



## EFEITO DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO EM CÉLULAS TUMORAIS

R.M. Maria<sup>1</sup>, W.F. Altei<sup>2</sup>, T. Venâncio<sup>3</sup>, A.D. Andricopulo<sup>2</sup>, A.B. Becceneri<sup>4</sup>, M.R. Cominetti<sup>4</sup>, L.A. Colnago<sup>1</sup>

- (1) Embrapa Instrumentação, Rua XV de Novembro, 1452, 13560-970, São Carlos, SP, robmmaria@gmail.com, luiz.colnago@embrapa.br  
(2) Instituto de Física de São Carlos, IFSC/USP, Avenida Trabalhador São-Carlense, 400, 13560-970, São Carlos, SP, wanaltei@gmail.com, aandrico@ifsc.usp.br  
(3) Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, DQ/CCET/UFSCar, Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905, São Carlos, SP, venancio@ufscar.br  
(4) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, CCBS/UFSCar, Departamento de Gerontologia, Laboratório de Biologia do Envelhecimento, LABEN, Rodovia Washington Luiz, Km 235, 13565-905, São Carlos, SP, amandabecc@gmail.com, mcominetti@ufscar.br

**Resumo:** O ácido linoleico conjugado (CLA), um grupo de isômeros do ácido linoleico, é encontrado no leite e na carne de animais ruminantes e apresenta propriedades anticarcinogênicas. Estudou-se o efeito do CLA em duas linhagens de células de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7, com a técnica de RMN denominada HR-MAS. As células de câncer de mama, MCF-7 incubadas com 100  $\mu$ M CLA tiveram aumento significativo do sinal de acetona. Também se observou que o teor de fosfocolina diminuiu em ambas as linhagens celulares quando tratadas com 100  $\mu$ M CLA. Mediante esses resultados e simulação por modelagem molecular propôs-se que o CLA pode atuar inibindo a ação da enzima HMG-CoA redutase (HMGR), de maneira similar as estatinas. Desta forma, pode-se concluir que a inibição da HMGR pelo CLA pode ser uma demonstração do mecanismo bioquímico de sua ação anticarcinogênica, além de suas outras atividades relatadas na literatura.

**Palavras-chave:** RMN, HR-MAS, células de câncer de mama, CLA, metabolismo.

### EFFECT OF CONJUGATED LINOLEIC ACID IN TUMOR CELLS

**Abstract:** Conjugated linoleic acid (CLA), a group of linoleic acid isomers, is found in milk and meat of ruminant animals, which have anticarcinogenic properties. The effect of CLA in two cell lines of breast cancer, MDA-MB-231 and MCF-7, was studied High Resolution Magic Angle Spinning (HR-MAS) NMR technique. The breast cancer cells, MCF-7 subjected to 100  $\mu$ M CLA had a significantly higher acetone signal. It was noted that the content of phosphocholine decreased in both cell lines treated with 100  $\mu$ M CLA. Given these results and simulation with molecular modeling we are suggesting that CLA inhibits the enzyme HMG-CoA reductase (HMGR), similar to statins. Therefore, the inhibition of HMGR by CLA may be the biochemical explanation for its anticarcinogenic activities as well as properties reported in the literature.

**Keywords:** NMR, HR-MAS, breast cancer cell, CLA, metabolism.

### 1. Introdução

O ácido linoleico conjugado ou CLA (do inglês, *conjugated linoleic acid*) é uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico, C 18:2, *cis*-9, *cis*-12. O CLA tem o mesmo comprimento de cadeia que o ácido linoleico (C18), no entanto, no CLA as duplas ligações são conjugadas, sem a separação pelo grupo metileno, como ocorre no ácido linoleico. O CLA é encontrado na natureza na carne de animais ruminantes, bem como no leite e seus derivados e tem potenciais efeitos benéficos na saúde humana, entre eles, a possível ação contra alguns tipos de tumores (TANAKA, 2005).

Apesar do grande progresso no diagnóstico precoce do câncer e do aprimoramento nas terapêuticas utilizadas, esta doença ainda é considerada devastadora com alto índice de mortalidade (INCA, 2013). Dessa forma, a abordagem sobre essa questão e ferramentas para diagnósticos tornam-se imprescindíveis. Uma área de grande interesse na pesquisa médica e bioquímica tem sido a análise dos metabólitos envolvidos no processo tumoral, já que consiste em uma forma de análise dos processos celulares em geral. Esta área de pesquisa tem como objetivo o desenvolvimento de novos métodos de análise laboratorial, contribuindo tanto para o prognóstico precoce quanto o monitoramento preciso da terapêutica, pois a regulação metabólica está altamente intrincada com a progressão tumoral (MERZ; SERKOVA, 2009).

Dentre estas ferramentas de análise de metabólitos, a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) vem se tornando uma técnica de grande destaque, pois fornece informações das condições fisiológicas e

bioquímicas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MERZ; SERKOVA, 2009). Assim, a técnica de RMN em alta resolução usando rotação no ângulo mágico HR-MAS (*High Resolution Magic Angle Spinning*) foi utilizada neste trabalho para estudar principalmente o metabolismo de células intactas de câncer de mama submetidas ao CLA.

## 2. Materiais e Métodos

Neste trabalho foram analisadas duas linhagens celulares de câncer de mama, a MCF-7 e a MDA-MB-231, Figura 1. A linhagem MCF-7 possui diversas características de um epitélio mamário diferenciado, incluindo a habilidade de processar o estradiol por meio de receptores de estrogênio citoplasmático (ER<sup>+</sup>) e capacidade de formação de nódulos. A linhagem MDA-MB-231, por sua vez, não possui receptores de estrogênio (ER<sup>-</sup>) e se apresenta pouco diferenciada, isto é, não forma nódulos (MEADOWS et al., 2008).

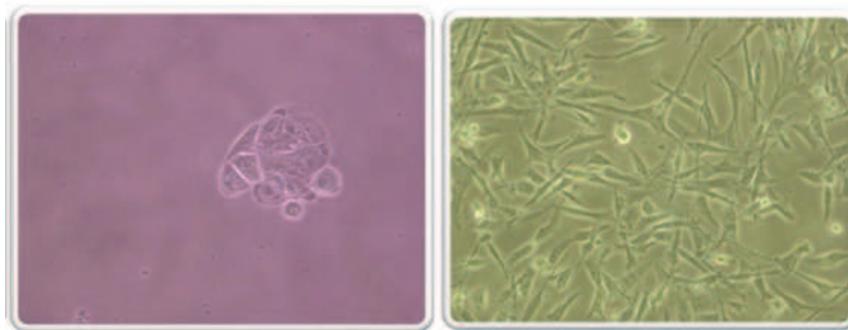


Figura 1. Imagens microscópicas das células de câncer de mama com receptores de estrogênio, MCF-7 (esquerda) e células de câncer de mama sem receptores de estrogênio, MDA-MB- 231 (direita).

As análises de HR-MAS foram realizadas em uma sonda dual <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C HR-MAS, no espectrômetro DRX 400 BRUKER de 9,4 Tesla (400,21 MHz para a frequência do hidrogênio) a uma temperatura de 23°C, com detecção inversa e gradiente de campo na coordenada z. A rotação da amostra foi de 5 KHz. Para a identificação dos metabólitos, as células intactas de câncer de mama foram analisadas com técnicas bidimensionais, tais como: COSY (*Correlation spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy*) e HMBC (*Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy*). Foram utilizadas as bases de dados online HMDB, *Madison Metabolomics*, KEGG *Metabolic Pathways* e a SMPDB para auxiliar na identificação dos metabólitos celulares e a correlação com as vias metabólicas.

## 3. Resultados e Discussão

A análise dos metabólitos foi realizada também com as células MCF-10A (células epiteliais não tumorigênicas), sendo utilizada neste trabalho como padrão de células saudáveis. Observou-se que o perfil metabólico das células MCF-10A não apresentou o sinal referente à fosfocolina, bem como a presença do sinal da acetona. Na Figura 2, está apresentada a quantidade relativa de acetona presente nos espectros de HR-MAS das células de câncer de mama, MCF-7 e MDA-MB-231, submetidas a 100 μM de CLA.

Quando as células MCF-7 foram cultivadas na presença de 100 μM de CLA, o nível de acetona aumentou significativamente. Observou-se que as células de câncer de mama, MCF-7, submetidas a 100 μM CLA, tiveram um aumento significativo do valor médio dos sinais da acetona em 90% ± 12,75%. Os espectros das células MDA-MB-231 submetidas ao CLA não apresentaram aumento da concentração de acetona. Ao contrário, apresentaram uma diminuição do sinal da acetona na presença do CLA.

As análises dos espectros de HR-MAS de ambas as linhagens demonstraram que os sinais de fosfocolina diminuíram com a adição do CLA, Figura 3. Os resultados mostraram que houve a diminuição do valor médio dos sinais de fosfocolina em 32.5 ± 19.13% nas células MCF-7 quando submetidas a 100 μM CLA. Os resultados reportaram também que este mesmo metabólito teve a diminuição de 33.5 ± 12.47% nas células MDA-MB-231 quando submetidas à mesma concentração do CLA. Considerando a fosfocolina como um biomarcador tumoral e sendo envolvido com a malignidade da doença (ELIYAHU et al., 2007), os resultados obtidos neste trabalho podem sugerir um efeito positivo do CLA nas células de câncer de mama analisadas. No nível mais amplo do metabolismo lipídico de membrana, as células devem coordenar os níveis de colesterol e fosfolípidios, já que há forte evidência indicando que estes estão em um controle recíproco positivo (NOHTURFFT; ZHANG, 2009). Assim como se observou uma redução da fosfocolina encontrada nas células analisadas, também poderia se supor que o colesterol decresceu com o uso do CLA.

Isto pode ser avaliado pelo fato que os ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são potentes inibidores da HMG-CoA redutase, que é uma enzima limitante na biossíntese do colesterol (NOTARNICOLA et al., 2010). Consequentemente, como o CLA é um ácido graxo de cadeia longa, poderia também inibir a HMG-CoA redutase. Desta forma, o CLA impediria a conversão do HMG-CoA a mevalonato, interferindo na síntese do colesterol. Esta

ação pode causar o bloqueio na via de biossíntese do colesterol, resultando assim em acúmulo de acetil-CoA, que pode se converter, após várias etapas, em acetoacetato, podendo ser reduzido para D-β-hidroxiacetato pela ação da enzima β-hidroxiacetato desidrogenase ou sofrer descarboxilação espontânea, produzindo acetona. A inibição da enzima HMG-CoA redutase pelo CLA causa mudanças na via metabólica para o acúmulo do acetil-CoA, consequentemente reduzindo a síntese do colesterol.

Estudos têm demonstrado que a inibição da síntese do colesterol tem levado à redução dos níveis de fosfolípidios (NOHTURFFT; ZHANG, 2009). Isto porque se demonstrou que a redução da síntese do colesterol altera a função da enzima citidiltransferase fosfocolina (CCT/CTP), resultando na redução dos níveis de produção da fosfocolina (YOSHIMUNE et al., 1995). Esta informação pode explicar os resultados obtidos nas análises da concentração de fosfocolina em ambas as linhagens estudadas. Os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com estes estudos prévios, pois os níveis de fosfocolina sofreram redução nos dois tipos celulares, MCF-7 e MDA-MB-231, após a suplementação com o CLA.

A fosfatidilcolina, envolvida no ciclo dos metabólitos de colina, é um ativador alostérico da enzima D-β-hidroxiacetato desidrogenase (PROTEIN KNOWLEDGEBASE, 2013), a qual atua na conversão do acetoacetato para hidroxiacetato. Na ausência ou em baixas concentrações deste modulador alostérico, a enzima D-β-hidroxiacetato desidrogenase não atua sobre o acetoacetato e a via bioquímica é direcionada para a produção da acetona. Esta hipótese explica o motivo de as células MCF-7 produzirem acetona em detrimento ao hidroxiacetato, quando tratadas com CLA.

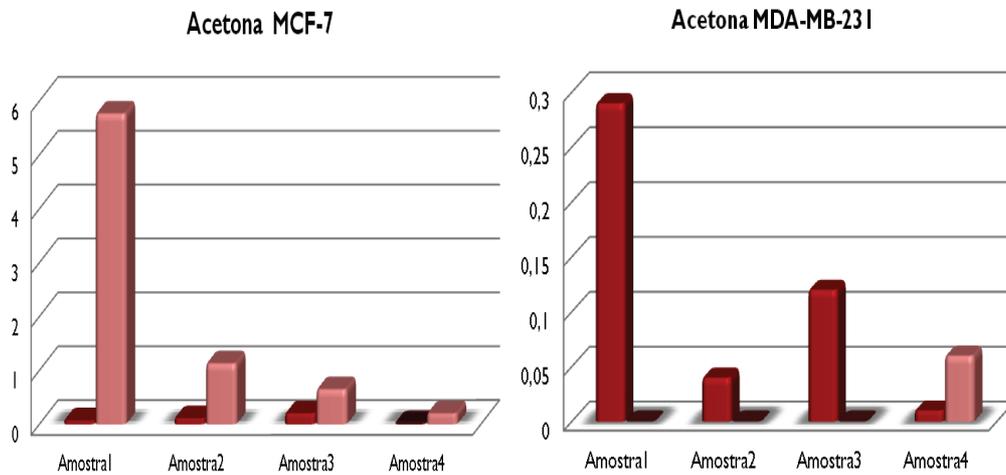


Figura 2. Quantidade relativa da acetona presente no espectro de HR- MAS das células MCF-7 MDA-MB-231, respectivamente. Células controle em vermelho escuro e submetidas ao CLA (100 μM) em vermelho claro.

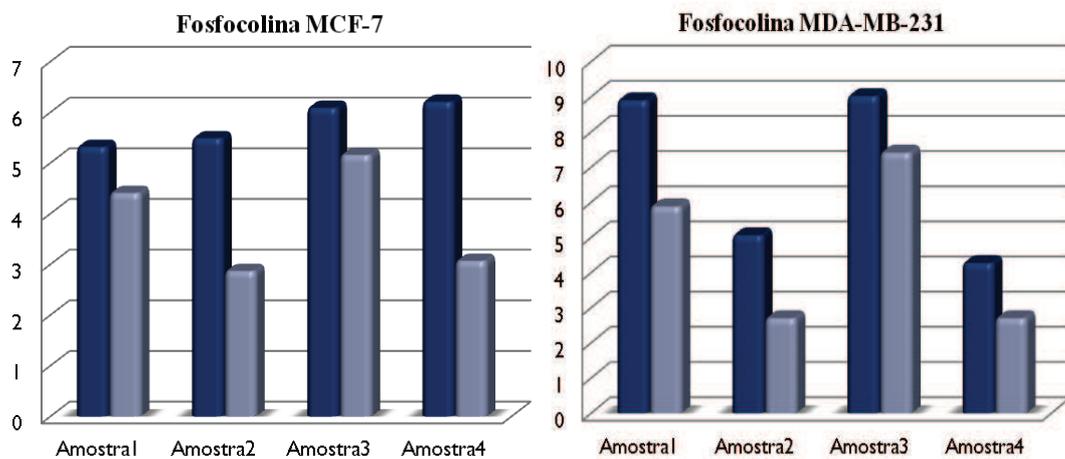


Figura 3. Quantidade relativa da fosfocolina presente no espectro de HR- MAS das células MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente. Células controle em azul escuro e submetidas ao CLA (100 μM) em azul claro.

#### 4. Conclusões

A técnica de HR-MAS mostrou ser uma ferramenta útil para identificação e quantificação do perfil metabólico das células de câncer de mama. Com os dados de HR-MAS demonstrou-se que o CLA alterou significativamente o perfil metabólico das duas linhagens celulares, com o aumento da produção de acetona na células MCF-7 e redução da fosfocolina em ambas as células, levantando a hipótese de que o CLA pode estar inibindo a enzima HMG-CoA redutase, de maneira similar as estatinas.

#### Agradecimentos

Este trabalho teve o suporte financeiro da FAPESP (2009/17846-4 e 2013/05128-5) e do CNPq.

#### Referências

- TANAKA, K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. *Animal Science Journal*, v.76, p. 291-303, 2005.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estatísticas do câncer. Vigilância do câncer e fatores de risco. Incidência 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>>. Acesso em: 20 jun.2013.
- MERZ, A.L.; SERKOVA, N.J. Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics in detecting drug resistance in cancer. *Biomark Medicine*, v. 3, n. 3, p. 289-306,2009.
- MEADOWS, A.L.; KONG,B.; BERDICHEVSKY, M.; ROY, S.; ROSIVA, R. BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. Metabolic and morphological differences between rapidly proliferating cancerous and normal breast epithelial cells. *Biotechnology*, v. 24, p. 334-341, 2008.
- ELIYAHU, G.; KREIZMAN, T.; DEGANI, H. Phosphocholine as a biomarker of breast cancer: Molecular and biochemical studies. *International Journal of Cancer*, v. 120, n. 8, p. 1721-1730, 2007.
- NOHTURFFT, A.; ZHANG, C. Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 25, p. 539-566,2009.
- Notarnicola, M.; Messa, C.; Refolo, M. G.; Tutino, V.; Miccolis, A.; Caruso, M. G. Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxy-methyl-glutaryl coA-reductase gene expression and promote apoptosis in hepG2 cell line. *Lipids in Health and Disease*, v. 9, p.1-8, 2010.
- YOSHIMUNE,S.; HOUWELING,M.; ZHA, X.; TABAS, I. Stimulation of CTP: Phosphocholine Cytidyltransferase by free cholesterol loading of macrophages involves signaling through protein dephosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 270, p. 29894-29903, 1995.
- PROTEIN KNOWLEDGEBASE 2002-2013. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/Q02338>>. Acesso em : 10 mar.2013.