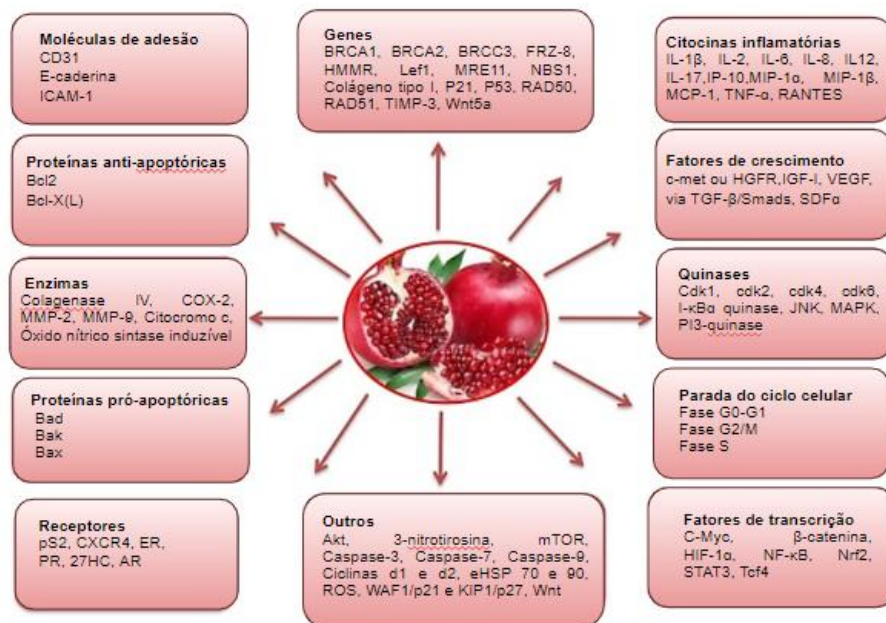


Figura 5 - Alvos moleculares da *Punica Granatum* (Adaptado de Khwairakpam *et al.*, 2018).

As sementes de romã acabam sendo subprodutos da produção de sucos e geleias da polpa (KÝRALAN *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2014). Estudos têm mostrado a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados contida no óleo de semente de romã (OSR), principalmente isômeros do ácido alfa-linolênico conjugado (CLnA).

Os estudos acerca dos ácidos graxos conjugados têm sido crescentes devido aos seus potenciais efeitos benéficos à saúde humana. Eles consistem em isômeros geométricos e de posicionais dos ácidos graxos insaturados com as duplas ligações conjugadas que podem estar nas posições 8,10,12, 9,11,13 e 10,12,14 nas formas geométricas *cis* e *trans* (SASSANO *et al.*, 2009; VERARDO *et al.*, 2014). Os primeiros estudos com esses ácidos graxos foram feitos com o ácido linoleico conjugado (CLA), proveniente de fermentação bacteriana em animais ruminantes e presentes em produtos de origem animal, principalmente laticínios. Outro AGC importante por ser encontrado em altas concentrações em óleos de sementes, são os ácidos graxos linolênicos conjugados, do ácido octadecatrienoico (18:3) (HENNESSY *et al.*, 2016; BIAŁEK *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2019). Alguns pesquisadores sugerem que algumas atividades biológicas exercidas pelos isômeros do CLnA, seria devido a bioconversão dele em isômeros do CLA, principalmente no *cis-9-trans-11* (MELO *et al.*, 2018).

No óleo de semente de romã são encontrados os seguintes CLnAs: o ácido punícico (C18:3-9*cis*,11*trans*,13*cis*) como majoritário, além de outros isômeros como o ácido α -eleosteárico (C18: 3-9*cis*, 11*trans*, 13*trans*) e ácido catálpico (C18:3-9*trans*, 11*trans*, 13*cis*) e o β -eleosteárico (18:3-9*trans*,11*trans*,13*trans*) que ocorrem em concentrações mais baixas (MELO *et al.*, 2014; VERARDO *et al.*, 2014).

Além dos ácidos graxos, estudos têm mostrado que o óleo de semente de romã também é constituído de altos teores de tocoferol, chegando a ser maior do que outros óleos de semente, como o de linhaça, por exemplo, além de conter compostos fenólicos, como ácido vanílico, ácido trans-cinâmico e quercetina. O γ -tocoferol foi encontrado em maior concentração nesse óleo em relação a outros óleos vegetais, além de δ -tocoferol e, em menores concentrações, o α e o β -tocoferóis (COSTA *et al.*, 2019). Melo e colaboradores (2016) viram, ainda, teores interessantes de fitosteróis, principalmente o β -sitosterol (374 mg/100g), fatores que contribuem para uma atividade antioxidante do óleo de semente de romã.

Arao e colaboradores (2004) mostrou que a ingestão de uma dieta com 1 % de ácido punícico (18:3-9*c*,11*t*,13*c*) atenuou o acúmulo de triacilglicerol no fígado de ratos OLETF obesos e com hiperlipidemia. Saha e Ghosh (2012) mostraram que a administração dos ácidos punícico e alfa-eleosteárico em ratos com diabetes induzidas por streptozotocin, foi capaz de

diminuir a glicemia no sangue, atenuar a peroxidação lipídica, além de exercerem efeito antioxidante e anti-inflamatório. As propriedades medicinais e farmacêuticas desse fruto vêm há muito sendo aplicada em medicinas tradicionais como a Ayurvédica e Unani, agindo contra parasitas, melhorando quadros de diarreia e úlceras (DA-SILVA *et al.*, 2013). Outro estudo mostrou, ainda, que a casca da romã apresentou efeito antiplasmodial (DELL'AGLI, 2009).

1.6. Óleo de semente de romã e efeitos anticâncer

Nos últimos anos, estudos têm mostrado que um dos efeitos benéficos do óleo de semente de romã e seus compostos bioativos para a saúde humana, é sua ação anticâncer, mostrados na tabela 1. Estudos mostraram que o ácido punícico foi capaz de inibir o crescimento e induzir apoptose em células de câncer de próstata LNCaP, através da redução da expressão do antígeno prostático específico (PSA) e inibição dos níveis de expressão do receptor de andrógeno (AR) (GASMI; SANDERSON, 2010). Adicionalmente, já foi mostrada a diminuição da proliferação de células de câncer de mama causada pelo ácido alfa-eleosteárico, através de modulações importantes para a progressão tumoral, como aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, diminuição da expressão de proteínas anti-apoptóticas e do receptor de estrogênio (ER α), além de aumento de PPAR γ (MOON, 2010), diminuição do potencial de membrana, inibição de PARP clivada e bloqueio do ciclo celular das células (GROSSMANN *et al.*, 2009). Mandal & Bishayee, (2015) e Bishayee *et al.* (2015) mostraram o efeito antitumoral de uma emulsão comercial do óleo de semente de romã, com a diminuição de proteínas anti-apoptóticas e aumento das pró-apoptóticas, liberação do citocromo *c*, o que indica ativação de vias de morte mediadas pela mitocôndria. O beta-eleosteárico foi capaz de induzir a apoptose em células de câncer de bexiga através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e ativação de PPAR γ (SUN *et al.*, 2012). Mandal *et al.* (2017) mostraram ainda que uma emulsão de romã teve efeito quimioprotetor *in vivo* em carcinoma hepatocelular experimental e em tumor de mama induzido por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno (DMBA), respectivamente, através da ativação de mecanismos antioxidantes. Albrecht e colaboradores (2014) mostraram que o óleo de semente de romã agiu como um supressor tumoral, inibindo o crescimento e diminuindo a migração celular.

Tabela 1 – Efeito do óleo de semente de romã ou seus compostos bioativos em diferentes tipos de câncer

Câncer	Intervenção	<i>In vitro</i> / <i>In vivo</i> /Clínico	Efeito	Referência
Mama	Ácido α -eleosteárico	<i>In vitro</i>	$\downarrow \Delta\psi_m$, inibição da cPARP e bloqueio do ciclo celular na fase G ₂ -M	Grossmann <i>et al</i> , 2009
	Ácido α -eleosteárico	<i>In vitro</i>	\uparrow PPAR- γ , p53, p21 e Bax; \downarrow ER α , pERK, Bcl-2 e procaspase-9	Moon <i>et al</i> , 2010
	Emulsão de romã	<i>In vivo</i>	\uparrow Bax \downarrow Bcl-2, \uparrow Bad, \uparrow caspase-3, -7 e -9, \uparrow poly (ADP ribose) polymerase e \uparrow citocromo c.	Bishayee <i>et al.</i> , 2015
	Emulsão de romã	<i>In vivo</i>	\downarrow expressão intratumoral de ER- α e ER- β , \downarrow a expressão, o acúmulo citoplasmático e a translocação da β -catenina e \downarrow ciclina D1	Mandal; Bishayee, 2015
Próstata	Óleo de semente de romã	<i>In vivo e In vitro</i>	Supressão do crescimento do tumor e da invasão na membrana de Matrigel, \uparrow p21 e MAPK, \downarrow c-myc e GADD45 α e aumento do ciclo celular na fase G ₂ -M	Albrecht <i>et al.</i> , 2004
	Ácido punícico	<i>In vitro</i>	\downarrow expressão do PSA, inibição da expressão AR, \downarrow Bcl-2, \downarrow pAkt e pGSK3 β , \uparrow c-PARP e c-caspase-9	Gasmi; Sanderson, 2010
Hepático	Emulsão de romã	<i>In vivo</i>	\downarrow COX-2 and HSP90, preveniu a degradação de I κ B α , impediu a translocação de NF- κ B do citosol para núcleo e \uparrow expressão e translocação nuclear de Nrf2	Mandal <i>et al.</i> , 2017
Bexiga	Ácido β -eleosteárico	<i>In vitro</i>	\uparrow PPAR- γ e caspase-3, \downarrow Bcl-2 e GSH	Sun <i>et al</i> , 2012
Leucemia	Óleo de semente de romã	<i>In vivo e in vitro</i>	Diminuição da viabilidade celular	Suzuki <i>et al</i> , 2001

A partir do exposto, os compostos do OSR, especialmente os CLnA apresentam efeitos benéficos à saúde, dentre eles, a propriedade anticâncer. Por outro lado, os mecanismos moleculares associados a esses efeitos ainda não foram completamente elucidados, nem os efeitos do OSR sobre o metabolismo intermediário e mitocondrial foram bem descritos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito do óleo de semente de romã (OSR) sobre o metabolismo intermediário de linhagens humanas de carcinoma mamário humano, MCF-7 e MDA-MB-231 e linhagem não tumoral de mama, MCF-10-A, com diferentes fenótipos metabólicos.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar o efeito do OSR sobre a viabilidade celular
2. Identificar vias metabólicas moduladas pelo OSR através do perfil de metabólitos polares intracelulares e extracelulares
3. Investigar o efeito do OSR sobre o metabolismo de ácidos graxos a partir da caracterização do perfil de ácidos graxos dos fosfolipídios de membranas celulares
4. Associar o efeito sobre a viabilidade às alterações metabólicas promovidas pelo OSR levando em consideração os diferentes fenótipos metabólicos das linhagens celulares

3. Materiais e métodos

3.1. Cultura de células e tratamento com óleo de semente de romã.

As linhagens tumorais, MCF-7 e MDA-MB-231, foram cultivadas em meio RPMI-1640, com L-glutamina e 25mM de HEPES, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB). A linhagem não tumoral, MCF-10A, foi cultivada em meio DMEM/F-12, com L-glutamina, suplementado com 10 % SFB, $1 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de Fator de crescimento epidérmico (EGF), $50 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ de hidrocortisona e $2 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ de insulina bovina. As três linhagens foram mantidas em atmosfera controlada com 5 % CO_2 , a 37°C .

O óleo de semente de romã (OSR) utilizado é comercial orgânico, extraído por prensagem a frio, proveniente de Israel (Neta™). Para exposição do OSR às culturas celulares, foi feita uma emulsão com SFB, para que o óleo, cuja composição é predominantemente de triacilgliceróis, lipídios muito apolares, solubilize no meio de cultivo das células, que é polar. As concentrações utilizadas do OSR foram: 0,5, 1,0 e 2,0 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ de meio de cultura, nos tempos de 24 e 48 horas, dependendo da análise a ser realizada.

3.2. Quantificação de ácidos graxos do óleo da semente da romã e de ácidos graxos incorporado aos fosfolipídios na membrana plasmática das linhagens celulares

A composição de ácidos graxos do OSR e das células foram analisadas por cromatografia gasosa com detector de ionização por chama (CG-FID), sendo o OSR analisado em cromatógrafo equipada com um injetor split/splitless (Shimadzu Co., Quioto, Japão) (NUNES, TORRES, 2010) e o extrato de células, Agilent Technologies 7890A CG System acoplada ao programa EZChrom Elite CDS (Agilent Technologies, Inc., CA, USA). Para tais análises, os lipídios das células foram extraídos usando o método descrito por Folch *et al.* (1957), e os solventes evaporados em vapor de N_2 . O extrato seco das células, assim como o OSR, adicionados de padrão interno (GLC reference standard 463, NU-CHEK-PREP, INC.; FAME mix de 37 componentes; Supelco Co., Bellefonte, PA, EUA, respectivamente) e Supelco 37 (Sigma®) respectivamente, foram metilados usando a esterificação alcalina por um método adaptado de Christopherson *et al.* (1970) e Kramer *et al.* (1997), obtendo, assim, ésteres metílicos de ácidos graxos, que foram injetados em cromatógrafo.

3.3. Viabilidade celular

A viabilidade foi analisada por um experimento colorimétrico utilizando o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio). As células foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio RPMI (células tumorais) ou DMEM/F12 (célula não tumoral) com 10 % de

SFB e, após 24 horas de cultivo, as células foram tratadas com concentrações especificadas de OSR (0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml). Após 24 e 48 horas do tratamento, as células foram incubadas com 0,5 ml de uma solução de MTT (5 mg/ml) por 2 horas. Em seguida, os cristais de formazan formados foram dissolvidos em isopropanol ácido (0,1 N HCl) e a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 570 nm. Essas análises foram realizadas com seis replicatas experimentais e três biológicas. As células foram contadas por microscopia óptica.

3.4. Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear

As células foram plaqueadas em placas de Petri e, após 24 horas, foram tratadas com o óleo de semente de romã ou tiveram seu meio trocado (células controle). Após os tempos de incubação com OSR, alíquotas do meio de cultura foram retiradas para análise do perfil de metabólitos extracelulares – exometaboloma – e as células foram extraídas, centrifugadas e armazenadas no ultrafreezer -80°C até a análise. Os metabólitos intracelulares – intrametaboloma – foram extraídos utilizando o protocolo descrito por Bligh & Dyer *et al.* (1959) e após evaporação do solvente, os extratos foram armazenados a -80°C até a análise. Às amostras de meio de cultura foi adicionado 10 % (v/v) de óxido de deutério (D_2O). Os extratos dos metabólitos intracelulares foram solubilizados em tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4, contendo 10 % de D_2O . Os perfis de metabólitos das células e meios de cultura foram avaliados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no equipamento Bruker 500-MHz Avance DRX spectrometer (Bruker Biospin, Alemanha), operando a 500.13 MHz para análise de ^1H com temperatura de 300 K. 0,1 mmol \times L⁻¹ de ácido 4,4-dimetil-4-silapentano-1-58 sulfônico (DSS) foi usado como composto de referência para os espectros dos metabólitos intracelulares. Os espectros foram processados em TOPSPIN 3.6.1 (Bruker-Biospin, Bremen, Alemanha). Para comparação entre células tratadas com OSR com o controle, as integrais dos picos foram calculadas, normalizadas pelo DSS e por 1×10^6 células.

3.5. Análises estatísticas

Estatística descritiva, feita pela análise de variância de duas vias (2 way ANOVA) com pós-teste de Tukey foram usados para comparar a incubação com o óleo de semente de romã e o tempo. Foram plotados média e erro padrão para os experimentos de viabilidade celular e média e desvio padrão na análise do intrametaboloma. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 7 (La Jolla, CA, EUA).

4. Resultados

4.1. Óleo de semente de romã como uma fonte de ácidos graxos bioativos, principalmente de ácidos linolênicos conjugados

Na análise do perfil de ácidos graxos do óleo de semente de romã por cromatografia gasosa foram detectados 18 ácidos graxos, sendo 6 % correspondente aos AG saturados e 94 % dos AG insaturados. Os picos cromatográficos apresentados na figura 6 foram identificados a partir de padrões de ácidos graxos com 37 ácidos graxos (FAME Mix Standard), padronização interna com o ácido heptadecanoico (17:0), além dos padrões dos isômeros de CLnA – punicico, alfa-eleosteárico, beta-eleosteárico e catálpico – para comparar os padrões de eluição e os resultados foram expressos em percentual (p/p) do total de ácidos graxos identificados no óleo de semente de romã.

De acordo com a análise dos ácidos graxos, os ácidos graxos saturados em maior quantidade são os AGs palmítico (2,86 %) e esteárico (1,68 %). De forma geral, os isômeros do ácido alfa-linolênico foram os ácidos graxos majoritários, equivalendo à 83,2 % do OSR, onde 63,5 % correspondeu ao ácido punicico, 7,6 % ao ácido α -eleosteárico, 4,1 % ao ácido catálpico, 1,5 % ao ácido β -eleosteárico, além de cerca de 6,4 % ser correspondente a CLnAs não identificados (Tabela 2). Dentre os ácidos graxos insaturados, os ácidos oleico e linoleico são os presentes em maior quantidade depois dos isômeros de CLnA.

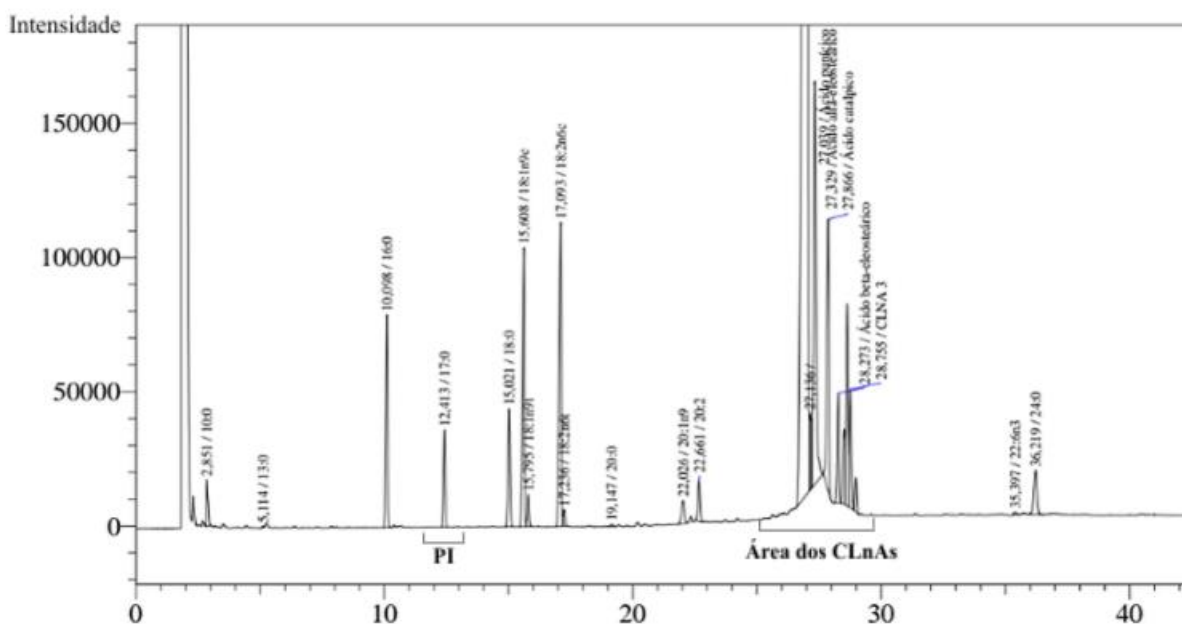


Figura 6 - Cromatograma representativo da análise de ácidos graxos do óleo de semente de romã. A análise no CG foi feita em coluna polar e os ácidos graxos foram identificados com um padrão com 37 ácidos graxos (FAME Mix Standard) para comparar os padrões de eluição. PI – Padrão interno.

Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos do óleo de semente de romã

Ácidos graxos	Teor (% p/p)
<i>Saturados</i>	
10:0	0,55
13:0	0,02
16:0	2,65
18:0	1,68
20:0	0,03
24:0	1,05
<i>Insaturados</i>	
18:1n9c	4,03
18:1n9t	0,44
18:2n6c	5,00
18:2n6t	0,22
20:1n9	0,47
20:2	0,62
22:6n3	0,06
<i>CLnAs</i>	
18:3c9t11c13 (Ac. punícico)	63,51
18:3c9t11t13 (Ac. α -eleosteárico)	7,64
18:3t9t11c13 (Ac. catálpico)	4,12
18:3t9t11t13 (Ac. β -eleosteárico)	1,54
CLnAs não identificados	6,37

4.2. OSR exerceu efeito citotóxico sobre as linhagens celulares, com maior efeito na linhagem não tumoral

O OSR diminuiu significativamente a viabilidade de ambas as células de carcinoma de mama de forma concentração e tempo-dependente, sendo a MDA-MB-231 a mais sensível, que apresentou uma diminuição de 60 % e 70 % na viabilidade, enquanto MCF-7, mostrou uma diminuição de 22 % e 30 % após 24 e 48 h de tratamento (Figura 7A e 7B), respectivamente, com a maior concentração do OSR. No entanto, fato não esperado, o óleo também causou a diminuição da viabilidade da linhagem não tumoral, MCF-10A, sendo ainda mais pronunciada do que nas linhagens tumorais, tendo uma diminuição máxima de 59 % da viabilidade após a exposição com 2,0 mg/ml de OSR por 24 h, e de 87 % na mesma concentração do OSR com maior tempo (Figura 7C).

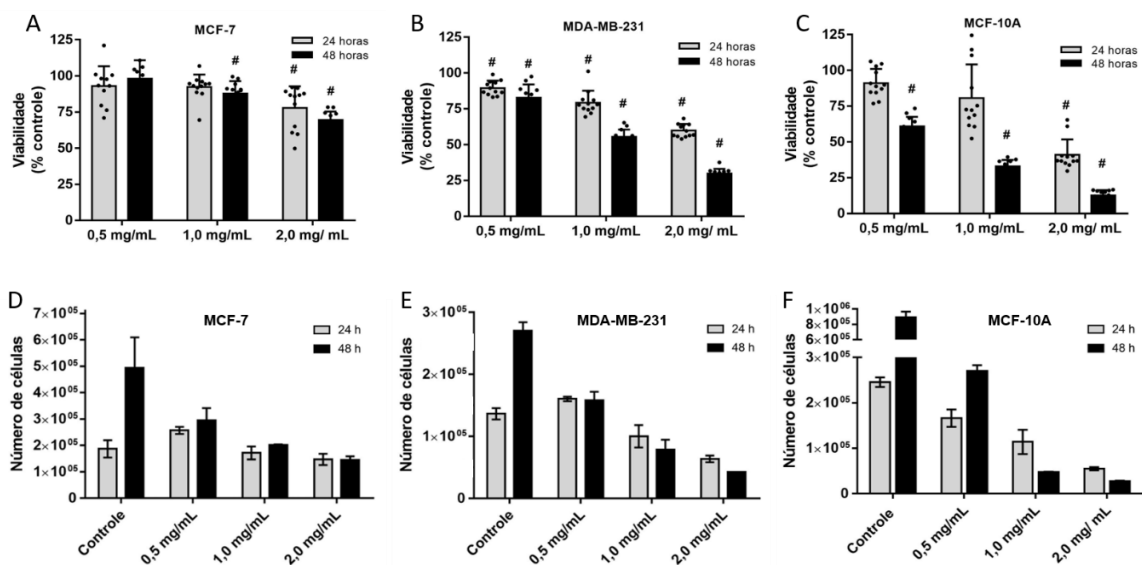


Figura 7 - OSR diminuiu a viabilidade celular e o número de células de forma concentração e tempo dependente. A viabilidade celular das linhagens MCF-7 (A e D), MDA-MB-231 (B e E) e MCF-10A (C e F) foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT após 24h (barras cinzas) e 48h (barras pretas) de incubação com 0,5, 1,0 e 2,0 mg/ml de OSR. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias, seguida de pós teste de Tukey. # – significativamente diferente do seu respectivo controle.

A diminuição da viabilidade das linhagens foi acompanhada por uma diminuição no número de células (Figura 7 D – F), também de forma concentração e tempo dependente, sendo a mais afetada a linhagem não tumoral, com redução quase total do número de células, seguida da tumoral mais agressiva (MDA-MB-231), com diminuição de 84 % do número de células e a MCF-7, a menos afetada, com redução de cerca de 70 % do número de células, corroborando com o experimento de viabilidade celular.

4.3. Óleo de semente de romã induz alteração sutil de metabólitos nas células

Os espectros representativos apresentados na figura 8 mostram regiões referentes aos deslocamentos químicos dos ^1H da glicose e ^1H lactato no meio de cultura das células MCF-7. É possível observar que há uma diminuição da intensidade dos picos referentes aos deslocamentos químicos dos ^1H da glicose no meio de cultura das células controle após 48 h (Figura 8A, traços azul e vermelho), acompanhando um aumento de cerca de 2,5 vezes do número de células (Figura 7D). Ou seja, a quantidade de glicose captada aumenta em função da proliferação das células. Uma diminuição semelhante é observada nas células tratadas com OSR (Figura 8A, traços preto e roxo). Entretanto, dado que o número de células após 48 horas é semelhante a 24 h, esses resultados sugerem que a incubação com OSR está aumentando a capacidade dessas células de captarem glicose. Com relação ao lactato (Figura 8B), foi observado um aumento de 2,5 vezes de 24 para 48 horas em ambas as condições, controle e

tratadas com OSR. E, como observado com o consumo de glicose, o acúmulo de lactato após 48 h com OSR é mais acentuado quando considerado o número de células.

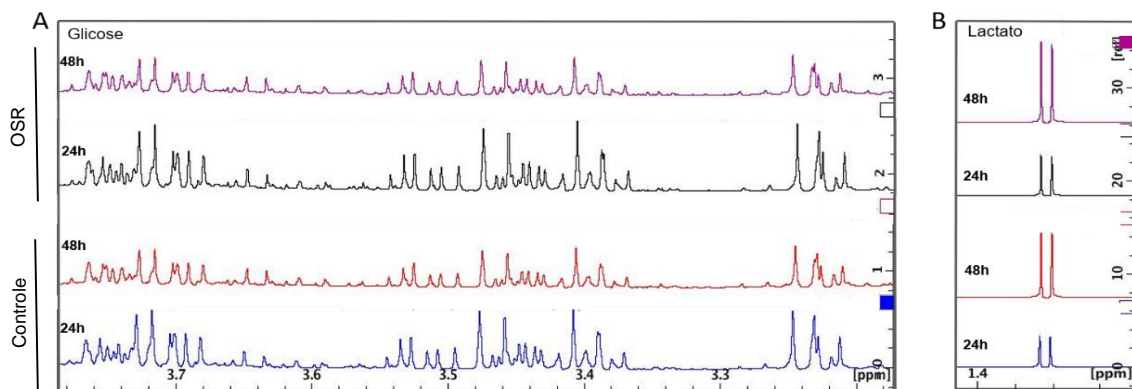


Figura 8 - OSR afetou o consumo de glicose e o acúmulo de lactato no meio de cultura pela célula MCF-7. Região do espectro representativo de RMN 1H correspondente aos sinais da glicose (A, 3,2-3,8 ppm) e lactato (B, 1,31 ppm) das células MCF-7, controle (azul e vermelho) e tratadas com 0,5 mg/mL de OSR (preto e roxo) após 24h (azul e preto) e 48h (vermelho e roxo) de tratamento.

Na linhagem MDA-MB-231, também há diminuição dos sinais correspondentes aos ^1H da glicose no meio de cultura no tempo de 48 h (Figura 9A), efeito que é ainda mais acentuado do que na linhagem MCF-7. A intensidade do sinal do lactato também aumenta nesta linhagem após 48 h em cultura, cerca de 3,5 vezes (Figura 9B). O mesmo perfil de variação foi observado quando as células foram incubadas com 0,5 mg/mL de OSR, *i.e.*, aumento do consumo de glicose e do acúmulo de lactato no meio de cultura (espectros pretos e roxos, respectivamente), sendo este último de 2,5 aproximadamente em relação a 24 horas de incubação. Dado que o número de células após 24 e 48 h de incubação com OSR é semelhante, assim como observado para a linhagem MCF-7, a incubação com o óleo estimulou o aumento da produção de lactato.

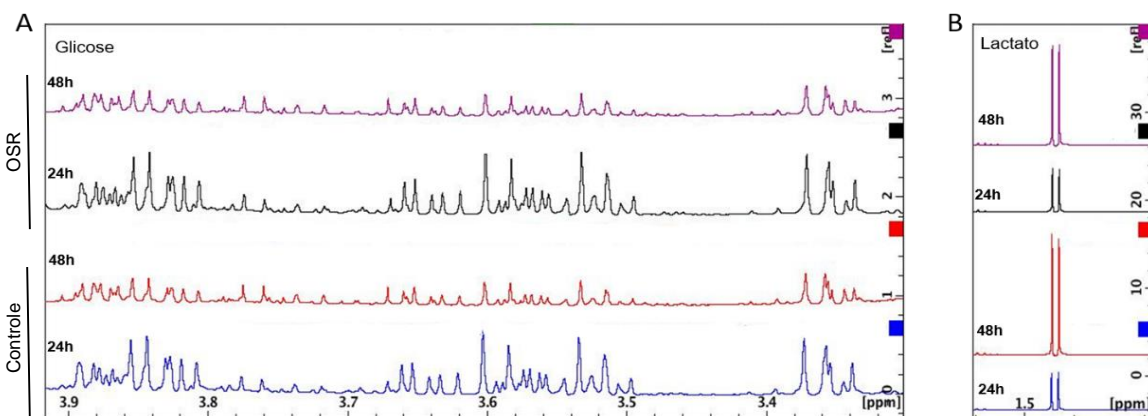


Figura 9 - OSR afetou o consumo de glicose e o acúmulo de lactato no meio de cultura pela célula MDA-MB-231. Região do espectro representativo de RMN 1H correspondente aos sinais da glicose (A, 3,2-3,8 ppm) e lactato (B, 1,31 ppm) das células MDA-MB-231, controle (azul e vermelho) e tratadas com 0,5 mg/mL de OSR (preto e roxo) após 24h (azul e preto) e 48h (vermelho e roxo) de tratamento

Analisando a figura 10, espectros azuis e vermelhos das células MCF10-A controle, pode-se perceber uma diminuição nos sinais referentes aos ^1H da glicose (Figura 10A) e um aumento de 50 % no sinal do lactato (Figura 10B) em 48 h em cultura, quando comparado a 24 horas, assim como observado nas linhagens tumorais. Entretanto, dado que essas células triplicaram em número após 48 h (Figura 7F), sugere-se que a utilização de glicose e produção de lactato não acompanhou a taxa de proliferação das células MCF-10A. Por outro lado, ao observar a redução nos sinais da glicose e aumento no sinal de lactato nas células incubadas com o OSR (traços pretos e roxos) em 48 horas quando comparadas ao tempo de 24 h, considerando um aumento de somente 60 % no número de células em 48 horas, pode-se concluir que o OSR estimulou significativamente o fluxo glicolítico nas células não tumorais.

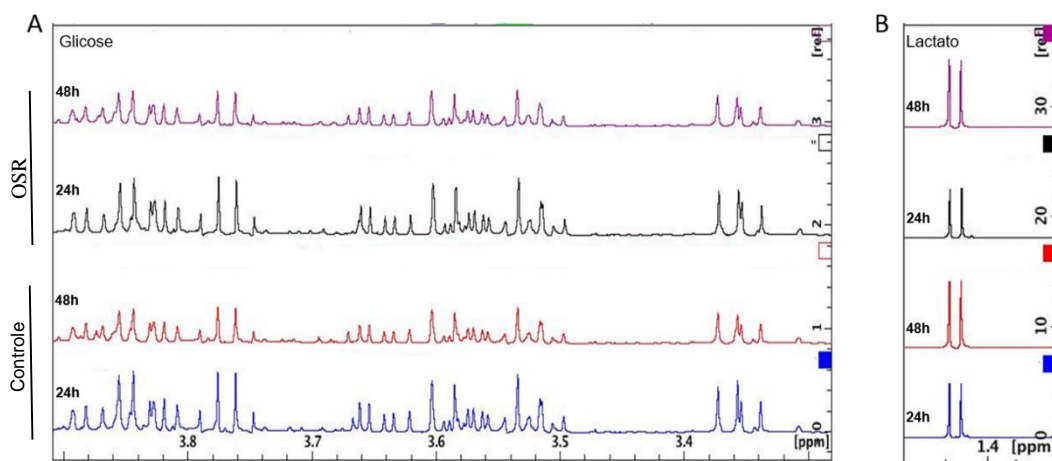


Figura 10 - OSR afetou o consumo de glicose e o acúmulo de lactato no meio de cultura pela célula MCF-10A. Região do espectro representativo de RMN ^1H correspondente aos sinais da glicose (A, 3,2-3,8 ppm) e lactato (B, 1,31 ppm) das células MCF-10A, controle (azul e vermelho) e tratadas com 0,5 mg/mL de OSR (preto e roxo) após 24 h (azul e preto) e 48 h (vermelho e roxo) de tratamento

O metaboloma intracelular das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear de prótons (^1H RMN). Na figura 11 estão apresentados os resultados do efeito do óleo de semente de romã sobre a concentração de intermediários metabólicos relacionados ao metabolismo oxidativo e ciclo de Krebs, a saber piruvato (Figura 11A), succinato (Figura 11B), fumarato (Figura 11C) e glutamato (Figura 11D) na linhagem celular MCF-7. É possível observar que há um efeito significativo do tempo sobre a concentração de piruvato, onde ambas as células controle e tratadas com OSR apresentaram redução neste metabólito. A redução após 48 horas em cultura na intensidade do piruvato foi 1,3 e 1,4 vezes nas células controle e incubadas com OSR, respectivamente. Não houve diferença significativa na intensidade do succinato entre os tempos 24 e 48 horas nas células controle nem nas células tratadas com OSR (figura 11 B), embora pareça aumentar em ambas as condições de forma concentração dependente. Quanto à intensidade do fumarato e

glutamato, é possível ver que não há diferença entre os tempos de incubação tanto nas células controle, quanto nas células tratadas. Por outro lado, com relação ao teor de glutamato, pode-se observar uma diminuição (não significativa) de 1,6 vezes nas células controle após 48 horas em cultura, quando comparado ao tempo de 24 h, sendo esse efeito menos pronunciado nas células tratadas com 0,5 mg/ml de óleo de semente de romã (Figura 11D).

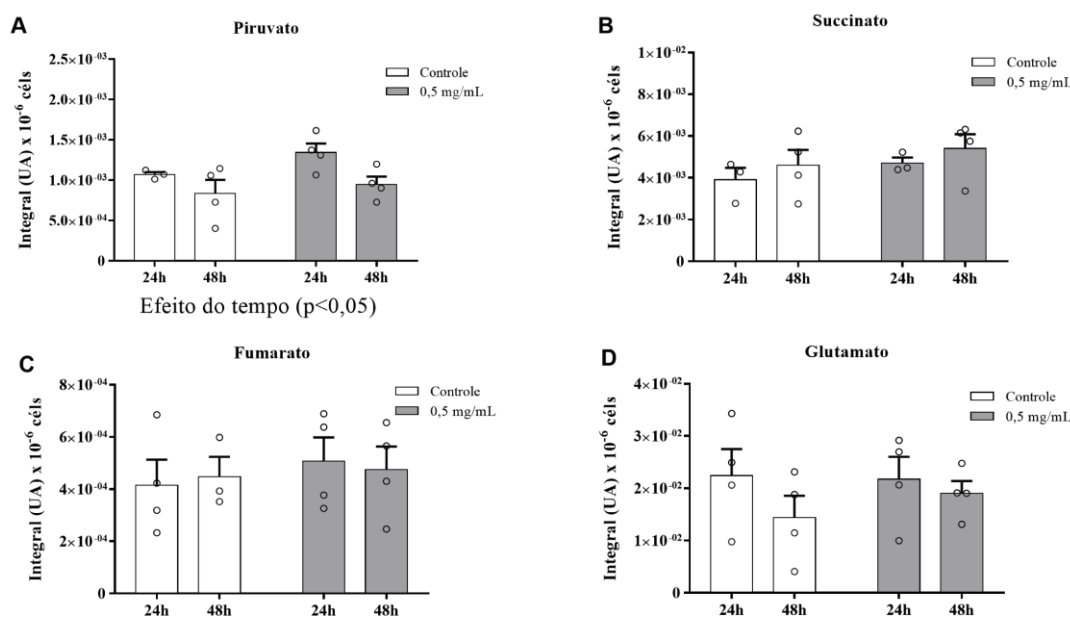


Figura 11 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade dos metabólitos piruvato, succinato, fumarato e glutamato na linhagem MCF-7. Intensidade de (A) piruvato, (B) succinato, (C) fumarato e (D) glutamato. A intensidade dos metabólitos foi determinada de acordo com a integral do pico e expressa relativo ao pico integral do DSS x 10⁶ células, proveniente do espectro de ¹H RMN. As células MDA-MB-231 controle tiveram o meio de cultura trocado, já as tratadas tiveram um meio de cultura trocado acrescido de 0,5 mg/ml de óleo de semente de romã. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. UA = Unidades Arbitrárias.

Na figura 12 são apresentados resultados do efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade dos mesmos intermediários metabólicos na linhagem MDA-MB-231. Há uma diminuição de cerca de 2,8 vezes na concentração de piruvato após 48 horas em cultura comparado ao tempo de 2 horas nas células controle (Figura 12A). O mesmo não foi observado nas células tratadas com 0,5 mg/ml de OSR. É possível observar um efeito significativo do fator tempo ($p < 0,05$) sobre a intensidade do succinato (Figura 12B), induzindo uma redução neste metabólito de cerca de 1,4 e 1,2 vezes nas células controle e incubadas com OSR, respectivamente. Adicionalmente, foi observado um efeito significativo da interação tempo x tratamento sobre o teor de glutamato (Figura 12D), com redução de 1,7 vezes em 24 h nas células incubadas com OSR comparadas ao controle. A intensidade do fumarato é igual entre

as células controle e tratada nos tempos de incubação (Figura 12C), além de, em ambas, haver uma diminuição da intensidade deste metabólito após 48 horas de incubação, quando comparado ao tempo de 24 horas.

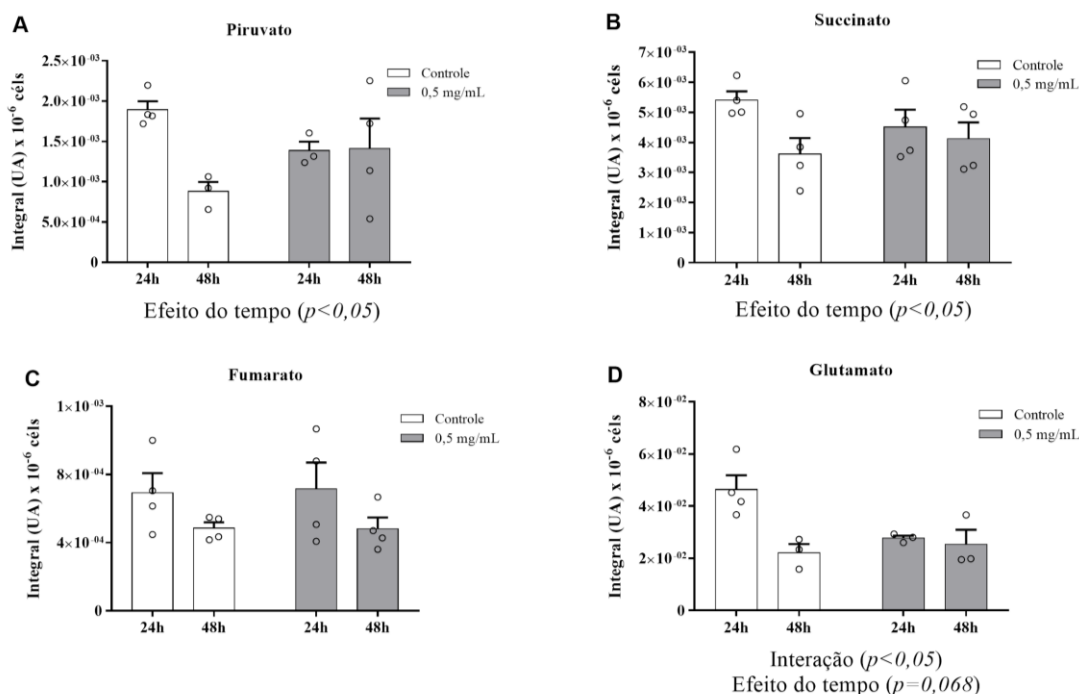


Figura 12 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de piruvato, succinato, fumarato e glutamato na linhagem MDA-MB-231. Intensidade de (A) piruvato, (B) succinato, (C) fumarato e (D) glutamato. A intensidade dos metabólitos foi determinada de acordo com a integral do pico e expressa relativo ao pico integral do DSS x 10⁶ células, proveniente do espectro de ¹H RMN. As células MDA-MB-231 controle tiveram o meio de cultura trocado, já as tratadas tiveram um meio de cultura trocado acrescido de 0,5 mg/ml de óleo de semente de romã. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. UA = Unidades Arbitrárias. Incluir informação sobre teste estatístico.

Os resultados do efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de piruvato, succinato e glutamato na linhagem celular MCF-10A é mostrado na figura 13. Nas células controle, há uma diminuição na concentração de piruvato após 48 horas de incubação, quando comparado ao tempo de 24 horas, enquanto nas células tratadas com OSR há um aumento (Figura 13A), porém com uma grande dispersão deste último dado. Ao comparar as células controle com as células tratadas com o OSR, pode-se ver que, no tempo de 24 horas a intensidade do piruvato nas células tratadas é menor do que nas células controle. Ambos os resultados não apresentaram diferença estatística. Com relação ao succinato (Figura 13B), houve um efeito significativo do tratamento do OSR, sendo observado um aumento tanto em 24 como em 48 horas de incubação ($p < 0,05$). Na figura 13C é possível observar que não há diferenças significativas na concentração de glutamato relacionadas ao tempo ou tratamento nas células MCF-10A. Cabe mencionar que não foi identificado o metabólito fumarato na

linhagem não tumoral MCF10-A, diferentemente das linhagens de carcinoma mamário humano.

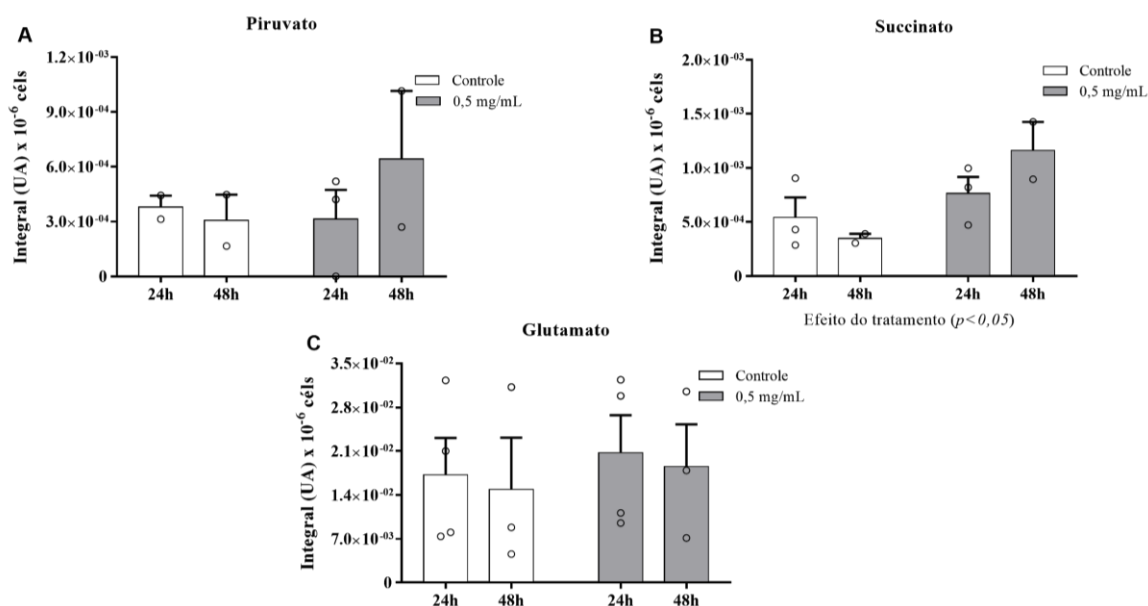


Figura 13 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a integral de piruvato, succinato e glutamato na linhagem MCF-10A. Intensidade de (A) piruvato, (B) succinato e (C) glutamato. A intensidade dos metabólitos foi determinada de acordo com a integral do pico e expressa relativo ao pico integral do DSS x 10⁶ células, proveniente do espectro de ¹H RMN. As células MCF-10A controle tiveram o meio de cultura trocado, já as tratadas tiveram um meio de cultura trocado acrescido de 0,5 mg/ml de óleo de semente de romã. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. UA = Unidades Arbitrárias.

Na figura 14 estão apresentados os resultados do efeito do óleo de semente de romã sobre a concentração de metionina, glicina, formato, colina, FC+GFC, metabólitos relacionados ao metabolismo de um-carbono (1C), na linhagem celular MCF-7. O tempo exerce um efeito significativo sobre a intensidade destes metabólitos, exceto do formato. É possível observar redução significativa na intensidade da metionina, glicina, colina, fosfocolina e glicerosfosfocolina nas células controle (1,4, 1,3, 2,2 e 1,7 vezes, respectivamente) e tratadas com OSR (1,9, 1,2, 2,0 e 2,3 vezes, respectivamente) após 48 horas de incubação quando comparado ao tempo de 24 horas da mesma condição. Não houve efeito da variável incubação com o óleo de semente de romã sobre esses metabólitos.

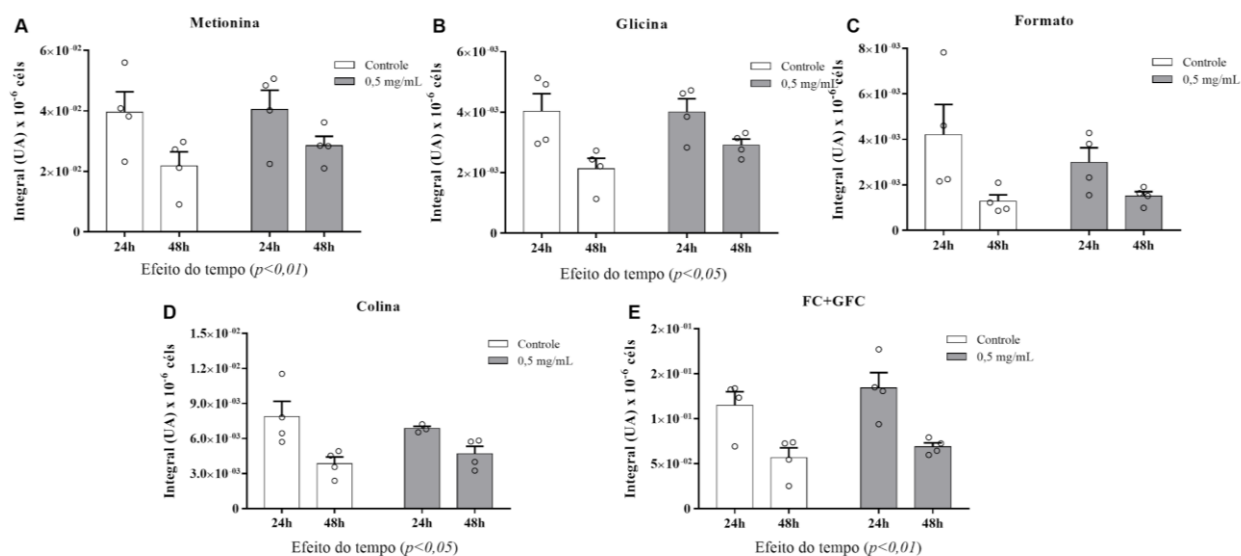


Figura 14 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de metabólitos do metabolismo de 1-carbono na linhagem MCF-7. Intensidade de (A) metionina, (B) glicina, (C) formato, (D) colina e (E) FC+GFC. A intensidade dos metabólitos foi determinada de acordo com a integral do pico e expressa relativo ao pico integral do DSS x 10⁶ células, proveniente do espectro de 1H RMN. As células MCF-7 controle tiveram o meio de cultura trocado, já as tratadas tiveram um meio de cultura trocado acrescido de 0,5 mg/ mL de óleo de semente de romã. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. UA = Unidades Arbitrárias; FC= fosfocolina; GFC= glicerosfosfocolina.

Os resultados apresentados na figura 15, correspondem ao efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade dos mesmos metabólitos supracitados, na linhagem MDA-MB-231. Assim como observado nas células MCF-7, há um efeito significativo do tempo em cultura sobre a concentração desses compostos, à exceção da colina ($p=0,057$) e da glicina. Metionina, formato, colina e FC+GFC, apresentaram redução em função do tempo. Vale ressaltar que, mesmo sem diferenças significativas, houve uma diminuição de 1,8 vezes da concentração da metionina nas células controle após 48 horas de incubação, quando comparado ao tempo de 24 horas, o que não foi observado nas células tratadas com o OSR. Adicionalmente, o teor de metionina após 24 horas de incubação com o OSR parece ser menor quando comparado ao das células controle 24 h (Figura 15A). Da mesma forma, o teor de FC+GFC parece ser menor nas células incubadas com OSR no tempo de 24 horas, quando comparado ao teor nas células controle (Figura 15D).

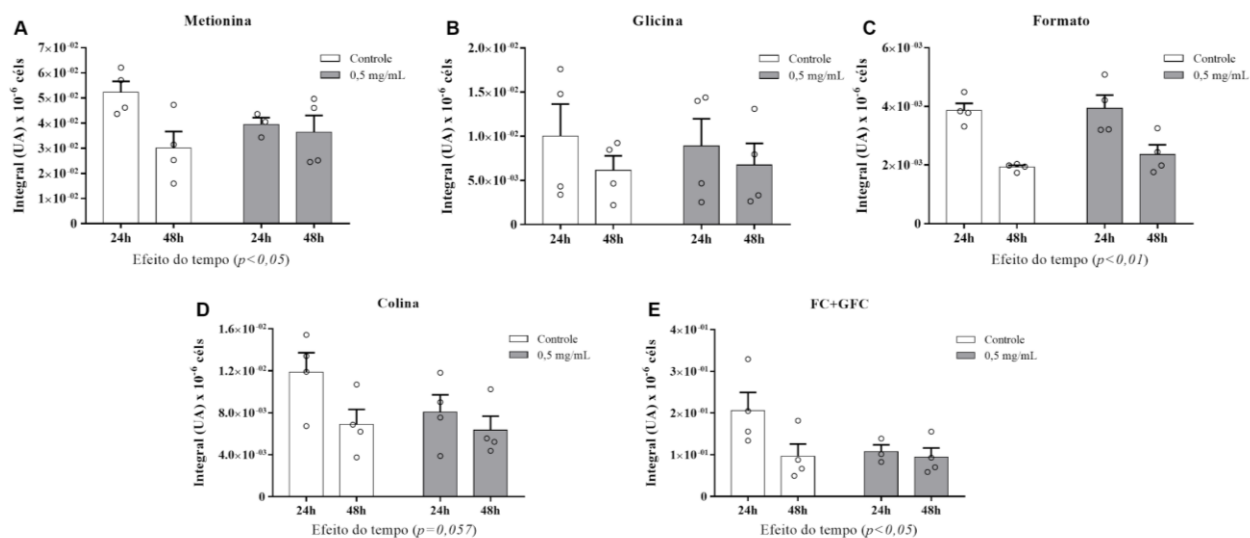


Figura 15 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de metabólitos do metabolismo de 1-carbono na linhagem MDA-MB-231. Intensidade de (A) metionina, (B) glicina, (C) formato, (D) colina e (E) fosfocolina e glicerosfosfocolina. A intensidade dos metabólitos foi determinada de acordo com a integral do pico e expressa relativo ao pico integral do DSS x 10⁶ células, proveniente do espectro de 1H RMN. As células MDA-MB-231 controle tiveram o meio de cultura trocado, já as tratadas tiveram um meio de cultura trocado acrescido de 0,5 mg/mL de óleo de semente de romã. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. UA = Unidades Arbitrárias; FC = Fosfocolina; GFC = Glicerosfosfocolina.

Por fim, na figura 16 estão apresentados os resultados do efeito do óleo de semente de romã sobre a concentração de metionina, glicina, formato, colina, FC+GFC na linhagem celular MCF-10A. Nenhum efeito do tempo nem do tratamento foi observado, possivelmente por conta da grande dispersão dos resultados obtidos para esses metabólitos nesta linhagem células. Entretanto, vale ressaltar um ligeiro aumento no teor de FC+GFC nas células incubadas com o OSR em 24 h, comparadas às células controle no mesmo tempo (Figura 16E). Já na concentração dos metabólitos formato, colina e fosfocolina e glicerosfosfocolina, observa-se uma diminuição na intensidade no maior tempo de incubação, tanto nas células controle, quanto nas células tratadas, ambos sem diferença estatística.

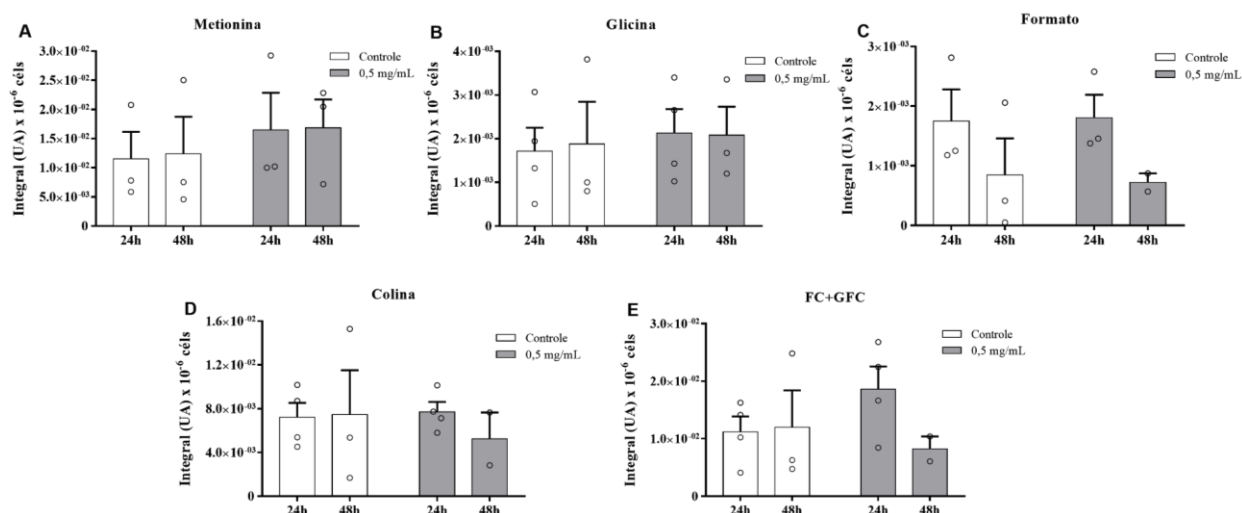


Figura 16 - Efeito do óleo de semente de romã sobre a intensidade de metabólitos do metabolismo de 1-carbono na linhagem MCF-10A. Intensidade de (A) metionina, (B) glicina, (C) formato, (D) colina e (E) fosfocolina e glicerosfosfocolina. A intensidade dos metabólitos foi determinada de acordo com a integral do pico e expressa relativo ao pico integral do DSS x 10⁶ células, proveniente do espectro de ¹H RNM. As células MCF-10A controle tiveram o meio de cultura trocado, já as tratadas tiveram um meio de cultura trocado acrescido de 0,5 mg/mL de óleo de semente de romã. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças foram consideradas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey. UA = Unidades Arbitrárias; FC = Fosfocolina; GFC = Glicerosfosfocolina.

Por fim destaca-se na figura 17 o metabólito 3-hidroxiбутирато (3-OHB). O tratamento com OSR levou a um maior acúmulo de 3-hidroxiбутирато (3-OHB) nas linhagens MDA-MB-231 (Figura 17 B) e MCF-10A (Figura 17 C) após 48 horas de incubação com o óleo, sendo a primeira 1,5 vezes e a segunda 2,5 vezes maior do que seu próprio controle. O mesmo não foi observado na linhagem MCF-7.

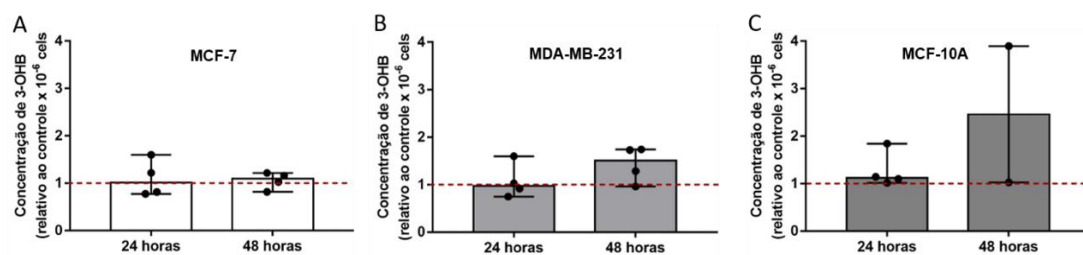


Figura 17 - OSR levou ao acúmulo de 3-Hidroxiбутирато (3-OHB) nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A. Concentração, relativa ao controle, do 3-hidroxiбутирато (3-OHB) nas linhagens MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e MCF-10A (C) tratadas com 0.5 mg/mL de OSR após 24h e 48h de tratamento. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças no perfil de ácidos graxos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA de duas vias seguida de pós teste de Tukey.

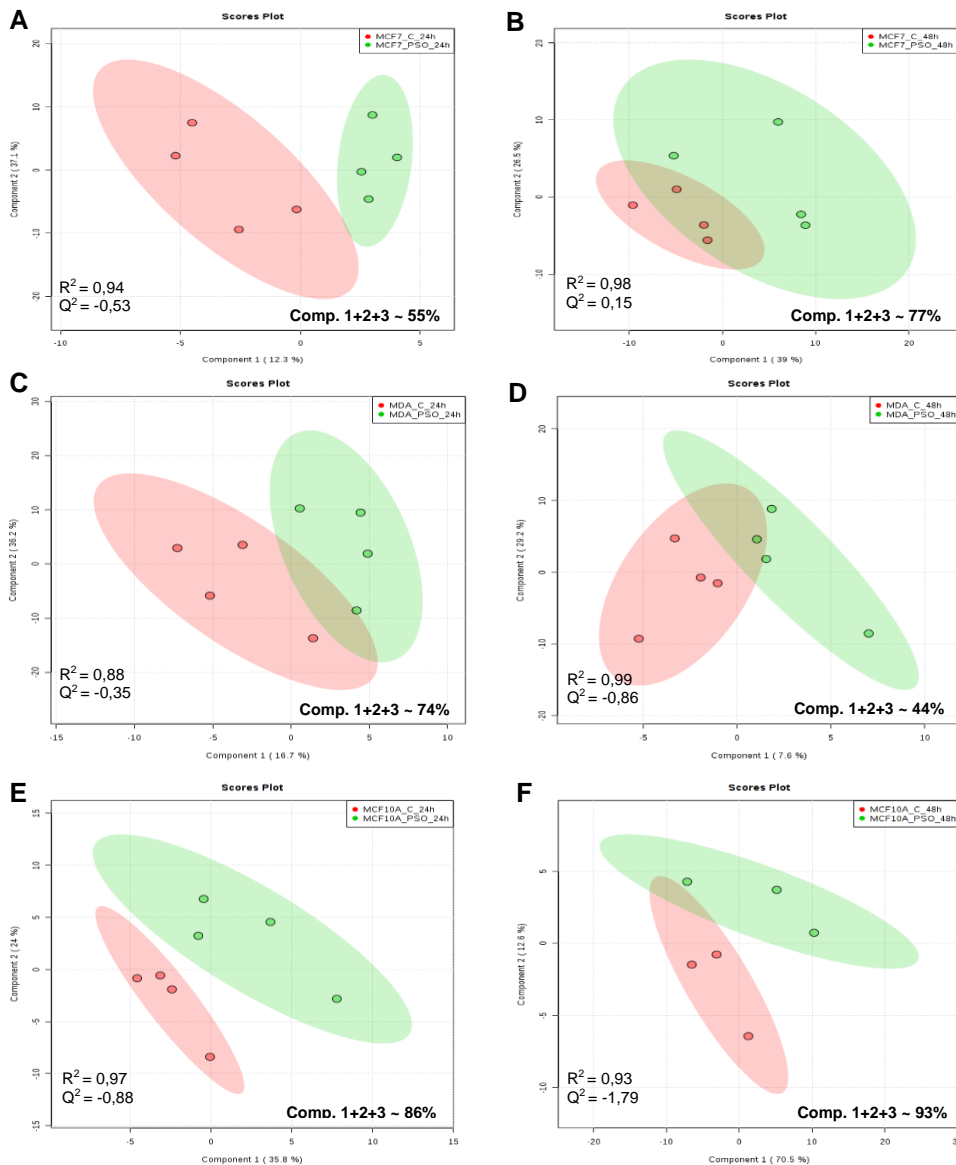


Figura 18 - Análise PLS-DA 2D, para os componentes 1 e 2 das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A.

Análises estatísticas multivariadas foram feitas para investigar possíveis diferenças globais no perfil metabólico, como mostrado nas plotagens de score PLS-DA (Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais) (Figura 18). A qualidade do modelo pode ser analisada pelos R^2 e Q^2 cumulativos, indicando a qualidade do ajuste e seu poder preditivo, respectivamente. Na figura 18, é possível observar que a soma dos componentes PLS-DA 1, 2 e 3 é capaz de explicar pelo menos 55%, 44% e 86% da variação dos metabólitos nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A, respectivamente. Apesar disso e dos valores de R^2 estarem próximos de 1, os valores de Q^2 estão próximos de zero, mostrando que o modelo não é preditivo. No entanto, os metabólitos indicados como responsáveis pela separação entre as linhagens celulares controle e tratadas, possibilitaram um melhor entendimento dos resultados das análises de metabolômica. Em todas as linhagens foi observada uma diminuição de NAD^+ , sugestivo de

um possível dano mitocondrial. Além disso, na linhagem MDA-MB-231, houve diminuição do IMP, que pode estar ligado a diminuição da proliferação nesta linhagem, e diminuição de aspartato e serina, mostrando que o metabolismo de nucleotídeos pode estar afetado nestas células. Na MCF-10A, além da diminuição do aspartato e glicose, foi observado um acúmulo de glutamina.

4.4. Tratamento com OSR modifica o perfil de ácidos graxos das células tumorais e não tumoral

O perfil de ácidos graxos saturados e insaturados foi quantificado nas linhagens celulares tumorais e não tumoral por cromatografia gasosa. De modo geral, os dados analisados indicam modificações sutis no perfil de ácidos graxos das células quando tratadas com o óleo de semente de romã. Na figura 19 está apresentada a distribuição das classes de ácidos graxos: saturados (AGS), mono (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) nas linhagens. A distribuição de ácidos graxos saturados e insaturados não varia muito entre as linhagens e condições, embora na linhagem MCF-7 parecer ter mais ácido graxo monoinsaturado e menos poli-insaturado que as demais linhagens. Além disso, na linhagem MDA-MB-231, o tratamento com o óleo exerceu efeito significativo na classe de AG monoinsaturados, diminuindo-o. Na linhagem não tumoral (MCF-10A) tratada com OSR por 48 horas houve uma diminuição dos AGS, ao passo que os AGPI apresentaram um aumento.

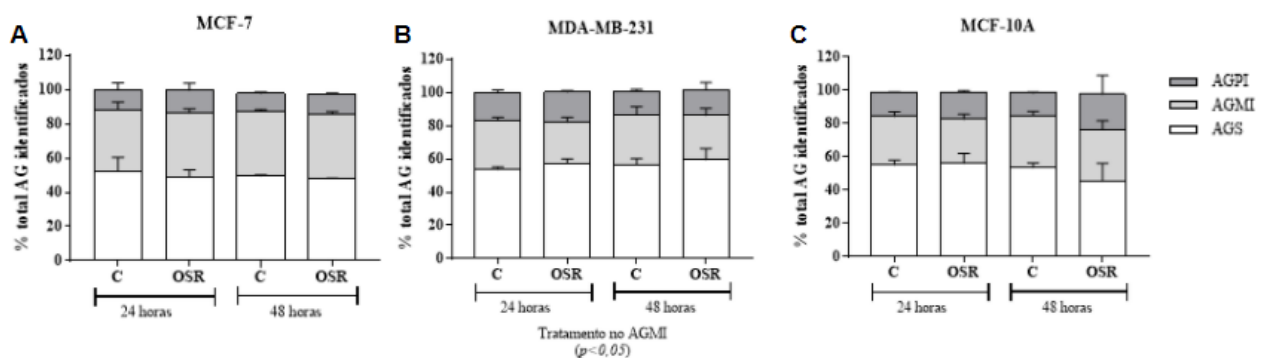


Figura 19 – Distribuição das classes de ácidos graxos das linhagens celulares em percentual do total dos ácidos graxos identificados. Os percentuais dos ácidos graxos saturados (AGS), mono (AGMI) e poli-insaturados (AGPI) – no gráfico apresentados nas cores branca, cinza claro e escuro, respectivamente – foram calculados a partir do total de ácidos graxos identificados nas células MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e MCF-10A (C) que foram incubadas com 0.5 mg/mL de óleo de semente de romã (OSR) ou tiveram seu meio trocado (controle) após 24h e 48h de incubação. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças no perfil de ácidos graxos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

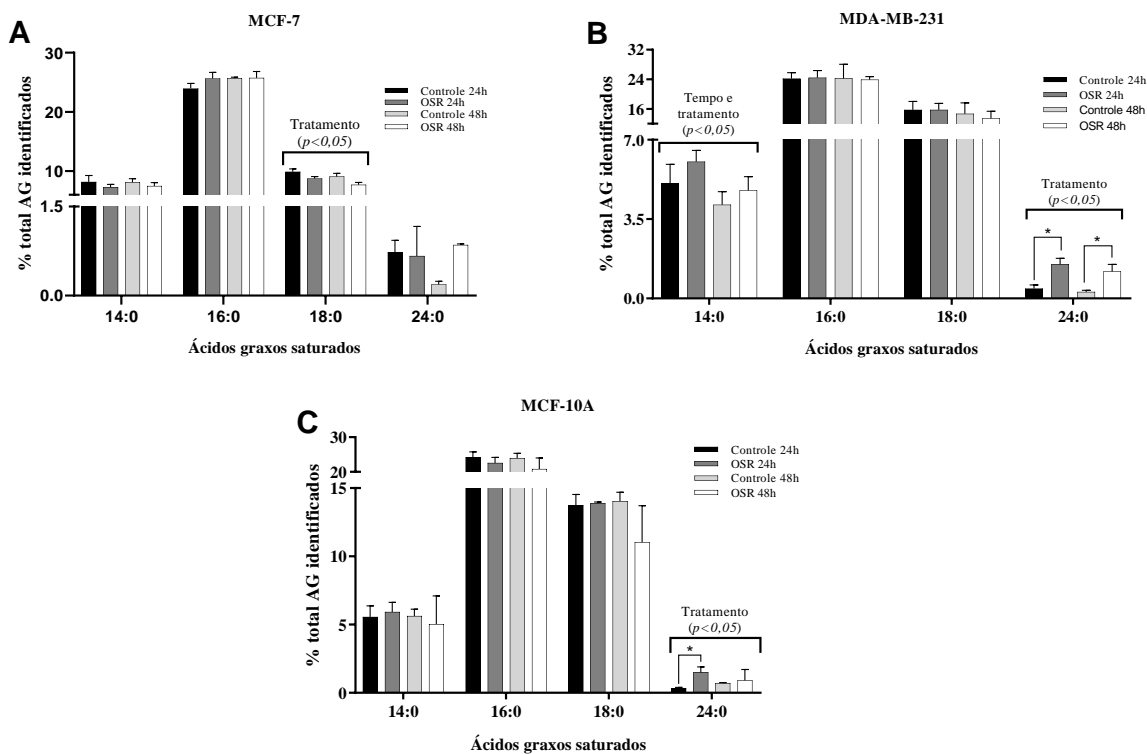


Figura 20 - Perfil de ácidos graxos saturados das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A controle e incubadas com OSR. As células controle (barras pretas e cinza claro) e tratadas com 0,5 mg/ mL de OSR (barras cinza escuro e branco) foram incubadas por 24 (barras preta e cinza escuro) e 48 horas (barras cinza claro e branca) e o perfil de ácidos graxos saturados das linhagens (A) MCF-7, (B) MDA-MB-231 e (C) MCF-10A foram quantificados por cromatografia gasosa. Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Diferenças no perfil de ácidos graxos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

O perfil de ácidos graxos saturados das linhagens estudadas está mostrado na figura 20. O ácido palmítico (16:0) foi o ácido graxo saturado majoritário em todas as linhagens, seguido pelo ácido esteárico (18:0). Na linhagem MCF-7 há efeito do tratamento apenas no ácido esteárico, onde tanto no tempo de 24 h, quanto 48 h, as células tratadas com o OSR apresentaram diminuição (figura 20A). Já na outra linhagem tumoral, MDA-MB-231, foi observado um efeito significativo na análise de variância (ANOVA) do tempo e tratamento ou somente do tratamento nos ácidos mirístico (14:0) e lignocérico (24:0), respectivamente, este último tendo diferença no pós-teste quando as células foram tratadas com o OSR em relação ao controle. Na MCF-10A também foi observado um aumento no teor do 24:0, apresentando efeito significativo do fator tratamento pela análise por ANOVA, sendo o efeito mais acentuado após 24 horas de incubação.

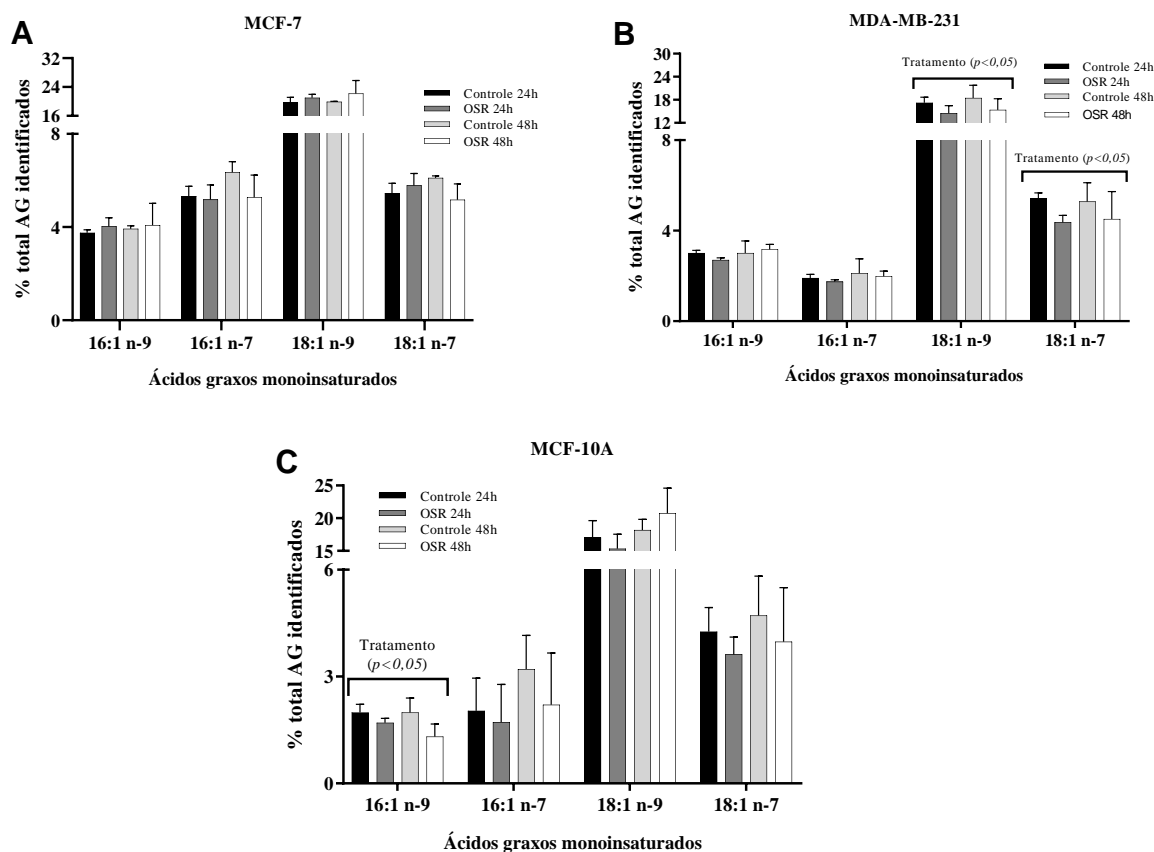


Figura 21 - Perfil de ácidos graxos monoinsaturados das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A controle e incubadas com OSR. As células controle (barras pretas e cinza claro) e tratadas com 0,5 mg/ mL de OSR (barras cinza escuro e branco) foram incubadas por 24 (barras preta e cinza escuro) e 48 horas (barras cinza claro e branca) e o perfil de ácidos graxos saturados das linhagens (A) MCF-7, (B) MDA-MB-231 e (C) MCF-10A foram quantificados por cromatografia gasosa. Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Diferenças no perfil de ácidos graxos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

Dentre os ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oleico (18:1 n-9) foi o majoritário nas linhagens tumorais e não-tumoral. Além disso, nota-se também que o teor de ácido palmítoleico (16:1 n-7) é maior na linhagem MCF-7 quando comparado às demais linhagens. Não foi observada alteração no perfil de ácidos graxos insaturados da linhagem MCF-7 quando as mesmas foram tratadas com o OSR, independente do tempo de incubação (Figura 21A e 22A) Já na linhagem MDA-MB-231, o tratamento com o OSR levou a uma diminuição significativa no perfil dos ácidos oleico e 18:1 n-7 no teste ANOVA, apesar de não ter dado significativo nas múltiplas comparações do pós teste. Na linhagem não tumoral, o fator tratamento exerceu efeito apenas sobre o ácido hexadecanóico (16:1 n-9), diminuindo o teor deste ácido graxo em ambos os tempos de incubação.

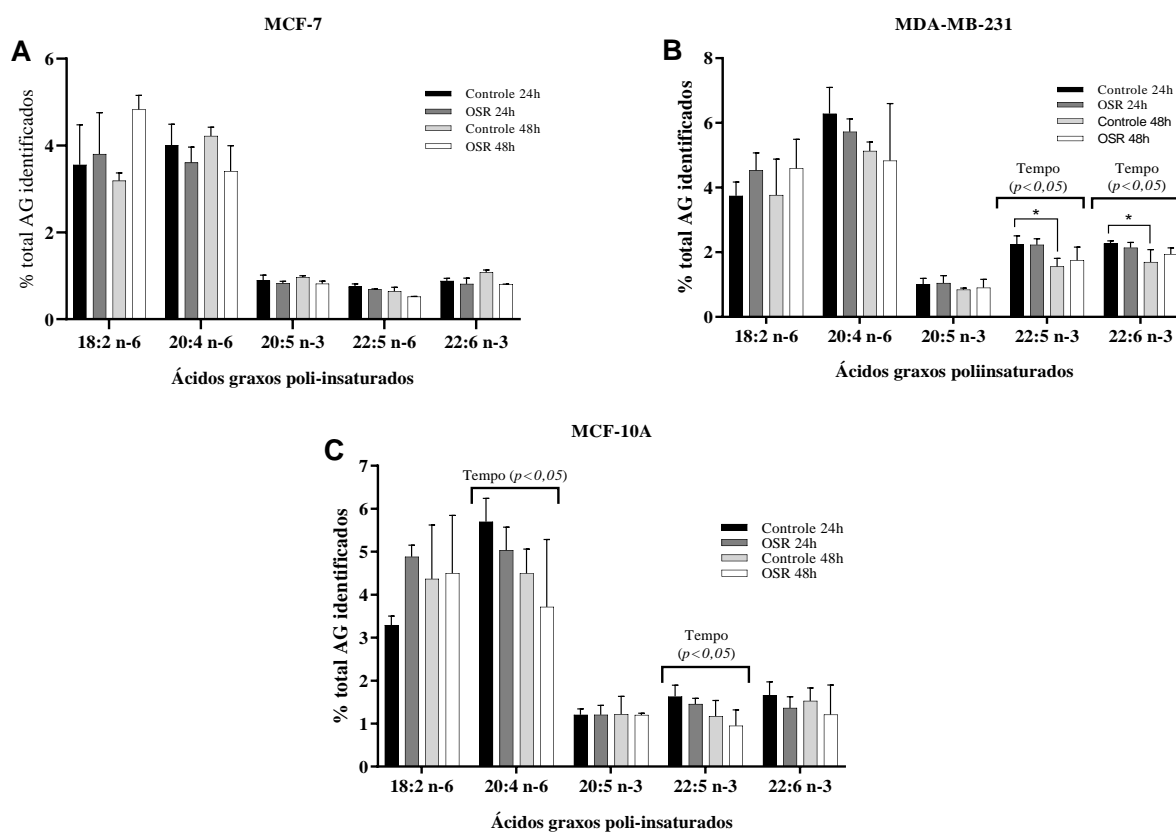


Figura 22 - Perfil de ácidos graxos poli-insaturados das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A controle e incubadas com OSR. As células controle (barras pretas e cinza claro) e tratadas com 0,5 mg/ mL de OSR (barras cinza escuro e branco) foram incubadas por 24 (barras preta e cinza escuro) e 48 horas (barras cinza claro e branca) e o perfil de ácidos graxos saturados das linhagens (A) MCF-7, (B) MDA-MB-231 e (C) MCF-10A foram quantificados por cromatografia gasosa. Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Diferenças no perfil de ácidos graxos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA seguida de pós teste de Tukey.

Na figura 22 estão apresentados os perfis de ácidos graxos poli-insaturados das linhagens estudadas. Foi observado um efeito do tempo sobre o perfil dos ácidos docosapentanoico (22:5 n-3, DPA) e docosahexadecanoico (22:6 n-3, DHA) no teste estatístico da ANOVA na linhagem MDA-MB-231 e, além disso, no pós teste de Tukey nas células controle 48 h o teor de ambos os ácidos graxos foi significativamente menor, quando comparado ao controle 24 h. Na linhagem MCF-10A houve efeito significativo do tempo nos teores dos ácidos araquidônico (20:4 n-6, AA) e DPA.

Além das variações no perfil de ácidos graxos individuais nas células, foram calculadas razões a fim de entender melhor as vias intracelulares que podem estar levando a essas alterações. Na figura 23 são apresentados os resultados destas razões. Na linhagem MCF-7 foi observada uma maior utilização do ácido esteárico (18:0) tanto para oxidação, sendo convertido em ácido palmítico, quanto para sua insaturação, sendo convertido em ácido oleico, tendo influência significativa do tempo ou do tempo e do tratamento, respectivamente, no teste

ANOVA (figura 23A e B). Nesta linhagem, ainda, o ácido linoleico parece ser menos metabolizado em ácido araquidônico que as células controle, sendo quase 2 vezes menor, embora esta variação não seja estatisticamente significativa.

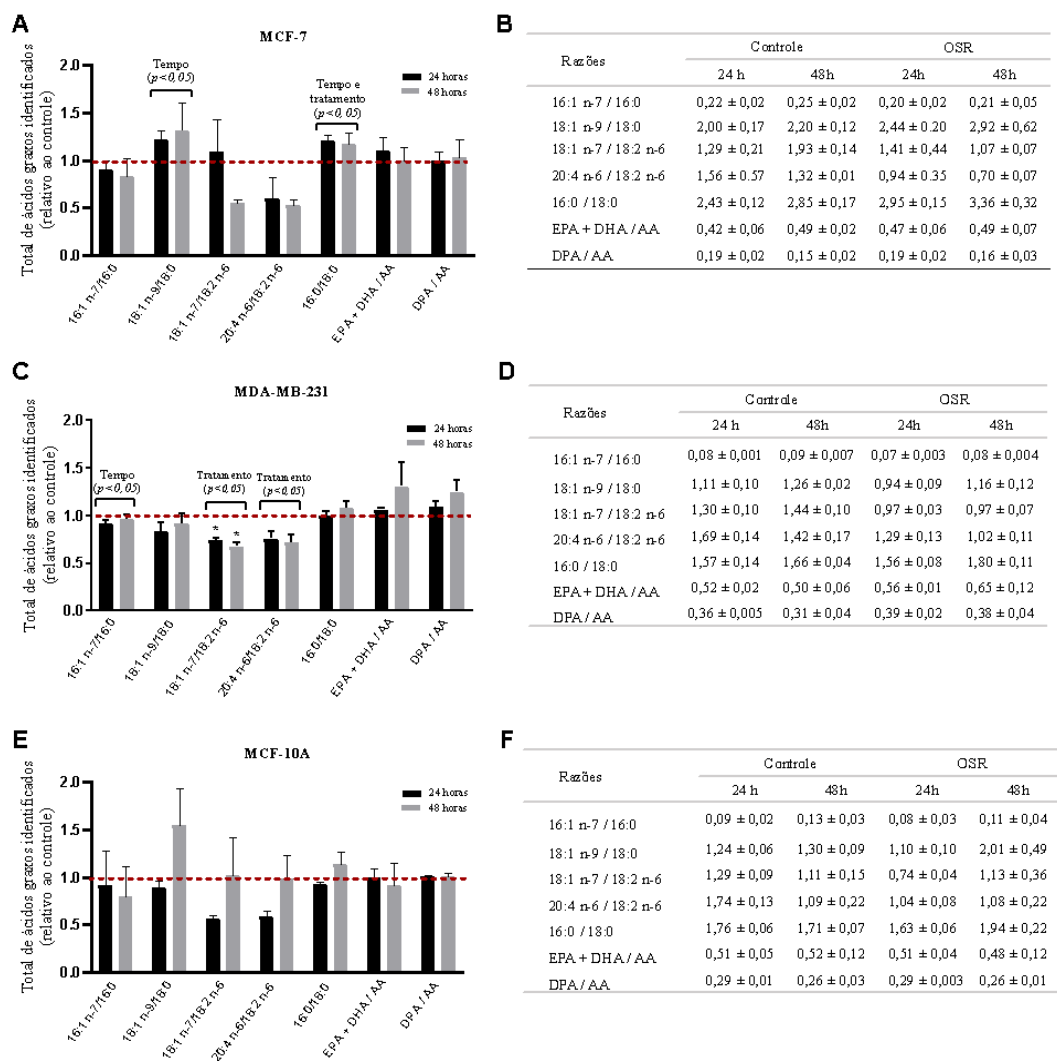


Figura 23 - Razão de ácidos graxos nas células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A tratadas com OSR relativo ao controle. As células foram incubadas com 0,5 mg/mL de OSR por 24 ou 48 horas e os lipídios foram extraídos e analisados por cromatografia gasosa, assim como descrito nos métodos. As razões foram calculadas a partir do teor de ácidos graxos identificados e expressas relativo ao controle – A, C e E – e em valores absolutos – B, D e F, respectivamente. Todos os dados são apresentados como média ± erro padrão. Diferenças no perfil de ácidos graxos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ na análise ANOVA seguida de pós teste de Tukey. O símbolo * foi usado quando as células tratadas com OSR foram estatisticamente diferentes dos seus respectivos controles ($p < 0,05$).

O fator tempo levou a uma menor conversão do ácido palmítico em ácido palmitoleico na linhagem MDA-MB-231 (figura 23C). O fator tratamento influenciou significativamente as razões que convertem o ácido linoléico em ácido vacênico e ácido araquidônico, diminuindo-as comparadas ao controle. A razão 18:1 n-7/18:2 n-6 nas células MDA tratadas com o OSR após 24 e 48 horas de incubação foi significativamente menor do que nas células controle nas

análises múltiplas. Não houve diferença significativa nas razões de ácidos graxos na linhagem não tumoral, MCF-10A (figura 23 E e F).

O 18:1 n-7, *cis*- vacênico, possivelmente é a configuração mais abundante nas amostras deste estudo. Entretanto, como a coluna utilizada nas análises de cromatografia não separa os isômeros *cis* e *trans*, pode-se sugerir que uma pequena fração do pico indicado como 18:1 n-7 seja 18:1-11,*trans*, que corresponde ao *trans*-vacênico. Ácido linoleico, através de biohidrogenação no rúmen, após sua conversão CLA, pode ser convertido em ácido *trans*-vacênico. Desta forma, com o intuito de entender a relação e possivelmente investigar a interconversão de CLnA, provenientes do OSR, em CLA, avaliamos a correlação do teor do AG 18:1 n-7, em função do teor de 18:2 n-6 (Figura 24) e de seu produto AA (Figura 25). Não foi observada uma correlação entre estes ácidos graxos analisando todos os grupos experimentais, exceto nas células tratadas com óleo de semente de romã após 24 horas de incubação na linhagem MDA-MB-231 (figura 24). Já a correlação entre ácido vacênico e ácido araquidônico foi positiva e significativa nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 quando considerado o grupo todo e na condição controle da MDA-MB-231 após 48 horas de incubação (Figura 25). Nenhuma correlação foi encontrada na linhagem não tumoral entre os ácidos graxos supracitados.

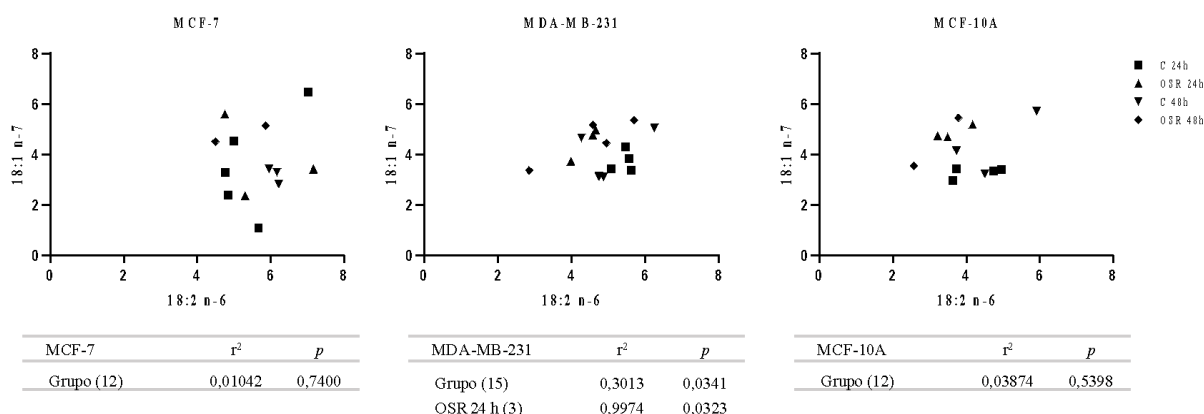


Figura 24 - Correlação entre os ácidos graxos 18:1 n-7 e 18:2 n-6. A correlação entre os ácidos vacênico e linoleico foi calculada nas linhagens celulares MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e MCF-10A (C) e os valores de r² e p são mostrados na tabela (D).

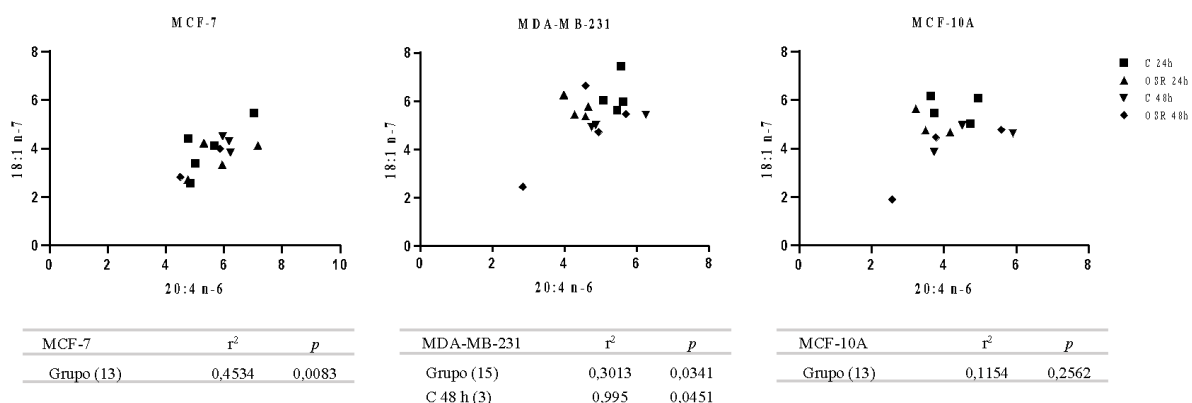


Figura 25 – Correlação entre os ácidos graxos 18:1 n-7 e 20:4 n-6. A correlação entre os ácidos vacênico e araquidônico foi calculada nas linhagens celulares MCF-7 (A), MDA-MB-231 (B) e MCF-10A (C) e os valores de r^2 e p são mostrados na tabela (D).

5. Discussão

A romã é um fruto rico em compostos bioativos, dentre eles os isômeros do ácido alfa-linolênico conjugado, que exercem efeito benéfico à saúde humana, apresentando atividade antitumoral, antioxidante, dentre outros. Os isômeros presentes neste óleo que já foram descritos na literatura são os ácidos punícico, alfa-eleosteárico, beta-eleosteárico e catálpico (Bishayee et al, 2011; Melo et al, 2014). Na análise do perfil de ácidos graxos do óleo de semente de romã foram detectados 18 ácidos graxos, sendo 6 % correspondente aos ácidos graxos saturados e 94 % dos ácidos graxos insaturados, dos quais os isômeros do ácido alfa-linolênico os ácidos graxos majoritários, equivalendo à 83,2 % do óleo, onde 63,5 % correspondia ao ácido punícico, 7,6 % ao ácido α -eleosteárico, 4,1 % ao ácido catálpico, 1,5 % ao ácido β -eleosteárico, além de cerca de 6,4 % ser correspondente a CLnAs não identificados. Esse está em conformidade com o já descrito em outros estudos que observaram pelo menos 70 % de ácido punícico, que é o majoritário dentre os isômeros do ácido alfa-linoleico, no óleo de semente de romã (KÝRALAN *et al*, 2009; SASSANO *et al*, 2009; MELO *et al*, 2014; VERARDO *et al*, 2014). A partir da comprovação da composição do óleo rica em isômeros conjugados do ácido alfa linolênico, foi testada uma possível atividade biológica antitumoral do óleo de semente de romã em células de carcinoma mamário humano com metabolismos diferentes – MCF-7, mais oxidativa, e ER+; e MDA-MB-231, mais glicolítica e triplo negativa – e em uma linhagem não tumoral de mama (MCF-10A).

O OSR diminuiu significativamente a viabilidade de ambas as células de carcinoma de forma concentração e tempo-dependente, sendo a MDA-MB-231 a mais sensível, que apresentou uma diminuição de 60 % e 70 % na viabilidade, enquanto MCF-7, mostrou uma

diminuição de 22 % e 30 % após 24 e 48 h de tratamento (Figura 7A e 7B), respectivamente, com a maior concentração do OSR. No entanto, fato não esperado, o óleo também causou a diminuição da viabilidade da linhagem não tumoral, MCF-10A, sendo ainda mais pronunciada do que nas linhagens tumorais, tendo uma diminuição máxima de 59 % da viabilidade após a exposição com 2,0 mg/mL de OSR por 24h, e de 87 % na mesma concentração do OSR com maior tempo (Figura 7C). A diminuição da viabilidade das linhagens foi acompanhada por uma diminuição no número de células (Figura 7D – F), também de forma concentração e tempo dependente, sendo a mais afetada a linhagem não tumoral, com redução quase total do número de células, seguida da tumoral mais agressiva (MDA-MB-231), com diminuição de 84 % do número de células e a MCF-7, a menos afetada, com redução de cerca de 70 % do número de células, corroborando com o experimento de viabilidade celular.

Com o intuito investigar possíveis alterações metabólicas promovidas pelo OSR que tenham precedido a diminuição da viabilidade celular e do número de células, o próximo passo foi investigar o perfil de metabólitos dessas linhagens, exometaboloma e metabólitos intracelulares, utilizando a menor concentração do OSR, aquela que apresentou efeito mais atenuado em ambos os tempos de tratamento (24 e 48h). Os metabólitos extra e intracelulares das linhagens MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear ^1H (RMN). Um total de 40 metabólitos foram identificados, cujos dados foram processados e analisados.

Os espectros representativos apresentados na figura 8 mostram regiões referentes aos deslocamentos químicos dos ^1H da glicose e ^1H lactato no meio de cultura das células MCF-7. É possível observar que há uma diminuição da quantidade de glicose no meio de cultura após 48 h de incubação nas células controle, acompanhando um aumento de cerca de 2,5 vezes do número de células (Figura 7 D). Ou seja, a quantidade de glicose captada em função da proliferação das células parece permanecer constante. Uma diminuição semelhante é observada nas células tratadas, porém o número de células após 48 horas com OSR é semelhante a 24 h, o que sugere que a incubação está aumentando a capacidade dessas células de captarem glicose. O mesmo perfil de variação é observado com o sinal do lactato, tendo um aumento com 48 horas em ambas as células controle e tratadas com OSR. E, da mesma forma, o acúmulo de lactato após 48 h com OSR é mais acentuado quando considerado o número de células. Esses dados indicam que, apesar de uma redução não significativa de 20-30 % na viabilidade dessas células (Figura 7 A), o OSR promoveu alterações no metabolismo de glicose, indicando que

essas células estão utilizando a glicólise anaeróbica como via para síntese de ATP e precursores biosintéticos. Essas alterações podem ser um indício de um possível efeito do OSR sobre a mitocôndria e metabolismo oxidativo.

Na linhagem MDA-MB-231, a diminuição dos sinais correspondentes aos ^1H da glicose no meio de cultura em 48 h é ainda mais acentuada do que na MCF-7, o que se dá pelo fato da primeira linhagem ser mais glicolítica (Figuras 9 e 10). Da mesma forma, a intensidade do sinal do lactato também é maior nessa linhagem, corroborando seu perfil mais glicolítico. O mesmo perfil de variação foi observado nas células incubadas com OSR, *i.e.*, aumento do consumo de glicose e do acúmulo de lactato no meio de cultura. Levando em consideração que as células incubadas 48 h com OSR apresentaram redução de 1,7 vezes no número de células com relação ao respectivo controle, sugere-se, que o OSR promoveu aumento no metabolismo glicolítico anaeróbico sugestivo de alteração nas vias oxidativas/mitocondriais – assim como observado na linhagem MCF-7. Importante comentar que a incubação com 0,5 mg/mL OSR promoveu diminuição significativa na viabilidade dessas células (figura 7 B).

Na análise do meio de cultura das células MCF-10A (Figura 10) pode-se observar que, quando comparada com as linhagens tumorais, apesar de haver uma diminuição na intensidade dos sinais de ^1H de glicose em 48 h, esta é mais atenuada nessa linhagem. No entanto, a capacidade de captação de glicose dessas células, quando tratadas com OSR, parece estar aumentada se considerado o número de células, já que o OSR promoveu redução de cerca de 3,3 vezes comparado ao controle 48h (Figura 7 F). Da mesma forma, o acúmulo de lactato foi mais acentuado nessas células tratadas, levando em consideração a diferença no número de células. Dado que a redução na viabilidade pela incubação com 0,5 mg/mL OSR foi mais pronunciada nessa linhagem (figura 7 C), pode-se sugerir que há uma associação entre citotoxicidade do OSR e aumento do metabolismo glicolítico anaeróbico – sugestivo de forte disfunção mitocondrial. Existem evidências que compostos que são direcionados a mitocôndria podem ter efeitos anti-tumoral mais acentuado, visto que o impacto sobre as vias de produção de ATP e regulação de morte celular por esta organela impactam diretamente a proliferação de células tumorais. Esses estudos tratam particularmente de compostos polares ou que direcionam para a mitocôndria, tais como compostos polifenólicos (DE SALES *et al.*, 2018) e 3-bromo piruvato (DA SILVA *et al.*, 2009), por exemplo. Por outro lado, estudos com compostos lipídicos sendo direcionados a mitocôndria, particularmente óleos, são escassos.

O próximo conjunto de resultados refere-se à análise dos metabólitos intracelulares. Nas figuras 13, 14 e 15 foram mostradas as variações de intensidade dos metabólitos mitocondriais piruvato, succinato, fumarato e glutamato. Na linhagem MDA-MB-231, o OSR induziu uma diminuição do conteúdo de glutamato, particularmente em 24 horas. Esse resultado pode ser sugestivo de uma diminuição da metabolização de glutamina e consequente conversão em glutamato, reforçando a hipótese que o OSR afeta o metabolismo mitocondrial dessas linhagens de carcinoma mamário humano. Uma redução na metabolização de glutamina é descrita na literatura como um mecanismo anticâncer importante, visto a importância deste aminoácido para a proliferação e sinalização tumoral (OBRE e ROSSIGNOL, 2015).

Pode-se observar que a linhagem MCF-10A apresentou aumento de 1,5 vezes de succinato em 48 horas (figura 13 C), o que não foi observado nas outras linhagens. Adicionalmente, não foi possível detectar fumarato nessa linhagem, diferentemente do observado na MDA-MB-231 e na MCF-7, à exceção do tempo de 48 horas. Possivelmente a concentração deste metabólito é inferior à sensibilidade de detecção desta técnica, que é baixa. Entretanto, este resultado indica que sua concentração na linhagem MCF-10A é inferior a encontrada nas outras linhagens. Dado que succinato é convertido em fumarato pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase na cadeia transportadora de elétrons, esses resultados corroboram a hipótese de que o OSR pode estar atingindo a mitocôndria dessas células, ou seja, lentificando o ciclo de Krebs e, conseqüentemente acumulando succinato. O fato da MCF-10A ter sido a mais afetada em relação aos metabólitos polares relacionados ao metabolismo mitocondrial pode ser um fator importante para essa linhagem ter sido a mais afetada pela incubação.

O metabolismo de 1 carbono, que envolve os ciclos de metionina e folato, ocorre com a transferência de unidades de 1 carbono (metila e formila) de metabólitos como formato, serina, glicina, colina e suas variações e betaína, contribuindo para o metabolismo de purinas e pirimidinas, bem como reações de metilação do DNA e histonas e síntese de fosfolipídeos, por exemplo (AMELIO *et al.*, 2014). Nas figuras 16, 17 e 18 também são apresentadas as variações de alguns metabólitos do metabolismo de 1C. Na linhagem MCF-7 o tempo exerceu um efeito significativo sobre a intensidade destes metabólitos, exceto do formato. É possível também ver que após 48 horas de incubação com óleo de semente de romã, a diminuição dos metabólitos do metabolismo de 1C na linhagem MDA-MB-231 é menor quando as células são tratadas com o óleo de semente de romã. Os resultados deste conjunto de metabólitos nas células MCF-10A

tiveram grande dispersão dos dados, o que mostra ainda um confundimento a respeito do efeito do tratamento com o OSR no metabolismo de 1-carbono nessa linhagem.

O tratamento com OSR levou, ainda, a um maior acúmulo de 3-hidroxiabutirato (3-OHB) nas linhagens MDA-MB-231 (Figura 17B) e MCF-10A (Figura 17C) após 48 horas de incubação com o óleo, sendo a primeira 1,5 vezes e a segunda 2,5 vezes maior do que seu próprio controle. Na MCF-10A foi encontrado ainda acetoacetato (dados não mostrados), que pode ser produto da oxidação de ácidos graxos ou da ligação de duas moléculas de Acetil-CoA, o que, novamente, sugere que o óleo pode estar afetando a mitocôndria de alguma forma. O acetoacetato, assim como o 3-OHB, é um corpo cetônico, assim sendo, o aumento desses metabólitos sugere uma oxidação/metabolização do óleo por essas duas linhagens.

Uma das hipóteses deste estudo era que os efeitos exercidos pelo óleo de semente da romã nas células de câncer seriam causados, em grande parte, pela incorporação dos ácidos graxos deste óleo, principalmente os ácidos conjugados do ácido alfa-linolênicos (CLnAs), nas células. A fim de entender melhor possíveis mecanismos de ação do OSR, uma lipidômica dirigida foi analisada através da quantificação do perfil de lipídios das células por cromatografia gasosa. Com base nos resultados apresentados, observa-se que o tratamento com o OSR influencia o perfil de ácidos graxos de ambas as células estudadas, tumorais e não tumoral.

O primeiro resultado interessante que merece ser discutido é que, apesar de o OSR ser uma matriz muito rica em AG conjugados, não foi encontrado nenhum isômero do AG alfa-linoleico nas linhagens estudadas. Possivelmente devido ao teor muito reduzido desses ácidos graxos no OSR, aliado a dificuldades metodológicas, contribuíram para esse fato. Foi cogitada a possibilidade de os ácidos graxos presentes no OSR não terem sido captados pelas células, por conta da instabilidade da emulsão óleo/SFB. Entretanto, ácidos graxos que não são sintetizados por mamíferos, cuja única fonte possível é o soro fetal bovino foram identificados nos extratos celulares, a saber ácidos graxos de cadeia ímpar e possivelmente ácido *trans* vacênico.

No que tange a distribuição das classes de ácidos graxos, observa-se que na MCF-7, linhagem menos afetada pelo óleo, tem um teor maior de ácidos graxos monoinsaturados (figura 19 A), o que pode ser justificado pela maior quantidade do ácido palmitoleico (16:1 n-7) nesta do que nas demais linhagens. Estudos associam uma maior quantidade de ácido palmitoleico a uma maior sobrevivência das células de câncer (BYBERG *et. al.*, 2014; FRIGOLET & GUTIÉRREZ-AGUILAR, 2017), o que poderia explicar o fato desta linhagem ter sido menos

afetada que as demais. Ainda, o fator tratamento levou a uma diminuição do ácido esteárico (figura 20 A), que pode ter sido causada pelo aumento das razões 16:0/18:0 e 18:1 n-9/18:0 (figura 23 A). O aumento da primeira razão sugere que o 18:0, então, está sendo mais utilizado para β -oxidação na mitocôndria, para a síntese de ATP, que talvez seja para compensar uma possível ineficiência de produção de energia via glicólise aeróbica. Com relação ao aumento do ácido oleico, estudos tem mostrado que os efeitos biológicos diferem dependendo dos tipos de células cancerígenas. Para este ácido graxo, os estudos sobre seu efeito em células de câncer ainda são contraditórios, onde alguns estudos tem mostrado que ele promoveu a migração e invasão de células de câncer de mama e estômago, respectivamente, através de via dependentes de ácido araquidônico, ativação da via de PI3K/Akt e aumento da metaloproteína 2 (NAVARRO-TITO *et al.*, 2010; XIANG *et al.*, 2017), o que poderia justificar o fato desta linhagem ter sido menos afetada pelo tratamento com o óleo de semente de romã. Radde *et al.* (2016) mostrou que embora tenha causado a diminuição da taxa de consumo de oxigênio, o ácido oleico aumentou a viabilidade de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. Por outro lado, Menendez *et al.* (2005) viu que o ácido oleico aumentou a capacidade do quimioterápico Trastuzumab de inibir as vias de sinalização do Her-2 / *neu* em células de câncer de mama e Moon *et al.* (2014) o 18:1 n-9 suprimiu a proliferação celular e o potencial maligno das células de câncer de esôfago.

Na linhagem MDA-MB-231 tratada com o OSR, foi observado um aumento dos ácidos graxos saturados mirístico e lignocérico, tanto com 24 h quanto com 48 h de incubação, o que pode sugerir uma possível lentidão ou diminuição da beta oxidação mitocondrial (14:0) e peroxissomal (24:0) nesta linhagem. Observa-se também que houve uma diminuição significativa dos ácidos graxos monoinsaturados (figura 19 B), o que pode ser explicado pela diminuição significativa dos ácidos oleico e vacênico nesta mesma linhagem (figura 21 B). Nesta mesma linhagem podemos ver que em relação aos ácidos graxos poli-insaturados, parece haver um aumento do ácido linoleico nas células tratadas quando comparado ao controle e, embora este resultado não tenha sido significativo, pode-se ver seu impacto refletido nas razões 18:1 n-7/18:2 n-6 e 20:4 n-6/18:2 n-6, que foram menores nas células tratadas em relação ao controle. Na figura 23 C é possível ver que menos ácidos graxos insaturados estão sendo metabolizados nesta linhagem.

Na linhagem não tumoral – MCF-10A – que foi a mais afetada pelo óleo de semente de romã, apresentou poucas alterações do perfil de ácidos graxos nas células, dado que também

pode ter sido influenciado pela grande dispersão entre as replicatas. Os resultados mostram que o teor do AGS 24:0 é maior nas células tratadas com OSR, o que pode sugerir uma diminuição na beta-oxidação peroxissomal, uma vez que ácidos graxos de cadeia muito longa são oxidados nessa organela, indicando uma possível disfunção da mesma. Dados recentes da literatura indicam que uma disfunção peroxissomal parece estar envolvida em processos degenerativos associados ao envelhecimento e doenças crônicas, como câncer (CIPOLLA & LODHI, 2017). Uma das hipóteses é que a disfunção peroxissomal está intimamente relacionada à disfunção mitocondrial, apesar dos mecanismos ainda não serem conhecidos (FRANSEN *et al.*, 2017)

Ainda, a diminuição significativa do teor do ácido palmitoleico nas células MCF10-A tratadas com o óleo mostra um cenário oposto a MCF-7, ou seja, uma vez que Byberg *et al.* (2014) e Frigolet & Gutiérrez-Aguilar (2017) mostraram um efeito pró carcinogênico deste ácido graxo, uma diminuição deste após o tratamento com o óleo de semente de romã pode ter contribuído para a maior mortalidade desta linhagem. O tempo, mas não o tratamento, exerceu efeito significativo diminuindo os teores dos ácidos araquidônico e docosapentanóico (DPA). Não foi observada diferença nas razões de ácidos graxos nesta linhagem celular.

Os resultados das análises de correlação entre o teor de ácido vacênico (*cis* e *trans*) e LA e AA sugerem que de fato o metabolismo de CLnA e CLA se interconvertem. Melo *et al.* (2018) mostrou que ao inserir o óleo de semente de romã na alimentação de ratos, o ácido punícico foi metabolizado e foi encontrado isômeros do CLA no fígado, coração e rim dos animais e isômeros do CLA (punícico e alfa-eleosteárico) foram encontrados apenas no rim. Já é sabido que o ácido *trans* vacênico é convertido em ácido rumênico (CLA c9-t11) em ruminantes, no entanto, Turpeinen e colaboradores (2002) mostraram que a bioconversão entre esses ácidos graxos também ocorrem em humanos, uma vez que possuímos a enzima $\Delta-9$ -desaturase, enzima responsável por essa conversão.

Com base nos resultados apresentados, foi possível ver que as células estudadas apresentaram alterações distintas e de dimensões diferentes, umas apresentando maiores alterações em relação aos metabólitos polares, como a MCF-10A, e outras maiores alterações no metabolismo lipídico, como a MCF-7 e a MDA-MB-231. Conforme a literatura, essas células têm metabolismos diferentes, sendo assim, esperava-se que o efeito do óleo poderia variar entre essas linhagens. Apesar de sutis, o conjunto de resultados aponta para efeitos do

OSR sobre a função mitocondrial dessas células, seja tumoral e não-tumoral. Efeitos esses relacionados a diminuição do ciclo de Krebs e alteração, como no caso da MCF-10A e a diminuição da oxidação do piruvato, como no caso da MDA-MB-231, e alterações no perfil de ácidos graxos associadas a modulação da na β -oxidação mitocondrial e peroxissomal. Sugere-se, portanto, que esses efeitos estejam relacionados à modulação da composição dos ácidos graxos nos fosfolipídios das membranas mitocondriais. Mas essa hipótese necessita ser testada, visto que os resultados das análises de AG corresponderam aos AG totais, sem fracionamento prévio dos compartimentos/organelas celulares. Adicionalmente, os mecanismos moleculares envolvidos nessas alterações metabólicas não foram investigados neste estudo. Postula-se que a modulação de PPAR pode estar envolvida e merece ser testada, uma vez que o PPAR γ desempenha um papel importante na regulação do metabolismo lipídico celular e está envolvido no desenvolvimento de células tumorais. Já foi mostrado que os agonistas do PPAR γ inibem a atividade do receptor de estrogênio, o que poderia suprimir a progressão tumoral, e Hyun-Seuk *et al.* (2010) mostrou que o ácido alfa-eleosteárico, um dos isômeros de CLnA, agiu como um agonista de PPAR γ . Este estudo é o primeiro deste modelo e com perfil mais exploratório a fim de entender se uma matriz alimentar rica em compostos bioativos como o óleo de semente de romã teria efeito em diferentes células de câncer e em uma linhagem não tumoral e como poderia ser esse efeito. Mais experimentos, portanto, se fazem necessários para elucidar melhor e ampliar o conhecimento acerca das vias de ação do óleo de semente de romã, focando na bioenergética mitocondrial.

6. Conclusão

Nesse estudo foi visto um efeito citotóxico do OSR em todas as linhagens estudadas, sendo os efeitos mais pronunciados na linhagem MCF-10A não tumoral e, apesar de não termos observado incorporação dos AG do OSR, houve mudanças no perfil de ácidos graxos nas diferentes linhagens. Apesar dos mecanismos envolvidos na maior toxicidade não terem sido alvo do presente estudo, acredita-se que o OSR tenha afetado a função mitocondrial dessas células e, possivelmente, a peroxissomal. A MDA-MB-231, por exemplo, uma linhagem conhecidamente mais glicolítica, foi a linhagem tumoral mais afetada pelo tratamento, isso sugere que o OSR pode estar agindo na mitocôndria dessas células não só em relação a produção de energia, mas também a vias de morte celular.

O óleo de semente de romã, portanto, mostra-se uma matriz alimentar interessante para ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos de ação de uma matriz lipídica, rica em

compostos bioativos, no câncer. Tendo em vista que os resultados encontrados no presente estudo são ainda novos e levam em conta linhagens celulares imortalizadas isoladas e não uma massa tumoral com várias células e metabolismos, ainda é cedo para pensar no OSR como terapia anticâncer. Mais estudos funcionais, possivelmente utilizando modelo animal, a respeito da bioenergética mitocondrial, atividade peroxissomal e sinalizações de morte, são necessários para avançarmos nos mecanismos de ação do OSR.

7. Referências

- ABEL, S. *et al.* Dietary PUFA and câncer. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 73, p. 361–367, 2014.
- ALBRECHT *et al.* Pomegranate Extracts Potently Suppress Proliferation, Xenograft Growth, and Invasion of Human Prostate Cancer Cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 7, p. 274–283, 2004.
- AMELIO, I. *et al.* Serine and glycine metabolism in cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 4, p. 191-198, 2014.
- ANDERSON, R. G. *et al.* Mitochondria in cancer metabolism, an organelle whose time has come? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1870, p. 96-102, 2018.
- ARAO, K. *et al.* Dietary effect of pomegranate seed oil rich in 9cis, 11trans, 13cis conjugated linolenic acid on lipid metabolism in obese, hyperlipidemic OLETF Rats. **Lipids in Health and Disease**, 3:24, 2004.
- ARMITAGE, E. G.; BARBAS, C. Metabolomics in cancer biomarker discovery: Current trends and future perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 1-11, 2014.
- ARMSTRONG, J. S. Mitochondria: a target for cancer therapy. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 239–248, 2006.
- BEGER, R. D. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. **Metabolites**, v. 3, p. 552-574, 2013.
- BERQUIN, I. *et al.* Modulation of prostate cancer genetic risk by omega-3 and omega-6 fatty acids. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 1866-1875, 2007.
- BERQUIN, I. *et al.* Multi-targeted therapy of cancer by omega-3 fatty acids. **Cancer Letters**, v. 269, p. 363-377, 2008.
- BIAŁEK *et al.* Pomegranate seed oil influences the fatty acids profile and reduces the activity of desaturases in livers of Sprague-Dawley rats. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 131, p. 9-16, 2017.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37, 911–917, 1959.
- BYBERG, L. *et al.* Cancer death is related to high palmitoleic acid in sérum and to polymorphisms in the SCD-1 gene in healthy Swedish men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 99, p. 551-558, 2014.
- CAIRNS, A. *et al.* Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 85 – 95, 2011.
- CHEN, J. *et al.* Dietary Flaxseed Enhances the Inhibitory Effect of Tamoxifen on the Growth of Estrogen-Dependent Human Breast Cancer (MCF-7) in Nude Mice. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 7703–7711, 2004.
- CHEN, Y.; LI, P. Fatty acid metabolism and cancer development. **Science Bulletin**, v. 61, p. 1473–1479, 2016.

- CHESNEY, J. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase and tumor cell glycolysis. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 9, p. 535–539, 2006.
- CHRISTOPHERSON, S. GLASS, R. Preparation of Milk Fat Methyl Esters by Alcoholysis in an Essentially Nonalcoholic Solution. **Journal of Dairy Science**, vol: 52 (8) pp: 1289-1290, 1969.
- CIPOLLA, C. M.; LODHI, I.J. Peroxisomal Dysfunction in Age-Related Diseases. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 28, p. 297-308, 2017.
- COSTA, A. M. M. *et al.* Chemical composition of commercial cold-pressed pomegranate (*Punica granatum*) seed oil from Turkey and Israel, and the use of bioactive compounds for samples' origin preliminary discrimination. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 75, p. 8-16, 2019.
- DA SILVA, A. P. P. *et al.* Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. **Biochemical Journal**, v. 417, p. 717-726, 2009.
- DA-SILVA, J. *et al.* Pomegranate biology and biotechnology: A review. **Scientia Horticulturae**, v. 160, p 85 - 107, 2013.
- DE SALES, N. F. F. *et al.* Anthocyanin-Rich Grape Pomace Extract (*Vitis vinifera* L.) from Wine Industry Affects Mitochondrial Bioenergetics and Glucose Metabolism in Human Hepatocarcinoma HepG2 Cells. **Molecules**, v. 23, p. 611-628, 2018.
- DEBERARDINIS, R. J.; CHANDEL, N. S. Fundamentals of cancer metabolism. **Science Advances**, v. 2, n. 5, p. 1-19, 2016.
- DEBERARDINIS, R. J. *et al.*, The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. **Cell Metabolism**, v. 7, 2008.
- DELL'AGLI, M. *et al.* Antiplasmodial activity of *Punica granatum* L. fruit rind. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 125, p. 279-285, 2009.
- DIRAT, B. *et al.* Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. **Cancer Research**, v. 71, 2011.
- FERNANDES, L. *et al.* Fatty acid, vitamin E and sterols composition of seed oils from nine different pomegranate (*Punica Granatum* L.) cultivars grown in Spain. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 39 p. 13–22, 2015.
- FRANSEN M. *et al.* The Peroxisome-Mitochondria Connection: How and Why? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 1126, 2017.
- FRIGOLET, M. E.; GUTIÉRREZ-AGUILAR, R. The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease. **Advances in Nutrition**, v. 8, p. 173-181, 2017.
- GASMI, J. & SANDERSON, J. T. Growth Inhibitory, Antiandrogenic, and Pro-apoptotic Effects of Punicic Acid in LNCaP Human Prostate Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(23), 12149–12156, 2010.
- GLOBOCAN 2018. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2018&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include>

_nmsc=1&include_nmsc_other=1&type_multiple=%257B%2522inc%2522%253Atrue%252C%2522mort%2522%253Atrue%252C%2522prev%2522%253Afalse%257D&orientation=horizontal&type_sort=0&type_nb_items=%257B%2522top%2522%253Atrue%252C%2522bottom%2522%253Afalse%257D&population_group_globocan_id=> Acessado em: 22 de maio de 2019

GROSSMANN *et al.* Eleostearic Acid Inhibits Breast Cancer Proliferation by Means of an Oxidation-Dependent Mechanism. **Cancer Prevention Research**, v. 2, 2009

HARAYAMA, T.; RIEZMAN, H. Understanding the diversity of membrane lipid composition. **Nature Review - Molecular cell biology**, 2018.

HARRELSON, J. P.; LEE, M. W. Expanding the view of breast cancer metabolism: Promising molecular targets and therapeutic opportunities. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 167, p. 60–73, 2016.

HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 1 – 15, 2016.

HENNESSY, A. A. et al. Sources and Bioactive Properties of Conjugated Dietary Fatty Acids. **Lipids**, v. 51, p. 377–397, 2016.

HOPPERTON, K. E. *et al.* Fatty acid synthase plays a role in cancer metabolism beyond providing fatty acids for phospholipid synthesis or sustaining elevations in glycolytic activity. **Experimental Cell Research**, vol. 320, p. 302-310, 2014.

HSU, P. P.; SABATINI, D. M. Cancer Cell Metabolism: Warburg and Beyond. **Cell**, v.134, p. 703-707, 2008.

Hyun-Seuk, L. *et al.* Alpha-eleostearic acid suppresses proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPAR γ and inhibition of ERK 1/2. **Cancer Science**, v. 101, p. 396-402, 2010.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2018.

JONES, R. G.; THOMPSON, C. B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **GENES & DEVELOPMENT**, v. 23, p.537–548, 2009.

JOSE, C. *et al.* Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? **Biochimica et Biophysica Acta**. Jun;1807(6):552-61, 2011.

JOURDAN, M. *et al.* Increased BRCA1 protein in mammary tumours of rats fed marine ω -3 fatty acids. **Oncology Reports**, v. 17, p. 713-719, 2007.

KHAN, N. *et al.* Screening of Punica Granatum seeds for antibacterial and antioxidant activity with various extracts. **J Gastroenterol Dig Dis.**, 1(1):1-7, 2017.

KHWAIRAKPAM, A. D. *et al.* Possible use of *Punica granatum* (Pomegranate) in cancer therapy. **Pharmacological Research**, v.133, p. 53-64, 2018.

KRAMER J. *et al.* Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, 1997.

KÝRALAN, M *et al.* Oil and Conjugated Linolenic Acid Contents of Seeds from Important Pomegranate Cultivars (*Punica granatum* L.) Grown in Turkey. **J Am Oil Chem Soc**, 86:985–990, 2009.

MANDAL, A. *et al.* Anti-Inflammatory mechanism involved in Pomegranate-mediated prevention of breast cancer: the role of NF- κ B and Nrf-2 signaling pathways. **Nutrients**, 9, p. 436-449, 2017.

MELO, I. L. P. *et al.* Pomegranate Seed Oil (*Punica Granatum* L.): A Source of Punicic Acid (Conjugated α -Linolenic Acid). **J Hum Nutr Food Sci**. v. 2-1: p. 1024, 2014.

MELO, I. L. P. *et al.* Punicic acid was metabolised and incorporated in the form of conjugated linoleic acid in different rat tissues. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, p. 421-431, 2018.

MENENDEZ, J.A. *et al.* Oleic acid, the main monounsaturated fatty acid of olive oil, suppresses Her-2/*neu* (*erbB-2*) expression and synergistically enhances the growth inhibitory effects of trastuzumab (Herceptin™) in breast cancer cells with Her-2/*neu* oncogene amplification. **Annals of Oncology**, v. 16, p. 359–371, 2005.

MOON, H. S. *et al.* Alpha-eleostearic acid suppress proliferation of MCF-7 breast cancer cells via activation of PPAR γ and inhibition of ERK 1/2. **Cancer Science**, vol. 101, n. 2, p. 396 - 402, 2010.

MOON, H. S. *et al.* Alpha linolenic acid and oleic acid additively down-regulate malignant potential and positively cross-regulate AMPK/S6 axis in OE19 and OE33 esophageal cancer cells. **Metabolism**, v. 63, p. 1447-1454, 2014.

MORENO-SÁNCHEZ *et al.* Energy metabolism in tumor cells. **FEBS Journal**, v. 274, p. 1393–1418, 2007

NAVANEETHAKRISHNAN, S. *et al.* Loss of Cdk5 in breast cancer cells promotes ROS-mediated cell death through dysregulation of the mitochondrial permeability transition pore. **Oncogene**, 2018.

NAVARRO-TITO, N. Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, p. 306-317, 2010.

NEWMAN, A. C. & MADDOCKS, O. D. K. One-carbon metabolism in cancer. **British Journal of Cancer**, v. 116, p. 1499-1504, 2017.

NUNES, J. C.; TORRES, A. G. Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23 p. 782-789, 2010.

OBRE, E.; ROSSIGNOL, R. Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: Metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 59, p. 167–181, 2015.

OMABE, M.; EZEANI, M.; OMABE, K. N. Lipid metabolism and cancer progression: The missing target in metastatic cancer treatment. **Journal of applied biomedicine**, v. 13, p. 47 – 59, 2015.

- PATEL, S.; AHMEDB, S. Emerging field of metabolomics: Big promise for cancer biomarker identification and drug discovery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p. 63-74, 2015.
- PATRA, K. C. et al. Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. **Cancer Cell**, v. 24, p. 213–228, 2013a.
- PATRA, K. C.; HAY, N. Hexokinase 2 as oncotarget. **Oncotarget**, v. 4: p. 1862–1863, 2013b.
- RADDE, B. N. *et al.* Anacardic Acid, Salicylic Acid, and Oleic Acid Differentially Alter Cellular Bioenergetic Function in Breast Cancer Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 117, p. 2521-2532, 2016.
- SAHA, S. S.; MAHUA GHOSH, M. Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. **British Journal of Nutrition**, v. 108, p. 974–983, 2012.
- SASSANO, G. *et al.* Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p.1046-1052, 2009.
- SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Modern pathology**, v. 23, p. S60– S64, 2010.
- SHINOHARA, Y. *et al.* Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type 1 glucose transporter in human tumor cell lines. **Cancer Letters**, v. 82, p. 27-32, 1994.
- SPRATLIN, J. L. *et al.* Clinical Applications of Metabolomics in Oncology: A Review. **Clinical Cancer Research**, 2010.
- SUN, Z. *et al.* Beta-eleostearic acid induce apoptosis in T24 human bladder cancer cells through reactive oxygen species (ROS)-mediated pathway. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 99, p. 1-8, 2012.
- SUZUKI *et al.* Cytotoxic Effect of Conjugated Trienoic Fatty Acids on Mouse Tumor and Human Monocytic Leukemia Cells. **Lipids**, vl. 36, n° 5, 2001.
- VERARDO, V. *et al.* Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. **Food Research International**, v. 65, p. 445-452, 2014.
- TANG, X. *et al.* A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 16, n. 4, p. 415, 2014.
- TARRADO-CASTELLARNAU, M. *et al.* Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. **Oncotarget**, v. 7, 2016.
- TSUJIMOTO, Y; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 835–840, 2007.
- TURPEINEN, A. M. *et al.* Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, p. 504-510, 2002.
- WALLACE, D. C. Mitochondria and câncer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 685–698, 2012.

WARBURG, O. The metabolism of carcinoma cells. **American Association for Cancer Research Journals**. 0099-7013, 1925.

WILSON, J. E. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, p. 2049-2057, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer control: knowledge into action: WHO guide for effective programmes; module 2, 2007.

XIANG, F. *et al.* Omental adipocytes enhance the invasiveness of gastric cancer cells by oleic acid-induced activation of the PI3K-Akt signaling pathway. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 84, 2017, p. 14-21, 2017.

YANG, M.; VOUSDEN, K. H. Serine and one-carbon metabolism in cancer. **Nature**, v. 16, p. 650-662, 2016.