



**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 VIA GLICOLÍTICA PARA O RELATÓRIO FINAL DO PROGRAMA DE  
INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**BRASÍLIA**

**2018**



**JENNIFER YUMIE SONOBE HABLE**

**TRATAMENTO COM METFORMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA E SUA  
INFLUÊNCIA NA VIA GLICOLÍTICA PARA O RELATÓRIO FINAL DO PROGRAMA DE  
INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

Relatório final da pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à assessoria de Pós- Graduação e Pesquisa

Orientação: Luciana de Farias Ramalho

**BRASÍLIA**

**2018**

## TRATAMENTO COM METFORMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA E SUA INFLUÊNCIA NA VIA GLICOLÍTICA

Jennifer Yumie Sonobe Hable – UniCEUB, PIC Institucional, aluno bolsista  
*yumiejennifer@gmail.com*

Luciana Ramalho de Farias – UniCEUB, professora orientadora  
*luciana.farias@ceub.edu.br*

O câncer é considerado o mal do século, segundo a OMS, sendo o de mama o mais letal entre as mulheres. Baixos níveis de oxigênio e nutrientes são fatores limitantes do microambiente tumoral. Porém, a proliferação celular maligna é garantida pela sobrevivência e adaptação de células tumorais que apresentam perfil metabólico glicolítico anaeróbico e aeróbico. Nesse contexto, alterações metabólicas influenciam altamente a biologia dessas células. Assim, a metformina tem sido considerada uma possível droga adjuvante no tratamento de câncer, pois, apesar da incerteza sobre o principal fator antitumoral, a droga é capaz de promover a diminuição da concentração de insulina circulante e ativação da AMPK. Dessa forma, compreender melhor o comportamento desse fenômeno em células cancerígenas sob tratamento pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias combinadas, o que possibilita melhorar o tratamento e prognóstico dos pacientes. Para realização do projeto, as células da linhagem MDA-MB-231 (adenocarcinoma mamário humano) foram cultivadas em meio L-15 (Leibovitz Medium) suplementado com solução antibiótica e Soro Fetal Bovino. No teste de viabilidade foram semeadas cerca de  $7 \times 10^3$  células, em triplicata, para o tratamento de 5 concentrações com metformina e para o controle do experimento. A placa contendo as células foi incubada a  $37^\circ\text{C}$ , *overnight*. Após a adesão celular, foram adicionados ao meio metformina (100 mM, em água). A citotoxicidade da droga nas células MDA\_MB-231 foram determinadas pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), cuja a concentração seguiu as recomendações do fabricante. 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. Cerca de  $750 \times 10^3$  células foram plaqueadas por poço para análise da expressão gênica. Após 24 h de incubação, entre 4 poços, três receberam tratamento com metformina, e um formou o grupo controle. Após o tempo de exposição de 24h, 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. A fim de analisar a expressão de três genes da via glicolítica, serão desenhados iniciadores para os genes que codificam as enzimas hexocinase, fosfofrutocinase e piruvato cinase, bem como para os genes do controle endógeno (tubulina e miosina), para utilização na técnica de qPCR em tempo real. O teste de viabilidade, no qual foram testadas 5 concentrações de metformina, indicou uma sobrevida de aproximadamente 84,4% das células MDA-MB-231 tratadas com 1,25mM, cerca de 82,4% com 2,5mM de metformina, 66,2% sobreviveram na concentração de 5mM, 47,45% na presença de 10mM e, por fim, 22% de sobrevida com a utilização de 20mM. Os experimentos de qPCR em tempo real estão em processo de finalização. Dessa forma, a conclusão do projeto será melhor elucidado após o termino do experimento de qPCR em tempo real.

**Palavras-Chave: Câncer de mama. Metformina. MDA-MB-231.**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>8</b>
<b>2.1. Câncer de Mama.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. Metabolismo Glicolítico das Células de Câncer.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3. Uso de Metformina no Tratamento de Câncer.....</b>	<b>12</b>
<b>3. METODOLOGIA.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Cultivo de e Manutenção das Células.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. Análise da Viabilidade Celular.....</b>	<b>13</b>
<b>3.3. Extração de RNA e Síntese de cDNA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.4. Desenho de Iniciadores.....</b>	<b>14</b>
<b>3.5. Análise da Expressão Gênica.....</b>	<b>15</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>18</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>19</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Na proliferação celular, mecanismos de gestão e controle possibilitam que o processo ocorra de forma sustentável. Entretanto, falhas podem ter como consequência o câncer (SANTOS, 2015). 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, 2008).

O câncer é considerado o mal do século e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) foram gastos mundialmente, com o câncer, 1,16 bilhões de dólares, 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, representando 16,8% das causas de morte pela doença (OMS, 2014).

Aparentemente, as células se tornam malignas devido a ocorrência de mutações genéticas que têm como consequência o aumento da sobrevivência e reprodução celular (JACQUELINE, 2017). Apesar de existirem fatores de risco associados a doença, os genes BRCA1 e BRCA2 estão diretamente relacionados ao desenvolvimento do câncer de mama, podendo aumentar em até 80% o risco de desenvolvimento dessa neoplasia maligna (LOPES, 2013), enquanto alterações em genes supressores de tumor (eg. TP53, PTEN) que provocam a perda dos seus fatores protetivos, aumentam em até 50% as chances de desenvolvimento de câncer de mama (CASCIATO, 2008). Nesse sentido, conclui-se que em células de câncer, alterações metabólicas importantes favorecem a biologia dessas células.

O metabolismo é definido como o conjunto de todas as reações químicas que ocorrem no organismo. Dentre elas, de forma generalizada, existem as reações anabólicas - reações que combinam estruturas moleculares simples em compostos complexos - e as reações catabólicas - reações que quebram compostos complexos em estruturas moleculares simples (TORTORA, 2012).

Em organismos aeróbios, a fosforilação oxidativa é a rota final do metabolismo produtor de energia, para a qual converge o catabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (NELSON, 2014). Contudo, na ausência de oxigênio, a fosforilação oxidativa é inibida, ficando a célula dependente da glicólise para a síntese de ATP, sendo dependente do processo de fermentação (efeito Pasteur) - conversão de piruvato em lactato - para renovar NAD<sup>+</sup>, molécula essencial da via glicolítica. Entretanto, em células tumorais, observa-se a troca da fosforilação oxidativa por glicólise aeróbia - realização de glicólise,

seguida de fermentação, em detrimento da fosforilação oxidativa sob altas concentrações de oxigênio (efeito Warburg) (LOPES, 2013; NELSON, 2014).

Os baixos níveis de oxigênio e nutrientes são fatores limitantes do microambiente tumoral. Porém, acabam por selecionar células neoplásicas com perfil metabólico glicolítico. Tendo em vista que a glicólise proporciona maior produção de ATP em menor tempo, em comparação com a fosforilação oxidativa, a proliferação celular maligna é garantida pela sobrevivência e adaptação de células tumorais que apresentam metabolismo glicolítico anaeróbico e aeróbico (LOPES, 2013).

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 o melhor caminho. Nesse sentido, a avaliação do comportamento metabólico através da análise da expressão de proteínas-chave da via glicolítica em células de câncer de mama poderá contribuir para compreender alguns questionamentos que permeiam a utilização da metformina no tratamento da doença.

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. Cirurgia e quimio/radioterapia são os métodos mais utilizados nos tratamentos dos pacientes, porém, a adversidade trazida por essas abordagens têm impulsionado as 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.

Dessa forma, este trabalho tem como objetivo avaliar os níveis de expressão de proteínas da via glicolítica 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, da quantificação da disponibilidade de glicose no meio de cultivo das células após este tratamento, e, por fim, comparação dos níveis de expressão gênica relacionada as proteínas Hexocinase, Fosfofrutocinase e Piruvato Cinase em células de câncer 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% (PRETRUCELLI 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 estrogênio 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 estrogênio (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. Metabolismo Glicolítico das Células de Câncer**

O metabolismo energético das células depende, principalmente, da glicólise e da fosforilação oxidativa para a síntese de ATP. Durante a glicólise, a glicose é convertida em duas moléculas de piruvato (com produção de 2ATPs e 2NADH) que, posteriormente, entra na mitocôndria e é oxidado no ciclo de Krebs, processo no qual são produzidos NADH e FADH<sub>2</sub>, moléculas que são utilizadas na fosforilação oxidativa que, ao final, produz 36 ATPs. A fosforilação oxidativa é um processo mitocondrial no qual a diferença de concentração de íons H<sup>+</sup> impulsiona a síntese de ATP pela enzima ATP-Sintase, localizada na membrana mitocondrial interna. Porém, a geração dessa diferença de concentração de íons H<sup>+</sup> depende do oxigênio como aceptor final dos elétrons trazidos pelas moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub>. Sendo assim, na ocorrência de hipóxia, a célula realiza fermentação, processo no qual o piruvato proveniente da glicólise é convertido em lactato ou etanol através da interação com o H<sup>+</sup> entregue pelo NADH (processo que renova NAD<sup>+</sup>), uma vez que a fosforilação oxidativa torna-se inviável. A fermentação é essencial para a manutenção da síntese de ATP, pois, uma vez que a fosforilação oxidativa está impedida de ocorrer, a célula fica dependente das duas moléculas de ATP produzidas pela glicólise, sendo essa vida metabólica dependente do NAD<sup>+</sup> para prosseguir (NELSON E COX, 2014; BERG et al., 2014).

Em meados de 1920, Otto Warburg e seus colaboradores descreveram o efeito Warburg (ou glicólise aeróbica), afirmando que as células de câncer produzem lactato, mesmo em condição de altas concentrações de oxigênio. Embora esse efeito tenha sido proposto em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial devido a algum defeito na organela (WARBURG, 1956), estudos demonstraram que a atividade mitocondrial, bem como a fosforilação oxidativa permanecem inalterados (MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007; Barbosa et al., 2012). As observações de Warburg ajudaram a compreender melhor sobre o metabolismo energético das células cancerígenas e são úteis na distinção da agressividade do tumor (ROMERO-GARCIA et al., 2011).

Em células pré-malignas foram observadas a ocorrência de hipóxia e acidose decorrentes da ausência inicial de angiogênese, sendo esses fatores apontados como pressões seletivas que dirigem a adaptação dessas células no sentido de priorizar a glicólise em detrimento da fosforilação oxidativa, sendo a hipóxia intratumoral relacionada com o aumento do risco de metástase, resistência ao tratamento e mortalidade do paciente (GORT et al., 2008; SEMENZA, 2008; HEDDLESTON et al., 2010).

Embora a fosforilação oxidativa continue ativa em células de câncer, há um aumento significativo da glicólise comprovado por observações que indicam um elevado nível de expressão dos genes relacionados aos transportadores de glicose, bem como as enzimas envolvidas na via glicolítica (ALTENBERG E GREULICH, 2004; MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007; LU et al., 2007).

O aumento do fluxo glicolítico está associado a maior atividade da enzima bifuncional fosfofrutociase-2 (PFK-2)/frutose-2,6-bifosfatase-2 (FBPase-2) (Yalcin et al., 2009). A ação da PFK-2 nessa enzima favorece a síntese de frutose-2,6-bifosfato (F2,6BP) que, por sua vez, aumenta a atividade da enzima fosfofrutocinase-1 (PFK-1). A PFK1 é uma enzima chave na regulação do fluxo da glicólise, determinado se essa via estará acelerada ou retardada. Como mencionado acima, a hipóxia é uma ocorrência natural em tumores malignos e, embora a produção de ATP pela via glicolítica seja 18 vezes menor do que na fosforilação oxidativa, a velocidade na qual esse processo ocorre parece compensar essa diferença, sendo a glicólise o melhor caminho para a produção de ATP no câncer (ROBEY E HAY, 2009; ALTENBERG E GREULICH, 2004). A alta taxa de glicólise em células cancerígenas tem como outras consequências ao aumento da síntese de ácidos graxos e nucleotídeos, duas moléculas que contribuem para o metabolismo anabólico do câncer.

Além da rápida produção de ATP e da síntese de muitas biomoléculas indispensáveis para o crescimento, proliferação e biossíntese celular (CAZZANIGA E BONANNI, 2015), a glicólise oxidativa proporciona outras vantagens importantes para as

células tumorais. Com a diminuição da fosforilação oxidativa, as células tumorais reduzem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS - *Reactive Oxygen Species*), uma vez que esses compostos são gerados pela fosforilação oxidativa quando o oxigênio utilizado nesse processo é convertido em superóxido que, posteriormente, deixa a mitocôndria e é transformado em peróxido de hidrogênio, um composto tóxico para a célula (SAITO, et al., 2015). A glicólise anaeróbia parece também estar envolvida na resistência a terapia antitumoral. Nesse processo, o favorecimento da síntese de ribose-5-fosfato devido ao acúmulo de precursores provenientes da via glicolítica, tem como consequência o aumento de produção de glutatona, o principal antioxidante do ambiente celular. O aumento da concentração da glutatona favorece a prevenção contra danos oxidativos nas células tumorais, bem como a detoxificação de drogas antitumorais, mecanismo no qual a glutatona estaria atuando como antagonista da droga utilizada no tratamento (SAITO, et al., 2015).

As células de câncer apresentam alterações em sua capacidade de ativar o mecanismo de morte celular programada (apoptose) sendo, muitas vezes imortais. A preferência pela glicólise aeróbica em detrimento da fosforilação oxidativa parece favorecer, também, proteção contra o acionamento da apoptose. Os fatores pró-apoptóticos são liberados pela mitocôndria devido a alterações na permeabilidade da membrana provocadas pela diferença de potencial de membrana durante a fosforilação oxidativa. Uma vez que a glicólise aeróbica proporciona a diminuição da fosforilação oxidativa, a alteração da permeabilidade da membrana é, também, diminuída. Contudo, a glicólise aeróbica atua de forma mais direta nessa alteração de permeabilidade da membrana mitocondrial: através da hexocinase, a primeira enzima da glicólise. Essa enzima se liga a uma proteína, localizada na membrana interna da mitocôndria, responsável por permitir a saída dos fatores pró-apoptóticos, sendo essa ligação uma dos fatores responsáveis pela diminuição da apoptose em células de câncer (CAZZANIGA E BONANNI, 2015).

Nesse sentido, a glicólise aeróbica que ocorre nas células tumorais parece contribuir com muitos aspectos patológicos do câncer. Compreender melhor o comportamento desse fenômeno em células cancerígenas sob tratamento pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias combinadas que poderão melhorar o tratamento e prognóstico dos pacientes.

### **2.3. Uso de Metformina no Tratamento de Câncer**

A metformina é uma droga utilizada no tratamento do 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 consequente diminuição da mortalidade (ALIMOVA et al., 2009).

Para células de câncer, o mecanismo de ação proposto 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 (HARDIE E ALESSI, 2013); 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.

### 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 CO<sub>2</sub>.

#### 3.2. Análise da Viabilidade Celular

Cerca  $7 \times 10^3$  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  $750 \times 10^3$  células por poço foram plaqueadas para análise da expressão gênica. Após 24 horas de incubação, três das quatro amostras receberam tratamento com 200  $\mu\text{L}$  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 será quantificado por fluorimetria (Qubit, Invitrogen®) e as concentrações serão igualadas entre tratamento e controle. A fim de retirar traços remanescentes de DNA genômico ainda presentes após a extração de RNA total, será 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 serão sintetizados utilizando o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (Invitrogen®), de acordo com o manual do fabricante. Na reação de síntese dos cDNAs será utilizada uma alíquota que corresponda a 1 mg de RNA à qual será adicionado 2  $\mu\text{L}$  de iniciadores [hexameros e oligo (dT)<sub>20</sub>] e 1  $\mu\text{L}$  de tampão de anelamento, sendo a reação incubada a 65°C por 5 min seguida de resfriamento em gelo por 1 min. Em seguida, serão adicionados à reação 10  $\mu\text{L}$  de tampão de reação (2X) e 2  $\mu\text{L}$  da *SuperScript III* e a síntese do cDNA ocorrerá a 50°C por 50 min, sendo terminada a 85°C por 5 min. Após sua síntese, o cDNA será armazenado a -20°C.

### 3.4 Desenho de Iniciadores

A fim de analisar a expressão de três genes da via glicolítica, serão desenhados iniciadores para os genes que codificam as enzimas hexocinase, fosfofrutocinase e piruvato cinase, bem como para os genes do controle endógeno (tubulina e miosina), para utilização na técnica de qPCR em tempo real. A sequência de nucleotídeos para desenho desses iniciadores, bem como dos genes que serão utilizados como padrão, estão disponíveis no banco de dados GenBank. O iniciadores serão desenhado através da ferramenta disponível na plataforma Primer3 Plus.

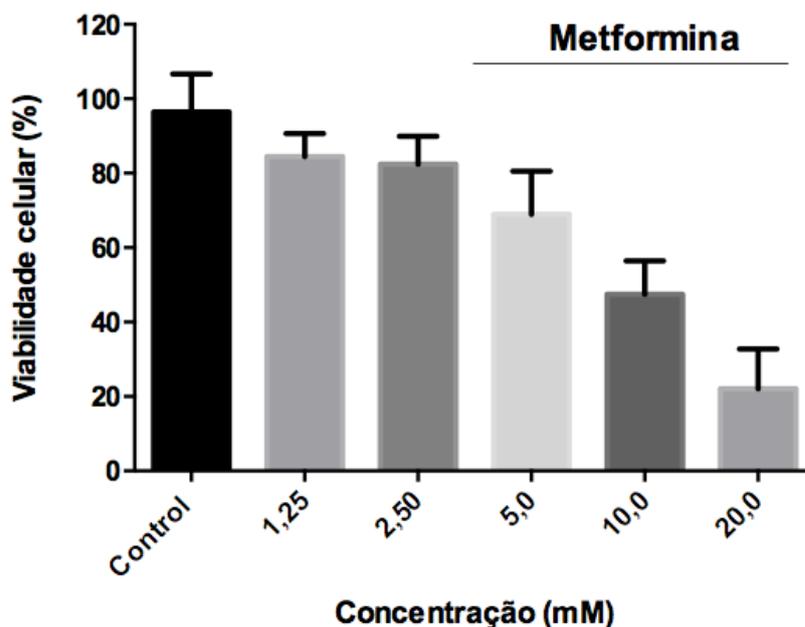
### 3.5 Análise da Expressão Gênica

A qPCR em Tempo Real será realizada em triplicata para cada um dos tratamentos. Como controle endógeno será utilizado a Tubulina e Miosina, o que possibilitará normalizar

a expressão dos genes-alvo e corrigir possíveis variações entre as réplicas. A comparação do perfil de expressão dos genes relacionados a hexocinase, fosfofrutocinase e piruvato cinase será realizada através da quantificação relativa pelo método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak e Schmittgen, 2001). A qPCR em Tempo Real será realizada em reações de 12  $\mu\text{L}$  contendo 6  $\mu\text{L}$  do Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas®), 1  $\mu\text{L}$  de cada par de iniciadores (direto e reverso) à concentração de 0,1  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{L}$  de cDNA e 2  $\mu\text{L}$  de água no equipamento Applied Biosystems® 7500 *Fast Real-Time PCR System* utilizando o SYBR® *Green* como indicador de fluorescência. As reações serão 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 serão: desnaturação inicial a 95°C por 2 min, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 50 s e anelamento/extensão a 60°C por 48 s.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de viabilidade celular demonstrou que o uso de metformina na concentração de 1,25mM, ocasionou em aproximadamente 84,4% de sobrevivência das células MDA-MB-231. Na concentração de 2,5mM, cerca de 82,4% das células sobreviveram, enquanto que na concentração de 5mM, foi de 66,2%. Por fim, nas concentrações de 10mM e 20mM, ocorreu uma sobrevida das células de, respectivamente, 47,45% e 22%.



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.

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 experimentos de qPCR em tempo real estão em processo de finalização, desse modo, os resultados sobre a expressão gênica ainda não foram esclarecidos.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Embora o tratamento com metformina possa proporcionar um benefício de sobrevida para as células saudáveis quando adicionado à terapia sistemática, pode-se concluir, através dos resultados, que o fármaco acarretou malefícios às células da linhagem de câncer de mama, pois gerou diretamente efeitos inibitórios na proliferação celular, principalmente com o uso de concentrações maiores que 5mM.

Apesar disso, a metformina ainda não é usada no cenário de combate ao câncer de mama pois, ainda há a necessidade de mais pesquisas com assuntos relacionando metformina e câncer. Neste quesito, pelo fato desse fármaco ser muito utilizado e fazer parte do programa Farmácia Popular do Ministério da Saúde no Brasil contribui ainda mais para a importância de mais pesquisas, pois logo se comprovado, traria grande benefício para a população.

## 6. REFERÊNCIAS

- Alimova, I.; Liu, B.; Fa, Z.; Edgerton, S. M.; Dillon, T.; Lind, S. E.; Thor, A. D. **Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro.** *Cell Cycle* 8:6, 909-915; 15, 2009 .
- Altenberg B, Greulich KO. **Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes.** *Genomics.* 84:1014-20, 2004.
- Barbosa, N. G. Machado, A. J. Skildum, P. M. Scott, and P. J. Oliveira, **Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: potential for new therapies.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Reviews on Cancer*, vol. 1826, no. 1, pp. 238–254, 2012.
- Casciato D A. Manual de Oncologia Clinica. Tecmed. 2008. São Paulo. D G R **Evans**, F Lalloo. Risk assessment and management of high risk familial breast cancer. University Department of Medical Genetics and Regional Genetic Service, St Mary's Hospital, Hathersage Road, Manchester, UK. 2002.
- Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. **Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients.** *BMJ.* 330:1304-5, 2005.
- Fischer, Y., Thomas, J., Rosen, P. & Kammermeier, H. **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, Wong N, Brunet JS, Begin LR, Zhang JC, Martinez JJ, Rozen F, Tonin PN, Narod SA, Karp SE, Pollak MN. Germ-line BRCA1 mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Clin Cancer Res* 1997;**3**:2465-9.
- Gort EH, Groot AJ, van der Wall E, van Diest PJ, Vooijs MA. **Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors.** *Curr Mol Med.* 8: 60-7, 2008.
- Gunton, J.E., Delhanty, P.J., Takahashi, S. & Baxter, R.C. **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.
- Heddleston JM, Li Z, Lathia JD, Bao S, Hjelmeland AB, Rich JN. **Hypoxia inducible factors in cancer stem cells.** *Br J Cancer.* 102:789-95, 2010.
- Jacqueline, C.; Biro, P. A.; Beckmann, C.; Moller, A. P.; Renoud, F. et al. **Cancer: a disease at crossroads of trace-off.** *Evol. App.* 10:215-225, 2017.

Lopes, A.; Iyeyasu, H.; Lopes; Lemar, L. F. . **Oncologia para graduação**. São Paulo: LeMar, 2013.

Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JM. **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.

LuY, YiY, LiuP, WenW, JamesM, WangD, etal. **Common human cancer genes discovered by integrated gene-expression analysis**. *PLoS ONE*, 2:e1149, 2007.

Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, and E. Saavedra. **Energy metabolism in tumor cells**. *FEBS Journal*, vol. 274, no. 6, pp. 1393–1418, 2007.

Narod SA, Ford D, Deville P, Barkardottir RB, Lynch HT, Smith SA, Ponder BAJ, Weber BL, Garber JE, Birch JM, Cornelis RS, Kelsell DP, Spurr NK, Smyth E, Haites N, Sobol H, Bignon YJ, Chang-Claude J, Hamann U, Lindblom A, Borg A, Piver MS, Gallion HH, Struwing JP, Whittemore A, Tonin P, Goldgar DE, Easton DF, Breast Cancer Linkage Consortium. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1995;**56**:254-64.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Glicólise, Gliconeogênese e a Via das Pentoses-Fosfato**. IN: Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2014.

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.

Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2016 Dec 15]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2017.

Romero-Garcia, J. S. Lopez-Gonzalez, J. L. Báez-Viveros, D. Aguilar-Cazares, and H. Prado-Garcia. **Tumor cell metabolism: an integral view**. *Cancer Biology and Therapy*, vol. 12, no. 11, pp. 939–948, 2011.

Robey RB, Hay N. Is Akt the “**Warburg kinase**”? **Akt- energy metabolism interactions and oncogenesis**. *Semin Cancer Biol*. 19:25-31, 2009.

Saito, R. F.; Colquhoun, A.; Chammas, R. O **metabolismo da célula tumoral**. IN: Saito, R. F.; Colquhoun, A.; Lana, M.; Chammas, R. (Org). Fundamentos de Oncologia Molecular. São Paulo: Atheneu, 2015.

Semenza GL. **Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate**. J Clin Invest.118:3835-7, 2008.

Warburg, O. **On the origin of cancer cells**. Science,vol.123,no. 3191, pp. 309–314, 1956.  
Xichun **Hu**, Wei Huang, Minhao Fan. Emerging therapies for breast cancer. Journal of Hematology & Oncology. 2017. Shanghai, China. 10.1186/s13045-017-0466-3.