

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA

TALITA IZAURA ALVES CARNEIRO

**CIANIDINA-3-*O*-GLICOSÍDEO, SEU METABÓLITO ÁCIDO PROTOCATECUICO
E METABOLISMO DE GLICOSE: ESTUDOS SOBRE A ATIVIDADE DA
HEXOKINASE EM CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

RIO DE JANEIRO

Setembro/2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO

**CIANIDINA-3-O-GLICOSÍDEO, SEU METABÓLITO ÁCIDO PROTOCATECUICO
E METABOLISMO DE GLICOSE: ESTUDOS SOBRE A ATIVIDADE DA
HEXOKINASE EM CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Talita Izaura Alves Carneiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Nutrição Humana

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

RIO DE JANEIRO

Setembro/2018

Carneiro, Talita Izaura Alves

CIANIDINA 3-O-GLICOSÍDEO, seu metabólito ácido protocatecuico e metabolismo de glicose: estudos sobre a atividade da Hexokinase em células de carcinoma mamário humano. / Talita Izaura Alves Carneiro. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana (PPGN), 2018.

70 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Tatiana El-Bacha Porto.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Nutrição Josué Castro, Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana (PPGN), 2018.

Referências: f. 59-70.

1. Antocianinas. 2. Neoplasias da mama- epidemiologia. 3. Hexoquinase -
. 4. Células Tumorais Cultivadas- metabolismo. 5. Nutrição - Dissertação. I. Porto, Tatiana El-Bacha. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro/ INJC, Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana (PPGN). III. Título.

**CIANIDINA-3-*O*-GLICOSÍDEO, SEU METABÓLITO ÁCIDO PROTOCATECUICO E METABOLISMO
DE GLICOSE: ESTUDOS SOBRE A ATIVIDADE DA HEXOKINASE EM CÉLULAS DE CARCINOMA
MAMÁRIO HUMANO**

TALITA IZAURA ALVES CARNEIRO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO DO INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE **MESTRE EM NUTRIÇÃO HUMANA**.

Orientada por:

Prof^a. Dr^a. Tatiana El-Bacha Porto
Doutora em Bioquímica - UFRJ

Examinada por:

Prof^a. Dr^a. Mariana Costa Monteiro
Doutora em Ciências de Alimentos - UFRJ - Presidente da banca e revisora

Prof. Dr. Anderson Junger Teodoro
Doutor em Ciências de Alimentos - UFRJ

Dr^a. Juliana Dias Zeidler
Doutora em Ciências Biológicas - USP

Prof. Dr. Alexandre Guedes Torres - Suplente
Doutor em Ciências de Alimentos - UFRJ

Aos meus amados pais, Armando
e Maria, e amado irmão, Leandro,
por todo amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, por me guiar em todos os caminhos e sempre me fortalecer para que eu possa alcançar meus sonhos.

À minha amada família, meus pais Armando e Maria e meu irmão Leandro, por todo amor, carinho e afeto que preenchem os meus dias, por me apoiarem nessa aventura e me encorajarem em todos os momentos. Aos meus amigos, tios e primos que compreenderam a minha escolha e muitas vezes o motivo da minha ausência e que sempre me incentivaram a prosseguir.

A minha querida orientadora, Tatiana El Bacha, que me inspirou em todos esses anos de convivência, compartilhando tanto de seu conhecimento e dedicação a pesquisa. Obrigada por acreditar em mim, por ter sido um diferencial na minha formação acadêmica e pessoal.

A toda equipe Lebiome, que se tornou uma extensão da minha família. Queridos amigos vocês foram fundamentais nessa conquista. Obrigada por compartilharem a vida de vocês comigo! Em especial à Gabriela, Carolina, Desirée, Nayara e Nathalia, por tornarem os dias mais leves e mais divertidos, por dividirem o café e o almoço, por estarem comigo em todos os momentos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, que me acolheram no seu espaço e partilharam comigo momentos de alegria, vocês moram no meu coração.

Às minhas amigas de cultura, Nathalia Ferrari e Desirée Lopes. Obrigada por todos os momentos que passamos juntas, pelos estudos, pela troca de conhecimentos. Mas também, por compartilharem das alegrias do dia a dia, da rotina cansativa, vocês foram fundamentais para que eu pudesse realizar tudo isso! Obrigada pelo pensamento positivo!

Às minhas amigas, Bruna, Maria Clara, Aline e Natalia Liacone, que estiveram sempre próximas, obrigada pelas conversas, pelas risadas, pelas caronas, corridas e por fazerem parte da minha vida. Às minhas queridas amigas, Erika Ferreira e Tamires Chaves, obrigada por fazerem diferença na minha vida, pela amizade verdadeira e por partilharem tantas alegrias.

Ao grupo de pesquisa em Bioquímica Nutricional do INJC, pela ajuda e convívio. À professora Fátima Sardinha pela confiança e apoio.

Aos grupos de pesquisas em Bioquímica de Vírus das professoras Andrea da Poian e Iranaia, nos quais estive fazendo parte dos meus experimentos, que me acolheram e ajudaram sempre que precisei.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“ We keep moving forward, opening
new doors, and doing new things,
because we're curious and curiosity
keeps leading us down new paths ”

Walt Disney

Resumo da dissertação apresentada ao PPGN/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em Nutrição Humana.

**CIANIDINA-3-*O*-GLICOSÍDEO, SEU METABÓLITO ÁCIDO PROTOCATECUICO
E METABOLISMO DE GLICOSE: ESTUDOS SOBRE A ATIVIDADE DA
HEXOKINASE EM CÉLULAS DE CARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Talita Izaura Alves Carneiro

Setembro/2018

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

RESUMO

Células de câncer apresentam reprogramações em vias metabólicas, particularmente a glicólise, que lhes permitem sustentar um fenótipo altamente proliferativo e resistente a apoptose. Compostos bioativos cuja ação envolve regulação de vias do metabolismo energético podem ser usados como novas estratégias para o tratamento do câncer. Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar o efeito da antocianina, cianidina-3-*O*-glicosídeo (C3G) e de um dos seus principais metabólitos, o ácido protocatecuico (PCA) no metabolismo de glicose de células de carcinoma mamário humano (MCF-7 e MDA-MB-231) e linhagem não tumoral (MCF10A). As células foram incubadas por 24 h com diferentes concentrações de C3G (1 – 100 μ M) quando o meio de cultura foi trocado e as células permaneceram em cultura por até 72 h, sem C3G. Ensaio funcionais dos efeitos da C3G sobre a atividade metabólica celular foram avaliados pelo método de redução do MTT, após 48 e 72 h do inóculo com C3G. O metabolismo de glicose foi determinado medindo-se o acúmulo de lactato no meio de cultura, sendo considerado como proxy do fluxo glicolítico, e pela atividade da hexoquinase (Hk). A atividade da Hk foi avaliada nas frações citosólica e mitocondrial, após centrifugação diferencial. O acúmulo de lactato foi quantificado após 48 e 72 h do inóculo com C3G. A atividade da Hk foi avaliada de duas formas: (a) após 24 h de incubação com C3G (20, 40 e 100 μ M), e (b) pela adição direta de C3G e PCA. MCF10A e MDA-MB-231 apresentaram um aumento de 10 % na atividade metabólica, após 48 h. A linhagem tumoral não metastática MCF-7, por outro lado, apresentou redução de 8 % e 37 % da atividade metabólica, após 48 h e 72 h, respectivamente.

O acúmulo de lactato pelas células MCF10-A e MDA-MB-231 aumentou de forma dependente após 72 h, enquanto que a linhagem MCF-7 apresentou redução neste parâmetro. A incubação com C3G por 24 h alterou a atividade da Hk nas frações citosólica e mitocondrial das linhagens tumorais, mas não afetou a linhagem não tumoral. As células MCF-7 e MDA-MB-231 apresentaram aumento significativo de cerca de 40 % na atividade da Hk citosólica quando incubadas por 24 h com 20 μ M de C3G. No entanto, na fração mitocondrial, os efeitos da incubação com C3G foram distintos entre as linhagens tumorais, onde as células MDA-MB-231 apresentaram aumento de aproximadamente 40 % enquanto as células MCF-7 apresentaram uma redução de 24 % com 40 μ M. A adição direta de C3G e PCA promoveu um aumento na atividade da Hk na fração citosólica em todas as linhagens celulares estudadas. Na fração mitocondrial, por outro lado, houve redução da atividade da Hk nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-10A, e na linhagem MCF-7 foi observado um aumento de 35 % neste parâmetro quando incubado com a C3G isolada. Em conjunto, estes resultados sugerem que a C3G e seu metabólito, PCA, afetam a bioenergética das linhagens celulares de carcinoma mamário humano, modulando diferencialmente o metabolismo de glicose nos compartimentos citosólico e mitocondrial.

Palavras chave: Cancer, cianidina-3-*O*-glicosídeo, ácido protocatecuico, hexoquinase, reprogramação metabólica, metabolismo de glicose, MCF-7, MDA-MB-231, MCF10-A.

**CYANIDIN-3-*O*-GLUCOSIDE, ITS METABOLITE PROTOCATECHUIC ACID AND
GLUCOSE METABOLISM: STUDIES ON HEXOKINASE ACTIVITY IN HUMAN
MAMMARY CANCER CELLS**

Talita Izaura Alves Carneiro

September/2018

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

ABSTRACT

Cancer cells present reprogramming in metabolic pathways, particularly glycolysis, that allow them to sustain a highly proliferative and apoptosis resistant phenotype. Bioactive compounds whose action involves regulation of energy metabolism pathways can be used as new strategies for the treatment of cancer. In this context, the present study aimed to evaluate the effect of anthocyanin, cyanidin-3-*O*-glycoside (C3G) and one of its main metabolites, protocatechuic acid (PCA) on glucose metabolism of human mammary carcinoma cells (MCF-7 and MDA-MB-231) and non-tumoral lineage (MCF10A). Cells were incubated for 24 h at different concentrations of C3G (1 - 100 μ M) when the culture medium was changed and the cells remained in culture for up to 72 h, without C3G. Functional assays of the effects of C3G on cellular metabolic activity were evaluated by the MTT reduction method after 48 and 72 h of the C3G inoculum. The metabolism of glucose was determined by measuring the accumulation of lactate in the culture medium, being considered as a proxy for the glycolytic flux, and by the hexokinase (Hk) activity. The Hk activity was evaluated in the cytosolic and mitochondrial fractions after differential centrifugation. The accumulation of lactate was quantified after 48 and 72 h of the inoculum with C3G. The activity of Hk was evaluated in two ways: (a) after 24 h of incubation with C3G (20, 40 and 100 μ M), and (b) the direct addition of C3G and PCA. MCF10A and MDA-MB-231 showed a 10% increase in metabolic activity after 48 h. The MCF-7 non-metastatic tumor line, on the other hand, presented a reduction of 8 % and 37 % of the metabolic activity, after 48 h and 72 h, respectively. Lactate accumulation by MCF10-A and MDA-MB-231 cells increased in a concentration-dependent manner after 72 h, whereas the MCF-7 line presented a reduction in this parameter. The incubation with C3G for 24 h altered the Hk activity in the cytosolic and mitochondrial fractions of the tumor lines, but did not affect the non-tumoral lineage. MCF-7 and MDA-MB-231 cells showed a significant

increase of about 40 % in cytosolic Hk activity when incubated for 24 h with 20 μ M C3G. However, in the mitochondrial fraction, the effects of C3G incubation were distinct among tumor lines, where MDA-MB-231 cells showed an increase of approximately 40 % while MCF-7 cells showed a reduction of 24% with 40 μ M. The direct addition of C3G and PCA promoted an increase in Hk activity in the cytosolic fraction in all cell lines studied. In the mitochondrial fraction, on the other hand, there was a reduction of Hk activity in the MDA-MB-231 and MCF-10A lines, and in the MCF-7 line, a 35 % increase was observed in this parameter when incubated with C3G alone. Together, these results suggest that C3G and its metabolite, PCA, affect the bioenergetics of human mammary carcinoma cell lines, differentially modulating glucose metabolism in the cytosolic and mitochondrial compartments.

Keywords: Cancer, Cyanidin-3-*O*-glucoside, protocatechuic acid, hexokinase, metabolic reprogramming, glucose metabolism, MCF-7, MDA-MB-231, MCF10-A.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018, exceto pele não melanoma.....	17
Figura 2. Classificação dos polifenóis em flavonoides e não flavonoides.....	19
Figura 3. Classificação dos flavonoides, estrutura química, compostos representativos e principais fontes dietéticas.....	20
Figura 4. Estrutura básica das principais antocianinas	21
Figura 5. Representação esquemática da glicólise, via das pentoses-fosfato, glutaminólise, via de síntese de lipídios e aminoácidos em células de câncer.....	29
Figura 6. Representação esquemática da glicólise, via das pentoses-fosfato, glutaminólise, via de síntese de lipídios e aminoácidos em células de câncer, e a inibição de etapas limitantes no metabolismo por polifenóis.....	33
Figura 7. Efeito da cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo na atividade metabólica das linhagens celulares MCF10-A (não tumoral), MCF-7 e MDA-MB-231 (tumorais).....	42
Figura 8. Acúmulo de lactato das linhagens celulares de mama MCF10A (não tumoral), MCF-7 e MDA-MB-231 (tumorais).....	44
Figura 9. Atividade específica e total da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231.....	46
Figura 10. Efeito da incubação com cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo por 24 h, na atividade da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231.....	48
Figura 11. Efeito direto da cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo e ácido protocatecuico na atividade da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231.....	50

Figura 12. Efeito da incubação com cianidina-3-*O*-glicosídeo por 24 h, na atividade total da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231.....51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPK - Proteína quinase ativada por AMP
- ATP - Adenosina trifosfato
- BAK - do inglês, *BCL-2 antagonist or killer*
- BAX - do inglês, *BCL-2-associated X protein*
- BCL-2 - do inglês, *B cell lymphoma 2*
- Bcl-xl - do inglês, *B-cell lymphoma-extra large*
- BSS - do inglês, *Balanced Salt Solution*
- C3G – Cianidina-3-*O*-glicosídeo
- CIP - Coquetel inibidor de protease
- DMSO - do inglês, *Dimethyl Sulfoxide*
- EGF - do inglês, *Epidermal Growth Factor*
- EGFR - do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor*
- FADH₂ - forma reduzida do dinucleotídeo de flavina adenina (FAD)
- FDG-PET - do inglês, *positron emission tomography*, tendo como marcador o ¹⁸F-flúor-deoxi-2-glicose (¹⁸FDG)
- G3DPH - Gliceraldeído 3-fosfato-desidrogenase
- GLUT - do inglês, *Glucose transportes*
- ³H-DG – do inglês, *3H-2-deoxy-D-glucose*
- HER-2 - receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
- HIF-1 - do inglês, *Hypoxia inducible factor 1*
- HkI - Hexoquinase isoforma I
- HkII - Hexoquinase isoforma II
- HPLC-ESI-MS/MS - do inglês, *high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry*
- INCA - Instituto Nacional do Câncer
- LDH - Lactato desidrogenase
- LDHA - Lactato desidrogenase A
- LDHB - Lactato desidrogenase B
- LDHC - Lactato desidrogenase C
- LDHD - Lactato desidrogenase D
- MCT1 - Transportadores de ácidos monocarboxílicos isoforma 1
- MCT2 - Transportadores de ácidos monocarboxílicos isoforma 2

MTT - (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio).

NAD/NADH - do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide*

NADPH - do inglês, *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

PBS - do inglês, *Phosphate Buffered Saline*

PCA – Ácido protocatecuico

PDH - Piruvato desidrogenase

PDK - Piruvato quinase

PDK - Piruvato desidrogenase quinase

PFK - Fosfofrutoquinase

PGA - do inglês, *phloroglucinaldehyde*

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

PK - Piruvato quinase

PKL - Piruvato quinase isoforma L

PKM1 - Piruvato quinase isoforma M1

PKM2 - Piruvato quinase isoforma M1

PKR - Piruvato quinase isoforma R

RE - Receptor de estrogênio

RP - Receptor de progesterona

SFB - Soro fetal bovino

TNBC – do inglês, *Triple Negative Breast Cancer*

VDAC - Voltage Dependent Anion Chanel

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1.	Introdução	17
1.1	Câncer de mama: definição, estatística e tratamento.....	17
1.2	Polifenóis: aspectos gerais.....	19
1.3	Antocianinas e ação anticâncer.....	21
1.3.1	Metabolismo da cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo.....	22
1.3.2	Ações anticâncer da cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo.....	24
1.4	Reprogramação do metabolismo intermediário do câncer.....	25
1.4.1	Metabolismo de glicose.....	25
1.4.2	Etapas comprometidas no metabolismo da glicose no câncer.....	26
1.4.3	Oncogenes e regulação do metabolismo de glicose.....	29
1.5	Polifenóis de alimentos e efeito anticâncer sobre o metabolismo energético.....	31
2.	Justificativa	34
3.	Objetivo geral	35
3.1	Objetivos específicos.....	35
4.	Metodologia	36
4.1	Modelos celulares.....	36
4.2	Cultura de células e compostos bioativos.....	36
4.3	Ensaio de atividade metabólica	37
4.4	Produção de lactato	37
4.5	Preparo das frações citosólica e mitocondrial das linhagens celulares.....	38
4.6	Ensaio enzimático acoplado.....	39
4.7	Quantificação de proteínas.....	40
4.8	Análise estatística.....	40
5.	Resultados	41
5.1	Avaliação da atividade metabólica das linhagens de mama submetidas ao tratamento com cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	41
5.2	Avaliação do acúmulo de lactato das linhagens de mama submetidas ao tratamento com cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	43
5.3	Avaliação do efeito da cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo na atividade da enzima hexoquinase após incubação por 24 h e o efeito agudo com cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo e ácido protocatecuico.....	45
6.	Discussão	52

7.	Conclusões.....	58
8.	Referências Bibliográficas.....	60

1. Introdução

1.1 Câncer de mama: definição, estatística e tratamento

O câncer, a segunda causa de morte do mundo, representa um conjunto de doenças caracterizado pelo crescimento rápido e desordenado de células, com alta capacidade invasiva (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2018). A enfermidade resulta de alterações em mecanismos regulatórios que aumentam a resistência a apoptose, interferem na atividade e expressão de proteínas do ciclo celular e ativam vias de angiogênese, essenciais para suportar a proliferação elevada das células (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

No Brasil, estima-se para o biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. O câncer de mama é o mais frequente em mulheres, correspondendo a 29,5 % dos casos, seguido do câncer de intestino, colo do útero, pulmão e tireoide (**Figura 1**) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA, 2018).

	Localização primária	Casos	%
Mulheres 	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes em mulheres estimados para 2018, exceto pele não melanoma. (Adapto de INCA, 2018)

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama estão: exposição a estrogênios endógenos e fatores reprodutivos, exposição exógena a estrogênios, estilo de vida, alimentação, fatores ambientais como exposição à radiação ionizante, e fatores genéticos (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, INCA, 2018).

O câncer de mama, foco de estudo do presente trabalho, é classificado de acordo com diferenças moleculares e se diferencia em relação aos seus padrões de expressão gênica, metabolismo, características clínicas, prognóstico e resposta ao tratamento (SCHNITT, 2010). Apesar de ser considerado uma única doença, já são descritos cerca de 21 subtipos histológicos

da doença e 3 diferentes subtipos moleculares, que são determinados por imuno-histoquímica e estão diretamente associados a escolha da terapia sistêmica, como a quimioterapia, terapia endócrina e terapia anti-HER2 (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Desta forma, o câncer de mama é dividido em 3 subtipos moleculares definidos de acordo como a presença ou ausência de receptores hormonais, estrogênio (RE) e progesterona (RP), do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), sendo: (1) luminal (RE⁺ RP⁺ HER2^{+/+}), (2) HER2 (RE⁻ RP⁻ HER2⁺) e (3) basal (RE⁻ RP⁻ HER2⁻) (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

O subtipo luminal pode ser subdividido de acordo com a expressão do HER2: (a) luminal A quando expressa os 3 receptores (RE⁺/RP⁺/HER2⁺), corresponde de 30 % – 40 % dos casos e apresenta melhor prognóstico, com alta taxa de sobrevivência e baixa recidiva; e (b) luminal B, que não expressa HER2 (RE⁺/RP⁺/HER2⁻), apresenta maior taxa proliferativa em relação ao tipo A e corresponde de 20 % – 30 % dos casos de câncer de mama (MOCANU; NAGY; SZÖLLŐSI, 2015; LOSADA-ECHEBERRÍA *et al.*, 2017; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

O subtipo HER2 não expressa RE e RP, apresenta altos níveis de HER2 e corresponde a 12 – 20 % dos casos, sendo considerado um dos mais agressivos e com maior recidiva.

O subtipo basal, também conhecido como triplo negativo por não expressar RE, RP e HER2, corresponde a 15 % – 20% dos casos de câncer de mama e apresenta o pior prognóstico pois ainda não há terapias que sejam específicas a esse tipo de câncer (BANDYOPADHYAY; BLUTH; ALI-FEHMI, 2018; FRAGOMENI; SCIALLI; JERUSS, 2018).

Atualmente, os tratamentos para o câncer de mama são baseados na resposta das células tumorais aos marcadores moleculares HER2, RE e RP. De acordo com a classificação do tumor é determinado o tipo de tratamento correspondente, assim, os subtipos luminais por apresentarem os receptores hormonais, podem ser submetidos a terapia hormonal, sendo que a responsividade do tipo A é maior do que o B. Essa variação pode ser causada pela maior expressão de Ki67, proteína necessária para a proliferação celular, no tipo luminal B. Para os tumores HER2⁺, avanços com terapias alvo específica, como o trastuzumab, tem apresentado melhoria no prognóstico destes (MOCANU; NAGY; SZÖLLŐSI, 2015; LOSADA-ECHEBERRÍA *et al.*, 2017).

Apesar dos avanços positivos, a administração de drogas anticâncer causa uma série de efeitos colaterais, como no caso da doxorubicina que pode levar à cardiotoxicidade (MOCANU;

NAGY; SZÖLLŐSI, 2015) e à quimioresistência e, com isso, o desenvolvimento de um fenótipo mais resistente capaz de superar os efeitos citotóxicos dos quimioterápicos convencionais e consequente aumento dos casos recorrentes (MOCANU; NAGY; SZÖLLŐSI, 2015; BUDISAN *et al.*, 2017). Com este cenário clínico, a busca por novas terapias e moléculas naturais que apresentem menos efeitos colaterais e que ultrapassem a resistência ao tratamento, se tornou o principal objetivo no tratamento anticâncer. Há tempos, tem-se visto que compostos bioativos de plantas, especialmente os polifenóis, apresentam atividade biológica promissora sobre uma série de doenças como diabetes, inflamação, doenças relacionadas a obesidade, distúrbios neurodegenerativos, infecções bacterianas e virais, doenças cardiovasculares e câncer (LOSADA-ECHEBERRÍA *et al.*, 2017).

1.2 Polifenóis: aspectos gerais

Os polifenóis referem-se ao grupo de compostos não nutrientes originados do metabolismo secundário de plantas, que possuem um ou mais grupos hidroxil ligados por anéis aromáticos e estão extensamente presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal, como no vinho, chás, frutas, legumes, especiarias, oleaginosas e soja. No reino vegetal, eles estão envolvidos em diversos processos como polinização, pigmentação, crescimento e proteção contra patógenos, predadores e radiação UV (FRAGA *et al.*, 2010; DEL RIO *et al.*, 2013; BRAAKHUIS; CAMPION; BISHOP, 2016).

Com base em sua estrutura química, os polifenóis podem ser classificados em dois grandes grupos, os flavonoides e os não flavonoides (Figura 2) (DEL RIO *et al.*, 2013; ZHANG; TSAO, 2016)

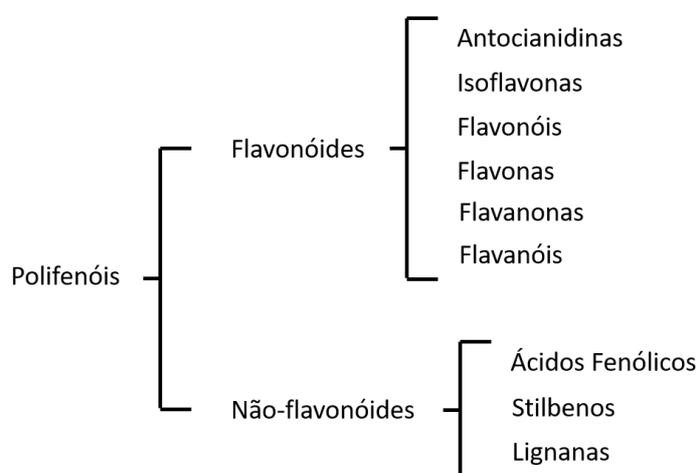


Figura 2. Classificação dos polifenóis em flavonoides e não flavonoides. (ZHANG & TSAO, 2016).

Com mais de 9000 compostos compondo a família, os flavonoides representam aproximadamente 60 % do total de polifenóis e são formados por uma estrutura básica contendo dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono, formando um heterociclo oxigenado. Podem ser divididos em 6 subclasses: flavonóis, flavanóis (flavan-3óis), flavonas, flavanonas, antocianidinas e isoflavonas, que se diferem em sua estrutura de acordo com a presença de anéis aromáticos e a extensão de sua saturação (DEL RIO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2016; AMAWI; JR; TIWARI, 2017) (Figura 3).

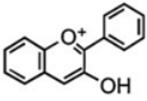
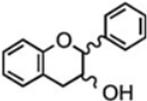
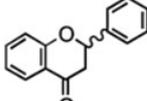
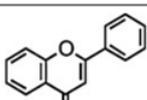
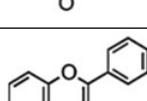
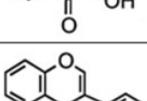
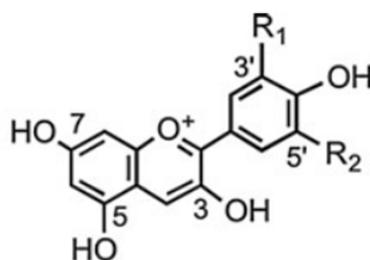
Classificação	Estrutura química	Compostos representativos	Principais fontes dietéticas
Antocianidinas		delfinidina, pelargonidina, cianidina, malvidina e petunidina	berries, uvas, cerejas, romã, ameixa
Flavanóis		epicatequina, epigallocatequina, EGCG, procianidinas	maçãs, peras, chá, cacau, leguminosas e vinho
Flavanonas		hesperidina, naringenina	frutas cítricas
Flavonas		apigenina, crisina e luteolina	salsa, laranja, cebola, chá, mel, especiarias, aipo
Flavonóis		quercetina, kaempferol, mirecetina, galangina, Isorhamnetina	berries, maçãs, brócolis, feijões, chá
Isoflavonas		genisteína, daidzeína	soja

Figura 3. Classificação dos flavonoides, estrutura química, compostos representativos e principais fontes dietéticas (adaptada de ZHOU *et al.*, 2016).

As antocianinas constituem a classe majoritária dos flavonoides e estão amplamente distribuídas no reino vegetal. São pigmentos solúveis responsáveis pelas cores vermelha, azul e roxa atrativas e brilhantes das frutas e verduras. Em plantas, as antocianinas são geralmente encontradas na forma glicosilada, ou seja, ligadas a um resíduo de açúcar que pode ser de glicose, galactose, arabinose, rutinose, ramnose ou xilose. As formas agliconas, que não apresentam uma molécula de açúcar associada à sua estrutura, são conhecidas como antocianidinas, incluindo cianidina, delfinidina, peonidina, petunidina, pelargonidina e

malvidina (DEL RIO *et al.*, 2013; ZHOU *et al.*, 2016) (Figura 4).



Antocianidina	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 4. Estrutura básica das principais antocianinas (Adaptado de DEL RIO *et al.*, 2013)

1.3 Antocianinas e ações anticâncer

A grande maioria das evidências científicas relacionadas aos efeitos benéficos do consumo de flavonoides centra nas doenças cardiovasculares (PONZO *et al.* 2015). Neste contexto, vários mecanismos de ação já foram propostos como redução da produção de mediadores e citocinas inflamatórias (CASSIDY *et al.*, 2015), inibição de vias associadas à angiogênese (CEREZO *et al.*, 2015) e diminuição do estresse oxidativo pelo aumento da atividade de enzimas antioxidantes e da capacidade antioxidante do organismo (KUNTZ *et al.*, 2014). Grande parte desses estudos mostra os efeitos benéficos das antocianinas sobre o desenvolvimento e tratamento dessas doenças.

No contexto do câncer, talvez o polifenol mais estudado seja o estilbeno resveratrol, onde uma busca recente na base de dados Pubmed disponibilizou mais de 3.000 publicações. Particularmente no caso do câncer de mama, já foi mostrado que o resveratrol age como quimio sensibilizador ao quimioterápico convencional Melfalan (CASANOVA *et al.*, 2012) e possivelmente age revertendo o fenótipo de resistência a múltiplas drogas (ALAMOLHODAEI *et al.*, 2017).

No caso particular das antocianinas, objeto de estudo do presente trabalho, existem em torno de 600 trabalhos disponíveis na base de dados PubMed, sugerindo sua ação anticâncer.

As antocianinas foram extraídas e isoladas de diferentes fontes vegetais para investigar sua capacidade anticâncer, em diferentes tipos de tumor como de mama, fígado, esôfago, cólon, entre outros (KHOO *et al.*, 2017). Assim como no caso do resveratrol, já foi mostrado o efeito das antocianinas como adjuvantes nos efeitos de quimioterápicos. Células de câncer de mama não resistentes, MDA-MB-453, BT474 e HCC1569, quando expostas a cianidina-3-*O*-glicosídeo e peonidina-3-*O*-glicosídeo, apresentaram maior sensibilidade ao efeito do quimioterápico convencional Traztuzumab, com consequente aumento da apoptose e redução da proliferação (LIU *et al.*, 2014). Complementarmente, os autores mostraram que as mesmas antocianinas, em células de câncer de mama com fenótipo de resistência a múltiplas drogas, promoveram redução na viabilidade possivelmente por reverter o efeito de resistência (LI *et al.*, 2016b).

Estudos mostram que extratos ricos em antocianinas podem funcionar como agentes anticâncer, pelo fato de terem como alvos vias relacionadas a apoptose e proliferação, além de afetaram o metabolismo energético dessas células. Em um estudo que avaliou os efeitos do extrato de arroz negro, rico em antocianinas, foi mostrado supressão da metástase em células de carcinoma mamário, MDA-MB-453 (HER2⁺), tendo como alvo a via RAS/RAF/MAPK, que está associada a regulação do ciclo celular, crescimento, proliferação e diferenciação celular (CHEN *et al.*, 2015). Adicionalmente, nosso grupo mostrou o efeito anticâncer do extrato de bagaço de uva, proveniente da indústria vitivinícola, rico em antocianinas como delphinidina-3-glicosídeo e cianidina-3-glicosídeo, em células de hepatocarcinoma humano HepG2 (SALES *et al.*, 2018). Propusemos que as antocianinas presentes no extrato foram responsáveis por reduzir a capacidade de utilizar glicose e por aumentar a função mitocondrial dessas células, tendo como resultante a redução na produção de espécies reativas de oxigênio e da proliferação celular. Estas alterações vistas no metabolismo energético das células HepG2 foram associadas ao efeito citotóxico do extrato de bagaço de uva nessas células.

1.3.1 Metabolismo da cianidina-3-*O*-glicosídeo

Dentre as antocianinas, a forma glicosilada da cianidina, Cianidina 3-*O*-glicosídeo (C3G) é a de maior distribuição na natureza. Ela está presente em diversas frutas e vegetais, como uva, morango, pêssego, feijão preto, mas principalmente em *berries* e, é responsável pela coloração azul e vermelha desses alimentos (OLIVAS-AGUIRRE *et al.*, 2016).

Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a estabilidade e biodisponibilidade da C3G. Foi visto que em meio de cultura DMEM, *cell free*, com pH ácido (2,3) a 37° C, não houve

degradação de cianidina e nem C3G, no entanto, ao mimetizar condições fisiológicas com pH 7,4 a 37° C, foi visto que a cianidina sofreu maior degradação, cerca de 96 %, enquanto que sua forma glicosilada, C3G, apresentou degradação de 50 % após 4 h (KAY; KROON; CASSIDY, 2009). Quando incubada em altas temperaturas, 70 - 90° C, em solução tampão e pH neutro (7,0), foi observado que a C3G sofreu degradação significativa, gerando um aumento proporcional de seu metabólitos, PCA (ácido protocatecuico) e PGA (do inglês, *phloroglucinaldehyde*), sendo que o PCA apresentou maior estabilidade em pH 7,0 em relação ao PGA (PACE *et al.*, 2018). Esses estudos sugerem que a antocianina é sensível ao pH neutro a alcalino e a altas temperaturas.

Quando incubada em um meio com células Caco-2 (células de mucosa intestinal), C3G e cianidina apresentaram o mesmo comportamento, sendo a C3G novamente mais estável do que a forma aglicona, com degradação de 57 e 96 % respectivamente, demonstrando que a degradação destes compostos se dá de forma espontânea no meio de cultura, com aumento proporcional dos metabólitos de fase I (KAY; KROON; CASSIDY, 2009).

No entanto, mesmo com a instabilidade demonstrada em ensaios *in vitro*, estudos com seres humanos utilizando C3G isotopicamente marcada demonstram que a biodisponibilidade e bioacessibilidade desta antocianina é maior do que considerada previamente (CZANK *et al.*, 2013). Os autores mostraram que a ingestão de 500 mg de C3G por adultos jovens saudáveis, do sexo masculino, resultou no aparecimento de C3G e de seus metabólitos (conjugados de fase II do ácido proto-catecuico, ácido ferúlico e ácido hipúrico) no soro, ar expirado, urina e nas fezes. As concentrações mais elevadas desses compostos foram encontradas na urina e nas fezes dos voluntários.

Em complemento ao estudo com C3G isotopicamente marcada, Ferrars *et al.* (2014) identificaram uma diversidade de metabólitos da C3G que não haviam sido demonstrados anteriormente, utilizando a técnica HPLC-ESI-MS/MS, no soro, urina e fezes de voluntários após administração de 500mg de C3G C3G e conjugados da C3G e cianidina, foram detectados na urina após o período de 1 – 2 h de sua administração por gavagem, no entanto, a C3G representa apenas 2 % dos metabólitos encontrados na circulação. Após 2 h, foi visto um considerável aumento de PCA e PGA no soro e urina dos voluntários. Levando em consideração o aumento na concentração de PCA e PGA em um curto período, sugere-se que a C3G degrada espontaneamente no intestino delgado e circulação e que sua bioatividade pode ser mediada pela ação de seus metabólitos. Dentre os compostos encontrados por Ferrars *et al* (2014), estão os principais metabólitos de fase I da C3G, que são o PCA e PGA e metabólitos de fase II, metil, sulfato, glicina e glucoronil.

Dado conhecimento prévio sobre a metabolização da C3G no organismo humano e sua distribuição em alimentos, estudos *in vitro* apresentam-se promissores para a compreensão dos mecanismos de ação da C3G no organismo humano.

1.3.2 Ações anticâncer da cianidina-3-O-glicosídeo

Estudos *in vitro* e em modelos animais têm demonstrado efeitos benéficos da C3G, incluindo ação antioxidante, anti-inflamatória, efeito protetor pulmonar e cardíaco. Yan *et al.*, (2015), constataram que em ratos com injúria pulmonar aguda, a C3G apresentou um efeito protetor antioxidante, reduzindo a mortalidade desses animais causada por sepse, através da inibição da atividade de NF- κ B e aumento da atividade de enzimas antioxidantes, como a SOD (superóxido dismutase).

Em células hepáticas, a C3G estimulou a oxidação de ácidos graxos através da ativação da via da AMPK, que diminui a atividade da enzima Acetil CoA carboxilase e ativa a carnitina palmitoil acil transferase-1 (GUO *et al.*, 2012). Um outro estudo demonstrou que 40 μ M de C3G promoveu a redução do citocromo *c* (SKEMIENE *et al.*, 2013) e foi capaz de aumentar a eficiência da fosforilação oxidativa em mitocôndrias danificadas por isquemia, através do aumento na atividade do complexo I da cadeia transportada de elétrons (SKEMIENE; LIObIKAS; BORUTAITE, 2015). Além disso, a ação antioxidante e hipolipidêmica da C3G já foi descrita por Duchnowicz *et al.*, (2012), onde o tratamento *in vitro* com C3G do sangue e eritrócitos isolados de pacientes hipercolesterolêmicos foi eficaz em reduzir a concentração de colesterol total e a peroxidação lipídica (DING *et al.*, 2006; DUCHNOWICZ *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2015).

A ação anticâncer da C3G tem sido caracterizado em diferentes modelos. Em células de glioblastoma, U87, a C3G promoveu efeito apoptótico associado à alteração de proteínas da família BCL-2 (do inglês, *B cell lymphoma 2*), com aumento da proteína pró apoptótica, BAX (do inglês, *BCL-2-associated X protein*) e redução da anti-apoptótica BCL-2 (HOSSEINI *et al.*, 2017). A cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo, inibiram de forma dose-dependente a migração e invasão de células de carcinoma pulmonar humano altamente metastático, A549, mesmo na ausência de citotoxicidade (CHEN *et al.*, 2006).

Particularmente no câncer de mama, a C3G foi eficaz de promover a apoptose de células de câncer de mama triplo negativo, através da degradação de EGFR (do inglês, *Estrogen Growth Factor Receptor*) (WANG *et al.*, 2016). Adicionalmente, a C3G reduziu a viabilidade de células HER2⁺ de forma sinérgica com o quimioterápico Trastuzumab (LIU *et al.*, 2014).

Isolada da beterraba-sacarina, a C3G causou efeito citotóxico nas linhagens celulares de câncer colorretal Caco-2, HepG2 (hepático) e MCF-7 (mama), além de promover ativação das proteínas pro-apotóticas Bax e caspase 3 (CHEN; ZHAO; YU, 2016). Isolada da amora, a C3G induziu a apoptose em células de câncer de mama, MDA-MB-453, pela ativação de caspase-3 clivada e fragmentação do DNA. Em complemento, mostraram inibição do crescimento tumoral em modelo *in vivo*, após inoculação de células MDA-MB-453, indicando sua eficácia em inibir a progressão do tumor (CHO *et al.*, 2017). Ademais, promoveu redução da viabilidade, alteração no ciclo celular e apoptose de forma dose-dependente na linhagem de carcinoma mamário metastático humano HS578T (CHEN *et al.*, 2005).

1.4 Reprogramação do metabolismo intermediário no câncer

Levando em consideração a heterogeneidade do câncer de mama e dos outros tipos de tumores, o metabolismo energético comum a todos para produção de ATP e síntese de compostos biossintéticos, eventos essenciais para manutenção da elevada taxa de proliferação dessas células, apresenta pontos de regulação que podem ser explorados como alvos metabólicos na busca de novas terapias anticâncer (MOCANU; NAGY; SZÖLLŐSI, 2015). Neste sentido, apesar dos estudos indicando ações benéficas da C3G na redução da proliferação de células tumorais, ainda pouco se tem descrito acerca de seus efeitos sobre o metabolismo de glicose e sobre a bioenergética mitocondrial.

Dentre as alterações moleculares associadas ao câncer, possivelmente adaptações no metabolismo energético e na produção de compostos biossintéticos- essenciais para suportar taxas de proliferação celular elevadas- são comuns a grande maioria dos tumores (AMOEDO *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ *et al.*, 2014)(AMOEDO *et al.*, 2011; RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ *et al.*, 2014). Nesse sentido, a literatura científica recente mostra que a flexibilidade metabólica dos diferentes tipos de tumores está intimamente associada à sua capacidade de proliferação e invasão e que “terapias bioenergéticas” direcionadas ao metabolismo de glicose, de aminoácidos, particularmente da glutamina, e à bioenergética mitocondrial podem auxiliar no tratamento anticâncer (OBRE, E; ROSSIGNOL, R, 2015).

1.4.1 Metabolismo de glicose

A glicose é a principal fonte de carbonos para produção de ATP (do inglês *Adenosine Triphosphate*) na maioria das células de mamíferos. Além da importância para a produção de

ATP, a glicose é oxidada pelas células para fornecer precursores biossintéticos necessários para o crescimento e proliferação celular e manutenção do estado oxido-redutor apropriado (NELSON; COX, 2014).

Através de transportadores específicos - GLUT (do Inglês *GLU*ucose *Tran*sporters), a glicose é transportada através da membrana celular e onde sucede a primeira etapa da glicólise catalisada pela enzima hexoquinase (HK), que fosforila a glicose em glicose-6-fosfato em uma reação irreversível dependente de ATP. Na glicólise, 1 molécula de glicose é oxidada parcialmente em 2 moléculas de piruvato, produzindo 2 ATP e 2 NADH (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide*) (NELSON; COX, 2014).

Na maioria das células, o piruvato é direcionado para a mitocôndria, onde é oxidado à Acetil-CoA, pela enzima piruvato desidrogenase, que entra no Ciclo de Krebs onde ocorre a oxidação completa dos carbonos da glicose. No Ciclo de Krebs há produção das co-enzimas reduzidas NADH e FADH₂ que são oxidadas na cadeia transportadora de elétrons, com concomitante aumento do potencial de membrana mitocondrial e da força próton motriz, essenciais para a síntese de ATP pela enzima ATP sintase na fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2014).

Em células que não tem mitocôndrias ou quando a velocidade de produção de piruvato excede a capacidade oxidativa das células, o piruvato é reduzido em lactato no citoplasma pela enzima lactato desidrogenase (LDH), com produção de NAD⁺. A reoxidação do NADH no citoplasma, nessas condições onde a capacidade oxidativa/mitocondrial é reduzida, é essencial para dar continuidade à glicólise, que depende de NAD⁺ (ORTEGA *et al.*, 2009). A conversão de glicose em lactato consiste na glicólise anaeróbica ou fermentação (NELSON; COX, 2014).

1.4.2 Etapas comprometidas no metabolismo da glicose no câncer

Em 1930, Otto Warburg descreveu que células tumorais apresentavam aumento do consumo de glicose com elevada produção de lactato, mesmo na presença de oxigênio, além do aumento na expressão de enzimas glicolíticas e de transportadores GLUT (OBRE; ROSSIGNOL, 2015). A hipótese difundida na época era de que tumores apresentavam altas taxas de produção de lactato devido à disfunção mitocondrial e diminuição das vias oxidativas. Atualmente, embora já tenha sido descrito que o modelo de Warburg não é universalmente aplicável a todos os tipos de câncer e que a maioria apresenta mitocôndrias funcionais, o aumento expressivo na captação e na utilização de glicose é prevalente na maioria dos tumores

(KROEMER; POUYSSEGUR, 2008), feito que as distingue de células não tumorais (HAY, 2016).

Neste sentido, na prática clínica, a técnica FDG-PET que consiste na utilização de tomografia por emissão de prótons (PET) associada ao análogo de glicose ^{18}F -flúor-deoxi-2-glicose (FDG), detecta esse aumento exorbitante da captação e fosforilação da glicose pelas células, sendo, portanto, utilizada para identificar a localização de células tumorais e uma ferramenta essencial para o diagnóstico, tratamento e prognóstico, no caso de células metastáticas (MANKOFF *et al.*, 2007).

O aumento na captação de glicose para produção glicolítica de ATP ou para reações anabólicas a partir da síntese de intermediários desta via e das vias dos polióis e das pentoses, é essencial para o crescimento, proliferação e aumento da capacidade invasiva destas células (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008) (Figura 5).

Esse incremento na captação de glicose é mediado por transportadores GLUTs, sendo que no câncer as isoformas 1 e 3 são as de maior expressão. O GLUT-1 está super expresso em muitos tumores, incluindo câncer hepático, mamário, pancreático, cerebral, renal, pulmonar, endometrial, coloretal, cervical e de ovário (SZABLEWSKI, 2013).

As enzimas glicolíticas apresentam papel fundamental na carcinogênese, sendo as reações irreversíveis catalisadas pelas enzimas Hk, fosfofrutoquinase e piruvato quinase, possíveis alvos terapêuticos (HAY, 2016). A Hk é a primeira enzima da glicólise e apresenta 4 isoformas diferentes em humanos com distribuição tecido-específica. Em células tumorais, há uma superexpressão das isoformas I (HkI) e II (HkII) (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2014), sendo a HkII comum em diversos tipos de câncer, incluindo de mama (SATO-TADANO *et al.*, 2013), fígado (KWEI *et al.*, 2012), coloretal (HO; COOMBER, 2016), próstata (WANG *et al.*, 2014b) e glioblastoma (WOLF *et al.*, 2011).

Cerca de 70 % da HkII encontra-se associada à membrana externa da mitocôndria, ligada à proteína VDAC (do inglês, *Voltage Dependent Anion Channel*), localizada no espaço intermembrana mitocondrial e é sua localização intracelular que favorece altas taxas de proliferação celular. A interação da HkII à mitocôndria aumenta a atividade da enzima e inibe o processo de apoptose mitocondrial, pois evita a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e impede a liberação do citocromo *c* para o citosol e a diminuição do potencial de membrana mitocondrial. A liberação de citocromo *c* do espaço intermembranas para o citosol é o principal mecanismo de indução da apoptose pela formação do complexo Apaf-1 e ativação de caspases (PASTORINO; SHULGA; HOEK, 2002; CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2014; CZABOTAR *et al.*, 2014). Desta forma, o aumento da atividade de

isoformas da Hk associadas à mitocôndria favorece a manutenção da proliferação tanto pelo aumento da utilização de glicose como pela inibição do processo de apoptose.

O produto da reação catalisada pela Hk, a glicose-6-fosfato, pode seguir também pela via das pentoses fosfato, que é fundamental para a síntese de ribonucleotídeos e NADPH. Esta via desempenha importante papel na tumorigênese por ser fonte de precursores biossintéticos que suprem as necessidades anabólicas de células tumorais, além de ser a principal fonte de NADPH, que é necessário na síntese lipídica e para manter a homeostase redox intracelular (CAIRNS; HARRIS; MAK, 2011; PATRA; HAY, 2014; HAY, 2016).

Outra enzima chave que apresenta modificações na carcinogênese é a gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (G3PDH), que catalisa a reação de fosforilação do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato e produção de NADH. Também super expressa em células de câncer, é crucial para a sobrevivência pois age como inibidor da via apoptótica mediada por caspases (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2014).

Uma terceira enzima que compromete o metabolismo da glicose, é a piruvato quinase (PK), que catalisa a conversão irreversível de fosfofenolpiruvato e ADP em piruvato e ATP. Em mamíferos apresenta 4 isoformas, PKM1, PKM2, PKR e PKL, sendo que em células tumorais há aumento da isoforma PKM2. Além de contribuir para o aumento da glicólise, a PKM2 estimula a sobrevivência do tumor pois induz a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-xL (do inglês, *B-cell lymphoma-extra large*) (KWON *et al.*, 2012; LUO; SEMENZA, 2012; CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2014).

Em complemento a elevada captação de glicose, há aumento proporcional da produção de ácidos bicarbônicos e láctico por essas células, a liberação deles no meio extracelular proporciona ambiente mais ácido que favorece a invasão e suprime efeitos imunológicos anticâncer. A produção de lactato é catalisada pela enzima lactato desidrogenase (LDH), que apresenta 4 isoformas, LDHA, LDHB, LDHC e LDHD. A isoforma LDHA é a de maior expressão nos tumores e possui alta afinidade pelo piruvato. O lactato produzido é excretado pelas células tumorais através de transportadores de ácidos monocarboxílicos (MCT I e II), no espaço extracelular, pode ser captado por células do estroma, para regenerar o piruvato que será usado pela célula tumoral na fosforilação oxidativa (KROEMER; POUYSSEGUR, 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011; KENNEDY *et al.*, 2013).

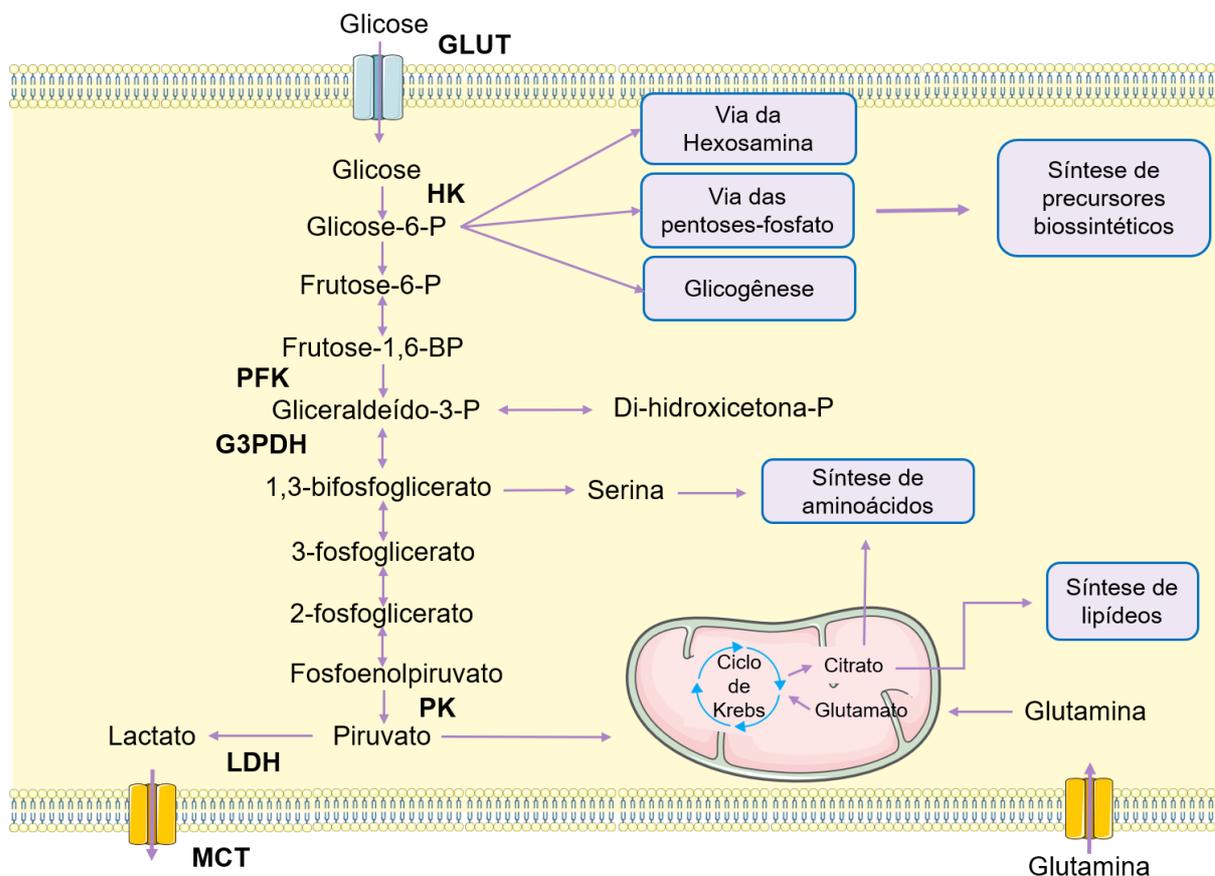


Figura 5: Representação esquemática da glicólise, via das pentoses-fosfato, glutaminólise, via de síntese de lipídios e aminoácidos. O metabolismo da glicose é acelerado em células de câncer devido ao aumento na expressão de transportadores e enzimas que dirigem o fluxo de glicose a fim de suprir as demandas anabólicas das células. Enzimas e transportadores que estão superexpressas em células de câncer estão representados em negrito. (Adaptado de MOCANU; NAGY; SZÖLLÖSI, 2015)

Di – hidroxiketona-P, di-hidroxiketona-fosfato; Frutose-6-P, Frutose-6-fosfato; G3PDH, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; Gliceraldeído-3-P, gliceraldeído-3-fosfato; Glicose-6-P, Glicose-6-fosfato; GLUT, transportador de glicose; HK, hexoquinase; LDH, Lactato desidrogenase; MCT, transportador de ácidos monocarboxílicos; PFK, fosfofrutoquinase; PK, piruvato quinase.

1.4.3 Oncogenes e regulação do metabolismo de glicose

O incremento na capacidade glicolítica nas células tumorais sustentado pelo aumento de transportadores de glicose e de algumas enzimas-chave do metabolismo glicolítico, como já mencionado, é regulado pela ativação de alguns oncogenes, como c-MYC, PI3K, e principalmente o fator de transcrição HIF-1 (do Inglês Hypoxia Inducible Factor-1) (TARRADO-CASTELLARNAU; DE ATAURI; CASCANTE, 2016).

HIF-1 regula diferentes etapas do metabolismo de glicose em células tumorais, como aumento da expressão de GLUTs, das enzimas Hk I e II, LDHA e do transportador de lactato MCT-1 (TARRADO-CASTELLARNAU; DE ATAURI; CASCANTE, 2016). A ativação de HIF-1 depende de sua estabilidade, que ocorre em condições de baixa tensão parcial de

oxigênio. E, apesar de a ativação de HIF-1 ser comum a diversos tipos de tumores, células tumorais localizadas no centro de tumores sólidos apresentam maior ativação de HIF-1 (TOTH; WARFEL, 2017). Além de aumentar a utilização de glicose pela via anaeróbica, HIF-1 diminui sua utilização pela via aeróbica, através da inibição da enzima piruvato desidrogenase (PDH, que converte piruvato em Acetil-CoA (KIM, *et al.*, 2006).

A regulação exercida por HIF ocorre principalmente sobre a glicólise anaeróbia, enquanto que em condições com aumento da tensão parcial de oxigênio, o fator de transcrição c-MYC é o principal regulador. O aumento na expressão de c-MYC ocorre em diversos tipos de câncer, como de cólon, mama, próstata e bexiga (DANG; LE; GAO, 2009). Sua ação contribui para a conversão de glicose em piruvato, pois diminui a expressão da enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), principal inibidor da PDH. Desta forma, c-MYC estimula glicólise aeróbica através da oxidação do piruvato em Acetil Co-A. Do mesmo modo, c-MYC promove o aumento da expressão de LDHA e MCT1, favorecendo o aumento na produção e efluxo de lactato. Outros genes glicolíticos regulados por c-MYC incluem as enzimas HkII, G3PDH, enolase 1 e PK, e o transportador GLUT1 (OSTHUS *et al.*, 2000; DANG; LE; GAO, 2009; TARRADO-CASTELLARNAU; DE ATAURI; CASCANTE, 2016).

Outro oncogene que participa ativamente do remodelamento bioenergético nas células de câncer PI3K/Akt (fosfatidil-inositol-3-quinase/Akt). Dentre as várias ações deste oncogene sobre o metabolismo de glicose, estão o aumento da expressão de GLUT1 (BARTHEL *et al.*, 1999; WIEMAN; WOFFORD; RATHMEL, 2007; BARRON *et al.*, 2016), e o estímulo da ligação da Hk à mitocôndria, o que aumenta sobremaneira a captação e a metabolização de glicose pelas células tumorais. Adicionalmente, a associação da Hk à mitocôndria, como já mencionado anteriormente, além de aumentar a atividade desta enzima, impede a formação do poro de transição de permeabilidade da membrana através de sua interação com as proteínas VDAC e Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica. Ademais, a interação de BAX e BAK (do inglês, *BCL-2 antagonist or killer*) duas proteínas pró-apoptóticas, é inibida pela associação da Hk a membrana externa da mitocôndria. Desta forma, a ativação de PI3K/Akt, está diretamente associada à inibição do processo de apoptose mitocondrial (ROBEY; HAY, 2009).

A regulação do metabolismo tumoral também é exercida pelo fator de transcrição p53, que atua como supressor tumoral e é conhecido como “guardião do genoma”. A proteína p53 é capaz de suprimir a tumorigênese através da regulação do ciclo celular e indução da apoptose em resposta ao estresse. Entretanto, aproximadamente 60 % dos cânceres humanos apresentam mutação na proteína p53, o que promove aumento da sobrevivência, invasão e metástase do tumor. Adicionalmente, tumores que apresentam mutação na p53, têm expressão elevada de

GLUT 1, sugerindo um papel dessa proteína na regulação da utilização de glicose pelas células tumorais (LU; TAN; CAI, 2015; CORDANI *et al.*, 2016; TARRADO-CASTELLARNAU; DE ATAURI; CASCANTE, 2016).

A partir dessas informações, torna-se clara que a flexibilidade metabólica dos diferentes tipos de cânceres envolve a regulação de diferentes etapas do metabolismo de glicose e função da mitocôndria, esse último particularmente relacionado à inibição da regulação da via de apoptose. Da mesma forma, muitos mecanismos parecem regular reciprocamente o metabolismo energético no citoplasma e na mitocôndria, representando, portanto, um aspecto importante na terapia anticâncer (AMOEDO *et al.*, 2011).

1.5 Polifenóis de alimentos e efeitos anticâncer sobre o metabolismo energético

Apesar de ainda escassa, a literatura científica tem mostrando a ação anticâncer de alguns compostos bioativos isolados, tendo como alvo enzimas e transportadores relacionados ao metabolismo de glicose (Figura 6). E, mais uma vez, o composto mais estudado neste contexto é o resveratrol. Li *et al.* (2016) demonstraram que o resveratrol reduziu a expressão da enzima Hk-II e a utilização de glicose em células de câncer de pulmão (LI *et al.*, 2016a). Gomez *et al.* (2013) demonstraram que o resveratrol reduziu a viabilidade, o consumo de glicose e ATP em células de carcinoma mamário humano, MCF-7, sendo esses efeitos correlacionados a inibição da enzima fosfofrutoquinase (PFK) após tratamento com resveratrol. Adicionalmente, evidências recentes mostraram que o resveratrol é um potente regulador da função mitocondrial de células tumorais, através da regulação da biogênese e de vias relacionadas à produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Além do resveratrol, já foi descrito que a curcumina, um curcuminóide, derivada da *Curcuma aromatica salisb*, também apresenta efeito inibidor sobre a atividade da enzima Hk-II em células de câncer colorretal. A ação da curcumina parece estar associada à dissociação da Hk-II da membrana externa da mitocôndria, o que levou à redução do consumo de glicose e da produção de lactato, e indução da via de apoptose nestas células (WANG *et al.*, 2014). Da mesma forma, a Oroxila-A, um flavonóide proveniente da raiz da *Scutellaria*, reduziu a atividade e expressão da Hk-II em células de câncer de pulmão, ademais diminuiu a produção de lactato, expressão do GLUT 1 e a captação de glicose em células de carcinoma mamário humano (WEI *et al.*, 2013). Ademais, o Kaempferol já foi descrito como inibidor da captação de ³H-DG, um análogo de glicose não metabolizável utilizado para avaliar o metabolismo de

glicose, em células MCF-7, com efeito associado a redução da expressão do transportador GLUT1 e inibição de MCT-1 (AZEVEDO *et al*, 2015)

A partir desses resultados, a utilização de polifenóis de alimentos que tenham como alvo o metabolismo energético, apresenta-se promissora como terapia anticâncer. Tendo em vista que as alterações metabólicas são características de células tumorais e menos frequentes em células não tumorais, possivelmente a utilização terapêutica de polifenóis de alimentos possivelmente cursa com menos efeitos colaterais do que drogas convencionais.

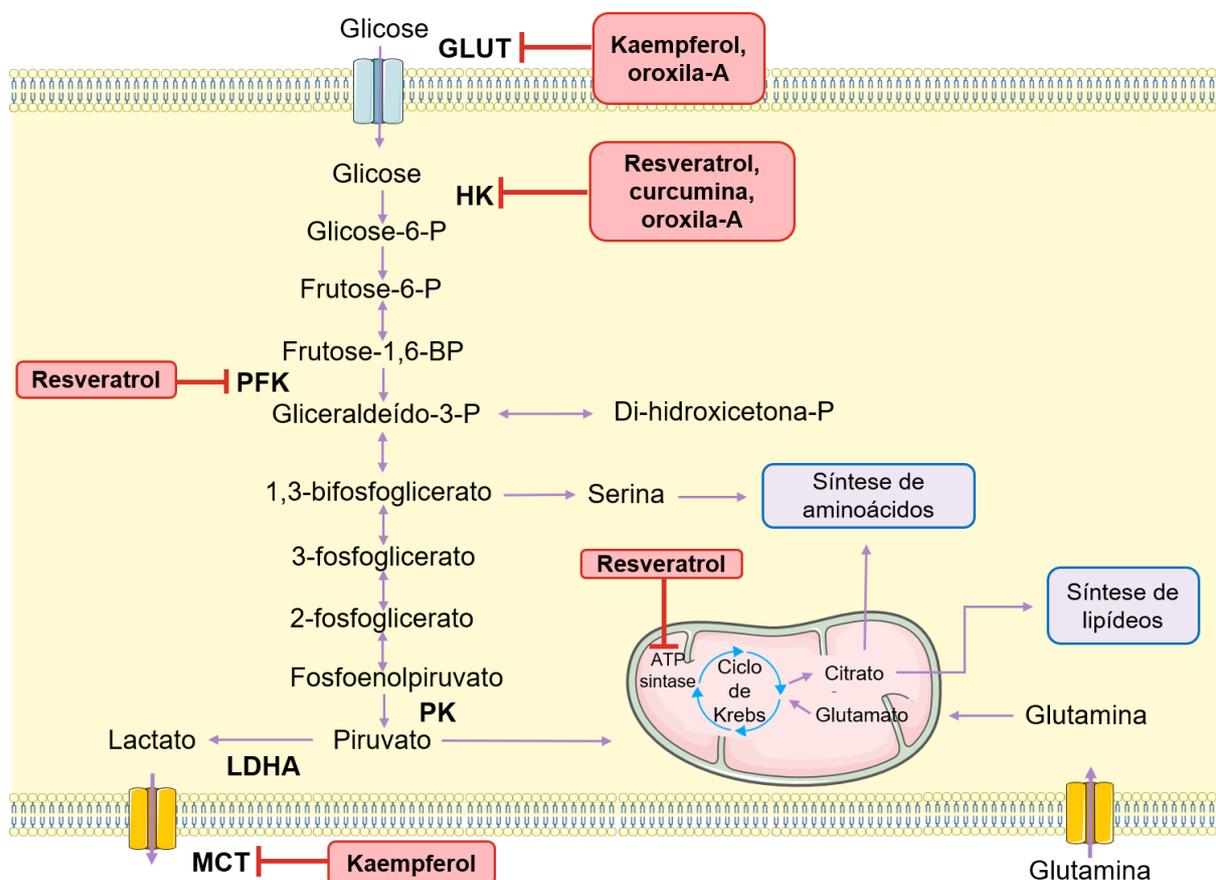


Figura 6: Representação esquemática da glicólise, via das pentoses-fosfato, glutaminólise, via de síntese de lipídios e aminoácidos, e a inibição de etapas limitantes no metabolismo por polifenóis. Inibição do GLUT por Kaempferol (AZEVEDO, 2015) e oroxila-A (WEI *et al*, 2013), da HK pelo resveratrol (LI *et al.*, 2016a), curcumina (WANG *et al.*, 2014) e oroxila-a (WEI *et al.*, 2013), a PFK por resveratrol, o MCT por Kaempferol. Na mitocôndria, há inibição da ATP sintase pelo resveratrol (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). (Adaptado de MOCANU; NAGY; SZÖLLŐSI, 2015)

Di – hidroxicetona-P, di-hidroxicetona-fosfato; Frutose-6-P, Frutose-6-fosfato; G3PDH, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; Gliceraldeído-3-P, gliceraldeído-3-fosfato; Glicose-6-P, Glicose-6-fosfato; GLUT, transportador de glicose; HK, hexoquinase; LDH, Lactato desidrogenase; MCT, transportador de ácidos monocarboxílicos; PFK, fosfofrutoquinase; PK, piruvato quinase.

2. Justificativa

Em virtude da dependência de células tumorais por glicose para suprir sua necessidade de crescente proliferação, o metabolismo energético dessas células, principalmente a via glicolítica, tem sido estudado como alvo terapêutico potencial no câncer. Compostos naturais que tenham como alvo de sua ação terapêutica as vias de produção de ATP podem se tornar promissores no tratamento anticâncer.

A partir de evidências sugestivas que alguns compostos bioativos, especialmente os polifenóis como resveratrol e quercetina apresentam efeito sobre o metabolismo de glicose e de enzimas glicolíticas, especulamos que a C3G pode apresentar efeito similar, levando em consideração sua ação no câncer previamente descrita. Além disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação *in vitro* da C3G sobre o metabolismo intermediário celular e, até o momento, não há na literatura estudos que tenham avaliado sua ação no metabolismo glicolítico de células de câncer.

3. Objetivo geral

Investigar os efeitos da cianidina-3-*O*-glicosídeo e de seu metabólito ácido protocatecuico, sobre o metabolismo de glicose nas linhagens de células mamárias humanas tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) e não tumoral (MCF10A)

3.1 Objetivos específicos

- Investigar o efeito da cianidina-3-*O*-glicosídeo na atividade metabólica das células
- Avaliar os efeitos da cianidina-3-*O*-glicosídeo sobre o fluxo glicolítico das células
- Avaliar a ação da cianidina-3-*O*-glicosídeo na atividade da enzima hexoquinase nas frações citosólica e mitocondrial a partir da incubação previa das células
- Investigar a ação direta da cianidina-3-*O*-glicosídeo e de seu metabólito ácido protocatecuico na atividade da hexoquinase nas frações citosólica e mitocondrial

4. Metodologia

4.1 Modelos Celulares

Para este trabalho foram utilizadas como modelo experimental, três linhagens celulares, sendo duas de carcinoma mamário humano, MCF-7 e MDA-MB-231, e uma não tumoral, MCF10A. Todas as linhagens são de mama, de origem epitelial, obtidas do banco de células American Type Cell Collection.

A MCF10A, linhagem luminal, foi estabelecida a partir de doença fibrocística de mama e é uma linhagem não tumoral. Entretanto, por ser uma célula imortalizada, suas características genótípicas/fenótípicas não são idênticas das células normais de mama (LACROIX; LECLERCQ, 2004; QU *et al.*, 2015).

A linhagem de carcinoma de mama, MCF-7 é classificada como luminal pois apresenta expressão elevada de genes envolvidos em junções celulares, como E-caderina. Esta linhagem é positiva para RE e apresenta a proteína p53 nativa. Adicionalmente, a literatura descreve que esta linhagem apresenta um fenótipo oxidativo (elevada atividade mitocondrial) (GUPPY *et al.*, 2002; COMŞA; CÎMPEAN; RAICA, 2015).

A linhagem de carcinoma mamário MDA-MB-231 é do tipo basal, caracterizada por apresentar a proteína p53 mutada e por não expressar nenhum dos receptores hormonais, RE, RP e HER₂, desta forma denominada TNBC (do inglês, *Triple Negative Breast Cancer*). Esta linhagem é altamente metastática e apresenta expressão elevada de marcadores de células mesenquimais, como a vimentina, o que favorece sua migração e invasão (LACROIX; LECLERCQ, 2004).

4.2 Cultura de células e compostos bioativos

As linhagens tumorais de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, foram cultivadas em meio RPMI, suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB). As células foram cultivadas nas densidades, $0,6 \times 10^6$ e $0,5 \times 10^6$ células, respectivamente, em garrafas de 25 cm². A linhagem não tumoral, MCF10A, foi cultivada em meio DMEM-F12, suplementado com 10 % de SFB, 1 mg/mL de EGF (do inglês, *Epidermal Growth Factor*), 50 µg/mL de hidrocortisona e 2 mg/mL de insulina. A densidade celular foi de $0,5 \times 10^6$ em garrafa de 25 cm². As três linhagens foram mantidas em atmosfera controlada com 5 % CO₂ a 37 °C e subcultivadas a cada 3 dias.

A antocianina cianidina-3-*O*-glicosídeo foi isolada de um extrato de arroz negro e gentilmente cedida pelo Pesquisador Paul Kroon, do Quadram Institute Bioscience, Norwich, Reino Unido sendo do grau de pureza de 98 %. O ácido protocatecuico utilizado foi da Sigma-Aldrich. Ambos foram preparados em DMSO (Dimethyl Sulfoxide) e armazenados a -20° C.

4.3 Ensaio de atividade metabólica

Para avaliar o efeito da C3G sobre a atividade metabólica celular, foi feito o ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazólio).

Trata-se de um ensaio colorimétrico (MOSMANN, 1983), onde o MTT, um sal de coloração amarela solúvel em água, é reduzido a formazan por desidrogenases celulares/mitocondriais, um composto que forma um precipitado de coloração roxa solúvel em solventes orgânicos. A intensidade da coloração pode ser quantificada espectrofotometricamente e correlacionada com a atividade metabólica/mitocondrial das células.

As células foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h e então tratadas com diferentes concentrações de C3G (1, 3, 7, 10, 20, 40 e 100 μ M) por 24 h. Depois do período de incubação, o meio de cultura foi trocado por um meio sem C3G. As células controle foram incubadas nas mesmas condições, sem a C3G. Após 48 e 72 h do momento da incubação com C3G, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com a solução de MTT a 0,5 mg/mL dissolvida em BSS (do inglês, *Balanced Salt Solution*) por 2 h a 37° C. A solução foi descartada e adicionou-se isopropanol ácido (0,1 N HCl) para dissolver os cristais de formazan. A leitura foi feita em leitor de microplacas a 570 nm.

4.4 Produção de lactato

O lactato produzido através da via glicolítica foi avaliado no meio de cultura, pelo método descrito por Hamilton & Pardue (1984). O lactato liberado para o meio de cultura reflete o quanto do composto foi acumulado em um determinado período. Foi feita a quantificação de lactato baseado na oxidação do piruvato e consequente redução de NAD⁺, catalisada pela enzima lactato desidrogenase.

Para este ensaio, foram plaqueadas 10⁶ células das linhagens MDA-MB-231, MCF-7 e MCF10A em placas de 96 poços. Após 24 h de incubação, o meio foi removido e adicionado meio de cultura com diferentes concentrações de C3G (1, 3, 7, 10, 20, 40 e 100 μ M) por 24 h.

Após este período, o meio de cultura foi coletado em microtubos de plástico e adicionou-se um novo meio de cultura sem C3G, após 48 e 72 h do momento da incubação foram feitas novas coletas de meio de cultura. As células controle foram incubadas nas mesmas condições, sem a C3G. As coletas de meio de cultura foram feitas em duplicata.

O ensaio para quantificação de lactato foi realizado adicionando 6 μL de amostra de meio de cultura no meio de reação em tampão hidrazina/glicina (pH 9,2), contendo 5 mg/mL $\beta\text{-NAD}^+$ e 15 U/mL de lactato desidrogenase. A leitura do ensaio foi realizada em espectrofotômetro a 340 nm e a presença de lactato no meio de cultura foi comparada com uma curva padrão de lactato e expressa em nmol de lactato/poço (HAMILTON; PARDUE, 1984).

4.5 Preparo das frações citosólica e mitocondrial das linhagens celulares

Para obter a fração mitocondrial e citosólica das linhagens, utilizou-se o método de centrifugação diferencial, onde o lisado celular total é submetido a diferentes etapas de centrifugação e as frações subcelulares são separadas de acordo com sua densidade (WILSON & WALKER, 2000).

Para este ensaio, $1,2 \times 10^6$ células das linhagens MCF10A e MDA-MB-231, e $1,5 \times 10^6$ células da linhagem MCF-7, foram plaqueadas em placas de petri de 60 cm^2 . As células foram mantidas em incubadora a 37°C e 5 % de CO_2 . O meio de cultura foi removido e a monocamada celular lavada com PBS (Phosphate Buffered Saline – Dulbecco A) a 4°C . Em seguida, foi adicionado 1 mL de PBS gelado às placas e as células foram tripsinizadas para dissociação. A suspensão de células foi transferida para um tubo cônico de plástico de 15 mL e centrifugadas a $1.000 \times g$ por 10 minutos (Fanem Excelsa II – Mod. 206 SL). O precipitado celular foi homogeneizado em tampão de extração proteica, na proporção 300 μL de tampão para cada 2 placas, contendo 10 mM TRIS-HCl pH 7,4, 250 mM sacarose, 20 mM NaF, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF e 64,3 μL de CIP (Coquetel inibidor de protease - ROCHE). A suspensão de células foi transferida para um homogeneizador de vidro (Wheatton Potter – Elvehjem), onde o processo de lise foi feito manualmente por 2 minutos, em banho de gelo (4°C).

O lisado celular foi transferido para um microtubo de plástico e centrifugado a $100 \times g$ por 5 minutos (centrifuga Sigma 4K15), a 4°C para descartar *debris* celulares. O sobrenadante resultante foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 min (centrifuga Sigma 4K15), a 4°C . O sobrenadante, correspondente à fração citosólica, foi transferido para outro tubo e o precipitado, correspondente à fração mitocondrial, foi homogeneizado em 60 μL de tampão de extração proteica. Tanto o sobrenadante (fração citosólica) quanto o precipitado (fração mitocondrial)

foram usados para medir a atividade da enzima Hk, por ensaio enzimático acoplado (AMOEDO *et al.*, 2011).

4.6 Ensaio enzimático acoplado

A atividade da Hk foi avaliada nas frações citosólica e mitocondrial por ensaio enzimático acoplado, que consiste na utilização de uma via de interconversão de NAD^+ e NADH auxiliar, que não faz parte do sistema da reação de interesse. A molécula de NAD^+ tem a característica de, ao transitar entre os estados oxidado (NAD^+) e reduzido (NADH), absorve menos ou mais luz. Esta propriedade permite avaliar a variação na absorvância em espectrofotômetro, comprimento de onda 340 nm. Assim, assumindo o coeficiente de extinção molar do NADH a 340 nm, ($\epsilon = 6,22 \times 10^3 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e considerando que 1 mol de glicose-6-fosfato produzido equivale a 1 mol de NAD^+ reduzido, é possível calcular a atividade da enzima Hk pela seguinte equação:

$$\text{Atividade específica} = \frac{\Delta \text{Absorvância}}{6,22 \times \text{mg de proteína}^{-1}} \times \text{S}$$

Para os ensaios de efeito crônico com C3G, as células foram cultivadas em placas de petri de 60 cm^2 , nas densidades $1,2 \times 10^6$ para as linhagens MCF10A e MDA-MB-231, $1,5 \times 10^6$ para a linhagem MCF-7. As células foram incubadas com C3G nas concentrações 20, 40 e 100 μM por 24 horas. As células controle foram incubadas nas mesmas condições, com o mesmo volume de DMSO (veículo). Os ensaios foram realizados utilizando as frações citosólica e mitocondrial de todas as condições obtidas por centrifugação diferencial. A atividade da enzima foi medida após adição de 5 mM de glicose ao meio de reação contendo 50 mM de Tris/HCl (pH 7,4), 10 mM de MgCl_2 , 1 mM de β - NAD^+ , 1 U/ml de G6PDH (*Leuconostoc mesenteroides* – glicose-6-fosfato-desidrogenase – Sigma Aldrich), 0,1 % Triton X-100, 2 mM de ATP e 20 μL do extrato da fração mitocondrial ou 50 μL da fração citosólica. Esses volumes de extrato corresponderam a aproximadamente 50 μg de proteína nas frações mitocondrial e citosólica das linhagens tumorais e 25 μg de proteína para a linhagem não tumoral.

Para os ensaios de efeito direto, as células foram cultivadas em placas de petri de 60 cm^2 , nas densidades $1,2 \times 10^6$ para as linhagens MCF10A e MDA-MB-231, $1,5 \times 10^6$ para a

linhagem MCF-7. Ao alcançarem 90 % de confluências (aproximadamente 3 dias de cultivo), as células foram processadas e as frações citosólica e mitocondrial obtidas por centrifugação diferencial, como descrito anteriormente. A atividade da Hk foi avaliada como descrito acima e, após início da reação, a variação da absorvância foi acompanhada por aproximadamente 2 minutos, até taxa constante. Em seguida foram adicionados isoladamente 100 μ M C3G ou 100 μ M PCA, em ordem aleatória, e a reação foi acompanhada até taxa constante. Por fim, o 2º composto foi adicionado, na mesma concentração, para avaliar seu efeito combinado sobre a atividade da enzima Hk.

4.7 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteína dos extratos citosólico e mitocondrial foi realizada pelo método de Bradford (BIO-RAD – Bradford Reagent – Bio-Rad Prontei Assay, Dye Reagent Concentrate - #500-0006) (BRADFORD, 1976).

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi feita calculando o IC50 e EC50 de cada linhagem após tratamento com C3G - a partir de regressão não linear, teste t de Student não pareado para comparar as médias das populações das três linhagens de células expostas as diferentes condições de C3G e teste t de Student pareado para comparar as diferentes condições dos ensaios da atividade da Hk com adição de C3G e PCA, considerando resultado estatisticamente diferente quando $p < 0,05$. O software utilizado para produção de gráficos e estatística foi o Graphpad prism 7.0.

5. Resultados

5.1 Avaliação da atividade metabólica das linhagens de mama submetidas ao tratamento com cianidina-3-*O*-glicosídeo

A figura 7, apresenta a atividade metabólica das linhagens de células mamárias, após incubação com C3G em diferentes concentrações (1 – 100 μM). Os resultados estão expressos relativos às células controle, não incubadas com C3G. A atividade metabólica foi avaliada a partir do ensaio de redução do sal de tetrazólio MTT, conforme descrito em material e métodos. A redução deste composto reflete a atividade das enzimas desidrogenases e pode ser considerada como proxy de atividade metabólica e proliferativa das células, visto que a mitocôndria concentra a maior parte da atividade dessas enzimas.

A linhagem não tumoral, MCF10-A, 48 h após o período inicial da incubação (Figura 7 A), apresentou aumento de aproximadamente 10 % na atividade metabólica quando comparada as células controle. Sendo a concentração de C3G necessária para alcançar 50 % da resposta máxima, 29,4 μM ($\text{LogEC}_{50} = 1,469 \mu\text{M}$, indicado pela seta vermelha). No entanto, com 72 h (Figura 7 B), a sensibilidade dessa linhagem a C3G aumentou, visto a diminuição significativa do EC_{50} para 2,3 μM ($\text{LogEC}_{50} = 0,36 \mu\text{M}$, indicado pela seta vermelha), correspondendo a um aumento de 8,6 % na atividade metabólica.

A linhagem tumoral MCF-7, apresentou redução de 8 % na atividade metabólica após 48 h de incubação (Figura 7 C), sendo o IC_{50} de 3,8 μM C3G ($\text{LogIC}_{50} = 0,57 \mu\text{M}$, indicado pela seta vermelha). Adicionalmente, após 72 h de incubação com C3G, houve redução de 37 % na atividade metabólica quando comparado com as células controle, sendo o IC_{50} correspondente a 1,12 mM de C3G ($\text{LogIC}_{50} = 3,048$), indicando que apesar da diminuição na atividade metabólica, a sensibilidade das células MCF-7 à C3G reduziu em 5 vezes com o passar do tempo.

Também representada na figura. 7, a linhagem tumoral MDA-MB-231, apresentou um aumento de 10 % na sua atividade metabólica após 48 h de incubação (Figura 7 E), sendo EC_{50} 29,43 μM de C3G ($\text{LogEC}_{50} = 1,278 \mu\text{M}$, indicado pela seta vermelha), efeito semelhante ao visto na linhagem não tumoral MCF10-A. Curiosamente, após 72 h de incubação (Figura 7 F), também houve um aumento de 6 % na atividade metabólica, entretanto a quantidade de C3G necessária para alcançar 50 % da resposta máxima foi 21 x menor quando comparado com o tempo de 48 h, correspondendo a 0,881 μM de C3G ($\text{LogEC}_{50} = -0,055 \mu\text{M}$, indicado pela seta vermelha). A redução no EC_{50} , visto nas linhagens MCF10A e MDA-MB-231, após 72 h

indica que uma menor concentração de C3G foi necessária para aumentar, mesmo que de forma sutil, a atividade metabólica de ambas as linhagens.

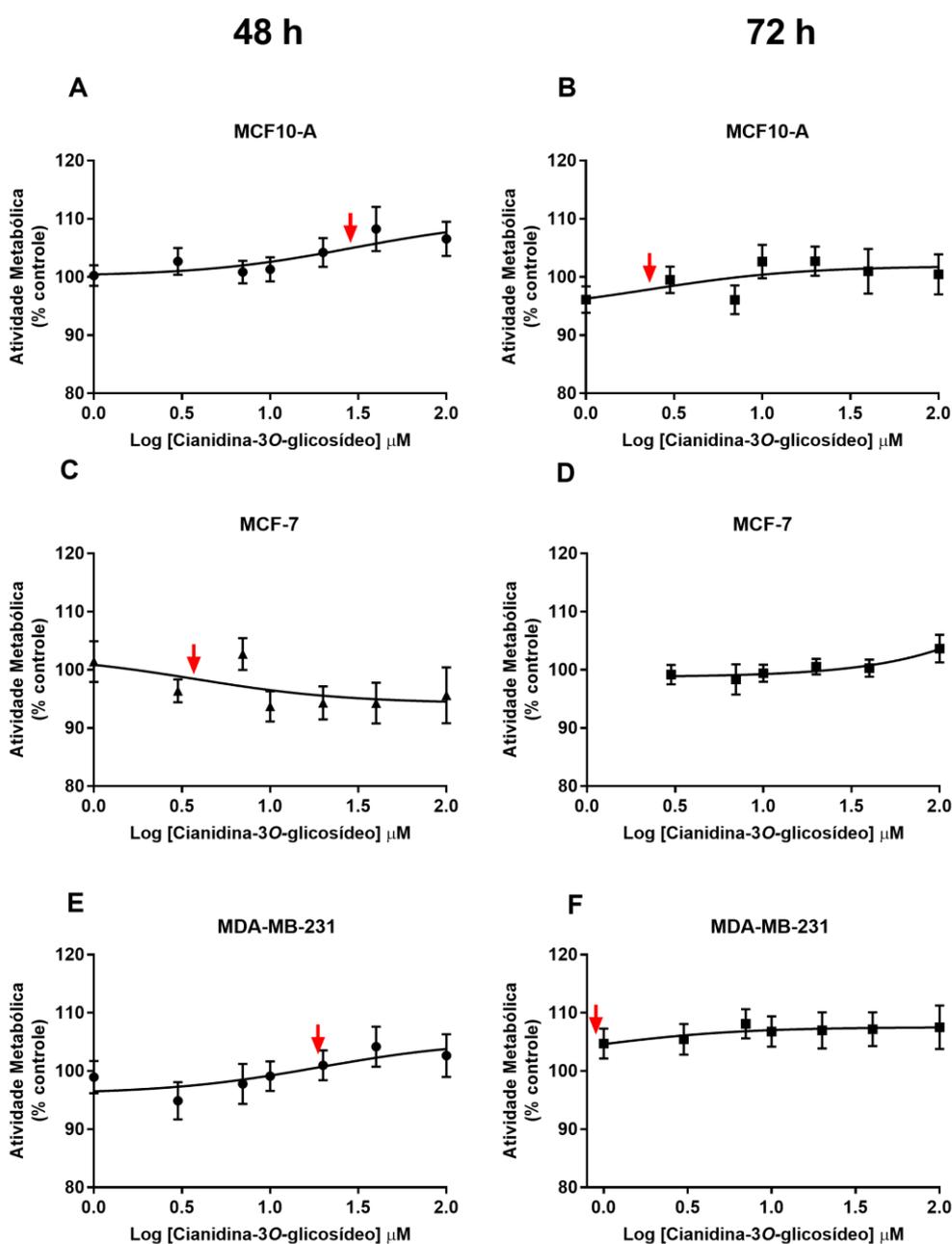


Figura 7. Efeito da cianidina-3-O-glicosídeo na atividade metabólica das linhagens celulares MCF10-A (não tumoral), MCF-7 e MDA-MB-231 (tumerais). As células foram incubadas com diferentes concentrações de C3G, 1, 3, 7, 10, 20, 40 e 100 μM, por 24 h, após esse período o meio foi trocado e a atividade metabólica celular medida após 48 e 72 h pelo ensaio de redução do MTT, como descrito em materiais e métodos. Os resultados são expressos relativos ao controle e os dados foram ajustados usando regressão não linear em função do log[C3G] μM, onde foram calculados o EC50 e IC50 para C3G, referentes a concentração de C3G necessária para alcançar 50 % da resposta máxima de ativação (EC50) ou inibição (IC50). A seta vermelha indica a concentração de C3G que atingiu 50 % da resposta máxima, onde para a linhagem MCF10-A (A e B) o EC50 foi de 29,43 μM e 2,295 μM, para a linhagem MCF-7 (C e D) o IC50 de 3,747 μM e 1117 μM, e para a linhagem MDA-MB-231 (E e F) o EC50 foi de 18,98 μM e 0,881 μM, nos tempos de 48 e 72 h, respectivamente. Valores representam media + EP, derivados de 3 replicatas biológicas.

Vale ressaltar, que este ensaio foi feito após um “pulso” inicial de 24 h com C3G e que ao término deste período, o meio de cultura foi trocado por um meio de cultura sem C3G, sugerindo que o efeito da C3G, ou de seus metabólitos, se prolongaram mesmo na ausência de exposição constante.

5.2 Avaliação do acúmulo de lactato das linhagens de mama submetidas ao tratamento com cianidina-3-*O*-glicosídeo

O acúmulo de lactato no meio de cultura, que reflete o metabolismo glicolítico anaeróbico dessas células, foi avaliado utilizando o meio de cultura coletado após 24 h de incubação com C3G, seguido de coleta nos tempos, 48 e 72 h após incubação inicial com C3G. A Figura 8 representa o acúmulo de lactato nas diferentes linhagens utilizadas neste trabalho após 48 e 72 h, normalizadas pela concentração de 24 h. É possível observar que as linhagens apresentam perfis diferenciados de acordo com o tempo e a variação de concentração de C3G utilizada.

Considerando que células tumorais apresentam aumento na produção e excreção de lactato em relação a células não tumorais, foi avaliado o perfil de acúmulo de lactato das linhagens celulares de mama, nas condições controle sem C3G, desta forma foi possível identificar que as células tumorais, MCF-7 (Figura 8 B) e MDA-MB-231 (Figura 8 C) apresentaram um aumento mais expressivo no acúmulo tanto após 48 h, como 72 h de cultivo, quando comparadas a não tumoral, MCF10-A (Figura 8 A). Essa última, apresenta um aumento importante no acúmulo de lactato somente após 72 h de cultivo (~ 1,5 ×). A linhagem MCF-7 apresenta um aumento de 1,3 e 1,9 × no acúmulo de lactato após 48 e 72 h, respectivamente. Adicionalmente, pode-se observar que a linhagem tumoral MDA-MB-231 (Figura 8 C), considerada a mais glicolítica, apresenta um aumento de aproximadamente 1,7 e 1,6 × no acúmulo de lactato após 48 e 72 h de cultivo, respectivamente.

Ao avaliar o acúmulo de lactato nas células incubadas com C3G, é possível observar que apesar dos efeitos sutis, o composto gerou alterações no perfil de acúmulo de lactato de todas as linhagens, entretanto em especial nas linhagens tumorais.

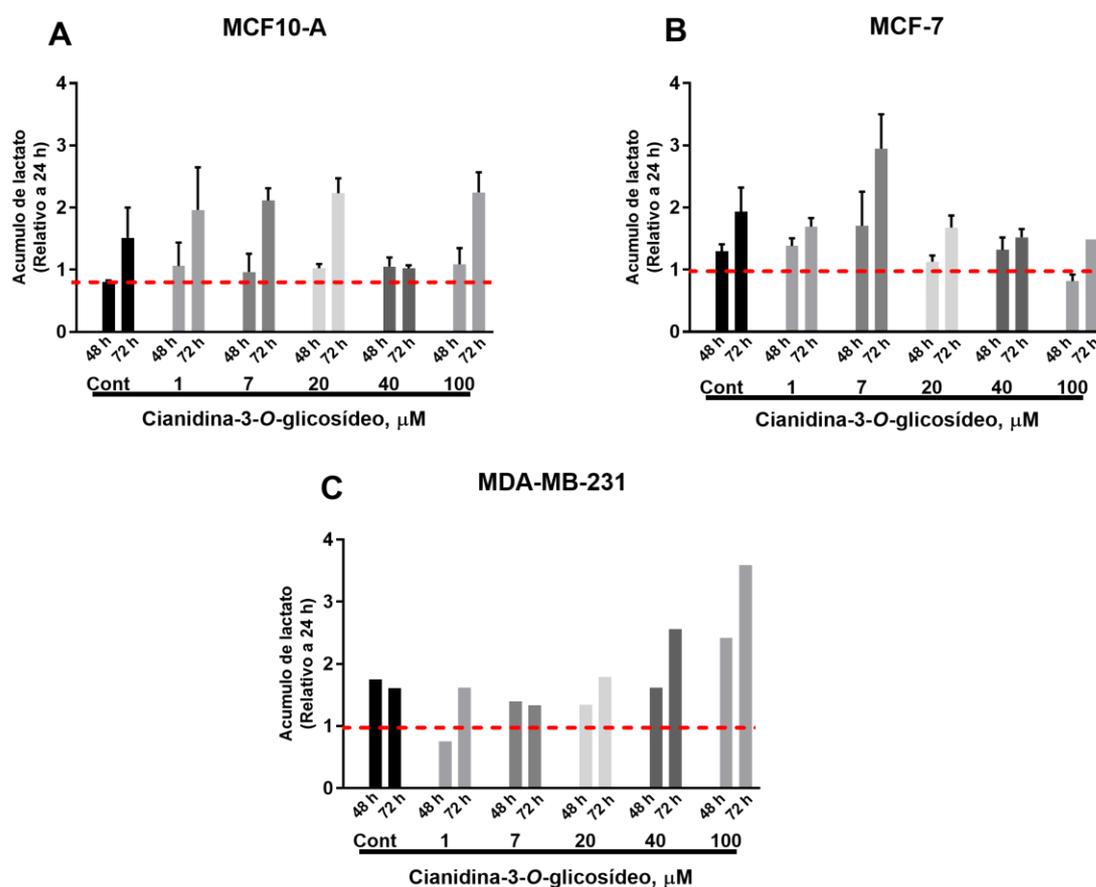


Figura 8. Acúmulo de lactato das linhagens celulares de mama MCF10A (não tumoral), MCF-7 e MDA-MB-231 (tumorais). As células MCF10A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C) foram incubadas com C3G nas concentrações de 1, 7, 20, 40 e 100 μM por 24 h, após esse período o meio foi trocado e o lactato em meio de cultura quantificado após 48 e 72 h. A medida de lactato no meio de cultura foi avaliada por ensaio enzimático, conforme descrito em material e métodos. Para avaliar o acúmulo de lactato dessas linhagens e os efeitos do tratamento com C3G, foi avaliado os tempos de 48 e 72 h, normalizados em relação ao tempo de 24 h. A linha tracejada vermelha indica o tempo controle de 24h. Valores representam média \pm EP, derivados de 2 replicatas biológicas (linhagem MCF10A), 3 replicatas biológicas (linhagem MCF-7), 1 replicata biológica (linhagem MDA-MB-231)

Em relação a linhagem não tumoral MCF10-A (Figura 8 A), similar às células controle, não tratadas com C3G, houve um aumento no acúmulo de lactato após 72 h, à exceção da condição de incubação com 40 μM de C3G. O acúmulo de lactato após 72 h, nas células incubadas com C3G, foi ligeiramente maior quando comparado à condição controle, entretanto sem diferença estatística.

Em relação a linhagem tumoral MCF-7, os efeitos da C3G sobre o fluxo glicolítico não foram claros, visto que houve flutuações nos resultados nas diferentes condições. Observando os efeitos após incubação com 7 μM C3G, o acúmulo de lactato foi maior nos 2 tempos quando comparados às células controle (sem C3G), sendo de 1,7 \times e de 2,9 \times após 48 e 72 h incubação,

respectivamente. Por outro lado, nas concentrações 20, 40 e 100 μM , o acúmulo de lactato foi menor ao padrão visto nas células controle no tempo de 72 h, sendo esse aumento em torno de 1,5 \times . Esses resultados indicam que a incubação com C3G regulou o metabolismo de glicose na linhagem MCF-7 e que na concentração de 20-100 μM , houve uma redução no fluxo glicolítico.

No caso da linhagem metastática MDA-MB-231, é possível notar que após 48 e 72 h, nas concentrações mais altas, 40 e 100 μM , a C3G promoveu um maior aumento no acúmulo de lactato em relação ao observado nas células controle (sem C3G), sendo esse aumento de 2,5 e 3,5 \times no tempo de 72 h na condição de 40 e 100 μM C3G, respectivamente. A MDA-MB-231 é uma linhagem caracterizada por apresentar um fenótipo mais glicolítico (LACROIX; LECLERQ, 2004). Portanto, a incubação com C3G pode ter aumentando o fluxo glicolítico anaeróbico. Adicionalmente, dado que as células podem produzir lactato a partir da glutaminólise (HENSLEY; WASTI; DEBERARDINIS, 2013), os efeitos metabólicos da C3G e/ou de seus metabólitos parecem envolver a modulação de várias vias metabólicas. Levando em consideração o resultado anterior apresentado na Figura 7, no qual a MDA-MB-231, apresentou um aumento na atividade metabólica com a incubação, é possível supor que a C3G pode estar causando alterações no metabolismo glicolítico e oxidativo destas células.

5.3 Avaliação do efeito da cianidina-3-O-glicosídeo na atividade da enzima hexoquinase após incubação por 24 h e o efeito agudo com cianidina-3-O-glicosídeo e o ácido protocatecuico

Como mencionado anteriormente, a Hk é a primeira enzima da via glicolítica e um dos principais pontos de regulação do metabolismo de células de câncer, tendo sido explorada como potencial alvo terapêutico no combate ao câncer. Isso se deve ao fato de a Hk estar diretamente associada a vias de produção de ATP, não somente a glicólise mas também a fosforilação oxidativa, esta última por regular o potencial eletroquímico mitocondrial (DA-SILVA *et al.*, 2004). A Hk também está relacionada a produção de precursores biossintéticos, a vias de inibição da apoptose e estímulo para proliferação (MATHUPALA; KO; PEDERSON, 2009). Desta forma, decidimos avaliar os efeitos da C3G e de seus metabólitos sobre a regulação da atividade desta enzima nas diferentes linhagens de mama e em diferentes frações subcelulares na tentativa de aprofundar na compreensão dos efeitos metabólicos e possivelmente anticâncer desses compostos.

Inicialmente, foi avaliada a atividade da Hk nas frações citosólica e mitocondrial das células controle, sem adição de C3G, como mostrado a seguir na Figura 9, com o intuito de entender mais detalhadamente as possíveis diferenças no metabolismo de glicose entre as linhagens estudadas.

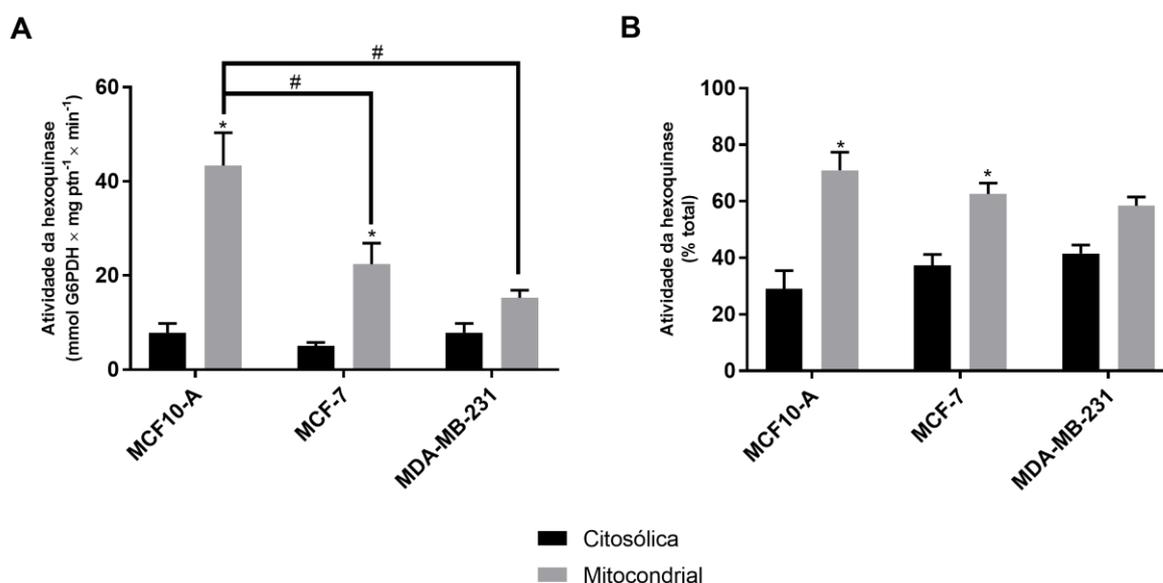


Figura 9. Atividade específica e total da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231. (A) Atividade específica da HK, medida por ensaio enzimático acoplado em frações citosólica (barra preta) e mitocondrial (barra cinza) e (B) Distribuição relativa da atividade da HK, calculada a partir das atividades específicas nas frações citosólica e mitocondrial. N = mínimo de 5 replicatas biológicas. * significativamente diferente da fração citosólica ($p < 0,05$). # significativamente diferente da fração mitocondrial da MCF10A ($p < 0,05$)

A Figura 9 A e B mostra, respectivamente, a atividade específica da Hk nas frações citosólica e mitocondrial, e a distribuição relativa da atividade da Hk nesses compartimentos celulares. A partir da observação dos gráficos, é possível verificar que a atividade específica da Hk na fração mitocondrial é maior do que a observada na fração citosólica, sendo esse aumento estatisticamente significativo nas linhagens MCF10A e MCF-7, $p < 0,05$ (Figura 9 A). Os valores das atividades específicas da Hk nas frações mitocondrial e citosólica nas linhagens MCF10A, MCF-7 e MDA-MB-231 foram, respectivamente, $7,87 \pm 1,94$, $5,07 \pm 0,69$, $7,89 \pm 1,95$ para a fração citosólica e $43,38 \pm 6,94$, $22,4 \pm 4,46$, $15,26 \pm 1,63$ nmoles G6P \times mg ptn⁻¹ \times min⁻¹, para a fração mitocondrial.

A MCF10-A, uma linhagem não tumoral, apresentou maior atividade específica da Hk mitocondrial em relação a MCF-7 ($p < 0,005$) e MDA-MB-231 ($p < 0,0005$), que são linhagens tumorais. Esse aumento foi de $1,9 \times$ em relação a MCF-7 e $2,8 \times$ comparado a MDA-MB-231.

A atividade específica na fração citosólica da Hk não diferiu entre as diferentes linhagens de mama.

Na Figura 9 B, é possível observar a distribuição relativa da atividade da Hk nas frações citosólica e mitocondrial. Desta forma, é possível verificar que na linhagem não tumoral MCF10-A, a distribuição da atividade da Hk nas frações mitocondrial e citosólica é 70 % e 30 %, respectivamente, sendo essa diferença significativa ($p < 0,0001$). Adicionalmente, a linhagem tumoral MCF-7 também apresentou uma maior proporção da atividade da Hk na fração mitocondrial, 62,6 %, quando comparada a fração citosólica, que correspondeu a 37,4 % da atividade total ($p < 0,05$). No caso das células MDA-MB-231, por outro lado, não houve diferenças da atividade da enzima Hk entre as frações mitocondrial e citosólica, sendo a distribuição 42 % e 58 %, respectivamente. É importante ressaltar que ao comparar a compartimentalização da atividade da Hk entre as 3 linhagens estudadas, não houve diferenças significativas.

O próximo conjunto de experimentos referem a avaliação da atividade da enzima Hk após incubação com C3G, nas concentrações 20, 40 e 100 μM , por 24 h, como mostra a Figura 10. Para este ensaio foram selecionadas as concentrações de C3G que não apresentaram efeitos tóxicos as linhagens de células de mama, mas que modularam a atividade metabólica e produção de lactato como visto anteriormente. Na linhagem não tumoral, MCF10-A, não houve diferença na atividade da Hk em nenhuma das frações, citosólica (Figura 10A) e mitocondrial (Figura 10B), após incubação com C3G. No entanto, com 40 μM de C3G houve uma tendência ($p = 0,05$) a redução de 20 % da atividade da Hk na fração mitocondrial (Figura 10B) quando comparada a condição controle.

Nas células tumorais, a incubação por 24 h com C3G causou alterações na resposta da atividade da Hk em ambas as frações (Figura 10 C - F). Foi observado um aumento na atividade da Hk na fração citosólica da MCF-7 (Figura 10 C), com todas as concentrações de C3G, sendo o aumento de $1,4 \times$ ($p < 0,0001$), $1,2 \times$ ($p < 0,05$) e $1,2 \times$ ($p < 0,005$), nas concentrações 20, 40 e 100 μM , respectivamente, comparadas às células controle, sem C3G. Já na fração mitocondrial (Figura 10 D), houve redução de 24 % ($p < 0,05$) na condição de 40 μM C3G. Esses dados mostram que a C3G afeta diferencialmente a atividade da Hk nas frações mitocondrial e citosólica, na linhagem tumoral MCF-7.

Na fração citosólica da MDA-MB-231 (Figura 10 E), houve um aumento significativo de 36 % ($p < 0,05$) na atividade da Hk quando as células foram incubadas com 20 μM de C3G, semelhante ao encontrado nas células MCF-7. Adicionalmente, na concentração de 100 μM , foi observado um aumento de 18 %, sem diferença estatística. Entretanto, esse resultado sugere

que as células MDA-MB-231 também foram sensibilizadas a C3G após 24 h em cultivo e que esse composto afeta a atividade da Hk. O mesmo é visto na fração mitocondrial, que apesar de não apresentar diferenças estatísticas, foi possível observar o aumento da atividade da Hk nas 3 condições, sendo este de $1,3 \times$, $1,4 \times$ e $1,4 \times$, respectivamente, nas concentrações 20, 40 e 100 μM de G3G, quando comparado as células controle.

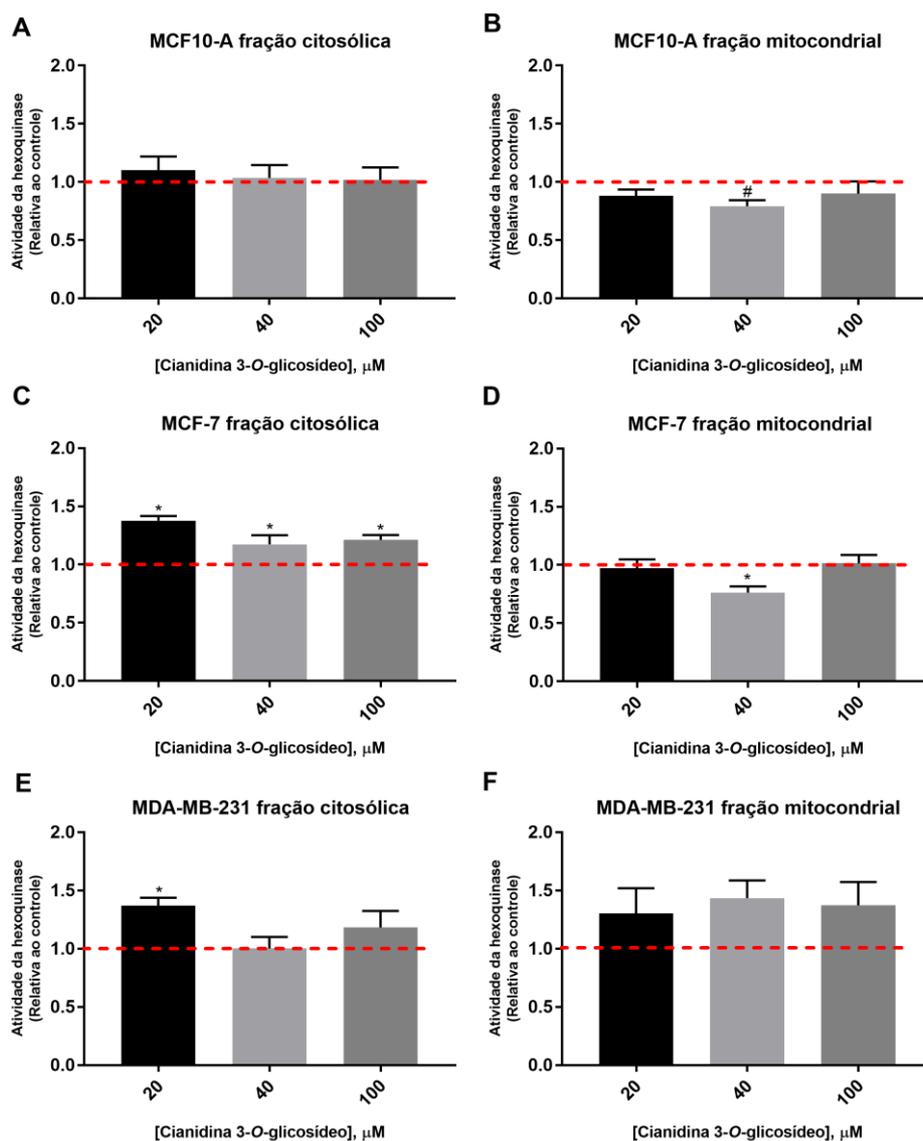


Figura 10. Efeito da incubação com C3G por 24 h, na atividade da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231. A atividade específica da Hk foi medida por ensaio enzimático acoplado em frações citosólica e mitocondrial após incubação com 20, 40 e 100 μM de C3G por 24 h, expressa em relação ao controle. A linha vermelha indica a atividade da Hk das células controle, sem C3G (100 %). As frações citosólica e mitocondrial são representadas nas 3 linhagens, sendo MCF10-A (A e B), MCF-7 (C e D) e MDA-MB-231 (E e F) respectivamente. N = mínimo de 3. * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$). # quando $p = 0,05$.

Com o intuito de esclarecer os efeitos causados pela C3G ainda na atividade da Hk, foi feito o mesmo ensaio enzimático acoplado, porém com uma abordagem diferenciada, neste avaliamos os efeitos da C3G e do seu metabólito principal PCA, adicionando-os diretamente nas frações citosólica e mitocondrial durante a cinética da reação da atividade da Hk. Além deste, o PGA outro importante metabólito da C3G, foi inicialmente testado, entretanto, devido a sua alta instabilidade, optamos por não investigar seus efeitos neste parâmetro estudado.

Na Figura 11, estão apresentados os resultados da atividade da Hk relativa ao controle, com a adição isolada de C3G ou PCA na concentração de 100 μ M, e o efeito combinado dos dois compostos, C3G + PCA (100 μ M de cada composto). É possível observar que os dois compostos isolados ou juntos, afetaram a atividade da Hk, efeito visto em todas as linhagens.

Na MCF10-A, linhagem cuja atividade da Hk não foi afetada com a incubação com C3G por 24 h, observamos que quando exposta diretamente aos compostos, houve um aumento significativo na atividade da Hk na fração citosólica em todas as condições, sendo que o efeito mais expressivo foi na presença de C3G isolada e C3G+PCA, com aumento de 41 % ($p < 0,005$) e de 36 % ($p < 0,0001$), respectivamente (Figura 11 A). Na fração mitocondrial, houve redução em todas as condições, sendo a redução de 54 % após adição de C3G significativamente diferente quando comparada ao controle ($p < 0,005$).

As diferenças encontradas na fração citosólica da Hk na linhagem MCF-7 foram compatíveis ao que foi visto com os resultados após incubação prévia, com C3G por 24 h. Foi observado um aumento de 47 % nesta fração após adição de C3G ($p < 0,0005$) e de 27 % após adição de PCA ($p < 0,005$). O efeito da adição combinada de C3G+PCA resultou em um aumento de 54 % ($p < 0,0001$). Apesar do aumento significativo após adição de PCA isoladamente, o efeito mais pronunciado foi da C3G. Quando analisada a fração mitocondrial, por outro lado, apenas a C3G isoladamente promoveu aumento significativo na atividade da Hk nessa linhagem, sendo este de 35 % comparado ao controle ($p < 0,05$).

Semelhante ao encontrado na fração citosólica das linhagens MCF10-A e MCF-7, houve aumento significativo da atividade da Hk na MDA-MB-231 (Figura 11 E), em todas as condições, novamente sendo o efeito mais expressivo após adição de C3G, onde foi observado um aumento de 64 % ($p < 0,005$), e um aumento de 35% ($p < 0,05$) após adição de PCA e de 54 % ($p < 0,0001$) quando utilizado os dois compostos. Na fração mitocondrial (Figura 11 F), houve uma redução de aproximadamente 15% nas 3 condições, sendo $p < 0,05$ quando utilizado PCA isolado.

É possível observar que quando adicionada diretamente às frações já isoladas, a C3G tem efeitos diferenciados, tornando as linhagens de câncer ainda mais sensíveis quando

comparado aos resultados com incubação de 24 h, e afetando também, a MCF10-A, o que não havia ocorrido anteriormente de forma expressiva. Isso indica que a acessibilidade dos compostos e a forma como são metabolizados pode influenciar na sua ação.

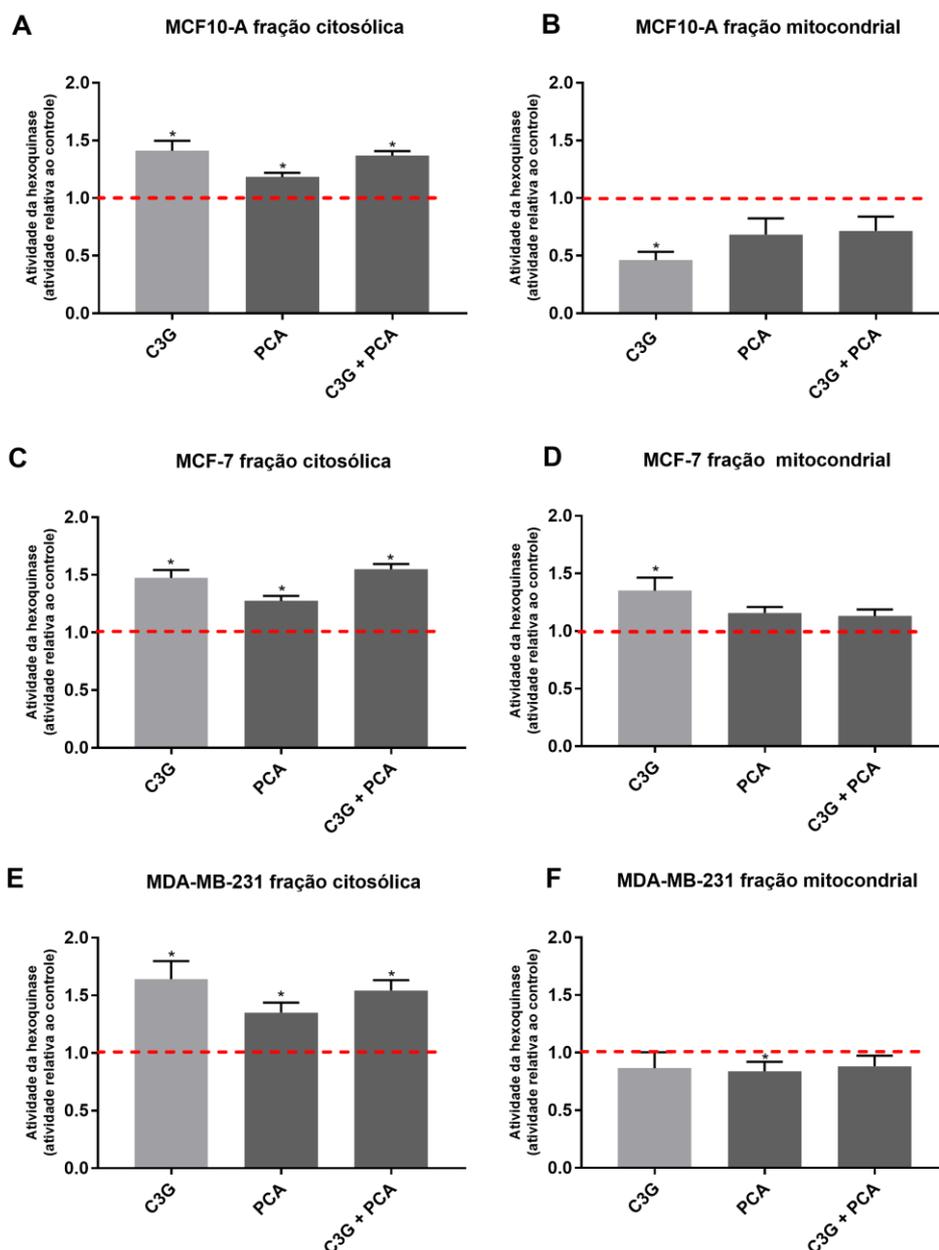


Figura 11. Efeito direto da C3G e PCA na atividade da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231. A atividade específica da HK foi medida por ensaio enzimático acoplado em frações citosólica e mitocondrial, após adição de C3G, PCA ou da combinação C3G + PCA, expressa em relação ao controle. A linha vermelha indica a atividade da HK das células controles (100%). As frações citosólica e mitocondrial são representadas nas 3 linhagens, sendo MCF10-A (A e B), MCF-7 (C e D) e MDA-MB-231 (E e F), respectivamente. N = mínimo de 3. * significativamente diferente do controle ($p < 0,05$).

Adicionalmente, ao avaliar a distribuição relativa da atividade da Hk após incubação com C3G (Figura 12), ou seja, nos compartimentos citosólico e mitocondrial, é possível observar que não houve diferença deste parâmetro comparando à distribuição das células controle nas linhagens MCF10-A e MDA-MB-231. No entanto, a linhagem tumoral MCF-7, apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$) entre as frações citosólica e mitocondrial, como já demonstrado na Figura 9 B, sendo a fração mitocondrial $2 \times$ maior que a citosólica. E apesar de não apresentar diferença estatística com os tratamentos quando comparados ao controle, é possível observar uma tendência ao aumento da fração citosólica, de $1,3 \times$, e redução da fração mitocondrial, de $1,2 \times$, nessas células, principalmente com 20 e 40 μM . Na condição de 100 μM , houve diferença estatística entre as frações ($p < 0,005$), sendo a fração mitocondrial $1,6 \times$ maior do que a citosólica.

As alterações observadas na distribuição da atividade da Hk nas frações citosólica e mitocondrial após incubação com C3G por 24 h, podem estar associadas a redução da atividade metabólica também vista na linhagem tumoral, MCF-7 (Figura 7 C-D).

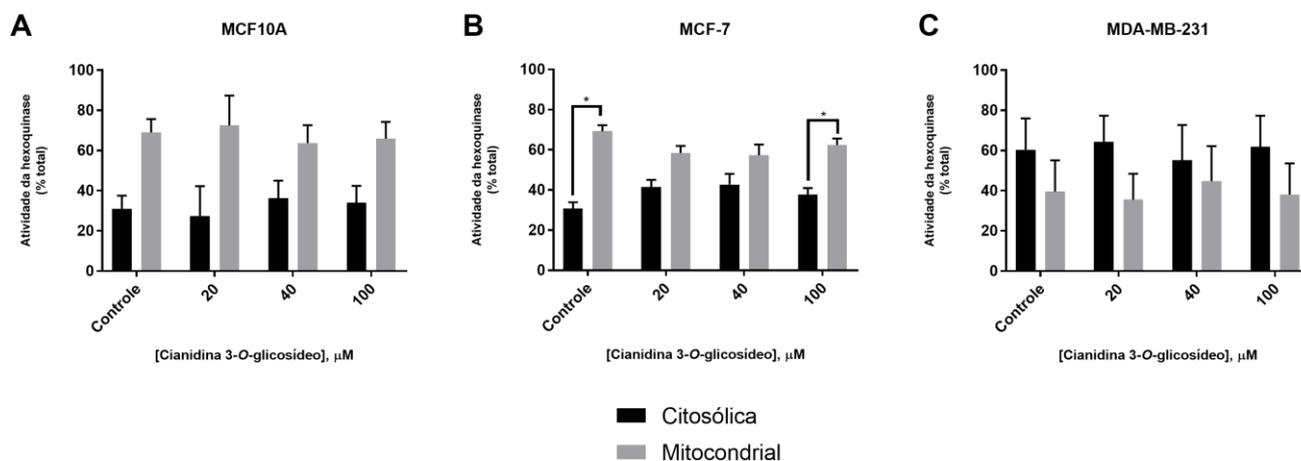


Figura 12. Efeito da incubação com C3G por 24 h, na atividade total da hexoquinase, frações citosólica e mitocondrial nas linhagens de mama, MCF10-A, MCF-7 e MDA-MB-231. A distribuição relativa da atividade da Hk, calculada a partir das atividades específicas nas frações citosólica e mitocondrial após incubação com 20, 40 e 100 μM de C3G por 24 h. A atividade relativa da hexoquinase está distribuída em fração citosólica (barra cinza) e mitocondrial (barra preta), representadas nas 3 linhagens, sendo MCF10-A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C) respectivamente. N= mínimo de 3. * significativamente diferente ($p < 0,05$).

6. Discussão

Por conta da alta dependência das células tumorais por ATP, o metabolismo energético de tumores tem se tornado protagonista na busca por alvos terapêuticos “alternativos” anticâncer, uma vez que células tumorais apresentam alterações em diferentes vias relacionadas ao metabolismo intermediário, como o metabolismo de glicose, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. As alterações no metabolismo de glicose em células tumorais talvez sejam as mais estudadas onde um fenótipo muito característico é o aumento expressivo na captação e utilização de glicose. O conhecimento deste fenótipo possibilitou o desenvolvimento de metodologia para auxiliar no tratamento e traçar prognóstico no câncer, através da técnica de Tomografia de Emissão de Pósitrons, onde um análogo radioativo da glicose (geralmente associada ao flúor radioativo) é injetado nos indivíduos e a emissão de pósitrons é acompanhada através de scanner. As regiões que apresentam a maior taxa de metabolização do composto parecem ser associadas a células com alta taxa de proliferação e células tumorais possibilitando, assim, a identificação de focos de metástase.

Muitas alterações moleculares já foram descritas como sendo responsáveis pela alta taxa de metabolização de glicose pelas células tumorais, sendo o aumento da expressão da enzima Hk isoforma II uma das alterações mais estudadas. Esta enzima desempenha papel importante na tumorigênese, pois está associada ao aumento da proliferação e progressão do câncer de mama, associado ao aumento da glicólise. A isoforma II da Hk, que está ligada à proteína VDAC na membrana externa da mitocôndria, apresenta propriedades cinéticas que parecem tornar mais eficiente a utilização de glicose pelas células tumorais, além de ser um ponto importante de regulação do metabolismo mitocondrial/oxidativo (DA-SILVA *et al.*, 2004). Desta forma, inúmeras evidências sugestivas indicam que a Hk, especialmente a isoforma II é um importante alvo para terapias anticâncer (PASTORINO; HOEK, 2008; MATHUPALA; KO; PEDERSEN, 2010; SATO-TADANO *et al.*, 2013; AMOEDO *et al.*, 2013).

A partir do exposto, no presente estudo foi avaliado os efeitos da C3G sobre a atividade da enzima Hk em três linhagens de mama, sendo a MCF-7 e a MDA-MB-231, modelos tumorais. Medidas de atividade metabólica e fluxo glicolítico também foram utilizadas para que avancemos na compreensão dos efeitos da C3G sobre o metabolismo de glicose destas células. Até onde temos conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a ação da C3G e de seu metabólito, PCA, sobre a atividade da enzima Hk em modelos celulares humanos de mama.

Nossa primeira abordagem investigativa foi avaliar as diferenças metabólicas destas linhagens sem o tratamento com C3G. Foi possível observar que as células tumorais

apresentaram maior acúmulo de lactato em relação a não tumoral, MCF10A (Figura 8). Esse resultado condiz com o fenótipo bioenergético diferenciado das células de câncer, caracterizado pelo aumento no metabolismo glicolítico, o que reflete em uma maior produção e excreção de lactato para o meio de cultura, favorecendo a proliferação e crescimento destas células (HAY, 2016). Além de diferenças no fluxo glicolítico, essas células apresentam regulação diferenciada da enzima Hk, que será discutido mais adiante.

Na literatura existem poucos relatos acerca dos efeitos da C3G e seus metabólitos sobre a proliferação de células de carcinoma de mama. E os poucos estudos concentram na linhagem MDA-MB-231, possivelmente pelo seu caráter metastático e resistente a múltiplas drogas. As concentrações de C3G já reportadas na literatura variam de 6,3 - 500 μM , com incubações prolongadas de no máximo 48 h (XU *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; LIANG *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2016; PACE *et al.*, 2018). Sendo o desenho experimental de 1 único pulso de C3G e os efeitos avaliados somente ao final do período de incubação.

Wang *et al.* (2016) avaliaram os efeitos da C3G em diferentes linhagens de mama, incluindo a linhagem MDA-MB-231, e mostraram que concentrações a partir de 150 μM de C3G por 24 e 48 h foram eficazes em reduzir significativamente a viabilidade celular e alterar a morfologia das células. Já nas linhagens MCF10A e MCF-7, os efeitos não foram pronunciados. Esses resultados diferem de nossas observações pois, apesar de sutis, a linhagem MCF-7 apresentou respostas diferenciadas em relação as demais linhagens. Essas diferenças nos resultados encontrados em relação à literatura podem estar associadas a forma de exposição das células a C3G e à faixa de concentração utilizada. Optamos por fazer um desenho experimental onde as células foram expostas à um pulso inicial de C3G por 24 horas, e posteriormente o meio de cultivo era trocado e as células incubadas por 24 e 48 horas na ausência de C3G, quando os efeitos biológicos eram avaliados.

Levando em consideração que a C3G agiria como uma droga, a avaliação dos efeitos em uma condição onde o composto não estaria mais presente caracterizaria o período de recuperação das células. Entretanto, dada as respostas sutis em quase todos os ensaios que realizamos, possivelmente uma exposição da C3G mais aguda seja mais interessante para destacar as diferenças de ação da C3G nas linhagens estudadas. Adicionalmente, no presente trabalho, a faixa de concentração utilizada de C3G foi 1-100 μM , 5 \times menor em comparação a concentração máxima do estudo de Wang *et al.* (2006), podendo ser este mais um aspecto relacionado a diferença entre os dados da literatura, particularmente com relação à ausência de efeito citotóxico na linhagem MDA-MB-231 observada em nossos resultados.

Estudos que avaliaram a estabilidade das antocianinas *in vitro*, mostraram que ao simular condições fisiológicas, pH 7,4 a 37° C, a C3G é rapidamente degradada a PCA e PGA, sendo essa hidrólise espontânea. Ao avaliar a metabolização da C3G na presença de células Caco-2, utilizada como modelo celular da barreira intestinal, essa degradação foi semelhante à observada em um meio sem células, sugerindo que a C3G pode ser degradada de forma espontânea no intestino delgado (KAY; KROON; CASSIDY, 2009; WOODWARD *et al.*, 2009).

Em um estudo conduzido por Czank *et al.* (2013), a utilização da C3G isotopicamente marcada mostrou que a biodisponibilidade deste composto é maior do que relatado anteriormente e que pode ser comparada a de outros compostos como os flavanóis e flavonas. Avaliando a cinética pós prandial da ingestão de 500 mg de C3G (isotopicamente marcada no ¹³C), verificaram que a C3G, metabólitos primários (PCA e PGA) e metabólitos secundários (ácidos hipúrico, vanílico e ferúlico) são encontrados no soro, ar expirado, fezes e urina dos voluntários (CZANK *et al.*, 2013; DE FERRARS *et al.*, 2014). Desta forma, a partir do conhecimento do metabolismo da C3G, tanto relacionado ao seu comportamento químico *in vitro* como sua metabolização *in vivo*, algumas considerações merecem ser feitas com relação aos resultados obtidos no presente trabalho: (a) após o período de incubação de 24 h, a maior fração de C3G possivelmente foi degradada em seus metabólitos, dado que 1 único pulso de C3G foi utilizado. Pulsos adicionais de C3G talvez sejam necessários para manter constante sua concentração e aumentar a possibilidade de captação pelas células; (b) sendo PGA e PCA os metabólitos majoritários da degradação espontânea da C3G, os efeitos observados se devem, em parte, aos efeitos desses compostos. Neste contexto, além da C3G, investigamos os efeitos do metabólito PCA sobre a atividade da enzima Hk.

Com o objetivo de avaliar os efeitos, a priori, citotóxicos da C3G sobre as linhagens celulares, utilizamos a metodologia de redução do sal de tetrazólio MTT, conforme descrito em material e métodos. A redução deste composto reflete a atividade das enzimas desidrogenases e pode ser considerada como proxy de atividade metabólica e proliferativa das células, visto que a mitocôndria concentra a maior parte da atividade dessas enzimas. A MDA-MB-231 e a linhagem não tumoral MCF10A, apresentaram alterações sutis após incubação com C3G, com aumento de até 10 % na atividade metabólica. Ao avaliar o fluxo glicolítico, observamos que houve um aumento no acúmulo de lactato no meio das células tratadas, sendo este efeito dose e tempo dependente na linhagem MDA-MB-231 e expresso apenas após 72 h na MCF10A.

Possivelmente esse ligeiro aumento “tardio” no acúmulo de lactato pode refletir uma ação mais prolongada (refletindo uma metabolização mais lenta) da C3G ou de seus metabólitos

sobre o metabolismo de glicose nas células MCF10A. Desta forma, podemos concluir que, mesmo sutis, os efeitos da C3G nessas linhagens parecem envolver os compartimentos mitocondrial (em função do aumento da atividade metabólica) como citosólico, em função do aumento da produção de lactato. Nosso objetivo é seguir na identificação de rotas de ação da C3G nas células, possivelmente relacionadas não somente a velocidade de metabolização da C3G nas células tumorais, mas também ao direcionamento diferenciado de seus metabólitos para diferentes compartimentos celulares, e.g., mitocôndria.

No caso da linhagem MCF-7, foi observada redução na sua atividade metabólica, principalmente após 72 h, esta de 37%. Vale ressaltar que neste trabalho, a atividade metabólica e o fluxo glicolítico foram avaliados após um “pulso” de 24 h de incubação com C3G e que este meio foi trocado por um sem C3G, assim os efeitos vistos principalmente na MCF-7 podem refletir um efeito prolongado da C3G ou de seus metabólitos como PCA e PGA.

Os diferentes efeitos encontrados nas células tumorais podem ser justificados pelas diferenças metabólicas entre elas. A MDA-MB-231, classificada como basal, é uma linhagem altamente metastática e invasiva, caracterizada por um metabolismo mais glicolítico. Por outro lado, a MCF-7 é uma linhagem dependente de estrogênio, predominantemente oxidativa e menos invasiva (GUPPY *et al.*, 2002; LACROIX; LECLERCQ, 2004b; COMÇA; CÎMPEAN; RAICA, 2015). Gupta & Tikoo (2013) mostraram que em situações de hiperglicemia, a MDA-MB-231 apresenta aumento da proliferação e carcinogênese enquanto que a MCF-7, apresentou aumento na sinalização de apoptose, mostrando que a linhagem MDA-MB-231 é mais resistente ao estresse oxidativo causado pela hiperglicemia.

Nas últimas décadas, uma série de estudos têm enfatizado a importância da reprogramação metabólica no desenvolvimento tumoral. O aumento na expressão e funcionalidade da enzima Hk tem sido considerado um grande contribuidor para o aumento da glicólise, visto que sua ligação com o VDAC na mitocôndria traz uma série de benefícios como: (a) aumento da afinidade pelo ATP, (b) acesso preferencial ao ATP gerado pela mitocôndria, (c) redução da inibição alostérica pelo seu produto glicose-6-fosfato. Ademais, a associação da Hk a mitocôndria pode exercer um efeito anti-apoptótico, como a ação antagonista sobre proteínas pró apoptóticas da família Bcl-2, que tem localização ou direcionamento a mitocôndria (MATHUPALA; KO; PEDERSEN, 2009; ROBERTS; MIYAMOTO, 2015). Portanto, o uso de inibidores glicolíticos, especialmente aqueles que visam a Hk II pode vir a ser uma abordagem viável para direcionar as terapias anticâncer.

Embora ainda escassos na literatura, os efeitos de polifenóis na expressão e atividade da Hk de células tumorais já tem sido descritos, como o resveratrol que reduziu a expressão da

enzima Hk-II em células de câncer de pulmão (LI *et al.*, 2016), os efeitos da curcumina inibindo a atividade da enzima Hk-II em células de câncer colorretal (WANG *et al.*, 2014) e da Oroxila-A, um flavonóide, que reduziu a atividade da Hk-II em células de câncer de pulmão (WEI *et al.*, 2013).

Dados os resultados encontrados na atividade da Hk das células tumorais após incubação com C3G por 24 h, podemos supor que o composto afeta de forma diferente os compartimentos citosólico e mitocondrial destas células, sendo a mitocôndria o seu principal alvo. Ao avaliar os efeitos sobre a linhagem MCF-7, podemos sugerir que a C3G provoca um estresse metabólico nestas células, cursando possivelmente com alterações na mitocôndria que levariam a célula a alterar seu metabolismo, aumento da glicólise, visto que essa célula já foi descrita como mais oxidativa do que a MDA-MB-231 (RODRIGUES, 2013), e que de acordo com a concentração de glicose no meio, estas células alterar a utilização das duas vias metabólicas para suprir o aporte de ATP (PACHECO-VELÁZQUEZ *et al.*, 2018).

Lu *et al* (2015), mostraram que a linhagem MCF-7 altera seu metabolismo após estresse causado por radiação, essa alteração foi mediada pela alteração na mTOR, associada a regulação da proliferação celular, pode ser realocada na mitocôndria, resultando no aumento da fosforilação oxidativa e redução da glicólise. Foi mostrado também que a mTOR forma um complexo com a Hk II, causando redução da atividade desta enzima.

No entanto, no presente estudo vimos um perfil diferenciado, após incubação com C3G, a linhagem MCF-7 apresentou redução do acúmulo de lactato e da atividade metabólica, refletindo em uma modificação no metabolismo energético destas células e que essa alteração é gerada por uma atenuação do fluxo glicolítico quando comparado as células controle. Com a alteração na atividade da Hk, na qual foi visto aumento no compartimento citosólico e redução no mitocondrial, podemos sugerir que a C3G reduz o fluxo glicolítico nas células MCF-7, possivelmente a partir da diminuição da atividade da enzima Hk na fração mitocondrial.

Ao avaliar a atividade da HK das três linhagens observamos que na linhagem MDA-MB-231, o aumento encontrado nas frações mitocondrial e citosólica, sugerem alterações no metabolismo glicolítico, possivelmente o aumento da necessidade energética, levando em consideração também o maior acúmulo de lactato (Figura 8 C) de forma dose e tempo dependente. O fato de a MDA-MB-231, a linhagem estudada que apresenta o fenótipo mais glicolítico, não apresentar enriquecimento da atividade da Hk na fração mitocondrial levanta a hipótese da importância da regulação do fluxo glicolítico no compartimento citosólico. Conforme observado na Figura 8 C, essa linhagem apresenta um elevado acúmulo de lactato após 48 h em cultura, diferentemente das outras 2 linhagens, cujo aumento na produção de

lactato é observado principalmente após 72 h de cultivo (Figura 8 A e B). Desta forma, pode-se especular que a distribuição similar da atividade da enzima Hk entre os compartimentos mitocondrial e citosólico seja importante para o elevado fluxo glicolítico anaeróbico, característico desta linhagem celular, e conseqüentemente para sua elevada taxa de proliferação.

Ademais, os resultados encontrados, mostram que as linhagens tumorais apresentam alterações na atividade da Hk em ambas as frações, mitocondrial e citosólica, após o tratamento com C3G (figura 10). E essas diferenças parecem refletir alterações no metabolismo energético e desta forma, indicar uma regulação diferenciada da utilização de glicose por essas células.

Ao considerar o metabolismo da C3G, sugere-se que os efeitos atribuídos a ela, podem estar também relacionados a ação de seus metabólitos, desta forma, prosseguimos com a avaliação da atividade da Hk. Realizamos os ensaios com a C3G e o PCA, um de seus metabólitos majoritários, adicionando-os diretamente as frações citosólica ou mitocondrial das células, em alta concentração (100 μ M), para avaliar o efeito específico destes compostos nos compartimentos celulares.

Quando comparados com os efeitos da C3G e do PCA, é possível observar que a MCF-7 apresentou efeito semelhante ao visto com 24 h, na fração citosólica, sugerindo que os efeitos observados na pré incubação refletem a ação direta da C3G e podem ser causados pela entrada do composto “íntacto” nessas células. Nas demais linhagens, MCF10A e MDA-MB-231, a adição dos compostos nas frações citosólica e mitocondrial (Figura 11), resultaram em efeitos diferentes da pré incubação (Figura 10), o que indica que a forma como estes compostos são captados e metabolizados impacta diretamente em seus efeitos. Desta forma, possivelmente o metabolismo da C3G é diferente entre essas 3 linhagens.

7. Conclusões

Neste estudo, mostramos que a C3G apresenta efeito sutil sobre as três linhagens, ou seja, ela não é citotóxica, diferentemente do que hipotetizamos. No entanto, apresentou pequenas alterações na atividade metabólica das três linhagens, principalmente na MCF-7. Mecanismos mais robustos devem ser investigados a fim de determinar com mais clareza o efeito da C3G sobre a atividade metabólica, principalmente mitocondrial. A fim de prosseguir com o estudo dos efeitos da C3G no metabolismo energético, a respirometria de alta resolução é uma opção viável para investigar a funcionalidade da mitocôndria.

Diferenças no metabolismo energético entre as três linhagens pode determinar o metabolismo e, conseqüentemente, a ação da C3G. Como mostrado, a C3G apresentou efeito oposto no acúmulo de lactato das células tumorais, promoveu um aumento dose e tempo dependente na MDA-MB-231 e uma redução na MCF-7. Mais análises são necessárias para confirmar os efeitos da C3G sobre a produção, transporte e acúmulo de lactato.

A C3G alterou a atividade da Hk das duas linhagens tumorais, mas não afetou a linhagem não tumoral, MCF10A, mostrando que seu efeito prolongado no metabolismo energético é específico as células tumorais. O fato da C3G ter apresentado efeitos diferenciados entre as células tumorais pode significar que o metabolismo do composto e o fenótipo energético das linhagens é diferenciado. Apesar de já ter sido descrito na literatura o metabolismo da C3G e que essa antocianina é encontrada em fezes, urina e soro humano, seus efeitos podem estar associados a ação de seus metabólitos. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos de ação destes metabólitos e a possível ação sinérgica entre os compostos.

Ao avaliar a ação direta da C3G na atividade da Hk nos compartimentos citosólico e mitocondrial, vimos que as linhagens apresentaram maior sensibilidade a C3G isolada do que ao PCA, mas que o efeito sinérgico dos dois compostos também afeta de forma eficiente as 3 linhagens, principalmente na fração citosólica da MDA-MB-231 e MCF-7.

O PCA isolado teve efeito nas linhagens tumorais, mas não afetou, de forma isolada, a linhagem MCF10A, novamente, este efeito pode estar associado ao metabolismo diferenciado dessas células e a capacidade de expulsão e/ou metabolização dos compostos.

Diante do exposto, mais estudos são necessários para entender os efeitos da C3G sobre o metabolismo energético, particularmente a enzima Hk, visto que a redução da atividade dessa enzima tem sido considerada como promissora terapia anticâncer.

Investigar os efeitos dos metabólitos da C3G e não somente dela isolada é relevante, pois as células com fenótipos diferentes possivelmente metabolizam a C3G de forma diferente.

Ademais, pesquisar os efeitos da C3G e do PCA metabólitos sobre a expressão proteica da Hk e sobre a regulação da expressão gênica pode ser promissora, visto que os compostos apresentaram efeito sobre a atividade desta enzima.

8. Referências Bibliográficas

ALAMOLHODAEI, N. S. *et al.* Resveratrol as MDR reversion molecule in breast cancer: an overview. **Food and Chemical Toxicology**, v. 103, p. 223–232, 2017.

AMAWI, H.; JR, C. R. A.; TIWARI, A. K. Cancer chemoprevention through dietary flavonoids: what's limiting? **Chinese Journal of Cancer**, v. 36, n. 1, p. 50, 2017.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures 2017-2018**. Atlanta: American Cancer Society, Inc. 2017

AMOEDO, N. D. *et al.* Cell cycle and energy metabolism in tumor cells: strategies for drug therapy. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 6, n. 1, p. 15–25, 2011.

AZEVEDO, C. *et al.* The chemopreventive effect of the dietary compound kaempferol on the MCF-7 human breast cancer cell line is dependent on inhibition of glucose cellular uptake. **Nutrition and cancer**, v. 67, n. 3, p. 504-513, 2015.

BANDYOPADHYAY, S.; BLUTH, M. H.; ALI-FEHMI, R. Breast Carcinoma: Updates in Molecular Profiling 2018. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, n. 2, p. 401–420, 2018.

BARRON, C. C. *et al.* Facilitative glucose transporters: Implications for cancer detection, prognosis and treatment. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 65, n. 2, p. 124–139, 2016.

BARTHEL, A. *et al.* Regulation of GLUT1 Gene Transcription by the Serine / Threonine Kinase Akt1 Regulation of GLUT1 Gene Transcription by the Serine / Threonine Kinase Akt1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 29, p. 20281–20286, 1999.

BRAAKHUIS, A. J.; CAMPION, P.; BISHOP, K. S. Reducing breast cancer recurrence: the role of dietary polyphenolics. **Nutrients**, v. 8, n. 9, p. 547, 2016.

BUDISAN, L. *et al.* Dietary intervention by phytochemicals and their role in modulating coding and non-coding genes in cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1178, 2017.

CAIRNS, R.; HARRIS, I.; MAK, T. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 85–95, 2011.

CASANOVA, F. *et al.* Resveratrol chemosensitizes breast cancer cells to melphalan by cell cycle arrest. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 8, p. 2586–2596, 2012.

CASSIDY, A. *et al.* Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with antiinflammatory effects in a population of US adults. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 172–181, 2015.

CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Modulatory roles of glycolytic enzymes in cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 92, n. 1, p. 22–30, 2014.

CEREZO, A. B. *et al.* Molecular structure-function relationship of dietary polyphenols for inhibiting VEGF-induced VEGFR-2 activity. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 59, n. 11, p. 2119–2131, 2015.

CHEN, M.; ZHAO, Z.; YU, S. Cytotoxicity and apoptotic effects of polyphenols from sugar beet molasses on colon carcinoma cells in vitro. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 993, 2016.

CHEN, P.-N. *et al.* Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis in vitro and suppress tumor growth in vivo. **Nutrition and Cancer**, v. 53, n. 2, p. 232–243, 2005.

CHEN, P. N. *et al.* Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Letters**, v. 235, n. 2, p. 248–259, 2006.

CHEN, X. Y. *et al.* Black rice anthocyanins suppress metastasis of breast cancer cells by targeting ras/raf/mapk pathway. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

CHO, E. *et al.* Anti-cancer effect of cyanidin-3-glucoside from mulberry via caspase-3 cleavage and dna fragmentation in vitro and in vivo. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 11, p. 1519–1525, 2017.

COMȘA, Ș.; CÎMPEAN, A. M.; RAICA, M. The story of mcf-7 breast cancer cell line : 40 years of experience in research. **Anticancer Research**, v. 35, n. 6, p. 3147–3154, 2015.

CORDANI, M. *et al.* Mutant p53 proteins alter cancer cell secretome and tumour microenvironment: Involvement in cancer invasion and metastasis. **Cancer Letters**, v. 376, n. 2, p. 303–309, 2016.

CZABOTAR, P. E. *et al.* Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 15, n. 1, p. 49–63, 2014.

CZANK, C. *et al.* Human metabolism and elimination of the anthocyanin, cyanidin-3glucoside: a 13 C-tracer study 1 – 3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, n. 5, p. 995–1003, 2013.

DA-SILVA, W. S. *et al.* Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. Steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39846–39855, 2004.

DANG, C.; LE, A.; GAO, P. Myc-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 21, p. 6479–6483, 2009.

DE FERRARS, R. M. *et al.* The pharmacokinetics of anthocyanins and their metabolites in humans. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 13, p. 3268–3282, 2014.

DE OLIVEIRA, M. R. *et al.* Resveratrol and the mitochondria: From triggering the intrinsic apoptotic pathway to inducing mitochondrial biogenesis, a mechanistic view. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 4, p. 727–745, 2016.

DEL RIO, D. *et al.* Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. **Antioxidants & redox signaling**, v. 18, n. 14, p. 1818–92, 2013.

DING, M. *et al.* Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 25, p. 17359–17368, 2006.

DUCHNOWICZ, P. *et al.* Hypolipidemic and antioxidant effects of hydroxycinnamic acids, quercetin, and cyanidin 3-glucoside in hypercholesterolemic erythrocytes (in vitro study). **European Journal of Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 435–443, 2012.

FRAGA, C. G. *et al.* Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 31, n. 6, p. 435–445, 2010.

FRAGOMENI, S. M.; SCIALLI, A.; JERUSS, J. S. Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 27, n. 1, p. 95–120, 2018.

GOMEZ, L. S. *et al.* Resveratrol decreases breast cancer cell viability and glucose metabolism by inhibiting 6-phosphofructo-1-kinase. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1336–1343, 2013.

GUO, H. *et al.* Cyanidin-3-O- β -glucoside regulates fatty acid metabolism via an AMP-activated protein kinase-dependent signaling pathway in human HepG2 cells. **Lipids in Health and Disease**, v. 11, n. 1, p. 10, 2012.

GUPPY, M. *et al.* Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. **Biochemical journal**, v. 364, n. Pt 1, p. 309–315, 2002.

GUPTA, C.; TIKOO, K. High glucose and insulin differentially modulates proliferation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. **Journal of molecular endocrinology**, v. 51, n.1, p. 119–129, 2013.

HAMILTON, S. D.; PARDUE, H. L. Quantitation of lactate by a kinetic method with an extended range of linearity and low dependence on experimental variables. **Clinical Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 226–229, 1984.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAY, N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 10, p. 635, 2016.

HENSLEY, C. T.; WASTI, A. T.; DEBERARDINIS, R. J. Review series glutamine and cancer: cell biology, physiology, and clinical opportunities. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 9, p. 3678–3684, 2013.

HO, N.; COOMBER, B. L. Hexokinase II expression is correlated with colorectal cancer prognosis. **Cancer Treatment Communications**, v. 6, p. 11–16, 2016.

HOSSEINI, M. M. *et al.* Cytotoxic and apoptogenic effects of cyanidin-3-glucoside on the glioblastoma cell line. **World Neurosurgery**, v. 108, p. 94–100, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil/ Instituto nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva** – Rio de Janeiro, 2018. < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/casos-taxas-brasil.asp>>. Acessado em 08/07/2018

KAY, C. D.; KROON, P. A.; CASSIDY, A. The bioactivity of dietary anthocyanins is likely to be mediated by their degradation products. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, n. S1, p. S92–S101, 2009.

KENNEDY, K. M. *et al.* Catabolism of exogenous lactate reveals it as a legitimate metabolic substrate in breast cancer. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e75154, 2013.

KHOO, H. E. *et al.* Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. **Food & Nutrition Research**, v. 61, n. 1, p. 1361779, 2017.

KIM, J. W. *et al.* HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. **Cell Metabolism**, v. 3, n. 3, p. 177–185, 2006.

KROEMER, G.; POUYSSEGUR, J. Tumor cell metabolism: cancer's achilles' heel. **Cancer Cell**, v. 13, n. 6, p. 472–482, 2008.

KUNTZ, S. *et al.* Anthocyanins from fruit juices improve the antioxidant status of healthy young female volunteers without affecting anti-inflammatory parameters: results from the randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over ANTHONIA (ANTHOCyanins in Nutrition). **The British journal of nutrition**, v. 112, n. 6, p. 925–936, 2014.

KWEE, S. A. *et al.* Choline kinase alpha and hexokinase-2 protein expression in hepatocellular carcinoma: association with survival. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e46591, 2012.

KWON, O. H. *et al.* Pyruvate kinase M2 promotes the growth of gastric cancer cells via regulation of Bcl-xL expression at transcriptional level. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 423, n. 1, p. 38–44, 2012.

LACROIX, M.; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 83, n. 3, p. 249–289, 2004.

LI, W. *et al.* Resveratrol inhibits hexokinases II mediated glycolysis in non-small cell lung cancer via targeting Akt signaling pathway. **Experimental Cell Research**, v. 349, n. 2, p. 320–327, 2016a.

LI, X. *et al.* Anthocyanins inhibit trastuzumab-resistant breast cancer in vitro and in vivo. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 5, p. 4007–4013, 2016b.

LIANG, C. *et al.* Energy sources identify metabolic phenotypes in pancreatic cancer. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 11, p. 969–979, 2016.

LIU, W. *et al.* Anthocyanins potentiate the activity of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer cells in vitro and in vivo. **Molecular Medicine Reports**, v. 10, n. 4, p. 1921–1926, 2014.

LOSADA-ECHEBERRÍA, M. *et al.* Polyphenols as promising drugs against main breast **Cancer Signatures. Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 88, 2017.

LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer Letters**, v. 356, n. 2, p. 156–164, 2015.

LUO, W.; SEMENZA, G. L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 560–566, 2012.

MANKOFF, D. A. *et al.* Tumor-specific positron emission tomography imaging in patients: [18F] fluorodeoxyglucose and beyond. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 12, p. 3460–3469, 2007.

MATHUPALA, S. P.; KO, Y. H.; PEDERSEN, P. L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer's stygian link to the “Warburg effect” and a pivotal target for effective therapy. **Seminars in Cancer Biology**, v. 19, n. 1, p. 17–24, 2009.

MATHUPALA, S. P.; KO, Y. H.; PEDERSEN, P. L. The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1797, n. 6–7, p. 1225–1230, 2010.

MOCANU, M. M.; NAGY, P.; SZÖLLŐSI, J. Chemoprevention of breast cancer by dietary polyphenols. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22578-22620, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014

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 & Cell Biology**, v. 59, p. 167–181, 2015.

OLIVAS-AGUIRRE, F. J. *et al.* Cyanidin-3-*O*-glucoside: Physical-chemistry, foodomics and health effects. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1264, 2016.

ORTEGA, Á. D. *et al.* Glucose avidity of carcinomas. **Cancer Letters**, v. 276, n. 2, p. 125–135, 2009.

OSTHUS, R. C. *et al.* Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 21797–21800, 2000.

PACE, E. *et al.* Impact of thermal degradation of cyanidin-3-*O*-glucoside of haskap berry on cytotoxicity of hepatocellular carcinoma HEPG2 and breast cancer MDA-MB-231 cells. **Antioxidants**, v. 7, n. 2, p. 24, 2018.

PACHECO-VELÁZQUEZ, S. C. *et al.* Energy Metabolism Drugs Block Triple Negative Breast Metastatic Cancer Cell Phenotype. **Molecular pharmaceuticals**, v. 15, n. 6, p. 2151–2164, 2018.

PASTORINO, J. G.; HOEK, J. B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 40, n. 3, p. 171-182, 2008.

PASTORINO, J. G.; SHULGA, N.; HOEK, J. B. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 9, p. 7610–7618, 2002.

PATRA, K. C.; HAY, N. The pentose phosphate pathway and cancer. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 8, p. 347–354, 2014.

PONZO, V. *et al.* Dietary flavonoid intake and cardiovascular risk: a population-based cohort study. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 218, 2015.

QU, Y. *et al.* Evaluation of MCF10A as a reliable model for normal human mammary epithelial cells. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131285, 2015.

ROBERTS, D. J.; MIYAMOTO, S. Hexokinase II integrates energy metabolism and cellular protection: Akt on mitochondria and TORCing to autophagy. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 2, p. 248–257, 2015.

ROBEY, R. B.; HAY, N. Is Akt the “Warburg kinase”? -Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. **Seminars in cancer biology**, v. 19, n. 1, p. 25–31, 2009.

RODRIGUES, M. F. **Estudo das alterações no metabolismo energético induzidas por butirato de sódio em linhagens de câncer de mama**. 2013. 167p. Dissertação – Mestrado em Química Biológica. Universidade Federal do Rio de Janeiro– UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Bioquímica Médica, Rio de Janeiro, 2013.

RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ, S. *et al.* Canonical and new generation anticancer drugs also target energy metabolism. **Archives of Toxicology**, v. 88, n. 7, p. 1327–1350, 2014.

SALES, N. F. F. DE *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, n. 3, p. 611, 2018.

SATO-TADANO, A. *et al.* Hexokinase II in breast carcinoma: A potent prognostic factor associated with hypoxia-inducible factor-1 α and Ki-67. **Cancer Science**, v. 104, n. 10, p. 1380–1388, 2013.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 23, n. S2, p. S60–S64, 2010.

SKEMIENE, K. *et al.* Anthocyanins block ischemia-induced apoptosis in the perfused heart and support mitochondrial respiration potentially by reducing cytosolic cytochrome c. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 45, n. 1, p. 23–29, 2013.

SKEMIENE, K.; LIOBIKAS, J.; BORUTAITE, V. Anthocyanins as substrates for mitochondrial complex i - Protective effect against heart ischemic injury. **FEBS Journal**, v. 282, n. 5, p. 963–971, 2015.

SOUSA, A. *et al.* Antioxidant and antiproliferative properties of 3-deoxyanthocyanidins. **Food Chemistry**, v. 192, p. 142–148, 2016.

SZABLEWSKI, L. Expression of glucose transporters in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1835, n. 2, p. 164–169, 2013.

TARRADO-CASTELLARNAU, M.; DE ATAURI, P.; CASCANTE, M. Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, p. 62726–62753, 2016.

TOTH, R.; WARFEL, N. Strange bedfellows: nuclear factor, erythroid 2-like 2 (Nrf2) and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in tumor hypoxia. **Antioxidants**, v. 6, n. 2, p. 27, 2017.

WANG, K. *et al.* Curcumin inhibits aerobic glycolysis and induces mitochondrial-mediated apoptosis through hexokinase II in human colorectal cancer cells in vitro. **Anti-cancer drugs**, p. 1–10, 2014a.

WANG, L. *et al.* Cyanidin-3-o-glucoside directly binds to ER α 36 and inhibits EGFR positive triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 68864–68882, 2011.

WANG, L. *et al.* Hexokinase 2-mediated warburg effect is required for pten and p53 deficiency driven prostate cancer growth. **Cell Reports**, v. 8, n. 5, p. 1461–1474, 2014b.

WANG, L. *et al.* Cyanidin-3-o-glucoside directly binds to ER α 36 and inhibits EGFR positive triple-negative breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 42, p. 68864, 2016.

WEI, L. *et al.* Oroxylin A sensitizes non-small cell lung cancer cells to anoikis via glucosedeprivation-like mechanisms: C-Src and hexokinase II. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3835–3845, 2013.

WIEMAN, H. L.; WOFFORD, J. A.; RATHMEL, J. C. Cytokine Stimulation Promotes Glucose Uptake via Phosphatidylinositol-3 Kinase/Akt Regulation of Glut1 Activity and Traffickin. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 4, p. 1437–1446, 2007.

WILSON, K.; WAKER, J. **Principles and techniques of practical biochemistry**. 5. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2000

WOLF, A. *et al.* Hexokinase 2 is a key mediator of aerobic glycolysis and promotes tumor growth in human glioblastoma multiforme. **The Journal of experimental medicine**, v. 208, n. 2, p. 313–326, 2011.

WOODWARD, G. *et al.* Anthocyanin stability and recovery: Implications for the analysis of clinical and experimental samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5271–5278, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Fact sheet, february 2018**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/en/>> Acesso em: 05 de abril de 2018.

XU, M. *et al.* Cyanidin-3-glucoside inhibits ethanol-induced invasion of breast cancer cells overexpressing ErbB2. *Molecular cancer*, v. 9, n. 1, p. 285, 2010. YAN, X. *et al.* Cyanidin-3-O-glucoside attenuates acute lung injury in sepsis rats. **The Journal of surgical research**, v. 199, n. 2, p. 592–600, 2015.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and antiinflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 8, p. 33–42, 2016.

ZHOU, Y. *et al.* Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 515, 2016.