



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UnICEUB
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

JENNIFER YUMIE SONOBE HABLE

**TRATAMENTO COM METFORMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE
MAMA E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO (EROS)**

BRASÍLIA

2019



JENNIFER YUMIE SONOBE HABLE

**TRATAMENTO COM METFORMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE
MAMA E SUA INFLUÊNCIA NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE
OXIGÊNIO (EROS)**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e
Pesquisa.

Orientação: Luciana de Farias Ramalho

BRASÍLIA

2019

RESUMO

O câncer é considerado o mal do século, segundo a OMS, sendo o de mama o mais letal entre as mulheres. Diferenças metabólicas, em comparação com as células saudáveis, favorecem o desenvolvimento e a sobrevivência das células cancerígenas. Nesse sentido, as células neoplásicas apresentam níveis basais de espécies reativas de oxigênio (EROs) elevados, porém desenvolvem mecanismos de defesa através da produção de enzimas com ação antioxidante - catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione - que evitam o estresse oxidativo e consequente morte celular. Uma vez que a ativação da AMPK nas células cancerígenas tratadas com metformina está associada à menor síntese de EROs, compreender melhor o comportamento desse fenômeno em células cancerígenas sob tratamento com metformina pode representar mais uma possibilidade no desenvolvimento de ferramentas que poderão ser utilizadas na terapia de combate ao câncer. Para realização do projeto, foram cultivadas células da linhagem MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano) em meio L-15 (Leibovitz Medium). No teste de viabilidade foram semeadas cerca de 7×10^3 células, em triplicata, para o tratamento de 4 concentrações com metformina. A citotoxicidade da droga nessas células foram determinadas pelo ensaio padrão por brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium (MTT). As placas foram lidas a 595 nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices USA), sendo a porcentagem de inibição do crescimento celular determinada através da comparação da densidade celular das células tratadas com as células controle. Para as análises da expressão gênica cerca de 750×10^3 células foram plaqueadas e submetidas ao tratamento com metformina com 3 concentrações distintas determinadas pelo resultado obtido no teste de viabilidade (1,25mM, 10mM e 20mM). Após o tempo de exposição de tratamento (24h), as células foram submetidas a extração de RNA utilizando o kit Power SYBR® Green Cells-to-CT™ (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, foram sintetizados cDNAs com utilização do kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen®). Para análise dos níveis de expressão gênica foram desenhados iniciadores para os genes que codificam as enzimas Superóxido Dismutase, Catalase e Heme Oxigenase, bem como para o gene do controle endógeno (GAPDH), para utilização na técnica de PCR em tempo real. O teste de viabilidade para as 5 concentrações de metformina, indicou uma mortalidade de aproximadamente 15,6% das células MDA-MB-231 tratadas com 1,25mM, 17,6% com 2,5mM, 33,8% com 5mM, 52,55% com 10mM e, por fim, 78% de mortalidade com a utilização de 20mM, demonstrando uma mortalidade dose-dependente. A partir da análise de variância com um fator (one-way ANOVA), constatou-se que há comparação estatisticamente significativa entre o grupo controle e as concentrações 1,25mM, 10mM e 20mM, sendo essas concentrações utilizadas nos ensaios para análise da expressão de enzimas antioxidantes. Os resultados da qPCR demonstraram que não houve alteração significativa nos níveis de expressão gênica destas enzimas em relação ao controle, fato que pode estar relacionado com a menor produção de EROs nas células devido à inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons. Ainda nesse sentido, os estudos que investigam a relação entre a metformina e o estresse oxidativo em linhagens de células carcinogênicas mamárias ainda são escassos, apontando a necessidade em ampliar o desenvolvimento de pesquisas que investigam essa relação.

Palavras-Chave: MDA-MB-231, Expressão Gênica, Neoplasia Mamária .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	7
2.1. Câncer de Mama.....	7
2.2. Uso de Metformina no Tratamento de Câncer.....	8
2.3. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	9
2.4. Estresse Oxidativo.....	10
2.5. Relação entre Metformina e Produção de EROs.....	12
3. METODOLOGIA.....	13
3.1. Cultivo e Manutenção das Células.....	13
3.2. Análise da Viabilidade Celular.....	13
3.3. Extração de RNA e Síntese de cDNA.....	14
3.4. Desenho de Iniciadores.....	14
3.5. Análise da Expressão Gênica.....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
6. REFERÊNCIAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

Na proliferação celular, mecanismos de gestão e controle possibilitam que o processo ocorra de forma sustentável. Entretanto, falhas em diversos mecanismos podem ter como consequência o câncer. Nesse sentido, o progressivo acúmulo de uma massa de células advindas de um processo replicativo e excessivo não compensado pela perda celular apropriada é caracterizado como câncer (CASCIATO D. A., 2008).

O câncer é considerado o mal do século, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e ocasiona gastos mundialmente, cerca de 1,16 bilhões de dólares só no ano de 2010, enquanto a taxa de mortalidade atribuída à doença foi de 8,8 milhões de pessoas no mundo em 2015. No Brasil, o câncer mais letal entre as mulheres é o de mama e corresponde a cerca de 29,5% dos casos novos anualmente (INCA, 2018).

Neste contexto, as células se tornam malignas devido a ocorrência de mutações genéticas que têm como consequência o aumento da sobrevivência e reprodução celular (JACQUELINE C. et al, 2017). Existem fatores de risco associados à doença, entre eles os genes BRCA1 e BRCA2 que estão relacionados ao aparecimento do câncer de mama aumentando em até 80% o risco do seu desenvolvimento (LOPES A. et al, 2013), e as alterações em genes supressores de tumor (eg. TP53, PTEN) que provocam a perda dos seus fatores protetivos, e assim, aumentam em até 50% as chances de desenvolvimento desse tipo de câncer (CASCIATO D. A., 2008).

No Brasil, o câncer de mama é o segundo com maior incidência, ficando atrás apenas do câncer de pele não-melanoma (INCA, 2016). O tratamento do câncer de mama exige uma série de análises que leva em consideração o estadiamento da doença. Nesse contexto, os principais métodos utilizados como tratamento são cirurgia, quimioterapia e radioterapia, porém a adversidade trazida por essas abordagens têm impulsionado buscas por inovações terapêuticas contra o câncer de mama.

Atualmente, o interesse dos efeitos da metformina sobre o desenvolvimento, tratamento e progressão do câncer de mama tem aumentado de forma considerável devido a estudos que demonstraram a diminuição da incidência de câncer de mama em mulheres diabéticas tratadas com metformina. Porém, embora os resultados com a metformina sejam promissores, algumas questões metabólicas ainda precisam ser elucidadas para melhor esclarecer se as vias influenciadas pelo uso dessa droga são favoráveis ou não ao uso terapêutico da mesma, no tratamento do câncer de mama.

As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem papéis fisiológicos cruciais na manutenção da função biológica tanto das células normais, quanto das cancerosas. Nesse contexto, estão relacionadas a transdução de sinal, resposta inflamatória e autofagia. Entretanto, em conjunto com o estresse oxidativo são considerados prejudiciais para as células, pois podem danificar o DNA celular, oxidar ácidos graxos e aminoácidos, e desativar algumas enzimas e seus cofatores (TONG et al., 2015). Dessa forma, essas alterações biológicas eventualmente levam à destruição tecidual.

Ademais, as células cancerígenas apresentam níveis basais de EROs elevados quando comparadas com as células homólogas normais. Esse seria um fator positivo, uma vez que poderia proporcionar a morte das células tumorais devido ao estresse oxidativo, porém, essas células desenvolvem mecanismos de defesa através da produção de antioxidantes (catalase, glutathione peroxidase e glutathione) que irão rebaixar os níveis de EROs. Conseqüentemente, auxilia na prevenção de danos oxidativos, bem como no desenvolvimento de resistência às terapias antitumorais (TONG et al., 2015).

A metformina tem sido considerada uma droga que pode ser utilizada como adjuvante no tratamento de diferentes tipos de câncer, inclusive o de mama. Porém, os resultados controversos obtidos pelos pesquisadores, deixa clara a necessidade de mais pesquisas sobre o comportamento do metabolismo das células de câncer mediante o tratamento com metformina. Ainda não está claro se a ação indireta da metformina através da diminuição da concentração de insulina circulante é o principal fator antitumoral promovido pela droga; ou se sua ação direta através da ativação da AMPK tem maior poder antitumorigênico; ou ainda se uma combinação entre esses dois mecanismos pode ser uma alternativa.

Uma vez que a ativação da AMPK nas células cancerígenas tratadas com metformina está associada à maior síntese de EROs, a investigação dessa relação pode representar mais uma possibilidade no desenvolvimento de ferramentas que poderão ser utilizadas na terapia de combate ao câncer.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar a produção de EROs em células de câncer de mama submetidas ao tratamento com metformina, *in vitro*. Através do cultivo da linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231, da análise da viabilidade das células após o tratamento com metformina, e, por fim, comparar os níveis de expressão gênica relacionada as proteínas Superóxido Dismutase, Catalase e Heme Oxigenase em células de câncer e controle após o tratamento com metformina.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO

2.1. Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum em mulheres, responsável por cerca de 29% dos cânceres diagnosticados por ano (CASCIATO, 2008). Na maioria dos casos, o câncer de mama demora aproximadamente 8 anos, e trinta duplicações consecutivas, para chegar ao tamanho de 1 cm (GOMES, 1997).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os tumores malignos de mama podem ser classificados em epiteliais não invasivos, epiteliais invasivos, mistos epiteliais mesenquimais e tumores malignos diversos. Os tumores não invasivos são classificados dessa forma por respeitarem a membrana basal epitelial.

Menarca precoce, antes dos 12 anos de idade, primeira gravidez tardia, após 28 anos de idade, nulipariedade, menopausa tardia, ganho significativo de peso na vida adulta, uso distendido de contraceptivos orais, histórico familiar, tempo prolongado de terapias com reposição hormonal são alguns fatores associados ao aumento de risco do desenvolvimento do câncer de mama (EVANS et al., 2002).

Há algumas comprovações que mulheres com câncer de mama herdado possuem um prognóstico pior que em uma população controle (FOULKES et al., 1997). Assim, o fator hereditário é um dos aspectos de risco mais importantes a ser considerado para o desenvolvimento de câncer de mama (EVANS et al., 2002). Exceto em casos raros como a síndrome de Cowden, não há pistas fenotípicas que ajudem a identificar as pessoas que possuem mutações patológicas (EVANS et al., 2002).

Evidências sugerem que há várias mutações genéticas envolvidas na predisposição a câncer de mama (NAROD et al., 1995). Entretanto, as mais comuns são alterações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 (EVANS et al., 2002). Indivíduos com mutações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 possuem o câncer de mama como a neoplasia maligna mais comum e apresentam, assim, um risco de morte entre 46% a 87% (PETRUCCELLI et al., 2016).

O gene BRCA-1, localizado no braço longo do cromossomo 17, aparentemente é responsável pela supressão da sinalização a partir do receptor de estrógeno nas células epiteliais mamárias. Mais de 500 mutações podem ocorrer nesse gene e são herdadas como um fator autossômico dominante, de penetrância variável. As mulheres que apresentam mutação em BRCA-1 têm chances de 50% a 85% de desenvolverem o câncer de mama. Os tumores de mama que possuem esta mutação tendem a se apresentar como negativo para o receptor de estrógeno (ER-) (CASCIATO, 2008).

O gene BRCA-2, localizado no cromossomo 13, assim como o gene BRCA-1, é um gene supressor de tumor, porém possui uma complexidade maior que o gene BRCA-1. As alterações nesse gene aumentam o risco de desenvolvimento de melanoma, câncer de mama, de ovários e de pâncreas e, majoritariamente, ocorre em idades mais avançadas do que os que têm mutações no gene BRCA-1. O tumor com esta mutação em mulheres com câncer de mama tende a se apresentar como positivos para o receptor de estrógeno (ER+) (CASCIATO, 2008).

De acordo com as diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network*, é aconselhável as mulheres com alterações nos genes BRCA-1 e BRCA-2 considerarem a mastectomia bilateral como um tratamento cirúrgico primário para o câncer de mama, devido à sua elevada taxa de câncer de mama ipsilateral e contralateral.

Em relação a outras formas de tratamento, a imunoterapia baseada em inibidores de ponto de verificação combinada com a quimioterapia é considerada como um campo promissor para o câncer de mama. O receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e CDK4/6 são dois alvos biológicos mais importantes para o câncer de mama. Dessa forma, os tratamentos anti-HER2 e inibidores de CDK4/6 aumentam a resposta objetiva e a sobrevivência livre de progressão (HU et al., 2017).

2.2. Uso de Metformina no Tratamento de Câncer

A metformina é uma droga utilizada no tratamento de diabetes e que tem apresentado bons resultados em pacientes com câncer de mama, surgindo como uma novo potencial na terapia anticâncer. Além de ter demonstrado uma menor incidência da doença em populações que fazem o uso da metformina (EVANS et al., 2005; LIBBY et al., 2009), em pacientes com câncer de mama foram observadas a inibição da proliferação tumoral, bem como o impedimento da colonização e a parada na fase G1 do ciclo celular, com conseqüente diminuição da mortalidade (ALIMOVA et al., 2009).

Para células de câncer, o mecanismo de ação propostos para metformina envolve duas vias, uma direta e outra indireta. Na via indireta, uma vez que a insulina é considerada um agente mitógeno, a metformina está relacionada com a diminuição da concentração de insulina circulante, uma vez que a metformina aumenta a atividade dos receptores de insulina que, por sua vez, aumentam a translocação dos transportadores de glicose (GLUT 2) nas células hepáticas (GUNTON et al., 2003) e musculares (FISCHER et al., 1995; GUNTON et al., 2003). Esse mecanismo faz com que mais glicose seja transportada para dentro das células (aumentando também a taxa de glicólise) e menos glicose esteja circulando na corrente sanguínea, fazendo com que ocorra a diminuição da

secreção de insulina pelo pâncreas com consequente queda na concentração de insulina circulante (PERNICOVA E KORBONITS, 2014).

A via direta proposta para o mecanismo da metformina envolve a diminuição da síntese de ATP através do bloqueio do primeiro complexo enzimático da cadeia transportadora de elétrons localizado na membrana mitocondrial interna. Com a queda na síntese de ATP ocorre o aumento da concentração de AMP, fazendo com que a enzima AMPK seja ativada via a cinase LKB1. A ativação da AMPK provoca a inativação da via PI3K/AKT/mTOR, conhecida por promover a proliferação celular. Porém, a ativação da AMPK pode estar relacionada a uma maior produção de energia através de vias catabólicas como, por exemplo, a glicólise; sendo esse um comportamento que poderia favorecer o metabolismo das células de câncer. Devido a obtenção de resultados controversos em relação a metformina, investigações sobre os efeitos diretos e indiretos dessa droga no tratamento do câncer precisam continuar sendo explorada, no intuito de esclarecer melhor as relações metabólicas desencadeadas com esse tipo de tratamento.

2.3 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

A maioria das EROs são produzidas na cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, principalmente nos complexos I e III. (MURPHY, 2009). Nessa cadeia, os elétrons do NADH são transferidos para as moléculas de oxigênio (O_2) e, eventualmente, geram moléculas de água inócua. Quando apenas um elétron é transferido, o O_2 é reduzido a superóxido (O_2^-), que deixa a mitocôndria e é convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) via catálise pela superóxido dismutase. Através da reação de Fenton, H_2O_2 pode então ser catalisado para formar um ERO altamente reativo, um radical hidroxila (OH^\bullet) (THOMAS, et al., 2009). Além disso, o O_2^- também reage com o óxido nítrico (NO^\bullet) para gerar peroxinitrito ($ONOO^-$) por uma difusão controlada. (KUMAR et al., 2013).

Além das mitocôndrias, EROs também são produzidas no citoplasma de muitas células a partir de diversas reações enzimáticas. (MARLATT, et al., 2004). Como por exemplo pelo óxido nítrico sintetase (NOS) que produz NO^- ao facilitar a conversão de l-arginina para l-citrulina. Os NOS não acoplados produzem O_2^- . (MUNZEL, et al., 2005).

Ademais, a hipóxia existente no ambiente tumoral, ativa diferentes chaves reguladoras, como a expressão do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1). A super-expressão do HIF-1 promove a produção de EROs que, por sua vez, aumenta a expressão de HIF-1, completando um loop de feedback positivo da indução da síntese de EROs nas células tumorais. (MURPHY, 2009; GUZY, et al., 2005). Outras enzimas celulares, incluindo

xantina oxidase, lipoxigenase, ciclo-oxigenases e famílias de citocromo p450, também participam na geração de EROs durante reações biológicas normais. (PARAVICINI & TOUYZ, 2008).

Além das fontes endógenas, os estresses ambientais, como a radiação ultravioleta (RUV), a radiação ionizante (RI) e a hipóxia, também induzem a produção celular de EROs. Em particular, foi demonstrado que o UVB (um tipo de RUV) ativa a oxidase e promove o desacoplamento da NOS. (YAO et al., 2009; LIU, 2010). Essas enzimas contribuem para a produção de O_2^- , $NO\cdot$ e $ONOO^-$. (WU et al., 2010). No caso da RI, a molécula de água é submetida à radiólise, gerando moléculas altamente reativas, como água ionizada (H_2O^+), $\cdot OH$ e H_2O_2 , que causarão danos ao DNA celular. Além disso, a RI regula a função da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial resultando em uma maior produção de ROS. (YAMAMORI et al., 2012).

Pesquisas demonstraram ainda que o H_2O_2 está envolvido em muitas vias de sinalização. Fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidérmico (EGF), ligaram-se a seus receptores e estimularam a produção de EROs, o que leva à ativação das vias de sinalização p38 MAPK (CHENG, et al., 2013). Em baixas concentrações, as EROs são críticas para o crescimento celular e proteção antiapoptótica. Conseqüentemente, esta via pode ser utilizada pelas células cancerígenas que levam à tumorigênese. Baixos níveis de EROs favorecem a fosforilação da proteína cinase Akt, a mesma favorece o transporte de glicose para o interior celular uma vez que aumenta a translocação dos transportadores de glicose para a membrana plasmática, bem como o aumento da atividade da hexocinase e fosfofrutocinases, enzimas-chave na glicólise e via das pentoses fosfato, sendo essa última fonte de açúcares para montagem de nucleotídeos e fonte de glutathione (molécula antioxidante não enzimática), fatores que favorecem as células cancerígenas. (PANIERI, 2013).

2.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é causado por uma falta de balanceamento entre produção e remoção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Isso pode ser atribuído à uma super produção destas espécies ou deterioração do sistema antioxidante. Esse estresse está associado a várias doenças, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes e cânceres. Em particular, níveis elevados de EROs estão associados às células cancerígenas, em parte devido à elevada atividade metabólica dessas células (TONG et al, 2015).

Acredita-se que os níveis basais de EROs sejam mais altos nas células cancerígenas em comparação às mesmas células em sua forma saudável. Esses níveis

elevados de EROs são atribuídos principalmente às atividades metabólicas aumentadas e a alta energia mitocondrial - embora as células cancerosas mudem seu metabolismo de glicose para vias anaeróbicas, mesmo com suprimento suficiente de oxigênio, a captação mais alta do que o normal ainda estimula a energia mitocondrial, que tem suposta relação com a produção elevada de EROs (CHEN, 2015; FINKEL, 2012); às alterações das mitocôndrias, no qual, os elétrons perduram no complexo aumentando a possibilidade de serem transferidos para o oxigênio (LIU, 2010); à condição hipóxica do câncer que leva à ativação de várias proteínas principais, como o HIF-1; à inflamação crônica e liberação de citocinas (WARIS & AHSAN, 2006); por fim, à sinalização oncogênica - a ativação da proteína c-Myc e suas vias de sinalização a fluxo podem induzir a produção celular de EROs. (PELENGARIS, 2003).

Nesse contexto, os níveis de EROs acima do normal também são relacionados ao crescimento de células cancerosas, angiogênese e metástase (LIOU, et al., 2010). Embora níveis elevados de EROs sejam observados em células cancerígenas, sugere-se que as células cancerosas sejam mais vulneráveis à indução intracelular de EROs. Dessa forma, muitas células cancerígenas equipam fortes defesas antioxidantes para se adaptarem ao estresse oxidativo e evitar a apoptose. (SUN et al., 2013). Portanto, tratamentos focados em alterar o status redox das células cancerosas podem ser uma abordagem terapêutica viável na terapia do câncer. (TONG et al., 2015).

Como um importante local de produção de EROs, as mitocôndrias são consideradas um dos alvos para o tratamento do câncer. Embora o efeito Warburg indique que o processo anaeróbico é preferido após a glicólise na mitocôndria, mesmo com suprimento suficiente de oxigênio, as mitocôndrias ainda permanecem funcionais ou mesmo hiperativas nas células cancerígenas, pois essas células tendem a absorver mais glicose do que as células normais. Nesse contexto, pesquisas mostraram que as células cancerosas são mais vulneráveis que as células normais à disfunção mitocondrial. (GOGVADZE, et al., 2008).

Dessa maneira, espera-se que os agentes que atinjam as mitocôndrias sejam eficazes na indução da apoptose do câncer. A exemplo disso, compostos antioxidantes como o resveratrol e o α -tocoferil succinato (análogos da vitamina E) exercem seus efeitos anticâncer diretamente nas mitocôndrias. (FULDA, et al., 2010).

Embora as mitocôndrias sejam as principais fontes de EROs, elas também são suscetíveis ao dano oxidativo. Em vez de reduzir as EROs, os compostos voltados para as mitocôndrias do câncer desencadeiam a superprodução de EROs, induzindo a transição de permeabilidade mitocondrial, perturbando o potencial transmembrana

mitocondrial e, por fim, interrompendo as mitocôndrias das células cancerígenas (FULDA, et al., 2010; SONG, et al., 2015).

2.5 Relação entre Metformina e Produção de EROs

A droga antihiperglicemiante metformina é utilizada para o tratamento do diabetes tipo 2 e, nos últimos anos, tem sido alvo de diversos estudos na área da oncologia por apresentar efeitos intrigantes em células de câncer. (SCHERNTHANER & SCHERNTHANER, 2007; CERZO et al., 2013; APAMPA, 2012).

Nesse sentido, a descrição de alguns mecanismos antitumorais demonstrou que estes efeitos podem ser diretos ou indiretos; sendo os mecanismos indiretos relacionados à diminuição da disponibilidade de glicose para a célula cancerígena, uma vez que a metformina reduz os níveis de glicose e insulina na corrente sanguínea, sendo esse último considerado um hormônio promotor do crescimento com efeitos mitogênicos (CERZO et al., 2015). Ademais, em relação aos mecanismos de ação diretos são aqueles que dizem respeito sobre a capacidade que a droga tem em manter alguns tipos de células cancerígenas, entre elas as do câncer de mama, presas na fase G0/G1 ou S do ciclo celular (BEN et al., 2008).

Como promotora da perda do potencial da membrana mitocondrial e inibidora parcial do complexo da NADH-desidrogenase na cadeia transportadora de elétrons (EL-MIR et al., 2000; OWEN et al., 2000), a metformina promove uma anormalidade no fluxo dos elétrons até o oxigênio (localizado no quarto complexo na membrana mitocondrial interna) tendo como consequência uma depleção energética. Esse processo, por sua vez, promove a indução da ativação da AMPK que, por sua vez, irá promover a inibição da mTOR tendo como consequência a diminuição da biossíntese de proteínas e lipídeos, do crescimento celular e da expressão do HIF-1, fatores que favorecem a proliferação das células oncogênicas (DOWLING et al., 2007).

3. METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado em parceria com o laboratório de microscopia localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob supervisão da professora Dra. Sônia Nair Bão.

3.1. Cultivo e manutenção das células

As células da linhagem MDA-MB 231 (adenocarcinoma mamário humano) foram cedidas pelo Laboratório de Morfologia da Universidade de Brasília. Estas células foram cultivadas em meio L-15 (Leibovitz Medium) suplementado com 1% de solução antibiótica (25 µg/ml de gentamicina) e 10% de SFB (Soro Fetal Bovino). As células foram mantidas em incubadora úmida à 37°C com 5% de CO₂.

3.2. Análise da Viabilidade Celular

Cerca 7×10^3 células MDA-MB 231 foram semeadas, em triplicata, para o tratamento com metformina; enquanto outra triplicata com o mesmo número de células foi cultivada para o controle do experimento. A placa contendo as células foi incubada a 37°C, *overnight*.

Após a adesão celular, foi descartado o meio e, em seguida, adicionados aos grupos teste 150 µL de metformina diluída em água e meio L-15, enquanto as células controle permanecerão em meio sem metformina. Foram testados 5 concentrações de metformina - 1,25 mM, 2,5mM, 5mM, 10mM e 20mM.

A citotoxicidade da metformina nas células MDA-MB-231 foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), cuja a concentração seguiu as recomendações do fabricante. Após o período de tratamento de 24h, foram adicionados 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) em cada poço da placa que contem as células (tratamento e controle), seguido de incubação por 4 horas, no escuro e a 37°C. Em seguida, a solução de MTT será retirada, sendo adicionado 200 µL de DMSO a cada um dos poços para a diluição dos cristais de formaram (formados pela metabolização do MTT nas mitocôndrias das células viáveis).

Por fim, as placas foram lidas a 595 nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). A porcentagem de inibição do crescimento celular foi determinada através da comparação da densidade celular das células tratadas com as

células controle, sendo essa comparação determinada pela fórmula: porcentagem de inibição = $(1 - \text{densidade da célula do grupo tratado}) / \text{densidade da célula do grupo controle}$.

3.3 Extração de RNA e Síntese de cDNA

Cerca de 750×10^3 células por poço foram plaqueadas para análise da expressão gênica. Após 24 horas de incubação, três das quatro amostras receberam tratamento com 200 μL de metformina diluída em água e meio, enquanto a outra formou o grupo controle. Cada poço teste recebeu uma concentração diferente de metformina - 1,25mM, 10mM e 20mM. Após o tempo de exposição de 24 horas, as células foram submetidas a extração de RNA utilizando o kit *Power SYBR® Green Cells-to-CT™* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante.

O RNA total extraído foi quantificado por fluorimetria (Qubit, Invitrogen®) e as concentrações foram igualadas entre tratamento e controle. A fim de retirar traços remanescentes de DNA genômico ainda presentes após a extração de RNA total, foi realizado o tratamento de 1 mg de RNA com DNase I (Roche®) a 37°C por 30 min. Ao final, a DNase será desnaturada a 65°C por 10 min.

Os cDNAs foram sintetizados utilizando o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen®), de acordo com o manual do fabricante. Na reação de síntese dos cDNAs foi utilizada uma alíquota que corresponda a 1 mg de RNA à qual é adicionado 2 μL de iniciadores [hexameros e oligo (dT)₂₀] e 1 μL de tampão de anelamento, sendo a reação incubada a 65°C por 5 min seguida de resfriamento em gelo por 1 min. Em seguida, foram adicionados à reação 10 μL de tampão de reação (2X) e 2 μL da *SuperScript III* e a síntese do cDNA ocorreu a 50°C por 50 min, sendo terminada a 85°C por 5 min. Após sua síntese, o cDNA foi armazenado a -20°C.

3.4 Desenho de Iniciadores

A fim de analisar a expressão das enzimas relacionadas a síntese e degradação de EROs, foram desenhados iniciadores para os genes que codificam as enzimas superóxido dismutase, catalase e heme oxigenase, bem como para o gene do controle endógeno, GAPDH, para utilização na técnica de PCR em tempo real.

A sequência de nucleotídeos para desenho desses iniciadores, assim como do gene que serão utilizado como padrão, estão disponíveis no banco de dados GenBank. O

iniciadores foram desenhado através da ferramenta disponível na plataforma Primer3 Plus.

3.5 Análise da Expressão Gênica

A qPCR em Tempo Real foi realizada em duplicata para cada um dos tratamentos. Como controle endógeno foi utilizado a GAPDH, o que possibilitou normalizar a expressão dos genes-alvo e corrigir possíveis variações entre as réplicas.

A comparação do perfil de expressão dos genes relacionados a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e heme oxigenase (HMOX) foi realizada através da quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A PCR em Tempo Real foi realizada em reações de 12 μ L contendo 6 μ L do Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas®), 1 μ L de cada par de iniciadores (direto e reverso) à concentração de 0,1 μ M, 2 μ L de cDNA e 2 μ L de água no equipamento Applied Biosystems® 7500 *Fast Real-Time PCR System* utilizando o SYBR® Green como indicador de fluorescência. As reações foram montadas em placas de 96 poços de 0,1 mL (Applied Biosystem®) e centrifugadas por 1 min a 4000 rpm a fim de evitar possíveis diferenças no volume final das reações. Os parâmetros do ciclo de amplificação foram desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 50 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 48 segundos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de viabilidade celular demonstrou que o uso de metformina na concentração de 1,25 mM, ocasionou cerca de 15,6% de mortalidade das células MDA-MB-231, enquanto nas concentrações de 2,5, 5, 10 e 20 mM de metformina, as taxas de mortalidade foram de 17,6%, 33,8%, 52,6% e 78%, respectivamente (Figura 1).

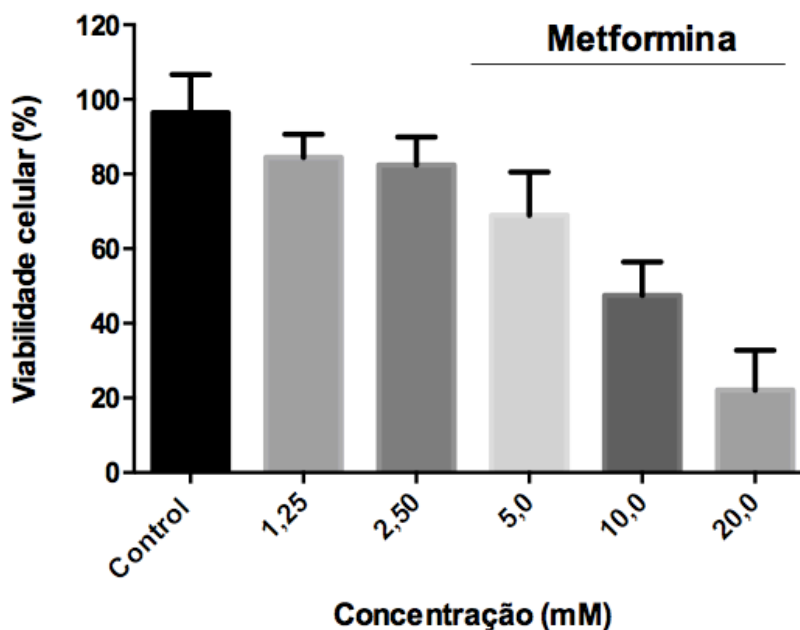


Figura 1. Taxa de mortalidade de células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de metformina.

Todos os dados foram expressos como valor médio \pm EPM (erro padrão da média) de pelo menos três experiências independentes. A diferença entre os grupos foi analisada usando análise one-way ANOVA. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o software do GraphPad Prism 6.

A partir da análise de variância com um fator (one-way ANOVA), constatou-se que a comparação entre o grupo controle e a concentração de 1,25mM, a concentração de 2,5mM e a de 1,25mM, a concentração de 2,5mM e 5mM não são estatisticamente significativas. Em relação a comparação com o controle, houve significância ao relacionar com as concentrações 5mM, 10mM e 20mM. Além disso, entre outras comparações significativas, destacam-se a relação entre 1,25mM com 10mM, 1,25mM com 20mM e 10mM com 20mM.

Pesquisas indicam que a metformina exibe um efeito antiproliferativo em células cancerígenas *in vitro* e *in vivo* (OWEN, 2000; SHARMA & KUMAR, 2018). Os resultados encontrados nesse estudo indicaram que a inibição do crescimento e da proliferação das células MDA-MB-231 derivadas do câncer de mama ocorrem de maneira dependente à dose, corroborando com estudos anteriores (WILLIAMS et al., 2013; SHARMA & KUMAR, 2018;).

Dessa forma, a partir das comparações estatisticamente significativas foram selecionados três das cinco concentrações testadas de metformina -1,25mM, 10mM e 20mM -, além do grupo controle, para extração do RNA e posteriormente análise da expressão gênica.

Os resultados da qPCR indicaram uma discreta redução nos níveis de expressão de todas as enzimas analisadas nas células tratadas com 1,25mM e 20mM de metformina. Em relação às células tratadas com 10mM, foi possível observar um discreto aumento da expressão da enzima heme oxigenase (HMOX) e superóxido dismutase (SOD), e uma discreta redução da catalase (CAT) (Figura 2). Sendo assim, não foram observadas alterações significativas na expressão das enzimas analisadas, corroborando com as pesquisas já publicadas que indicam a ação da metformina na inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons; fato que pode estar diretamente relacionado com uma menor produção de EROs nas células tratadas com a metformina (WHEATON et al., 2014; SCHEXNAYDER et al., 2018).

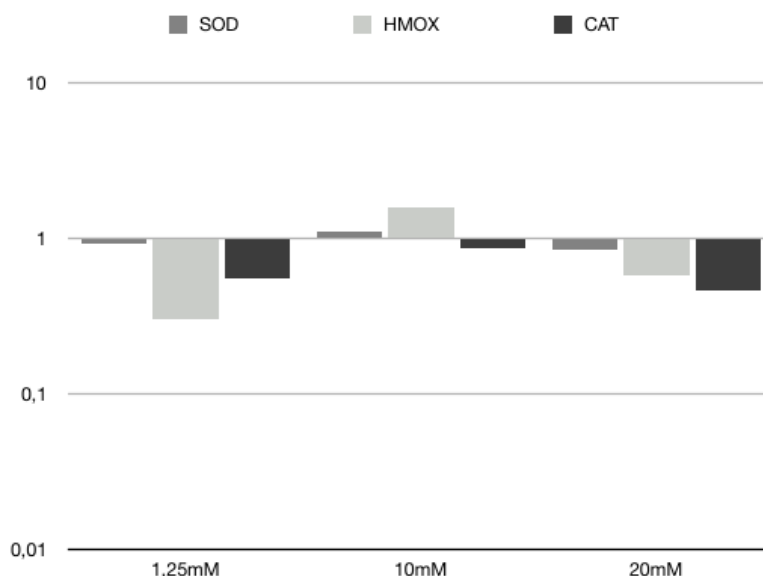


Figura 2. Análise da expressão gênica das enzimas SOD, HMOX e CAT em células da linhagem MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de metformina.

Ainda nesse contexto, há estudos que alegam uma dualidade sobre a influência de EROs no câncer, no qual produção moderada de EROs pode melhorar a sinalização de insulina, favorecendo a sobrevivência das células cancerígenas, enquanto a alta produção de EROs pode ser destrutiva (AFANAS'EV, 2011). Sendo assim, ampliar a investigação sobre a relação da metformina com o estresse oxidativo é fundamental para os avanços terapêuticos contra o câncer de mama.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o tratamento com metformina possa proporcionar um benefício de sobrevivência para as células saudáveis quando adicionado à terapia de determinadas doenças, foi possível observar, através dos resultados, que o fármaco acarretou malefícios às células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, uma vez que gerou diretamente efeitos inibitórios dose-dependente na proliferação celular, principalmente com o uso de concentrações maiores que 5mM.

Porém, não observamos uma influência significativa da metformina na expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT e HMOX. Ainda nesse sentido, os estudos que investigam a relação entre a metformina e o estresse oxidativo em linhagens de células carcinogênicas mamárias ainda são escassos. Tal fato indica a necessidade de um aprofundamento das pesquisas que tratam do tema, com o intuito de fornecer mais uma abordagem terapêutica no combate ao câncer de mama.

6. REFERÊNCIAS

AFANAS'EV, I. **Reactive oxygen species signaling in cancer: comparison with aging.** Aging and disease. Vol. 2,3: 219-30. 2011

ALIMOVA, I., et al. **Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro.** Cell Cycle 8:6, 909-915; 15, 2009.

BEN, I. S, et al. **The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level.** Oncogene; 27:3576–3586. 2008

CASCIATO, D. A. **Manual de Oncologia Clínica.** Tecmed. São Paulo. 2008.

CEREZO, M., et al. **Is it time to test biguanide metformin in the treatment of melanoma?** Pigment Cell Melanoma Res; 28:8–20. 2015

CHENG, J. C., et al. **Hypoxia-inducible factor 1 alpha mediates epidermal growth factor-induced down-regulation of E-cadherin expression and cell invasion in human ovarian cancer cells** Cancer Lett. 329 (2) 197–206. 2013.

DOWLING, R. J., et al. **Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells.** *Cancer Res*; 67:10804–10812. 2007

EI-Mir, M. Y., et al. **Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex 1.** *J Biol Chem* 275: 223-228, 2000.

EVANS D. et LALLOO F.. **Risk assessment and management of high risk familial breast cancer.** United Kingdom. *Med Genet*; 39:865–871. 2002.

Finkel, T. **Signal transduction by mitochondrial oxidants.** *J. Biol. Chem.* 287 (7) 4434–4440. 2012

FISCHER, Y., et al. **Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats.** *Endocrinology* 136, 412–420, 1995.

FOULKES W., et al. **Germ-line BRCA1 mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer.** *Clin Cancer Res* 3:2465-9. 1997.

FULDA, S., et al. **Targeting mitochondria for cancer therapy.** *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (6) 447–464. 2010.

GOGVADZE, V., et al. **Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?** *Trends Cell Biol.* 18 (4) 165–173. 2008.

GUNTON, J.E., et al. **Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2.** *J.Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1323–1332, 2003.

GUZY, R. D., et al. **Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing.** *Cell Metab.* 1 (6) 401–408. 2005

HU X. et al. **Emerging therapies for breast cancer.** *Journal of Hematology & Oncology.* China. 2017.

JACQUELINE, C. et al. **Cancer: a disease at crossroads of trade-off.** *Evol. App.* 10:215-225, 2017

KUMAR, S., et al. **Glutathione dimerization-based plasmonic nanoswitch for biodetection of reactive oxygen and nitrogen species.** *ACS Nano* 7 (3). 2221–2230. 2013.

- LIU, G.Y., et al. **Reactive oxygen species in cancer** Free Radic. Res. 44 (5) 479–496. 2010
- LIBBY, G., et al. **New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes.** Diabetes Care. 32:1620-1625, 2009.
- LOPES, A. et al. **Oncologia para graduação.** São Paulo: LeMar, 2013.
- MARLATT, M., et al. **Sources and mechanisms of cytoplasmic oxidative damage in Alzheimer's disease.** Acta Neurobiol. Exp. (Wars) 64 (1) 81–87. 2004.
- MUNZEL, A., et al.. **Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 25 (8) (2005) 1551–1557.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA. **Estimativa de Câncer no Brasil.** Brasil. 2018
- NAROD, S. A., et al. **An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families.** Am J Hum Genet 56:254-64. 1995.
- OWEN, M. R., et al. **Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain.** Biochem J 348: 607-614, 2000.
- PARAVICINI, T. M. & TOUYZ, R.M. **NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities.** Diabetes Care 31 (Suppl. 2) S170–S180. 2008
- PERNICOVA, I. & KORBONITS, M. **Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer.** *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 10, no. 3, pp. 143–156, 2014.
- PETRUCCELLI, N., et al. **BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer.** 1998 Sep 4 [Updated 2016 Dec 15]. In: PAGON R.A., et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.
- SAITO, R. F. et al. **O metabolismo da célula tumoral.** São Paulo. 2015.

SCHEXNAYDER et al. **Metformin Inhibits Migration and Invasion by Suppressing ROS Production and COX2 Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells.** *Int. J. Mol. Sci.*19: 3692, 2018

SHARMA, P. & KUMAR, S. **Metformin inhibits human breast cancer cell growth by promoting apoptosis via a ROS-independent pathway involving mitochondrial dysfunction: pivotal role of superoxide dismutase (SOD).** *Cellular Oncology.* 41:637–650. 2018

SONG I.S., et al., **Mitochondria as therapeutic targets for cancer stem cells.** *World J Stem Cells* 7 (2) 418–427. 2015

SUN, C., et al., **Isoliquiritigenin enhances radiosensitivity of HepG2 cells via disturbance of redox status.** *Cell Biochem. Biophys.* 65 (3) 433–444. 2013

THOMAS, C., et al. **Hydroxyl radical is produced via the Fenton reaction in submitochondrial particles under oxidative stress: implications for diseases associated with iron accumulation.** *Redox Rep.* 14 (3). 102–108. 2009.

TONG, L., et al. **Reactive oxygen species in redox cancer therapy.** *Cancer Letters.* doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.008. 2015.

XICHUN H., et al. **Emerging therapies for breast cancer.** *Journal of Hematology & Oncology.* Shanghai, China. 2007.

WARBURG, O. **On the origin of cancer cells.** *Science*, vol.123,no. 3191, pp. 309–314, 1956.

WARIS, G. & AHSAN, H. **Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions.** *J. Carcinog.* 5 (14). 2006.

WHEATON et al. **Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis.** *eLife*, 3:e02242, 2014.

WILLIAMS et al. **Metformin induces a senescence-associated gene signature in breast cancer cells.** *J. Health Care Poor Underserved*, 24: 93–103, 2013.

YAMAMORI, T., et al. Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. Free Radic. Biol. Med. 53 (2) 260–270. 2012.