UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ISABELLA DOS SANTOS GUIMARÃES

“Avaliação *in vitro* do efeito da metformina no tratamento de câncer de mama triplo negativo”.

Vitória, ES

2013

ISABELLA DOS SANTOS GUIMARAES

“Avaliação *in vitro* do efeito da metformina no tratamento de câncer de mama triplo negativo”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do espírito Santo, como requisito parcial para obtenção o título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof.ª Dr.ª Leticia Batista Azevedo Rangel

Co-orientador: Prof. Dr. Jones Bernardes

Vitória, ES

2013

ISABELLA DOS SANTOS GUIMARAES

“Avaliação *in vitro* do efeito da metformina no tratamento de câncer de mama triplo negativo.”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 26 de Abril de 2013

Profª. Drª Leticia Batista Azevedo Rangel

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora

Prof. Dr. Jones Bernardes Graceli

Instituição: Universidade Federal do Espírito Santo

Orientador

Vitória, ES

2013

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, especialmente meus pais, Moaci e Celina, pelo apoio incondicional. Sem eles nada disso seria possível.

Ao Tullio pelo amor, amizade, confiança e companheirismo.
Agradeço à minha orientadora, Profª Leticia Batista Azevedo Rangel, por sempre acreditar na minha capacidade e pela orientação.

Aos amigos do LBCMCH pela a força e companheirismo, e por tornarem o nosso dia a dia tão agradável.

Ao laboratório de Pesquisa Clínica (SPC) do INCa, especialmente à Drª Cinthya Sternberg pela oportunidade. Sem esquecer, claro, dos alunos e funcionários do SPC pela ajuda e ótima recepção.

Ao Criobanco, especialmente o Bruno, pelas parcerias.

Aos farmacêuticos Luiz Farias Júnior e Jamile Ladislau por tão prontamente nos ajudar.

Ao Maicon Delarmelina (PPGQUI/UFES) e o Prof. Dr. Sandro José Greco pela colaboração nesse trabalho.

Aos amigos extra-Lab, pela amizade e companheirismo.

As Agências de Fomento CAPES, FAPES e CNPq.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais e ao Tullio, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

“A ciência nos traz conhecimento; a vida, sabedoria.”

Will Durant

RESUMO

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC) configura doença heterogênea e de prognóstico ruim, dentre outras razões, por não ser responsivo às terapias-alvo e pelo elevado índice de relapso da doença apesar da responsividade inicial satisfatória aos antineoplásicos. Sendo assim, há urgência na identificação de substâncias alternativas, como ora apresentado em relação à metformina e TNBC (linhagem MDAMB231). Embora a porcentagem total de células em apoptose/necrose induzida por metformina seja pequena, 4,1% (10 µM) e 8,8% (54 mM), houve aumento discreto de células na fase sub-G0; aspecto concordante com o valor baixo, ainda que dobrado, de indução apoptose/necrose por metformina 54 mM. Metformina reverteu a ativação constitutiva de ERK, possível mecanismo antineoplásico da droga, mas somente reduziu a proliferação celular em doses elevadas (10 µM vs. 54 mM, 9,8% vs. 45,23%, respectivamente), possivelmente pela modulação de outros mecanismos de ação. Paclitaxel 0,25 µM promoveu apoptose/necrose em 29% das células, valor compatível os 36,34% de células mortas por MTT. Apesar da parada do ciclo celular em G2/M, favorecendo seu mecanismo de ação, sua eficácia antineoplásica limitada pode decorrer da sustentação da ativação constitutiva de ERK, já relacionada à quimiorresistência ao taxano. A combinação de metformina 10 µM com paclitaxel 0,25 µM, embora seja sinérgica quanto à ação antineoplásica (células mortas = 53,20%), manteve constante a indução de apoptose/necrose quando comparado ao paclitaxel sozinho, já que o benefício do aumento de células em G2/M pode ter sido sobreposto pela ativação de ERK. Quando administradas em suas IC_{50}, metformina 54 mM e paclitaxel 0,25 µM, o percentual total de células apoptóticas/necróticas aumentou para 41%, valor mais próximo àquele de diminuição da proliferação celular (59,9% de células mortas). É notório ter havido: i) reversão da ativação constitutiva de ERK, favorecendo a citotoxicidade de paclitaxel; ii) aumento de células em sub-G0. De fato, dos 41% de células em apoptose/necrose, 21,4% derivaram de efeito apoptótico tardio, justificando a expansão de sub-G0. Os dados apontam para sinergismo mútuo entre metformina e paclitaxel. Nossos achados evidenciam que, dentre outros possíveis mecanismos, a metformina atua como inibidor indireto de ERK, possivelmente também de mTOR, explicando, portanto, seu uso potencial no tratamento do TNBC, um dos grandes desafios da clínica oncológica.

Palavras-chave: Câncer de Mama Triplo-Negativo, Metformina, Paclitaxel

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a heterogeneous and poor prognostic disease, partially due to its ineligibility to target therapy, and the high relapse index, despite the initial satisfactory response to antineoplastic drugs. Therefore, the identification of alternative substances is urgent, as herein presented with regard to metformina and TNBC (lineage MDAMB231). Despite the low percentage of apoptotic/necrotic cells induced by metformin, 4.1% (10 µM) e 8.8% (54 mM), there was a discrete increase of cells in sub-G0, which is in agreement with the low value, despite doubled, of apoptosis/necrosis induced by metformina 54 mM. Metformin reverted ERK constitutive activation, possible antineoplastic mechanism; however, only reduced cellular proliferation at high doses (10 µM vs. 54 mM, 9.8% vs. 45.23%, respectively), possibly due to the modulation of other mechanisms of action. Paclitaxel 0.25 µM induced apoptosis/necrosis in 29% of the cells, which is comparable to the 36.34% of dead cells obtained by MTT. Despite the cell cycle arrest in G2/M that favours its mechanism of action, its antineoplastic efficacy can be compromised by ERK constitutive activation, which is related to taxane chemoresistance. Metformin 10 µM combined with paclitaxel 0,25 µM, although synergic with regard to the antineoplastic effect (dead cells = 53.20%), kept constant the induction of apoptosis/necrosis when compared to paclitaxel alone, as the benefit of arresting the cell cycle at G2/M can be overcome by ERK constitutive activation. When administered at their IC_{50}, metformin 54 mM and paclitaxel 0,25 µM, the percentage of apoptotic/necrotic cells increased to 41%, which is comparable to the decrease in cell proliferation (59.9% of dead cells). Worthwhile pointing that: i) ERK constitutive activation was reversed, favoring paclitaxel toxicity; ii) the number of cells in sub-G0 increased. Indeed, among the 41% apoptotic/necrotic cells, 21.4% derived from late apoptosis, thus justifying sub-G0 expansion. The data point to mutual synergism between metformina and paclitaxel. Our findings support that, among other mechanisms of action, metformina is an indirect inhibitor of ERK, possibly of mTOR as well, explaining, therefore, its potential application in the treatment of TNBC, a major challenge of clinical oncology.

Key words: Triple-Negative Breast Cancer, Metformin, Paclitaxel

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estimativas de câncer para o biênio 2012-2013. 15
Figura 2: Classificação molecular do TNBC. 23
Figura 3: Estrutura molecular da metformina. 27
Figura 4: Mecanismos indiretos e diretos da metformina no câncer. 42
Figura 5: Placa de 96 poços representativa dos tratamentos.....48
Figura 6: Estrutura cristalina das enzimas MERK1/2 e ERK1/2.....54
Figura 7: Efeitos do paclitaxel e doxorrubicina na proliferação celular. 58
Figura 8: Efeitos da metformina na proliferação celular 60
Figura 9: Efeitos da combinação entre metformina e quimioterápicos convencionais na proliferação celular 64
Figura 10: Efeitos da combinação entre metformina e paclitaxel na proliferação celular.....67
Figura 11: Efeitos da combinação entre metformina e doxorrubicina na proliferação celular.....69
Figura 12: Análise do ciclo celular em tratamentos com metformina e paclitaxel.....71
Figura 13: Análise da expressão e fosforilação da proteína cinase ERK1/2 74
Figura 14: Estruturas de ancoragem molecular entre metformina e MEK1/2 e ERK1/2. 77
Figura 15: Ensaio de Anexina-V FITC/PI 78
Figura 16: Modelos de mecanismos celulares modulados por metformina.....82
Figura 17: Modelos de mecanismos celulares modulados por metformina.....85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação imuno-histoquímica dos tumores de mama.....18
Tabela 2 - Estudos epidemiológicos correlacionando o uso da metformina por pacientes diabéticos com o risco de câncer e morbidade. 33
Tabela 3 - Estudos clínicos em câncer de mama registrados no site ClinicalTrials.gov 35
Tabela 4 - Concentrações das drogas clínicas utilizadas para cálculo de IC50. 47
Tabela 5 - Concentrações das drogas utilizadas nos estudos de combinação 48
Tabela 6 - Condições experimentais utilizadas nas análises do ciclo-celular 49
Tabela 7 - Condições experimentais utilizados nos experimentos de imunoblotting.52
Tabela 8 - Soluções de preparo do gel SDS-PAGE. 52
Tabela 9 - Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de Western-Blot. 53
Tabela 10 - IC_{50} estimada para as linhagens de CAM MDAMB231 e MCF7 56
Tabela 11 - Estudos de ancoragem molecular entre a metformina e MEK.. 76
Tabela 12 - Estudos de ancoragem molecular entre a metformina e ERK.....76
Tabela 13 - Dados compilados do presente estudo 80
Tabela 14 - Linhagens de TNBC a serem empregadas na continuação do presente estudo e suas características genotípicas.....87

LISTA DE SIGLAS

18-FDG: 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose

ACS: Associação Americana de Câncer

APS: Persulfato de amônia

AKT: Proteína Homóloga Celular do Oncogene Retroviral V-Akt

AMPK: Proteína cinase ativada por AMP

AMP: Monofosfato de adenosina

ATP: Trifosfato de adenosina

CAM: Câncer de Mama

CaMKKβ: Cinase β da proteína quinase dependente de Ca2+/calmodulina

CDI: Carcinoma Ductal Invasor

CDIS: Carcinoma Ductal *in situ*

CDI-SOE: Carcinoma Ductal Invasor Sem Outras Especificações

cDNA: Ácido Desoxiribonucleico Complementar;

CI: Intervalo de Confiança

CK: Citoqueratina

CREB: Proteína Ligante ao Elemento de Resposta do AMPc

CSC: Células Tronco Tumorais

DM2: Diabete Mellitus Tipo 2

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: Dimetilsulfóxido;

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

DOX: Doxorrubicina

EGFR: Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

EMT: Transição Epitélio-Mesênquima

ERK: Cinase Ativada por Estímulos Extracelulares

EUA: Estados Unidos da América

FBS: Fetal Bovine Serum - Soro Fetal Bovino

GEP: Padrão de Expressão Gênica

HEPES: Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico

HER2: Receptor do Fator de Crescimento Epidermal Humano 2

IGF1R: Receptor do fator de crescimento análogo relacionados à insulina 1

IGFBP1: proteína ligadora de fatores de crescimento relacionados à insulina 1

IMC: índice de Massa Corporal

INCa: Instituto Nacional do Câncer

IR: Receptor de insulina

IRS: Substrato do receptor de insulin

LKB1: Supressor Tumoral Serina/Treonina Cinase 11

NADPH: nicotinamida dinucleotídeo

NFKB: Fator de Transcrição Nuclear κβ

MAPK: Proteína cinase ativada por mitógenos

MEK: mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase;

MET: Metformina

mTOR: Alvo da rapamicina em mamífero

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

PAC: Paclitaxel

PARP: Poli (ADP-ribose) polimerase

PBS: Tampão Fosfato Salino

pCR: Resposta Patológica Completa

PDB: *Protein Data Bank*

PI: Iodeto de Propídeo

PI3K: Cinase Dependente de Fosfatidilinositol-3

PTEN: *Phosphatase and Tensin homolog deleted from chromosome 10*

PVDF: Poli(fluoreto de vinilideno);

RE: Receptor de Estrogênio

Rheb: *Ras homolog enriched in brain*

RP: Receptor de Progesterona

SDS: Dodecil Sulfato de Sódio;

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*;

SU: Sulfoniluréias

TBS: Tampão Tris-Salino;

TGF-β: Fator de Transformação de Crescimentos β

TNBC: Câncer de Mama Triplo-Negativo

TORC: Transdutor da Atividade de CREB Regulada por Coativadores

TSC: Complexo da Esclerose Tuberosa

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP Nick End Labeling*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
1.1. O CÂNCER DE MAMA 14
1.1.1. Classificação do Câncer de Mama 16
1.2. CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO 22
1.2.1. Aspectos Clínicos 22
1.2.2. Características moleculares do TNBC 23
1.2.3. Estratégias terapêuticas de controle do TNBC 24
1.3. METFORMINA 26
1.3.1. Metformina no Diabetes Mellitus do Tipo 2 28
1.3.2. Metformina e Câncer 30
2. OBJETIVOS 43
2.1. GERAL 43
2.2. ESPECÍFICOS 43
3. MATERIAIS E MÉTODOS 44
3.1. CULTURA DE CÉLULAS 44
3.1.1. Linhagem Celular 44
3.1.2. Descongelamento 45
3.1.3. Cultivo 45
3.2. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR 45
3.2.1. Plaqueamento 45
3.2.2. Cálculo de IC50 estimado das drogas clínicas 46
3.2.3. Determinação do efeito antiproliferativo da combinação entre as drogas 47
3.2.4 Ensaio de MTT 48
3.3. ANÁLISE DO CICLO CELULAR 49
3.4. ENSAIO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE POR ANEXINA V/PI 50
3.5. IMUNOBLOTTING 51
3.5.1. Preparo das amostras 51
3.5.2. Corrida Eletroforética 52
3.5.3. Western Blot 52
3.6. ESTUDO DE DOCKING 53
3.7. ANÁLISE DOS DADOS E TESTES ESTATÍSTICOS 55
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 56

4.1. Metformina inibe a proliferação celular nas linhagens de CAM 56
4.2. Metformina potencializa os efeitos da doxorrubicina e paclitaxel na inibição da proliferação celular na linhagem MDAMB-231.....61
4.3. Concentrações baixas de metformina potencializam os efeitos antiproliferativos do paclitaxel, mas não da doxorrubicina, na linhagem TNBC MDAMB231 65
4.4. O ciclo celular de células de TNBC MDAMB231 é modulado diferencialmente por concentrações distintas de metformina e pela combinação sinérgica entre metformina e paclitaxel. 69
4.5. Metformina inibe a ativação constitutiva de ERK1/2 na linhagem MDAMB231 de modo independente da dose quando empregada em monoterapia, mas somente em concentrações elevadas quando usada em combinação com paclitaxel ou doxorrubicina 72
4.6 Ensaios de modelagem molecular sugerem que metformina não interage diretamente com ERK1/2 nem MEK1/2 75
4.7 Metformina, em concentração baixa ou alta, não induz apoptose em células de TNBC MDAMB231, mas potencializa a indução de apoptose pelo paclitaxel de modo aparentemente dose-dependente. 77
5 CONCLUSÃO.....86
6 PERSPECTIVAS FUTURAS.....87
7. REFERÊNCIAS.....89

1. INTRODUÇÃO

1.1. O CÂNCER DE MAMA

Dentre as áreas das ciências médicas, a área da cancerologia se destaca pelo avanço técnico e científico notório nas últimas décadas. O desenvolvimento progressivo possibilitou abordagens diagnósticas mais acuradas, identificação de mecanismos de ação de medicamentos antineoplásicos e introdução de novas estratégias terapêuticas. Não obstante esse progresso, o câncer ainda configura uma doença de incidência elevada e crescente, levando ao óbito milhões de pessoas em todo o mundo anualmente. De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS, 2010), para o ano de 2013, são estimados mais de 1,6 milhões de novos casos de câncer nos Estados Unidos. Para esse mesmo ano estima-se mais de 580 mil mortes em decorrência da doença representando, aproximadamente, 1.600 mortes por dia. No Brasil, as estimativas para o biênio 2012-2013, apontam a ocorrência de 518.510 novos casos de câncer por ano (INCA, 2011).

Nesse contexto, o câncer de mama (CAM) é doença prioritária nos setores de saúde tanto públicos quanto privados, pois representa o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com exceção dos tumores de pele não melanoma, sendo o que mais acomete as mulheres. Estima-se que, em 2013, mais de 234 mil novos casos de CAM serão diagnosticados nos Estados Unidos e aproximadamente 40 mil mulheres morrerão em decorrência da doença (ACS, 2012). No Brasil, especula-se que para o biênio 2012-2013 ocorra o registro de mais de 50 mil novos casos da doença, com um risco estimado de 52 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2011) (Figura 1). Além da grande taxa de incidência e mortalidade, o CAM é temido pelas mulheres pelos seus efeitos psicológicos, afetando a percepção da sexualidade e da autoimagem da paciente.

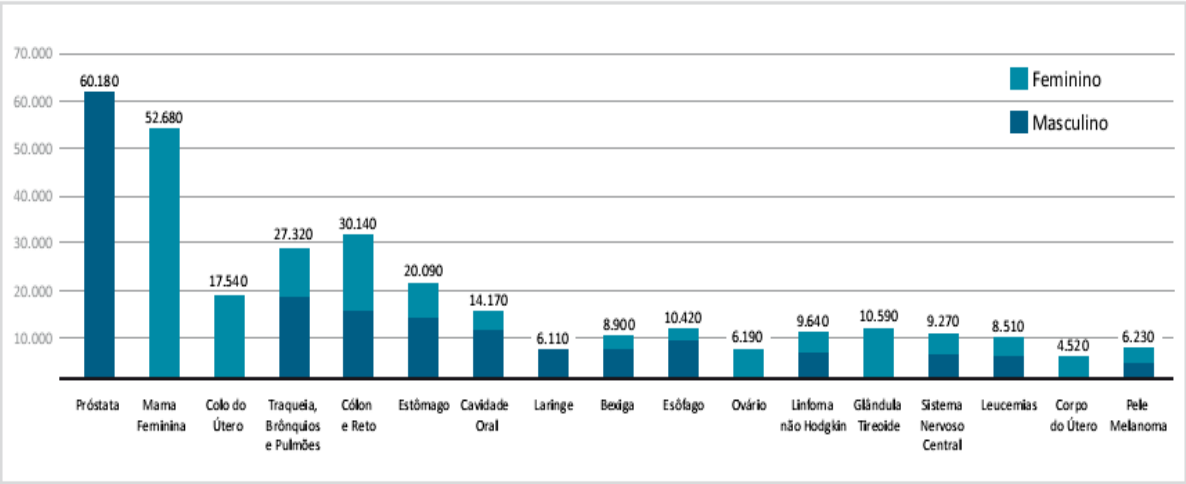


Figura 1: Estimativas de câncer para o biênio 2012-2013, exceto para câncer de pele não melanoma, na população brasileira, de acordo com o sexo. Fonte: INCA, 2011.

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Diversos fatores estão relacionados ao desenvolvimento do CAM, que tem etiologia multifatorial baseada em uma combinação de fatores genéticos, hormonais e ambientais. O CAM é raro em mulheres antes dos 35 anos, mas, acima dessa faixa etária, a taxa de incidência cresce rápida e progressivamente. Adicionalmente, outros fatores de risco já estão bem estabelecidos, como, por exemplo, aqueles relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação, menopausa tardia, terapia hormonal e uso de anticoncepcionais orais), história familiar de câncer de mama e alta densidade do tecido mamário (razão entre o tecido glandular e o tecido adiposo da mama) (revisado por INCA, 2011). Dentre os fatores ambientais, pode-se citar a obesidade e a hiperinsulinemia. A obesidade (definida pelo índice de massa corporal [IMC] ≥ 30 kg/m^2) configura um fator de risco para o desenvolvimento do CAM em mulheres na pós-menopausa que, além de aumentar os níveis circulantes de estrogênio, capaz de induzir a proliferação de células mamárias, aumenta a resistência à insulina e as concentrações circulantes desse hormônio, importante agente mitogênico (AHN et al., 2007 e MORIMOTO et al., 2002). Alguns estudos reportaram a relação do CAM e o diabetes (LARSSON, MANTZOROS & WOLK, 2007; LIPSCOMBE et al., 2006), entretanto ainda não há um consenso nessa associação.

O CAM é uma doença complexa e heterogênea, composta por múltiplos subgrupos associados às características biológicas e morfológicas distintas, com diferentes manifestações clínicas e padrões de resposta às terapias vigentes (revisado por VIALE, 2012; PEROU et al., 2000). Consequentemente, essa neoplasia não pode ser considerada uma entidade clinico-patológica única, sendo imprescindível a sua classificação em subgrupos que congregam características mais homogêneas. Atualmente, o CAM é classificado de acordo com suas características histológicas, imuno-histoquímicas e moleculares.

1.1.1. Classificação do Câncer de Mama

1.1.1.1. Classificação Histológica

A classificação histológica dos tumores mamários é baseada na diversidade das características morfológicas dos tumores e continua sendo o método de avaliação mais utilizado no CAM, devido ao seu baixo custo e importância prognóstica na graduação dos tumores (PAGE, 1997; RAKHA et al., 2007). É necessário ressaltar que a maioria dos especialistas sugere a complementação da classificação histológica tradicional com as informações de testes imuno-histoquímicos e moleculares.

Inicialmente, os tumores de mama são divididos em invasivos ou localizados (*in situ*). Os carcinomas *in situ* constituem uma neoplasia maligna mais precoce, cujo tratamento adequado resulta em excelente sobrevida global, sendo subclassificados em carcinoma lobular e ductal (TAVASSOLI & DEVILEE, 2003). O carcinoma ductal *in situ* (CDIS) representa a maioria dos tumores localizados e, de acordo com a sua morfologia e avaliação histológica, é classificado em comedo, cribriforme, micropapilar, papilar e sólido (Revisado por CONNOLLY, 2004).

Os carcinomas invasivos são morfologicamente subdivididos de acordo com os padrões de crescimento e grau de diferenciação (Revisado por RAKHA 2010). O sistema de graduação mais utilizado na atualidade avalia: (a) formação tubular, (b) pleomorfismo nuclear e (c) índice mitótico (ELSTON, ELLIS & PINDER 1998). Os subtipos mais comuns de tumores invasivos incluem: carcinoma ductal infiltrante

(CDI), carcinoma lobular infiltrante, carcinoma ductal infiltrante/lobular infiltrante, carcinoma mucinoso, carcinoma tubular, carcinoma medular e carcinoma papilar. Não obstante a utilidade da classificação histológica, a maioria dos tumores de mama (60 a 70%) é classificada como carcinoma invasivo sem outras especificações (CDI-SOE), pois não exibem características suficientes, em mais de 50% da massa tumoral, para classificá-los nos subtipos histológicos (revisado por RAKHA 2010)

1.1.1.2. Classificação Imuno-Histoquímica

Conforme previamente mencionado, a classificação histológica constitui uma ferramenta útil, mas limitada para o diagnóstico acurado do CAM. Nesse sentido, nas últimas décadas, esquemas de classificação baseados na caracterização imuno-histoquímica dos tumores mamários, associados aos fatores clinicopatológicos do CAM, promoveram melhoras no prognóstico da doença, dentre outras razões por servir de ferramenta auxiliar na decisão da estratégia terapêutica a ser empregada na tentativa de combate da mesma (revisado por VIALE, 2012). Adicionalmente, a maioria dos subtipos moleculares, os quais serão discutidos adiante, pode ser retratado utilizando marcadores imuno-histoquímicos, reforçando a importância do procedimento no diagnóstico do CAM, o qual é técnica e economicamente mais viável que os procedimentos moleculares (YANG et al., 2007; RAKHA et al., 2007)

O perfil imuno-histoquímico dos tumores mamários é baseado na avaliação da expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), superexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2) pelas células tumorais, bem como pelo índice de proliferação celular por meio da investigação da expressão da proteína Ki67 pelas mesmas (expressa em todas fases do ciclo celular, exceto em G0) (revisado por DOWSETT et al., 2011). A análise do fenótipo obtido por meio da determinação do perfil imuno-histoquímico dos tumores permite classificá-los em CAM luminal A, luminal B, HER-2 “enriched” e triplo-negativos (TNBC) (Tabela 1) (revisado por WEIGELT & REIS-FILHO, 2010).

Tabela 1 - Classificação imuno-histoquímica dos tumores de mama.

Subtipo Imuno-histoquímico	Padrão de imunomarcação
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2*- e Ki-67 <14%**
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2*- e Ki-67 ≥14%**
	RE+ e/ou RP+, HER2*+
Luminal B HER2	RE-, RP- e HER2*+
TNBC	RE-, RP-, HER2*-

* São considerados casos positivos aqueles com score >3; Score iguais a 2 devem ser submetidos a análise por FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) ou CISH (Chromogenic In Situ Hybridization) para confirmação (Chuthapisith et al., 2012).
** De acordo com Cheang et al., 2009, a imunomarcação da proteína Ki67 ≥14% correlaciona-se com alta taxa de proliferação celular.

Classicamente, células de CAM luminal expressam RE, sendo a síntese de RP facultativa; entretanto, não expressam HER2. Por outro lado, estudos de análise molecular do CAM inseriram complexidade à classificação de tumores mamários luminais ao revelarem que os mesmos podem ser divididos de acordo com a taxa de proliferação celular e expressão de HER2 (CHEANG et al., 2009). Assim, CAMs luminal A são caracterizados pela ausência de expressão de HER2 e baixa taxa de proliferação celular, enquanto que os tumores luminal B podem apresentar os seguintes imunofenótipos: RE+, RP+/-, HER2- e alto índice de proliferação ou RE+, RP+/-, HER2+. Vale ressaltar que a expressão dos receptores hormonais permite a esses subtipos o benefício da terapia endócrina com moduladores seletivos do RE ou inibidores da enzima aromatase, como o tamoxifeno e anastrozol, respectivamente.

A superexpressão do HER2 aliada à ausência de expressão dos receptores hormonais pelas células de CAM caracteriza o subtipo imuno-histoquímico HER2 “enriched”. Muito embora haja associação desse subtipo de CAM à doença de pior prognóstico (BULL et al, 2004; WOLFF et al., 2007), o emprego de terapias alvo-específicas com anticorpos monoclonais anti-HER2 tem contribuído significativamente com a melhora do desfecho clínico das pacientes portadoras da patologia (Revisado por ROSS et al., 2004).

Por fim, o TNBC é caracterizado pela ausência de expressão de RE, RP e HER2 pelas células tumorais, representando um grupo consistente e altamente heterogêneo na apresentação clínica, histológica e resposta à terapia. Por outro lado, são tumores majoritariamente agressivos e invasivos, associados a um pior prognóstico da doença (Revisado por MADEIRA et al., 2012), dentre outros aspectos, em função da inelegibilidade da paciente ao uso de terapias endócrina e alvo-específicas eficazes.

1.1.1.3. Classificação Molecular

Durante os últimos 13 anos, os cinco subgrupos moleculares do CAM (luminal A, luminal B, basalóide, HER2 “enriched” e normal-símile) foram extensamente estudados e caracterizados. Em 2000, Perou e colaboradores demonstraram (PEROU et al., 2000) que o fenótipo diverso do CAM é acompanhado de uma heterogeneidade no padrão de expressão gênica (GEP) oriundos de estudos de microarranjo de cDNA. Esses pesquisadores, então, propuseram que o CAM pode ser classificado em subtipos distintos a partir das diferenças no GEP ou de suas assinaturas moleculares (PEROU et al., 2000).

De acordo com o estudo supracitado, o subtipo luminal A perfaz cerca de 50 - 60% dos casos de CAM. Apesar da prevalência, trata-se do subtipo de CAM de melhor prognóstico, quando comparado aos demais subtipos da doença. A denominação deriva da semelhança das células tumorais com as células mamárias normais, as quais ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais. As células dos CAMs luminal A expressam RE, molécula anti-apoptótica Bcl-2 e citoqueratina (CK) 8/18. Adicionalmente apresentam baixa expressão de genes relacionados à proliferação celular (PEROU et al., 2000).

Em termos de expressão gênica, CAM do subtipo luminal B difere consistentemente do subtipo luminal A, salvo, dentre outros fatores, pela presença de RE em suas células. Nesse contexto, células de CAM do subtipo luminal B apresentam baixa expressão de RP e alta expressão de genes relacionados à proliferação celular, como MKI67 (Ki67), BIRC5 (survivina), e o gene da ciclina B1 (CREIGHTON et al., 2012). Além de poder expressar genes associados ao HER2.

Ainda, esse subtipo é correlacionado à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno e por apresentar altas taxas de proliferação pode se beneficiar mais do que o subtipo luminal A à quimioterapia citotóxica convencional associada a antiestrogênicos (KENNECKE et al., 2010).

Além dos CAMs luminal A e B, há os tumores HER2 “enriched” cujas células possuem elevada expressão da oncoproteína HER2 e genes associados à sua via de sinalização celular, apresentando ausência de expressão dos receptores hormonais e alta expressão de genes relacionados à proliferação celular (PEROU et al., 2000). Esses tumores exibem alta taxa de mutação no gene supressor tumoral TP53 (OLIVIER et al., 2006) e geralmente são carcinomas alto grau e linfonodo positivos (CAREY et al., 2006; BRENTON et al., 2005). A inserção na clínica oncológica do trastuzumabe, anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2, resultou em melhora nas taxas de resposta, redução da progressão da doença e melhora na sobrevida das pacientes com CAM, quando utilizado em monoterapia ou em combinação à terapia citotóxica no CAM metastático (SLAMON et al., 2001; VOGEL et al., 2002). Atualmente, esse subtipo dispõe de um potente inibidor de receptor do tipo tirosino cinase desenvolvido como terapia alvo tanto para o HER2 quanto para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), receptor tirosino cinase cuja ativação leva à proliferação celular e migração, utilizado no tratamento dos tumores metastáticos com superexpressão de HER2 em estadios avançados (OPDAM et al., 2012).

O subtipo basalóide é caracterizado pela expressão de vários genes característicos de células de mama normais basais/mioepiteliais, como as CK de alto peso molecular (CK5 e CK17), EGFR, c-Kit, nestina, P-caderina e caveolinas 1 e 2 (PEROU et al., 2000). Apresenta, ainda, ausência de expressão tanto para os receptores hormonais, quanto de HER2 (PEROU et al., 2000). Portanto, na prática clínica, muitas vezes trata-se os tumores triplo-negativos como pertencentes ao subtipo basalóide. Entretanto, esses termos não são intercambiáveis, representando diferentes classificações dos tumores mamários (Revisado por THIKE et al., 2010).

Os tumores basalóides compreendem cerca de 10 a 20% dos casos de CAM e, morfologicamente, são caracterizados pelo alto grau histológico, elevado índice

mitótico e presença de áreas de necrose central (CHEANG et al., 2008). Esse subtipo tem pior prognóstico quando comparados aos CAM luminais (SORLIE et al., 2001), bem como apresentam alta taxa de relapso nos três primeiros anos, apesar da resposta inicial satisfatória à quimioterapia (ROUZIER et al., 2005). Adicionalmente, esses tumores apresentam mutação em TP53. Além disso, 80% dos tumores mamários com mutação no gene supressor tumoral BRCA-1 são classificados como basalóides (PEROU, 2011).

O subtipo “normal-like” ou normal-símile expressam genes característicos das células epiteliais normais da mama, das células adiposas e de outras células do estroma (PEROU et al., 2000). É o subtipo de menor prevalência dentre os CAMs (5-10%) e, habitualmente, não apresentam expressão dos marcadores tumorais usuais (RE, RP, HER2, CK5 e EGFR) (PEROU et al., 2000). Vários pesquisadores especulam a contaminação desses tumores com células normais durante a coleta ou na realização dos ensaios de microarranjo de cDNA, pois, muitos deles não conseguiram reproduzir os resultados de Perou e colaboradores (revisado por WEIGELT & REIS-FILHO, 2010).

Herschkowitz e colaboradores (HERSCHKOWITZ et al., 2007) identificaram um novo subtipo molecular de CAM, denominado claudin-low. Esse subtipo é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com as junções ocludentes e glicoproteínas de adesão intercelular, incluindo as claudinas 3, 4 e 7, a ocludina e a E-caderina, além da baixa expressão dos receptores hormonais e genes relacionados à via do HER2 (PRAT et al., 2010). O padrão de expressão gênica dos tumores claudin-low se assemelham aos tumores basalóides; entretanto, os primeiros expressam mais de 40 genes relacionados à resposta imune, indicando uma expressiva infiltração de células do sistema imunológico à massa tumoral (PARKER et al., 2009; PRAT & PEROU, 2011). A expressão de genes relacionados à proliferação celular é moderada, mas não atinge os baixos níveis do subtipo luminal A, sugerindo que esses tumores possam ser de ciclo lento (PRAT et al, 2010). Ademais, o subtipo claudin-low é caracterizado pelo aumento na expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima (EMT) e àqueles relacionados às células tronco tumorais (CSC), com fenótipo $CD44^{high}/CD24^{low}$ (PRAT et al., 2010).

Prat e colaboradores (PRAT et al., 2010) avaliaram a sensibilidade dos tumores claudin-low à quimioterapia neoadjuvante baseada nas antraciclinas e taxanos. Nesse estudo, os tumores claudin-low apresentaram taxa semelhante de resposta patológica completa (pCR) aos tumores HER-2 “enriched”, e consideravelmente menor do que os tumores basalóides (39% vs 73%). Isso demostra que esse subtipo possui alguma sensibilidade à quimioterapia; entretanto, Lu e colaboradores (LU et al., 2013) atribuíram forte correlação entre o grupo claudin-low e a recorrência da doença nos CAM de alto grau. Estudos adicionais *in vitro* e em modelos animais são necessários para caracterizar o perfil de sensibilidade desses tumores.

1.2. CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

1.2.1. Aspectos Clínicos

Epidemiologicamente, o TNBC acomete, com maior frequência, mulheres mais jovens (<50 anos), antes da menopausa e de ascendência africana (Revisado por ANDERS & CAREY, 2009). Mutações no gene BRCA1 estão associadas aos tumores triplo-negativos em 75% dos tumores (KREIKE et al., 2007).

Existe uma correlação entre a síndrome metabólica (caracterizada pela obesidade, resistência à insulina, dislipidemia e hipertensão) e o TNBC (MAITI et al., 2010). A obesidade, apesar de ser mais prevalente em pacientes portadoras de tumores com expressão dos receptores hormonais, pois aumentam os níveis circulantes de estrogênio, parece ter um papel importante na gênese do TNBC, principalmente no que concerne ao aumento da resistência à insulina e da glicemia (MAITI et al., 2010). Corroborando com essa hipótese, tumores triplo-negativos estão associados à maior captação de 18-FDG (2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose) avaliados por tomografia de emissão de pósitrons (BASU et al., 2007, SPECHT et al., 2010). O 18-FDG é um análogo da glicose marcado com o radioisótopo flúor-18 que permite o estudo do metabolismo da glicose por meio de sua maior captação em tecidos com maior atividade glicolítica acentuada (JADVAR, ALAVI & GAMBHIR, 2009).

Como previamente mencionado, o comportamento clínico do TNBC é classicamente mais agressivo do que os demais tumores mamários; consequentemente, a sobrevida dessas pacientes é inferior comparada àquela de mulheres portadoras de outros subtipos imuno-histoquímicos de CAM (ROUZIER et al., 2005). A maioria dos tumores TNBC é classificado como CDI-SOE, mas outros tipos histológicos, mais raros, também estão associados (metaplásico, medular e tumores adenoides císticos) (revisado por CAREY et al., 2010). Além disso, os tumores triplo-negativo apresentam maior tropismo visceral, sendo a ocorrência de metástases cerebrais, muitas vezes, um problema secundário nesta doença (revisado por HEITZ et al., 2011).

1.2.2. Características moleculares do TNBC

O TNBC é definido pela ausência de expressão do RE, RP e HER2, e, como mencionado anteriormente, destaca-se por apresentar alta heterogeneidade clínica, histológica e respostas distintas aos tratamentos. Essa diversidade também é retratada nos padrões de expressão gênica, que classificam a maioria dos tumores triplo-negativos em basalóides (39-54%) ou claudin-low (25-39%), seguidos do subtipo HER2 “enriched” (7-14%), luminal B (4-7%), luminal A (4-5%) e normal-símile (1%) (PRAT et al., 2010) (Figura 2).

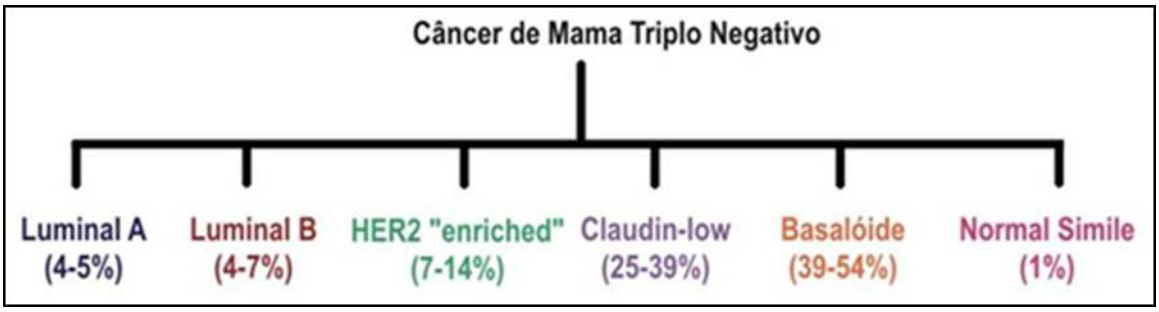


Figura 2: Classificação molecular do TNBC (PRAT et al., 2010).

A complexidade do TNBC estimulou recentes estudos moleculares, com intuito de compreender melhor a doença e a identificar estratégias terapêuticas mais acuradas para seu controle clínico. Dois grupos independentes propuseram a classificação dos tumores triplo-negativos em três subtipos principais: luminais/HER2, basalóides e claudin-low (LEHMANN et al., 2012; PRAT et al.,

2013). Essa estratificação é corroborada por estudos *in vitro* que analisaram um extenso painel de linhagens de CAM, subdividindo-as em luminal, basal A, basal B, correspondentes aos subtipos luminal/HER2, basalóides e claudin-low, respectivamente (NEVE et al., 2006; KAO et al., 2009). Prat e colaboradores (PRAT et al., 2013) apontam, ainda, que os tumores poderiam ser divididos em: basalóides-símile e não-basalóides. Cumpre destacar, que nessa classificação proposta por Prat et al., o subtipo basalóide-símile (basalóides e claudin-low) abrange a maioria dos tumores triplo-negativos que urgem por novas estratégias terapêuticas.

1.2.3. Estratégias terapêuticas de controle do TNBC

As modalidades de tratamento para o TNBC podem ser divididas em locais (cirurgia e radioterapia) e sistêmicas (quimioterapia). A resseção cirúrgica constitui o melhor método local para o controle do TNBC, que geralmente se apresenta como uma massa unifocal, densa e com margens regulares nos exames de ressonância magnética, tornando-o um bom candidato para a cirurgia de mama conservadora (revisado por YAGATA 2011). Contudo, os riscos de recorrência regional e loco-regional são maiores nas pacientes acometidas por TNBC do que nos outros subtipos (HAFFTY et al., 2006; FREEDMAN et al., 2009). E, apesar dos impactos dessas recorrências tumorais na sobrevida ainda não serem claras, as mesmas afetam dramaticamente a qualidade de vida das pacientes. Geralmente, a indicação para a radioterapia após a mastectomia ocorre em pacientes acometidas por tumores maiores de 5 cm, com envolvimento marginal ou metástase nos linfonodos (revisado por MINAMI, CHUNG & CHANG, 2011). A utilização da radioterapia, portanto, limita-se aos casos de doença residual ou metastática.

A quimioterapia é a única terapia sistêmica para o TNBC, podendo ser dividida em neoadjuvante ou adjuvante. A quimioterapia neoadjuvante é a denominação do tratamento citotóxico anterior à cirurgia ou radioterapia, recomendada para os tumores em estadios avançados não operáveis e nos casos de doença metastática (revisado por VAKLAVAS & FORERO-TORRES, 2011). Adicionalmente, essa modalidade terapêutica permite, nos casos de tumores em estadios iniciais, diminuir o tamanho da massa tumoral e assim realizar a cirurgia de

mama conservadora (revisado por CHARFARE, LIMONGELLI, & PURUSHOTHAM, 2005).

Geralmente os tumores triplo-negativos são sensíveis à quimioterapia neoadjuvante, atingindo altas taxas de pCR. Entretanto, a existência de doença residual implica em menor sobrevida e maior risco de recorrência da doença, quando comparado aos outros subtipos de CAM (ROUZIER et al., 2005; CAREY 2007; LIEDTKE et al., 2008). O tratamento citotóxico realizado nas pacientes com TNBC segue o preconizado para o CAM em geral, não apresentando regimes neoadjuvantes específicos às características desse subtipo extremamente heterogêneo, contribuindo assim para o cenário devastador dessa doença.

Os regimes baseados nas antraciclinas (epirrubicina e doxorrubicina) e/ou taxanos (docetaxel e paclitaxel) constituem o esquema neoadjuvante predominante no CAM (WU et al., 2011). Vários estudos clínicos demonstraram melhora na taxa de resposta em pacientes com TNBC com a adição dos taxanos, concomitantemente ou sequencialmente aos regimes com antraciclinas, mas os benefícios na sobrevida dos pacientes ainda permanecem controversos (revisado por ARSLAN, DIZDAR & ALTUNDAG, 2009). Cumpre ressaltar que diversos estudos clínicos estão sendo conduzidos para determinar a melhor combinação terapêutica, cronograma de administração e adição de novos agentes aos regimes neoadjuvantes corriqueiramente utilizados contra o TNBC.

A terapia adjuvante no TNBC se baseia no combate de micrometástases clinicamente não aparentes, nas quais as células estão propensas à expansão clonal culminando em relapso da doença, após terapias loco-regionais, como a cirurgia e radioterapia (revisado por VAKLAVAS & FORERO-TORRES, 2011). Nesse contexto, a realização do tratamento quimioterápico adjuvante após a cirurgia é indicado, principalmente, nos casos mais avançados da doença (KASHIWAGI et al., 2011). Similarmente à quimioterapia neoadjuvante, não existe nenhuma diretriz específica para tratamento citotóxico adjuvante dos tumores triplo-negativos (revisado por GOLDHIRSCH 2007), predominando a utilização dos regimes baseados em antraciclinas e/ou taxanos.

Recentemente, diversos estudos clínicos têm reportado a eficácia de regimes contendo o agente alquilante ciclofosfamida, em combinação com taxanos e antraciclinas (revisado por JOENSUU, GLIGOROV 2012). Ademais, derivados de platina têm apresentado boas respostas clínicas no TNBC, especialmente nos tumores que apresentam mutação no gene BRCA-1 (revisado por GOLDHIRSCH 2011). É importante ressaltar que as pacientes TNBC que não atingiram a pCR nesses estudos, estavam associadas à menor sobrevida e maior risco de recorrência da doença comparadas aos grupos não-TNBC, assim como o observado na terapia convencional baseada nos taxanos e/ou antraciclinas.

Como descrito anteriormente, os atuais regimes quimioterápicos empregados no TNBC não estão tratando satisfatoriamente a doença, além de apresentarem um grave perfil toxicológico às pacientes. Os taxanos possuem como principais efeitos adversos a neutropenia e severa neuropatia. Docetaxel está associado à retenção de líquidos, podendo causar edema periférico e edema pulmonar, nos casos mais graves (revisado por GUIMARAES et al., 2013). Além disso, docetaxel e paclitaxel podem ocasionar neurotoxicidade capaz de restringir seu uso para alguns pacientes. No que diz respeito às antraciclinas, o seu uso, especialmente a doxorrubicina, é associada ao desenvolvimento de cardiotoxicidade grave e irreversível (revisado por GUIMARAES et al., 2013).

Diante do exposto, o TNBC urge por novas estratégias terapêuticas, além da categorização quanto à elegibilidade dos subtipos triplo-negativos que serão beneficiados com os novos tratamentos. Nesse contexto, a metformina surgiu como opção terapêutica nos tratamentos de diversos tipos de câncer, inclusive no TNBC. É interessante notar que, no caso da metformina, o interesse inicial surgiu a partir de estudos epidemiológicos (Tabela 2) que proporcionaram a base empírica para a sua avaliação clínica no câncer, além de ser uma droga de baixo custo, é uma medicação oral bem tolerada e apresenta um perfil tóxico bem definido e modesto.

1.3. METFORMINA

A metformina (1,1-dimeti-bis-guanidina) é um derivado da guanidina, o composto ativo hipoglicemiante da *Galega officinalis* (BAILEY, 1996), representando

a droga antidiabética oral mais comumente prescrita no mundo. Constitui a terapia padrão para o diabete mellitus tipo 2 (DM2) não só pelos efeitos anti-hiperglicêmicos, mas também pelos benefícios na disfunção endotelial, hemostasia e estresse oxidativo, resistência à insulina, perfil lipídico e redistribuição de gorduras (revisado por DEFRONZO & GOODMAN, 1995).

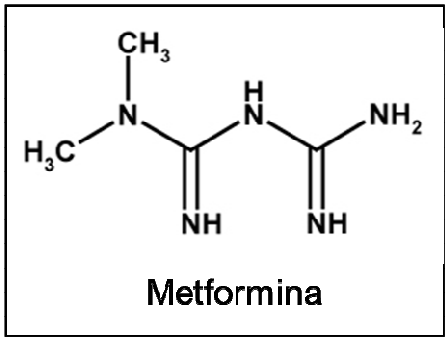


Figura 3: Estrutura molecular da metformina. Adaptado de STRACK (2008).

A utilização dos derivados da guanidina (fenformina e metformina) como agente hipoglicemiante data do início do século passado. Entretanto, a metformina só recebeu aprovação para uso no DM2 nos Estados Unidos (EUA) em 1995, apesar de sua utilização corriqueira em outras partes do mundo (revisado por GOODARZI & BRYER-ASH, 2005). Esse fato é atribuído aos casos de acidose lática e aumento da mortalidade por problemas cardíacos, registrados com o uso da fenformina que levou à sua retirada do mercado em 1977 (MISBIN et al., 1977).

Não obstante sua longa história e sucesso clínico na DM2, a metformina é uma droga de baixo custo caracterizada por um perfil de segurança favorável. Os efeitos adversos mais frequentes são sintomas gastrointestinais, geralmente leves e transitórios (DEFRONZO & GOODMAN, 1995). A incidência de acidose láctica no tratamento com metformina é rara (4,3 casos por 100.000 pacientes/ano) e usualmente está associada a outras complicações, como insuficiência renal, cardíaca e/ou hepática (SALPETER et al., 2010). A metformina em monoterapia não está relacionada à hipoglicemia (BODMER et al., 2008), entretanto observa-se uma diminuição da concentração sérica de vitamina B12 (DEFRONZO & GOODMAN, 1995).

A metformina é absorvida lentamente pelo segmento superior do intestino delgado, apresentando uma biodisponibilidade de 40 a 60%. A metformina não é metabolizada e, portanto, excretada sem alterações na urina, com tempo de meia vida de aproximadamente 5h (BAILEY, 1996). A droga é amplamente distribuída entre os tecidos através de transportadores de cátions orgânicos e as ligações às proteínas plasmáticas não são significativas (Revisado por GONG et al., 2012). Utilizando-se doses clínicas da metformina (500 - 2000 mg) em humanos, a concentração plasmática máxima encontrada nos usuários de metformina é de 2,8 - 15 µM (0,46 - 2,5 mg/L) (Revisado por STAMBOLIC et al., 2009).

Recentemente, Minematsu e colaboradores (MINEMATSU & GIACOMINI 2011) sugeriram uma potencial interação entre os transportadores de cátions orgânicos e inibidores específicos de receptores do tipo tirosino cinases (imatinibe, nilotinibe, gefitinibe, e erlotinibe), afetando a concentração da metformina. Esse estudo é relevante, pois a utilização de regimes combinados entre essas classes pode implicar na disponibilidade, eficácia e toxicidade da metformina. Cumpre ressaltar que interações com agentes citotóxicos utilizados corriqueiramente na terapia do câncer, ainda não foram reportadas na literatura.

Efeitos benéficos da metformina têm sido observados no tratamento da Síndrome do Ovário Policístico (MOGHETTI et al., 2000), Doença Hepática Gordurosa Não-Alcoólica (MARCHESINI et al., 2001), Puberdade Prematura (IBANEZ et al., 2006) e Síndrome Metabólica (ORCHARD et al., 2005). Além de recentes relatos do seu potencial efeito antineoplásico *in vitro*, em modelos animais, em estudos epidemiológicos e clínicos.

1.3.1. Metformina no Diabetes Mellitus do Tipo 2

As ações primárias da metformina no diabetes incluem a inibição da gliconeogênese hepática, sem causar hipoglicemia, além de atuar como um agente sensibilizador da insulina ocasionando redução da resistência e decréscimo significante no seu nível plasmático. A metformina, ainda, estimula a captação de glicose pelos músculos (CUSI, CONSOLI & DEFRONZO 1996; HUNDAL et al., 2000). Adicionalmente aos seus efeitos na produção endógena de glicose, a

metformina induz a redução do conteúdo lipídico em hepatócitos com aumento na oxidação de ácidos graxos e inibição da lipogênese.

A ativação da Proteína Cinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK) parece estar relacionada à maioria dos efeitos celulares da metformina (ZHOU 2001, SHAW, 2005). AMPK é uma serina/treonina proteinocinase que desempenha um papel crucial no metabolismo celular e na manutenção da homeostasia por meio da indução de uma cascata de eventos intracelulares em resposta a uma variedade de estresses metabólicos que provocam mudanças na carga energética celular (TOWLER & HARDIE, 2007).

AMPK é uma proteína heterotrimérica que consiste em uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ. Essa cinase é ativada pelo aumento da relação intracelular AMP/ATP resultado do desequilíbrio entre a produção de ATP e o seu consumo (revisado por HARDIE, 2003). A ativação de AMPK envolve a ligação de AMP nos sítios regulatórios da subunidade γ. Essa ligação provoca uma mudança conformacional que ativa alostericamente a enzima e inibe desfosforilação do resíduo de treonina 172, localizado na subunidade catalítica α (revisado por HARDIE, 2003; CARLING, 2004). Ademais a ativação de AMPK requer a fosforilação do resíduo de treonina 172 por cinases regulatórias, identificadas como o Supressor Tumoral Serina/Treonina Cinase 11 (LKB1) e Cinase β da Proteína Cinase Dependente de Ca2+/Calmodulina (CaMKKβ) (VIOLLET et al., 2009).

O decréscimo do conteúdo energético celular provoca a redução, pela AMPK, das vias metabólicas biossintéticas de ácidos graxos e colesterol, e simultaneamente estimula vias catabólicas de oxidação de ácidos graxos, captação de glicose e glicólise (revisado por HARDIE, 2003; CARLING, 2004). Essa regulação envolve a fosforilação pela AMPK de enzimas regulatórias e fatores/coativadores de transcrição modulando a expressão gênica (ZHOU et al., 2001; VIOLLET et al., 2008). A exemplo, AMPK fosforila o coativador transcricional TORC2 (Transdutor da Atividade de CREB Regulada por Coativadores) reduzindo a expressão de enzimas relacionadas com a gliconeogênese (THOMSON et al., 2007).

A metformina não ativa diretamente nem AMPK, nem seu principal ativador LKB1 (HARDIE, 2006), exercendo efeitos indiretos nessa via por meio do aumento intracelular da relação AMP/ATP em consequência da inibição do complexo I da cadeia respiratória. Os primeiros estudos que comprovaram as ações da metformina no complexo I da cadeia respiratória utilizaram hepatócitos perfundidos e hepatócitos isolados de roedores (OWEN, DORAN, & HALESTRAP, 2000; e EL-MIR et al., 2000). Posteriormente, as pesquisas foram expandidas para outros tecidos, incluindo músculo esquelético (BRUNMAIR et al., 2004), células endoteliais (DETAILLE et al., 2005), células β-pancreáticas (HINKE et al., 2007) e neurônios humanos (EL-MIR et al., 2008). Cabe ressaltar que o mecanismo exato pelo qual a metformina inibe o complexo I da cadeia respiratória ainda não foi elucidado.

Interessantemente, Foretz e colaboradores (FORETZ et al., 2010) estabeleceram que tanto a atividade de LKB-1 quanto AMPK são dispensáveis para o efeito mediado pela metformina na gliconeogênese. O estudo mostra que a redução do estado energético é o fator crítico para a produção da glicose hepática, pois tanto ATP quanto AMP exercem regulações alostéricas em enzimas chaves desta via. Por exemplo, o AMP atua de maneira sinérgica com a frutose 2,6-bisfosfato ativando a enzima Fosfofrutocinase, aumentando assim a sua afinidade pelo substrato (frutose-6-fosfato) e, consequentemente, ativa a glicólise (ZANCAN et al., 2007). Claramente os hepatócitos possuem vários mecanismos para regular a síntese de glicose, portanto, a ativação das cinases provavelmente representa uma via suficiente, mas não necessária para o controle da gliconeogênese.

1.3.2. Metformina e Câncer

1.3.2.1. Estudos epidemiológicos e clínicos

A potencial aplicabilidade da metformina na oncologia surgiu a partir de estudos epidemiológicos conduzidos em pacientes diabéticos com câncer. Evans e colaboradores (EVANS et al., 2005) foram os primeiros a reportarem a associação da metformina com a redução na incidência de câncer. Pacientes usuários a metformina (em oposição às outras terapias) apresentam menor incidência de câncer (risco relativo (RR) de 0,86; Intervalo de Confiança (CI) = 95%).

Adicionalmente, os autores identificaram uma relação dose-resposta entre a duração do uso da metformina, número de prescrições e quantidade dispensada com taxas mais baixas de incidência de câncer. Desde então, muitos estudos populacionais investigaram essa associação e relataram resultados semelhantes, como listado na Tabela 2.

Currie e colaboradores (CURRIE, POOLE & GALE, 2009), em um dos maiores estudos observacionais conduzido em mais de 60 mil pacientes diabéticos com o objetivo de correlacionar o benefício da metformina no tratamento do câncer, relataram que os usuários de insulina ou secretagogos, estavam mais pré-dispostos ao desenvolvimento de tumores sólidos do que os pacientes em terapia com metformina (RR de 1,36 e 1,42, para a monoterapia com sulfoniluréias e insulina, respectivamente; CI = 95%). Interessantemente, a associação da metformina reverteu o risco de câncer tanto relacionado às sulfoniluréias (RR de 1,08; CI = 95%) quanto à insulina (RR de 0,54; CI = 95%).

Adicionalmente, um estudo retrospectivo realizado no Reino Unido avaliou o risco de CAM entre pacientes com DM2 que realizam tratamento com antidiabéticos orais ou insulina (BODMER et al., 2010). O uso prolongado de metformina (≥ 40 prescrições) foi associado à redução no risco de desenvolver câncer de mama (RR de 0,44, CI = 95%) comparado com pacientes em uso de outras terapias antidiabéticas, relacionando não só o tipo de terapia, mas também a duração na redução da incidência de câncer.

Ademais, Jiralerspong e colaboradores (2009) avaliaram a taxa de resposta patológica completa (pCR) em 2.529 mulheres diabéticas que realizaram quimioterapia neoadjuvante para combater o CAM. A utilização da metformina estava associada à maior pCR (24%) comparada às pacientes que não fizeram uso da biguanida (8%) e não-diabéticas que nunca fizeram uso da metformina (16%). Entretanto, apesar do aumento da pCR, a metformina não melhorou significativamente a sobrevida. Similarmente, estudo com mulheres acometidas com TNBC não associaram a metformina a efeitos benéficos na sobrevida da paciente sem metástases, tempo livre da doença e sobrevivência (BAYRAKTAR et al., 2012). Mas o uso da metformina apresentou um risco ligeiramente menor de metástases

comparada às mulheres diabéticas portadoras de CAM que utilizavam outras terapias hipoglicemiantes.

Estudos prospectivos também identificaram benefícios no uso da metformina no tratamento do CAM. Niraula e colaboradores (NIRAULA, et al., 2012), em um resultado preliminar do estudo clínico NCT01101438, observaram decréscimo no marcador de proliferação celular, Ki67, e aumento na taxa de apoptose (pelo ensaio de TUNEL - terminal deoxynucleotidyltransferase dUTP nick end labeling) em mulheres não diabéticas recém diagnosticadas com CAM que utilizaram metformina (1500mg/dia) até a realização da cirurgia. Semelhantemente, Hadad e colaboradores (HADAD et al., 2012) relataram ligeiro decréscimo na expressão do Ki67 em mulheres não diabéticas com CAM operável que utilizaram metformina (1500mg/dia). Adicionalmente, esse estudo reportou alteração na expressão de vários genes envolvidos no metabolismo celular, inflamação e na sinalização de AMPK e mTOR.

Atualmente, vários estudos clínicos estão em andamento objetivando testar a eficácia da metformina como um adjuvante à quimioterapia convencional, bem como em combinação como novos agentes no CAM (Tabela 3). O maior estudo até agora (NCT01101438) objetiva incluir mais de 3 mil pacientes com CAM não metastático e testar se a metformina é superior ao placebo na sobrevida dessas pacientes

Tabela 2 - Estudos epidemiológicos correlacionando o uso da metformina por pacientes diabéticos com o risco de câncer e morbidade.

Tipo de Estudo	Sujeitos	Descobertas	Referência
Caso Controle	11.876 indivíduos recém-diagnosticados com DM2 na Escócia de 1993 a 2001.	Pacientes que utilizavam MET durante os 8 anos do estudo apresentavam um risco menor (30% a menos) de admissões hospitalares por câncer.	EVANS et al., 2005
Coorte Retrospectivo	10.309 pacientes tratados com MET e sulfoniluréias (SU) em Saskatchewan, Canadá, de 1991 a 1996.	Pacientes com DM2 que faziam uso de SU (4,9%) e insulina (5.8%) exógena tiveram um significativo aumento no risco de mortalidade relacionada ao câncer do que os pacientes em terapia com MET (3.5%).	BOWKER et al., 2006
Coorte Observacional	4.085 indivíduos com DM2 na Escócia de 1994 a 2003.	Do total de 4.085 indivíduos com DM2, 297 (7,3%) em tratamento com MET foram diagnosticados com câncer contra 474 (11,6%) que faziam uso de outras terapias. A associação da MET reverteu o risco de câncer tanto relacionado às SU quanto à insulina, diminuindo a incidência de câncer	LIBBY et al., 2009
Coorte Observacional	62.809 pacientes no Reino Unido tratados com SU, insulina e MET	O uso de MET diminuiu o risco de câncer de cólon e pâncreas, mas não dos cânceres de mama e próstata. A combinação de MET e insulina reverteu as altas taxas de malignidades.	CURRIE, POOLE & GALE, 2009
Caso Controle	1.340 pacientes DM2 (746 mulheres e 594 homens) em Florença, Itália, de 1998 a 2007.	A administração de MET, mas não de SU, foi associado com a redução da incidência de câncer	MONAMI et al., 2011
Coorte Retrospectivo	480.984 participantes diabéticos, de 2000 a 2007 em Taiwan.	Os diabéticos que não seguiam nenhuma terapia anti-hiperglicemica apresentaram incidência duas vezes maior para câncer. Pacientes tratados com MET (≤500 mg/dia) apresentaram redução na incidência de câncer próximas ou abaixo daquelas observadas para os pacientes não-diabéticos	LEE et al., 2011

Tipo de Estudo	Sujeitos	Descobertas	Referência
Caso Controle	973 pacientes com adenocarcinoma pancreático (259 pacientes com DM2) e 863 indivíduos controle (incluindo 109 com DM2) no Texas, EUA, de 2004 a 2008.	Pacientes diabéticos tratados com MET apresentaram menor risco para câncer pancreático. Em contraste, pacientes com DM2 que fizeram uso de insulina e secretagogos tiveram uma chance maior de desenvolver câncer pancreático comparado às outras terapias.	LI et al., 2009;
Coorte Retrospectivo	2.529 pacientes com CAM diagnosticados na fase inicial da doença e que realizaram quimioterapia neoadjuvante entre 1990 e 2007 no estado do Texas, EUA.	Pacientes em tratamento com MET (68 pacientes) apresentaram 24% de resposta patológica completa comparada a 8% dos indivíduos portadores de DM2 (87 pacientes) que não faziam uso desta biguanida. Nenhuma diferença na sobrevida foi observada.	JIRALERSPONG et al., 2009
Coorte Retrospectivo	1.983 pacientes diagnosticadas com CAM HER2+ entre 1998 e 2010, no estado do Texas, EUA.	Pacientes com câncer de mama HER2+ tiveram uma associação positiva na evolução clínica associado ao uso tiazolidinedionas e MET comparado aos diabéticos que não utilizavam essas terapias.	HE et al., 2012
Caso Controle	22.621 pacientes com DM2 em uso de drogas antidiabéticas orais, no Reino Unido de 1994 a 2005.	Observou-se uma redução de 56% no risco de CAM nas mulheres que faziam uso por 5 ou mais anos de MET, comparada a outras abordagens hipoglicemiantes.	BODMER et al., 2010
Coorte Observacional	1.448 mulheres que receberam tratamento adjuvante para TNBC de 1995 a 2007.	As mulheres foram divididas em: 63 pacientes diabéticos em tratamento com MET, 67 diabéticos que não receberam MET e 1.318 pacientes não-diabéticos. O grupo que recebeu MET apresentou um rico menor de desenvolver metástases distantes quando comparado aos outros grupos.	BAYRAKTAR et al., 2012

MET: Metformina; DM2: Diabetes Mellitus tipo 2; EUA: Estados Unidos da América; SU: Sulfoniluréias; HER2: Receptor do Fator Epidermal Humano;

Tabela 3 - Estudos clínicos em câncer de mama registrados no site ClinicalTrials.gov (Abril de 2013)

Identificação	Título	Fase do Estudo	Status do Estudo	Proposta
NCT00897884	Efeitos Clínicos e Biológicos da MET no CAM em Estadio Inicial	-	Estudo Completo	Determinar se o uso de MET diminuirá a taxa de proliferação celular no tumor. O estudo testou a administração de MET em pacientes elegíveis para a cirurgia. Os pacientes receberam MET 3 vezes por dia por 2-3 semanas antes de operar.
NCT00984490	MET no Tratamento de Mulheres com CAM Operável no Estadio I ou II	Fase I	Estudo Completo	Avaliar os efeitos in situ da MET na proliferação celular (Ki67) e apoptose (caspase-3).
NCT00933309	O impacto da Obesidade e dos tratamentos para Obesidade no CAM: Exemestano com MET e Rosiglitazona para mulheres obesas na pós-menopausa com CAM Metastático ER+	Fase I	Estudo Completo	Identificar a dose máxima tolerada do Exemestano em combinação com MET/Rosiglitazona.
NCT00909506	Eficácia e Segurança do Uso Adjuvante de MET em Pacientes com CAM Operável	Fase II	Não informado	Investigar o uso adjuvante da MET em pacientes com CAM operável.
NCT01302002	O Uso de MET em Pacientes com CAM inicial Pré-Cirurgia	Fase 0	Não informado	Estudo realizado pelo INCa, com o objetivo de determinar os efeitos da MET in situ em mulheres com CAM elegível à cirurgia nos estadios I ou II.
NCT00930579	Estudo da Intervenção Pré-Cirúrgica da MET no CAM	Fase II	Estudo em andamento	Avaliar os efeitos biológicos da utilização da MET nas mulheres recém diagnosticadas CAM
NCT01650506	Estudo do Erlotinibe e MET no CAM Triplo-Negativo	Fase I	Estudo em andamento	Estabelecer a dose máxima tolerável de Erlotinibe e MET, bem como avaliar se há efeito clínico na combinação das duas drogas em pacientes com CAM Triplo-Negativo
NCT01101438	MET no Tratamento de Pacientes com CAM em Estadios Iniciais	Fase III	Estudo em andamento	Comparar a adição de MET à terapia adjuvante padrão para o CAM, a partir da avaliação do tempo livre da doença.

Identificação	Título	Fase do Estudo	Status do Estudo	Proposta
NCT01266486	Efeitos da MET no Metabolismo do CAM	Fase II	Estudo em andamento	Identificar potenciais biomarcadores de resposta ao tratamento com MET.
NCT01310231	Estudo da adição de MET à Quimioterapia Padrão em Mulheres com CAM Metastático	Fase II	Estudo em andamento	Determinar se a adição da MET à quimioterapia padrão irá melhorar a sobrevida de mulheres com CAM metastático.
NCT01566799	MET em Combinação com Quimioterapia Neoadjuvante no CAM	Fase II	Estudo em andamento	Avaliar a eficácia da MET juntamente com ou em adição a quimioterapia padrão na resposta patológica completa em comparação ao placebo com os mesmos regimes terapêuticos.
NCT01589367	Uso Adjuvante de Letrozol e MET vs Letrozol e Placebo em Mulheres Pós-Menopausa com CAM ER+	Fase II	Estudo em andamento	Identificar o efeito antitumoral da MET em pacientes pós-menopausa, em terapia com Letrozol, com CAM Luminal.
NCT01477060	Modulação da Resposta à Terapia Hormonal com Lapatinibe e/ou MET em Pacientes com CAM Metastático	Fase II	Estudo em andamento	Avaliar a combinação de: Terapia Hormonal + Lapatinibe; Terapia Hormonal + MET; Terapia Hormonal + Lapatinibe + Metformina.
NCT01442870	Avaliação da Segurança Clínica da Combinação da MET com Quimioterápicos	Fase I	Estudo em andamento	Determinar a segurança clínica da adição de MET nos regimes terapêuticos com quimioterápicos convencionais.
NCT01627067	Eficácia do Exemestano, Everolimus e MET em Mulheres Pós-Menopausa com CAM Metastático Positivo para Receptores Hormonais e com Índice de Massa Corporal ≥25	Fase II	Estudo em andamento	Avaliar se a combinação de exemestano, everolimus e MET auxiliam no controle do CAM metastático em pacientes obesas, pós-menopausa e com positividade para os receptores hormonais
NCT01087983	Estudo de Fase I com Lapatinibe com Sirolimus ou MET em Cânceres Avançados	Fase I	Estudo em andamento	Estabelecer a dose máxima tolerável de lapatinibe na cominação com Sirolimus ou MET em cânceres avançados.

MET: Metformina; CAM: Câncer de Mama; RE: Receptor de Estrogênio

1.3.2.2. Mecanismo de Ação da Metformina no Câncer

Os estudos epidemiológicos previamente citados deram a base empírica para maiores investigações acerca das propriedades antitumorais da metformina, a partir de estudos pré-clínicos. O mecanismo de ação da metformina no câncer pode ser dividido em efeitos diretos nas células tumorais e em efeitos indiretos, por meio da redução da hiperinsulinemia e da glicemia.

Efeitos Indiretos

Os efeitos indiretos da metformina estão relacionados à sua habilidade de inibir fatores de transcrição chaves na gliconeogênese no fígado e aumentar a sensibilidade à insulina, reduzindo a concentração plasmática de glicose e os níveis de insulina circulantes, como mencionado anteriormente (Figura 4).

A insulina é um fator de crescimento e a sua ligação ao receptor de insulina (IR) ativa vias de sinalização complexas envolvidas no metabolismo da glicose e na proliferação celular. Os efeitos mitogênicos da insulina perpassam principalmente pela ativação da via das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) (revisado por BELFIORE & MALAGUARNERA, 2011). Adicionalmente, o IR deflagra a ativação da via da Fosfatidil Inosito-3-Cinase/ Proteína Cinase B (PI3K) contribuindo para a proliferação e sobrevivência celular (revisado por FRASCA et al., 2008). Essas ações indiretas da metformina são corroboradas pelos estudos epidemiológicos que relacionam o diabetes com risco maior de desenvolver câncer, inclusive o CAM (LARSSON, MANTZOROS & WOLK, 2007). Estudos em modelos animais também reforçam essa associação, pois animais induzidos à hiperinsulinemia transfectados com células neoplásicas não apresentaram crescimento tumoral quando tratados com metformina (ALGIRE et al., 2010).

Altos níveis do receptor de fatores de crescimento relacionados à insulina 1 (IGFR-1) estão associados à tumorogênese, além de inibir a indução de apoptose por agentes quimioterápicos, como etoposideo e carboplatina, por meio da ativação da via de PI3K (WARSHAMANA-GREENE et al., 2005). Esses fatores de crescimento são modulados pela proteína ligante de fatores de crescimento

relacionados à insulina 1 (IGFBP1). A produção de IGFBP1 é regulada negativamente pela insulina e a utilização da metformina aumenta os níveis de IGFBP1 produzidos pelo fígado, endométrio e células da granulosa, impedindo a ativação da via de PI3K (revisado por ALJADA & MOUSA, 2012).

Efeitos Diretos

Os efeitos diretos da metformina nas células neoplásicas parecem estar relacionados à ativação da via de LKB1/AMPK e subsequente modulação de vias relacionadas à proliferação celular (DOWLING et al., 2007). Entretanto várias evidências surgiram acerca de mecanismos celulares independentes dessa via, geralmente associados ao aumento da taxa AMP/ATP e possíveis efeitos diretos (Figura 4).

A síntese protéica, processo celular que requer grande quantidade de energia, pode ser regulada pela metformina tanto de maneira dependente de AMPK quanto por efeitos diretos na depleção de ATP pela inibição do complexo I da cadeia respiratória (KALENDER et al., 2010). A ativação de AMPK pela metformina provoca a inibição do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), membro de uma via de sinalização que regula processos fundamentais de crescimento e divisão celular, por meio de sua associação em complexos de multi-proteínas. A ativação de mTOR é relatada frequentemente no CAM e está correlacionada com a progressão tumoral e prognóstico adverso nas pacientes (revisado por MERIC-BERNSTAM & GONZALEZ-ÂNGULO, 2009). AMPK inibe o complexo mTORC1 por meio da fosforilação da proteína do complexo da esclerose tuberosa (TSC1/2) no resíduo de serina 1345. Há acúmulo de Rheb-GDP (na forma inativa) e impedimento da ativação de mTORC1 (DOWLING et al., 2007) e, consequentemente, a ativação da Proteína Ribossomal S6K1 (p70S6K1), substrato direto de mTORC1. Embora o papel de TSC1/2 na mediação dos efeitos de mTORC1 em resposta a depleção de energia, em células de mamíferos, ser bem documentada (INOKI, ZHU & GUAN 2003; DOWLING et al., 2007), estudos recentes demostraram que as biguanidas inibem a via de mTOR independente da via de TSC2, por intermédio da fosforilação de raptor, um constituinte do complexo mTORC1, pela AMPK (GWINN et al., 2008). Adicionalmente, Kalender e colaboradores (KALENDER et al., 2010) relataram a

existência de uma via alternativa, independente de AMPK, possivelmente mediada pela RagGTPase, pela qual a metformina inibe a atividade de mTORC1 como consequência da inibição do complexo I da cadeia respiratória.

A via de MAPK constitui uma das maiores famílias de transdução de sinais intracelulares, consistindo em três principais vias: Cinases c-Jun N-terminal (JNK), Cinase Controlada pela Sinalização Extracelular 1 e 2 (ERK1/2, conhecida também como p42/44 MAPK) e a Proteína Ativada por Mitógenos p38 (p38 MAPK) (revisado por CHANG & KARIN, 2001). ERK 1/2 integra uma via de sinalização iniciada por mitógenos por meio do estímulo de receptores do tipo tirosino cinase, como EGFR, HER2 e IGFR/IR (revisado por QI et al., 2005). Soares e colaboradores (SOARES et al., 2013) relataram que o tratamento de linhagens de células de câncer pancreático com metformina inibe a sinalização pela via de ERK concomitante com a inativação de mTORC1, sugerindo uma possível inibição de duas vias celulares importantes na progressão e proliferação tumoral.

Vazquez-Martin e colaboradores (VAZQUEZ-MARTIN et al., 2009) reportaram que o tratamento com metformina por 5 dias foi capaz de reduzir a expressão da oncoproteína HER2 em linhagens de CAM, por inibição direta, independente de AMPK, da atividade de p70S6K1, um efetor da via de mTOR. A metformina também apresentou efeitos em linhagens de CAM resistentes ao trastuzumabe, por interrupção dos complexos HER2/IGFR-1 reduzindo significativamente a proliferação celular (LIU et al, 2011).

Além das ações na inibição da síntese proteica, a metformina regula, via AMPK, a síntese de ácidos graxos, essencial para as células em rápido crescimento e proliferação (XIANG et al., 2004). Vários tipos tumorais, inclusive o CAM superexpressam constitutivamente a enzima Ácido Graxo Sintetase (FAS), com papel crítico na biossíntese *de novo* dos ácidos graxos (ALO et al. 1999; MILGRAUM et al. 1997)

A adaptação metabólica é crítica para manter a sobrevivência das células neoplásicas, pois estão em constante estímulo de fatores estressantes, como a falta de nutrientes e hipóxia. Em condições de aporte de nutrientes a via de LKB1/AMPK

possui papel importante nos efeitos antineoplásicos da metformina (ZHOU et al., 2001). Todavia, a redução da expressão de LKB1 aumenta os efeitos antiproliferativos da metformina (ALGIRE et al., 2010) em um contexto de estresse metabólico, como a falta de nutrientes adequados, pois as células perdem a capacidade de promover os mecanismos para reativar a homeostasia energética (SHAW 2004). Interessantemente, a expressão de LKB1 é ausente em uma parcela significante de linhagens celulares e tumores primários de mama, correlacionado com um pior prognóstico da doença (SHEN et al., 2002).

Semelhantemente, Buzzai e colaboradores (BUZZAI et al., 2007) observaram que a depleção nos níveis energéticos causados pela metformina nas linhagens celulares de câncer de cólon, cultivadas em meio de cultura com poucos nutrientes, foram suficientes para provocar a apoptose nessas células. As linhagens que apresentavam mutação no gene TP53 foram mais responsivas ao tratamento com metformina do que as células com o gene TP53 selvagem. Mutações no supressor tumoral TP53 são comuns no CAM (30-40% dos tumores), particularmente nos tumores mamários classificados como triplo-negativos (30-40% dos tumores), particularmente nos tumores mamários classificados como triplo-negativos (OLIVIER et al., 2006). Adicionalmente, recentes descobertas relacionam a perda de função de p53 com o fenótipo EMT e a aquisição de características de CSC em diferentes linhagens de câncer (KIM et al., 2011; PINHO, ROOMAN & REAL, 2011)

A teoria das CSCs postula que os tumores são mantidos por populações de células capazes de auto renovação e diferenciação em fenótipos distintos (revisado por MCDERMOTT & WICHA, 2010). Clinicamente, as CSCs estão relacionadas à quimiorresistência, ao aparecimento de metástases e ao relapso da doença. O primeiro estudo acerca das ações da metformina nas CSCs foi publicado por Hirsch e colaboradores (HIRSCH et al., 2009). Os autores demonstraram que em diferentes linhagens de CAM, as CSC, caracterizadas pelo fenótipo $CD44^{high}/CD24^{low}$, eram susceptíveis a baixas doses de metformina (0,1 a 0,3 mM). Adicionalmente, os autores reportaram efeito sinérgico da metformina combinada com doxorrubicina resultando na redução no tumor e recorrência tumoral tardia quando comparado ao tratamento da antraciclina em monoterapia (HIRSCH et al., 2009). A combinação de metformina (0,1 mM) com doxorrubicina, paclitaxel ou carboplatina retardou a

recorrência tumoral comparado aos agentes em monoterapia em modelos animais, transfectados com diferentes linhagens de CAM (ILIOPOULOS, HIRSCH, STRUHL K, 2011).

O processo denominado EMT está relacionado à aquisição de características de CSC (MANI 2008), no qual células diferenciadas perdem a polaridade celular, adquirindo propriedades mesenquimais de mobilidade e, assim, provocando metástases. Vazquez-Martin e colaboradores (VAZQUEZ-MARTIN et al., 2010) relataram que o tratamento com a metformina reduziu o fenótipo CSC ($CD44^{+}/CD24^{-/low}$) por meio da inibição de fatores transcricionais críticos para EMT, como ZEB1, TWIST, SLUG e TGF-β. Adicionalmente, a metformina preveniu a conversão de células epiteliais para mesenquimais, induzidas por TGF-β, pela regulação da E-caderina, essencial para a adesão epitelial célula-célula (CUFI et al., 2010). A metformina, portanto, pode ter um papel relevante na prevenção de metástases.

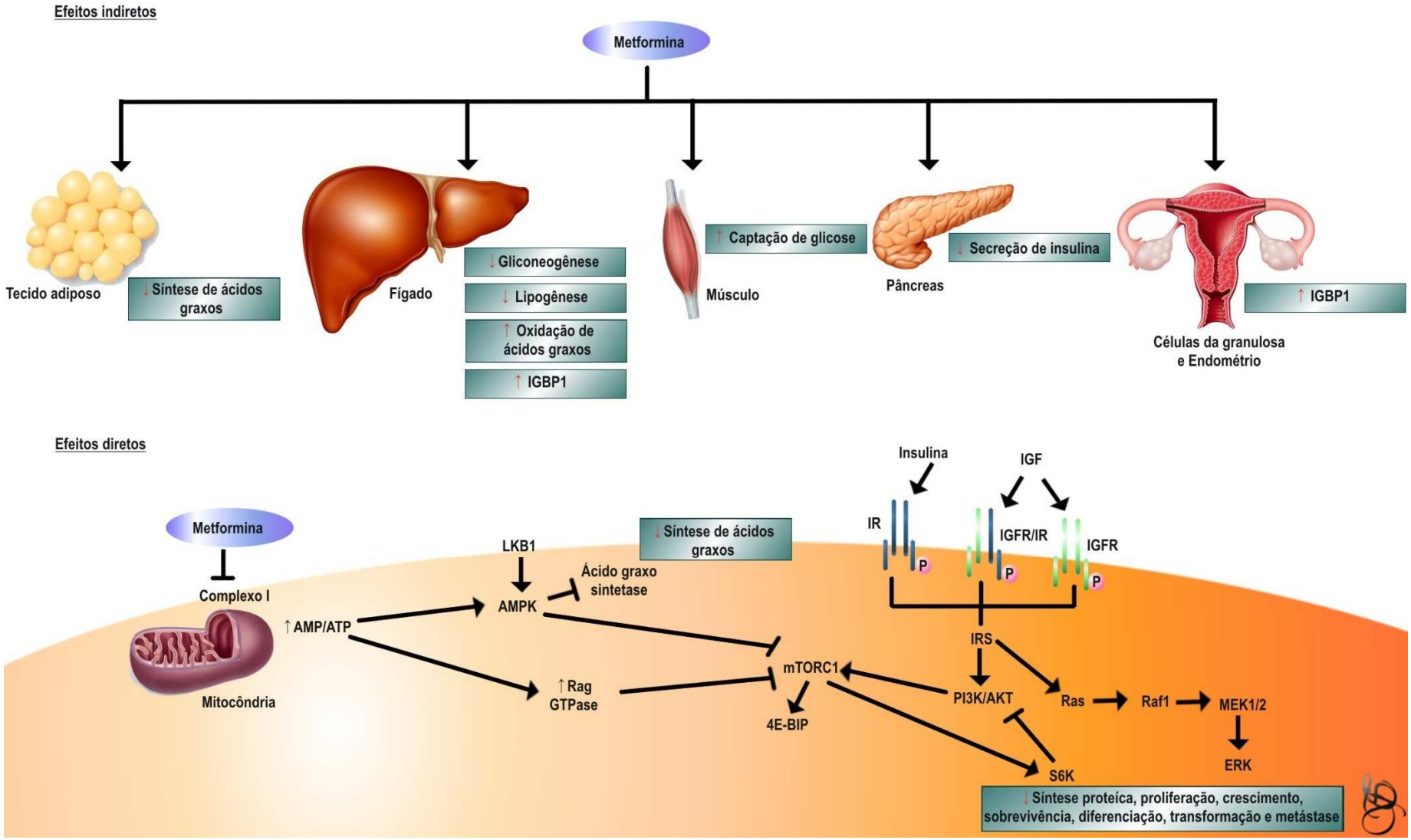


Figura 4: Mecanismos indiretos e diretos da metformina no câncer.

2. OBJETIVOS

2.1. GERAL

Em face ao conteúdo exposto, o presente estudo teve como objetivo geral a investigação da eficácia antineoplásica, bem como o entendimento de mecanismos relacionados à mesma, da metformina em linhagem de TNBC MDAMB231.

2.2. ESPECÍFICOS

Para contemplar o objetivo geral proposto, estabelecemos os objetivos específicos, a saber:

1. Determinação da eficácia antineoplásica da metformina, em monoterapia e em terapia combinada com quimioterápicos convencionais empregados contra o CAM, doxorrubicina e paclitaxel, em linhagem de TNBC MDAMB231;

2. Caracterização da possível aplicabilidade clínica de concentrações baixas de metformina, sabidamente seguras por serem empregadas no tratamento do DM2, no tratamento de TNBC;

3. Investigação dos mecanismos antineoplásicos potenciais da metformina na linhagem de TNBC MDAMB231, incluindo avaliação do ciclo celular, modulação da via de sinalização celular de MEK/ERK e indução de apoptose/necrose.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CULTURA DE CÉLULAS

3.1.1. Linhagem Celular

Para a realização do presente projeto de pesquisa, utilizou-se duas linhagens de câncer de mama, MDAMB231 e MCF7, cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCa). Segundo a “American Type Culture Collection” (ATCC), a linhagem MDAMB231 foi estabelecida a partir de células isoladas de efusão pleural de uma paciente caucasiana com adenocarcinoma de mama. É classificada como uma linhagem de TNBC do subtipo basal B, ou claudin-low. A MCF7, por sua vez, foi isolada em 1970 a partir de uma paciente caucasiana com adenocarcinoma de mama. Caracteriza-se pela expressão dos receptores hormonais (RE e RP) e ausência de HER-2, classificada como Luminal A.

Todas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco; Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) suplementado com HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico), bicarbonato de sódio, soro fetal bovino inativado 10% v/v (SFB, Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA). A manipulação das células foi realizada em capela de fluxo laminar, sendo as mesmas mantidas em incubação em estufa com condições controladas de temperatura (37ºC), com atmosfera de 5% de CO_2, condições adequadas para o crescimento de células de mamíferos. A passagem das células foi realizada de duas a três vezes por semana, de acordo com o tempo de crescimento, utilizando-se PBS (tampão fosfato salina) para lavagem e solução de tripsina/EDTA (0,25 µg/mL de tripsina e 1 µg/mL de EDTA) para rompimento da matriz extracelular que mantém as células aderidas à garrafa de cultura em monocamada.

3.1.2. Descongelamento

As alíquotas das linhagens celulares armazenadas em nitrogênio líquido a uma temperatura de -196ºC foram descongeladas bruscamente a 37ºC. O conteúdo armazenado em microtubo de 1,5 mL foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL estéril, livre de DNase e RNase, com 10 mL de meio DMEM acrescido de SFB a 10% v/v, solução estabilizada de penicilina-estreptomicina numa concentração de 100/mL unidades de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 450 *g* a 27ºC. Após a centrifugação, foi observado um pellet no fundo do tubo, e o sobrenadante foi descartado. As células foram então ressuspendidas em 15 mL de DMEM com SFB e antibióticos, citados anteriormente, e transferidas para uma garrafa de cultura de 75 cm² que foi incubada em estufa com 5% de CO_2.

3.1.3. Cultivo

As linhagens foram cultivadas em garrafas de 75 cm², com adição de 6 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB inativado, acrescido de solução estabilizada de penicilina-estreptomicina nas concentrações previamente especificadas. O cultivo se deu em estufa a 37ºC e com atmosfera de 5% de CO_2 até a subconfluência. Diariamente, as garrafas foram analisadas em microscópio óptico de luz invertida para avaliação do aspecto do meio e das células em cultivo, bem como de sua taxa de crescimento, confluência e morfologia.

3.2. ENSAIO DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

3.2.1. Plaqueamento

As duas linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de 75 cm² até a subconfluência para cada um dos experimentos. Os experimentos foram realizados até a passagem 10 das linhagens celulares em questão. Após seguir o método previamente reportado, foi retirada uma alíquota de 10 µL para a preparação de uma suspensão na proporção de 1:1 com a solução de Azul de Tripan (v/v) (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), com fins de quantificação de células viáveis no

cultivo, pois esta tem a finalidade de marcar as células que perderam a integridade da membrana. Para a contagem do número de células viáveis, foi utilizada a câmara de Neubauer. Encostou-se a ponta da pipeta na borda da lamínula e a câmara foi então cuidadosamente preenchida com a suspensão preparada. Após as células sedimentarem por 2 minutos, a câmara de Neubauer foi levada ao microscópio óptico e a área demarcada foi focalizada com a objetiva de menor aumento. A seguinte fórmula foi usada para o cálculo do número total de células:

$$\text{Nº de células/mL} = \frac{\text{Nº total de células}}{\text{Nº de quadrantes contados (4)}} \times \text{Fator de diluição (2)} \times 10^4$$

O valor encontrado, referente ao número de células por mL, era empregado numa nova equação:

$$\text{Volume final} = \text{Volume inicial} \times \frac{\text{Concentração desejada/mL } (10^5)}{\text{Nº de células/mL da suspensão final}}$$

Com isso, foi possível obter uma solução final na concentração de 7,5 x 10^5 células/mL. Posteriormente adicionou-se 100 µL/poço da solução em placas de 96 poços, incubada por 24 horas a 37ºC, em atmosfera de 5% de CO_2.

3.2.2. Cálculo de IC50 estimado das drogas clínicas

Para a realização dos experimentos de determinação de IC_{50} estimado foram utilizadas as seguintes drogas clínicas: Paclitaxel (Acoord Farmacêutica LTDA), Doxorrubicina (Bergamo LTDA) e Metformina (PharmaNostra). Para cada uma das drogas, foram realizadas diluições seriadas em PBS 1x, no caso da metformina e doxorrubicina, e em DMSO (Dimetilsulfóxido) 10% (v/v), no caso do paclitaxel, a fim de se obter as concentrações descritas na tabela 4. As alíquotas diluídas foram utilizadas para a determinação dos valores da concentração inibitória de 50% da proliferação celular (IC_{50}) a partir da curva dose resposta feita para cada droga, seguindo o protocolo do ensaio com brometo de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-

2,5-difeniltetrazólio, conhecido como metil-tiazol-tetrazólio (MTT) descrito abaixo. A análise estatística para o cálculo de IC_{50} foi realizada através do *software* GraphPad Prisma versão 5.

Tabela 4 - Concentrações das drogas clínicas utilizadas para cálculo de IC50.

Quimioterápicos	**Concentrações obtidas**				
Paclitaxel (PAC)	1000 nM	100 nM	10 nM	1 nM	0,1 nM
Doxorrubicina (DOX)	1000 µM	100 µM	10 µM	1 µM	0,1 µM
Metformina (MET)	100 mM	10 mM	1 mM	0,1 mM	0,01 mM

Após as 24 horas iniciais de incubação, as placas foram vertidas para remoção do meio e início dos tratamentos. Adicionou-se 90 µL de meio de cultura starving em cada poço juntamente com 10 µL de cada composto na concentração descritas na tabela 4. Todas as condições tratadas foram analisadas em quadruplicata. Os controles utilizados foram 4 poços tratados apenas com DMSO 10% (v/v), 4 poços tratados apenas com PBS, 4 poços com células na ausência de qualquer droga ou diluente e 4 poços sem células apenas com meio de cultura (branco). Cada experimento foi realizado por 4 vezes, em momentos independentes.

3.2.3. Determinação do efeito antiproliferativo da combinação entre as drogas

Com fins de avaliar as interações entre as drogas utilizadas na linhagem MDAMB231, realizou-se curvas dose-reposta, pelo método do MTT com diversas combinações entre os quimioterápicos, exemplificados na Figura 5 e descritos na tabela 5.

Tabela 5 - Concentrações das drogas utilizadas nos estudos de combinação

	Doxorrubicina	**Paclitaxel**	**Metformina**
$IC_{6,5}$	0,046mM	0,0312µM	6,75mM
$IC_{12,5}$	0,09mM	0,0625µM	13,5mM
IC_{25}	0,18mM	0,125µM	27mM
IC_{50}	0,36mM	0,25µM	54mM
IC_{75}	0,54mM	0,375µM	81mM
$2xIC_{50}$	0,72mM	0,5µM	108mM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	$A_{1/8}$ B0	$A_{1/8}$ B0	$A_{1/8}$ B0	$B_{1/8}$ A0	$B_{1/8}$ A0	$B_{1/8}$ A0	A B	A B	A B	$A_{1/8}$ $B_{1/8}$	$A_{1/8}$ $B_{1/8}$	$A_{1/8}$ $B_{1/8}$
2	$A_{1/4}$ B0	$A_{1/4}$ B0	$A_{1/4}$ B0	$B_{1/4}$ A0	$B_{1/4}$ A0	$B_{1/4}$ A0	2A 2B	2A 2B	2A 2B	$A_{1/4}$ $B_{1/4}$	$A_{1/4}$ $B_{1/4}$	$A_{1/4}$ $B_{1/4}$
3	$A_{1/2}$ B0	$A_{1/2}$ B0	$A_{1/2}$ B0	$B_{1/2}$ A0	$B_{1/2}$ A0	$B_{1/2}$ A0	2A B	2A B	2A B	NT	NT	BRANCO
4	A B0	A B0	A B0	B A0	B A0	B A0	A_{75} B	A_{75} B	A_{75} B	NT	NT	BRANCO
5	A75 B0	A75 B0	A75 B0	2B A0	2B A0	2B A0	2B A	2B A	2B A	NT	NT	BRANCO
6	2A B0	2A B0	4A B0	B75 A0	B75 A0	B75 A0	$B_{1/2}$ A	$B_{1/2}$ A	$B_{1/2}$ A	NT	NT	BRANCO
7	$A_{1/2}$ $B_{1/2}$	$A_{1/2}$ $B_{1/2}$	$A_{1/2}$ $B_{1/2}$	B75 A75	B75 A75	B75 A75	B_{75} A	B_{75} A	B_{75} A	NT	NT	BRANCO
8	$A_{1/2}$ B	$A_{1/2}$ B	$A_{1/2}$ B	PBS	PBS	PBS	DMSO	DMSO	DMSO	NT	NT	BRANCO

Figura 5: Placa de 96 poços representativa dos tratamentos realizados por 24h. NT: Poço sem tratamento; Branco: Poço sem células; A: Paclitaxel ou Doxorrubicina; B: Metformina;

3.2.4 Ensaio de MTT

Após as 24 horas de incubação com os compostos listados nas Tabelas 4 e 5, o meio foi removido e 15 µL de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) na concentração de 5 mg/mL foram adicionados em cada poço. A incubação com MTT se deu por 4 horas, protegido da luz, e, em seguida, adicionou-se 100µL de DMSO para dissolução dos cristais de formazan formados. Vale ressaltar que o método de análise colorimétrica com o MTT permite mensurar o metabolismo celular pela redução deste sal por ação da succinato-desidrogenase mitocondrial, ocorrendo a formação de cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. A leitura dos resultados foi realizada em leitor de microplaca (MR-96 A, Bioclin, Minas Gerais, Brasil) no comprimento de onda de 560 nm.

3.3. ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A avaliação do conteúdo de DNA para análise do ciclo celular foi realizado na linhagem MDAMB231. Para tal, foi utilizado um intercalante de DNA fluorescente, o iodeto de propídeo (PI), que entra na célula após sua permeabilização. O citômetro detecta a fluorescência do PI, permitindo avaliar o conteúdo de DNA referente a cada fase do ciclo celular.

As células MDAMB231 foram plaqueadas seguindo a metodologia já descrita para o ensaio de proliferação celular. A mesma fórmula foi usada para o cálculo do número total de células, sendo possível o ajuste à concentração de células desejadas (3,8 x 10^5 células) em cada um dos 6 poços da placa de cultura, acrescentando-se o volume calculado da suspensão e o volume de DMEM necessário para a totalização de 3 mL em cada poço da placa. Utilizou-se placas de 6 poços para a execução dos tratamentos, descritos na tabela 6, seguindo a metodologia já descrita para o ensaio de proliferação celular.

Tabela 6 - Condições experimentais utilizadas nas análises do ciclo-celular

Condições Experimentais	
MET 10 µM	PAC 0,25 µM
MET 27 mM	PAC 0,25 µM + MET 10 µM
MET 54 mM	PAC 0,25 µM + MET 54 mM

Após as 24h de tratamento, coletou-se o sobrenadante e as células foram tripsinadas com 300µL de Tripsina/EDTA (0,25 µg/mL de tripsina e 1 µg/mL de EDTA). Realizou-se a inativação do meio com o sobrenadante coletado e centrifugou as amostras por 5 minutos a 450 *g* a 27ºC. Em seguida foi descartado o sobrenadante e realizado duas lavagens com PBS e subsequentes centrifugações por 5min a 450 *g* a 27ºC. O sobrenadante foi novamente descartado e o *pellet* ressuspendido em 500µL de tampão de permeabilização, composto por Tris-Cl 3,4 mM em pH 7,6, NaCl 10 mM, NP40 0,1% (v/v), RNAse 700u/L e PI 0,075 mM (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). As amostras foram então incubadas no tampão por 15 minutos sob resfriamento, protegidas da luz e a leitura foi efetuada no citômetro BD Accuri® C6 FlowCytometer utilizando o canal FL-2 (585nm). Um total

de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software Summit v.4.3.

3.4. ENSAIO DE INDUÇÃO DE APOPTOSE POR ANEXINA V/PI

O ensaio de detecção de apoptose por anexina V/PI foi utilizado para determinar a porcentagem de apoptose induzida pelos tratamentos realizados. A anexina V faz parte de uma família de proteínas que possuem capacidade de se ligar a fosfolipídios da membrana plasmática, em um processo dependente de cálcio. Durante a apoptose ocorrem várias alterações celulares dentre elas a perda da simetria da membrana plasmática, resultando na exposição de fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana celular. A anexina V não é capaz de penetrar na membrana plasmática de células viáveis, havendo a marcação apenas naquelas que apresentarem exposição da FS. Na análise dessa marcação por citometria de fluxo, a anexina é então conjugada à um fluorocromo (FITC). E para diferenciar células vivas, em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose utilizou-se um intercalante de DNA, PI. Desta forma, células vivas não serão marcadas nem por anexina V nem por PI; células em apoptose inicial apresentam marcação positiva para anexina V e negativa para PI; células em apoptose tardia são positivas tanto para anexina V quanto para PI; e células em necrose apresentam marcação positiva somente para PI.

As células foram plaqueadas e tratadas seguindo a metodologia já descrita para a análise do ciclo celular. Depois dos tratamentos por 24h, coletou-se o sobrenadante e as células foram tripsinadas com 300µL de Tripsina/EDTA (0,25 µg/mL de tripsina e 1 µg/mL de EDTA). Realizou-se a inativação do meio com o sobrenadante coletado e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 450 *g* a 27ºC. As células foram então ressuspendidas com o tampão de ligação (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, $MgCl_2$ 1 mM e $CaCl_2$ 1,8 mM), centrifugadas por 5 minutos a 450 *g* a 27ºC e então incubadas, por 15 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz, com 100µL de tampão com adição de 5 µL de anexina V (BD Biosciences, Califórnia, EUA) nos tubos, exceto nos controles. No momento da leitura adicionou 5 µL de PI (1 mg/mL). A leitura foi efetuada no citômetro BD Accuri® C6 FlowCytometer utilizando o canal FL-1 (530 nm) para a anexina V-FITC e

o FL-2 (585 nm) para o PI. Um total de 10.000 eventos (células) foi adquirido por amostra e os dados analisados pelo software Summit v.4.3.

3.5. IMUNOBLOTTING

3.5.1. Preparo das amostras

Para a análise da expressão das proteínas de interesse, a serem especificadas a seguir, nas células de TNBC MDAMB231, essas foram cultivadas em garrafas de $25cm^2$ na concentração de $1x10^6$ células/garrafa. Ao atingirem um estado de confluência, as células foram lavadas com PBS 1X por 3 vezes e incubadas por 24h com as drogas, especificadas na tabela 7, em meio DMEM livre de SFB, para eliminar qualquer influência do soro no perfil das células. Após 24h, retirou-se o sobrenadante, lavando as células com PBS 1X por 3 vezes e, então, adicionou-se 1mL de solução de tripsina/EDTA (0,25 µg/mL de tripsina e 1 µg/mL de EDTA) às garrafas, que foram colocadas na estufa a 37°C por 2 minutos, para o total desprendimento das células da superfície das garrafas de cultivo. Em seguida, foram acrescentados os sobrenadantes para bloquear a ação da tripsina, sendo as células transferidas para tubos Falcon de 15 mL. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 450 *g*. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, mantendo o pellet no fundo do tubo, ao qual se adicionou 90 µL de tampão RIPPA para a lise das células, composto por RIPPA (Tris 50 mM, NaCl 0,15 M, EDTA 1 mM, Triton X100 1% v/v, desoxicolato de sódio 0,5% p/v, SDS 0,1% p/v) em uma concentração final de 1X, PPi 5 mM, NaF 50 mM vanadato 5 mM e inibidor de protease 1X (ROCHE, São Paulo, Brasil). O lisado celular foi transferido para eppendorfs e mantido no gelo por 30 minutos, e então centrifugado por 15 minutos a 450 *g* a 4ºC. Parte do sobrenadante foi aliquotada em tubos para dosagem das proteínas. Após a quantificação das proteínas, as amostras foram transferidas para outros tubos, onde receberam tampão de amostra composto por Tris 0,76% (p/v); glicerol 12,5% (v/v); SDS 2,3% (p/v); β3-mercaptoetanol 5% (v/v) e azul de bromofenol 0,19% (p/v). A mistura foi aquecida por 15 minutos à 95ºC, estando pronta para a aplicação no gel de eletroforese.

Tabela 7 - Condições experimentais utilizados nos experimentos de imunoblotting

Condições Experimentais		
MET 10 µM	PAC 0,25 µM	DOX 0,36mM
MET 54 mM	PAC 0,25 µM + MET 10 µM	DOX 0,36mM + MET 54 mM
	PAC 0,25 µM + MET 54 mM	

3.5.2. Corrida Eletroforética

A técnica de SDS-PAGE foi utilizada como a primeira etapa da técnica de Western Blot com o objetivo de separar as proteínas do lisado celular de acordo com o seu peso molecular. No gel SDS-PAGE 8% (p/v) foram aplicados aproximadamente 40µg de proteína paralelamente a um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ All Blue, 10–250 kD, BioRad). O gel foi composto por duas camadas, uma de separação e uma de empacotamento, seguindo a tabela abaixo:

Tabela 8 - Soluções de preparo do gel SDS-PAGE.

Soluções	Gel de Separação	Gel de Empacotamento
Acrilamida-bisacrilamida	30 : 0,8 %	30 : 0,8 %
Tris pH 8,8 + SDS 10%	-	1,5 M
Tris pH 6,8 + SDS 10%	1 M	-
H_2O	Qsp 15 mL	Qsp 5 mL
APS	10 g%	10 g%
Temed	0,005mL	0,010mL

Uma vez aplicadas as amostras e o padrão de peso molecular, o gel foi submetido a uma voltagem de 90V numa solução de corrida, composta por Tris base 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v) e SDS 0,01% (p/v). Após a separação das proteínas presentes no lisado celular, o gel foi submetido à técnica de Western Blot para a identificação das proteínas de interesse (RANGEL et al., 2002).

3.5.3. Western Blot

Terminada a corrida eletroforética, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de PVDF (Sequi-Blotim PDVF membrane for protein sequencing,

0,2pm, Bio Rad, EUA) por 2 hora, a 200 mA, em um tampão de transferência composto de tris 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v) e metanol 15% (v/v). Após a transferência, a membrana foi mantida em agitação por 1 hora, à temperatura ambiente, numa solução composta por leite desnatado sem gordura 5% (p/v) e TBS Tween 20 (TBS-T) 0,05% (p/v). Depois de lavada 5 vezes com TBS-T 0,05% (p/v) gelado, a membrana foi incubada durante a noite com anticorpo específico para a proteína de interesse (os anticorpos utilizados estão especificados na TABELA 04). Na etapa seguinte, a membrana foi lavada e incubada por 1 hora com o anticorpo secundário, que se liga especificamente ao anticorpo primário utilizado, sendo posteriormente lavada 5 vezes com TBS-T 0,05% (p/v). Foi feita uma última lavagem com TBS para eliminar resíduos do Tween. Os imunoblottings foram revelados usando o kit ECL-Plus (GE Healthcare, São Paulo - Brasil), segundo instruções do fabricante, e expostos ao filme (Kodak T-Mat, 8x24 cm, Sigma - Aldrich, Montana, EUA) (RANGEL et al., 2002).

Tabela 9 - Especificações dos anticorpos utilizados para a técnica de Western-Blot.

Anticorpo	Tipo	Marca	Diluição	Veículo
ERK1/2 Total primário	IgG de coelho - policlonal	Cell Signaling	1:1000	Leite
ERK1/2 Total secundário	Anti-IgG de coelho	GE Amersham	1:2000	Leite
ERK1/2 Fosforilado primário	IgG de coelho - policlonal	Cell Signaling	1:1000	Leite
ERK1/2 Fosforilado secundário	Anti-IgG de coelho	GE Amersham	1:2000	Leite
HSC-70 primário	IgG de cabra - policlonal	Cell Signaling	1:1000	Leite
HSC-70 secundário	Anti-IgG de cabra	Cell Signaling	1:2000	Leite

3.6. ESTUDO DE DOCKING

Estudos de *docking* consistem na utilização de técnicas computacionais para a predição da estrutura de complexos receptor-ligante. Diante dos resultados obtidos realizou-se o estudo de *docking* com o objetivo de avaliar a possível interação da metformina e as proteino cinases ERK1/2 e MEK1/2. Esse estudo foi realizado em colaboração com o Laboratório de Síntese Orgânica & Medicinal (LSO&M - UFES)

sob a orientação do mestrando Maicon Delarmelina (PPGQUI/UFES) e do Prof. Dr. Sandro José Greco.

A estrutura cristalina das enzimas ERK1/2 e MEK1/2 foram obtidas no *Protein Data Bank* (PDB), banco público de estruturas proteicas. De posse da estrutura cristalina depositada no PDB sob os códigos 1TVO (ERK2) e 4AN3 (MEK1), estudos de ancoragem molecular foram realizados com objetivo de estudar a conformação e energia de ligação entre a metformina e as proteínas cinases, através do programa Autodock Vina (TROT & OLSON, 2010).

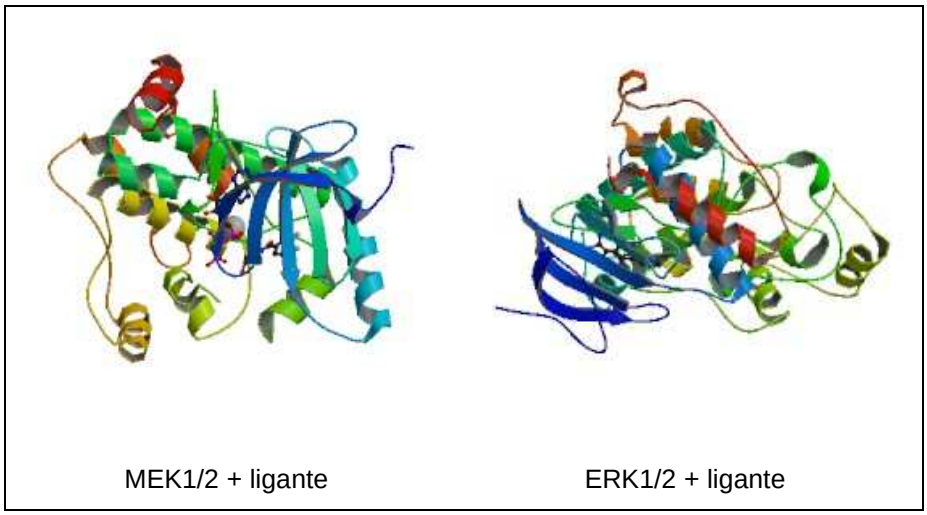


Figura 6: Estrutura cristalina das enzimas MERK1/2 e ERK1/2

Inicialmente, o ligante e a proteína foram preparados conforme protocolo descrito na literatura (TROT & OLSON, 2010). A seguir, a região para ancoragem foi construída de forma a cobrir todo o sítio ativo da enzima 18X10X12 Å centrada no ligante. Dessa forma, o ligante cristalográfico foi ancorado contra o próprio receptor com objetivo de validar os cálculos de *docking*.

Posteriormente, dois inibidores de MEK1/2 (5Y01384 e PD98059) e três inibidores de ERK1/2 (norathyriol, FR180204 e 19A) descritos na literatura foram superpostos ao sítio ligante da enzima. Cabe ressaltar que as estruturas químicas dos ligantes foram completamente otimizadas, usando o método semi-empírico PM6 (Stewart, 2007) contido no pacote de cálculos de orbitais moleculares Gaussian 09W. Como resultado, foi obtido a superposição dos ligantes no sítio ativo das

proteino cinases ERK1/2 e MEK1/2 através do cálculo de energia de interação ligante/receptor.

3.7. ANÁLISE DOS DADOS E TESTES ESTATÍSTICOS

As análises estatísticas foram efetuadas usando o Teste ANOVA de uma via, com significância de 5%. Em seguida, utilizou-se o Teste de Comparação Múltipla de Bonferroni. O programa usado para os cálculos estatísticos foi o GraphPAd Prism 5 para Windows (versão 5.00.288).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. METFORMINA INIBE A PROLIFERAÇÃO CELULAR NAS LINHAGENS DE CAM

Inicialmente, procedemos com os experimentos de proliferação celular pelo método de MTT com objetivo de determinarmos a IC_{50} estimada tanto dos agentes quimioterápicos convencionais empregados frequentemente em esquemas de combate ao CAM baseados na politerapia com agentes antraciclínicos e taxanos, doxorrubicina e paclitaxel, respectivamente, bem como da substância de interesse do presente estudo, a metformina, em ambas as linhagens de CAM MDAMB231 e MCF7, modelos *in vitro* de TNBC e CAM luminal A, respectivamente.

Tabela 10 - IC_{50} estimada para as linhagens de CAM MDAMB231 e MCF7

Droga	**IC_{50} (M)**	**IC_{50} (M)**
	MDAMB231	**MCF7**
Doxorrubicina	$3{,}61 \times 10^{-4}$	$4{,}88 \times 10^{-4}$
Paclitaxel	$2{,}5 \times 10^{-7}$	$1{,}07 \times 10^{-7}$
Metformina	$5{,}4 \times 10^{-2}$	$11{,}6 \times 10^{-2}$

A determinação de IC_{50} estimada de drogas pelo método de MTT, especialmente em modelos *in vitro*, constitui ferramenta útil com fins à determinação de potência e eficácia das mesmas quanto às suas atividades antiproliferativas, embora haja limitação do método em fornecer valores exatos de concentração para o parâmetro farmacocinético de IC_{50}.

Em nossos estudos, observamos que enquanto a eficácia antiproliferativa das drogas convencionais é similar nas duas linhagens de CAM avaliadas, a metformina é mais eficaz na linhagem de TNBC (MDAMB231) quando comparada à linhagem de CAM luminal A (MCF7) (Figuras 7 e 8). Por outro lado, nas nossas condições experimentais, ao analisarmos a potência das drogas referidas, aspecto farmacocinético muito relacionado ao surgimento de efeitos adversos desencadeados pela necessidade do emprego de concentrações maiores de droga para se obter o efeito clínico desejado, notamos que (Tabela 10): i) a doxorrubicina é

mais potente contra a linhagem MDAMB231 do que a MCF7 ($p < 0,05$); ii) o paclitaxel tem potência semelhante contra as duas linhagens de CAM ($p > 0,05$); iii) a metformina é mais potente contra a linhagem de TNBC (MDAMB231) do que a de CAM luminal A (MCF7) ($p < 0,001$).

Faz-se oportuno salientar que observamos efeito bifásico da doxorrubicina em ambas as linhagens celulares de CAM estudadas. Enquanto diversas substâncias endógenas e exógenas descrevem ações bifásicas, adicionado ao fato de desconhecermos mecanismos capazes de justificar o fenômeno observado, é possível que o efeito decorra de interferência da própria substância de coloração avermelhada no teste de MTT, o qual, conforme mencionado anteriormente, é um método colorimétrico.

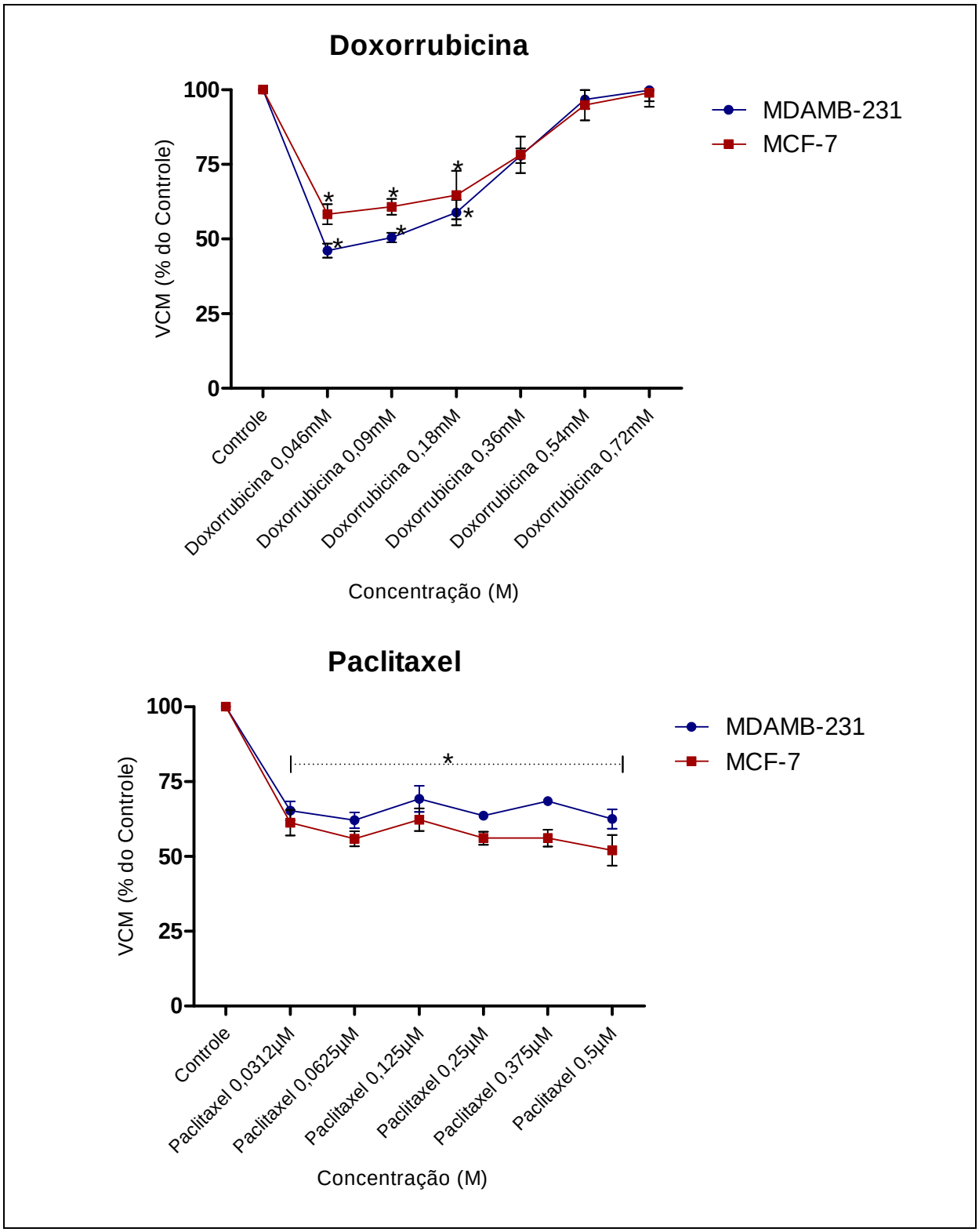


Figura 7: Efeitos do paclitaxel e doxorrubicina na proliferação celular das linhagens MDAMB231 e MCF7, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. *p < 0,05 quando comparados às condições Controle. Os resultados representam a média e desvio padrão (±) de 3 experimentos independentes.

Por outro lado, os dados discutidos até o momento levaram em consideração as concentrações de IC_{50} das drogas avaliadas, tal a possibilitar o argumento de que a segurança do emprego de metformina em concentração consideravelmente mais elevada do que as empregadas no manejo do DM2, de 500 a 2000 mg (2,8 - 15 µM), permanece desconhecida. Com o intuito de entendermos melhor o efeito da metformina no tratamento do CAM, realizamos experimentos de dose-resposta de seu efeito antiproliferativo, em intervalo de concentrações que compreendem desde aquela empregada no tratamento de DM2, sabidamente segura, até duas vezes a IC_{50} no TNBC, isto é, de 10 µM até 108 mM, nas linhagens MDAMB231 e MCF7.

Tal como pode ser observado na Figura 8, a metformina descreveu eficácia antiproliferativa, tanto em MDAMB231 quanto em MCF7, em concentrações significativamente superiores àquelas circulantes em pacientes portadores de DM2, situação cuja segurança da droga é bem estabelecida. Ainda, nas concentrações compatíveis com as empregadas no manejo do DM2, a metformina se mostrou ineficaz como substância antineoplásica em ambas as linhagens de CAM. Esse fato pode ser explicado, ao menos parcialmente, pela alta concentração de glicose presente no meio de cultura, além da possível interferência de fatores de crescimento presentes no soro fetal bovino adicionado às culturas celulares. Ainda que o tratamento das células propriamente dito tenha sido conduzido na ausência de soro fetal bovino, não se pode excluir a possibilidade de que os fatores de crescimento contidos no soro, bem como a elevada concentração de glicose do meio, possam ter modulado o perfil de crescimento das células à condição de favorecimento proliferativo.

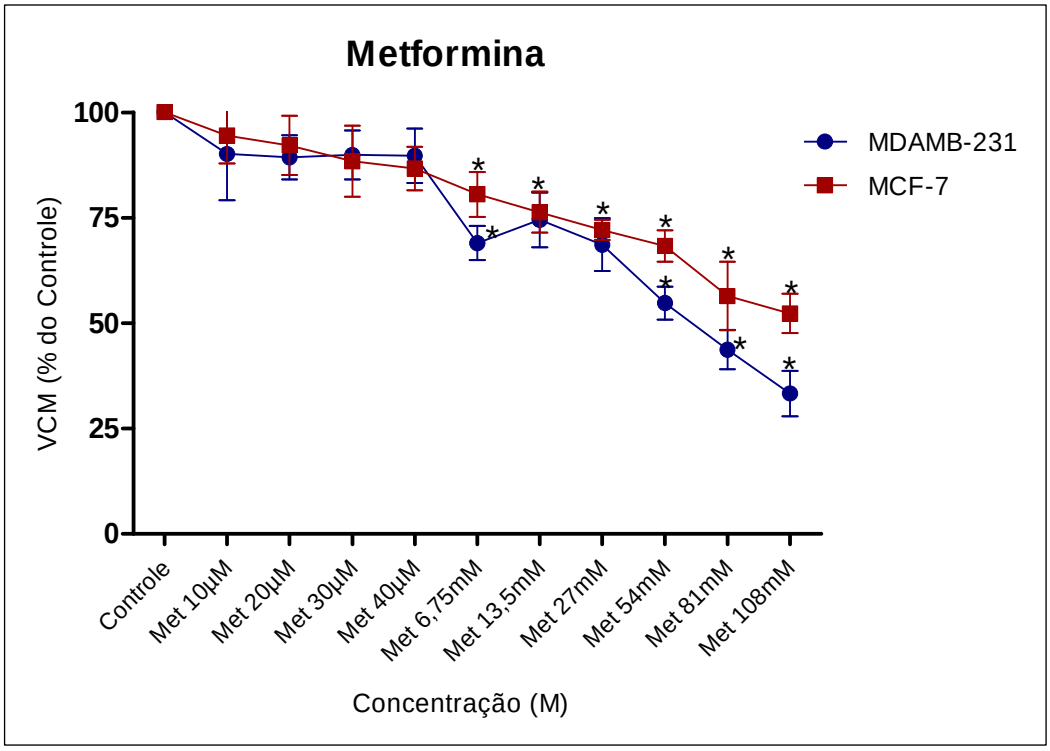


Figura 8: Efeitos da metformina na proliferação celular das linhagens MDAMB231 e MCF7, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. *p < 0,05 quando comparado à condição Controle. Os resultados representam a média e desvio padrão (±) de 3 experimentos independentes.

Dados da literatura têm demonstrado que a metformina é eficaz contra subtipos diferentes de CAM, sendo seu efeito independente da expressão de RE, RP, HER2 ou p53 pelas células tumorais. Por isso, tem-se atribuído benefício clínico ao uso de metformina como boa opção terapêutica contra tumores mamários de modo geral (ALIMOVA et al., 2009; LIU et al., 2009). Esses dados são corroborados pelos nossos estudos, pois tanto a linhagem de TNBC MDAMB231 quanto a linhagem luminal A MCF7 tiveram inibição significativa da proliferação celular na presença de metformina; entretanto, desde que a mesma seja empregada em concentrações superiores àquelas sabidamente seguras ao ser humano. Sendo assim, consideramos que devemos conduzir experimentos em que o efeito antiproliferativo da metformina seja testado em diferentes períodos de tratamento e condições de aporte energético. É nosso entendimento que somente assim poderemos, de fato, compreender melhor a contribuição das diferentes concentrações da droga no tratamento do CAM. Especialmente porque dois estudos independentes mostraram redução significativa no índice de proliferação celular por meio da avaliação da expressão da proteína Ki67 em pacientes não diabéticas

recém diagnosticadas com CAM que realizaram tratamento com metformina 1500mg/dia até a realização da intervenção cirúrgica na mama (NIRAULA et al., 2012; HADAD et al., 2012).

Por sua vez, e conforme enfatizado previamente, o TNBC configura doença heterogênea e de prognóstico ruim, dentre outras razões, por não ser suscetível ao emprego de terapias-alvo disponíveis comercialmente e pelo elevado índice de relapso da doença em detrimento da responsividade inicial satisfatória aos antineoplásicos convencionais (especialmente os derivados antraciclínicos, como doxorrubicina e epirrubicina) (ROUZIER et al., 2005; CAREY 2006). Sendo assim, há urgência na identificação de substâncias alternativas capazes de controlar o progresso da doença, como ora apresentado em relação à metformina e TNBC. Conforme supracitado, nossos estudos *in vitro* sugerem que a metformina tem maior eficácia e potência contra TNBC quando comparado aos tumores luminal A (MDAMB231 vs. MCF7, respectivamente), apontando que o aprofundamento dos estudos referentes ao emprego da substância no combate ao TNBC é de fundamental importância, posto que a doença configura um dos grandes desafios da oncologia clínica.

Motivados pelos nossos resultados experimentais, prosseguimos com os estudos focando, a partir deste momento, no efeito promissor da metformina no tratamento de TNBC.

4.2. METFORMINA POTENCIALIZA OS EFEITOS DA DOXORRUBICINA E PACLITAXEL NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR NA LINHAGEM MDAMB-231

A partir dos resultados anteriores, investigamos o impacto da adição da metformina aos tratamentos com os quimioterápicos convencionais, doxorrubicina e paclitaxel na linhagem celular MDAMB231. Avaliamos a proliferação celular, pelo método de MTT, utilizando as concentrações descritas na Tabela 5, tomando como parâmetro a IC_{50} da droga, a qual, como dito anteriormente, consiste em dose ordens de grandeza superior àquelas usadas no manejo do DM2.

Como descrito anteriormente, os regimes quimioterápicos atualmente empregados no tratamento do TNBC estão associados a índices elevados de toxicidade, como a importante cardio e neurotoxicidade causada pela doxorrubicina e pelo paclitaxel, respectivamente. Procuramos, então, avaliar o possível benefício da terapia combinada de metformina e os quimioterápicos, doxorrubicina e paclitaxel, em diferentes concentrações.

Como pode ser verificado por meio dos dados expostos na Figura 9A, a adição da metformina ao tratamento com a doxorrubicina potencializou a inibição da proliferação celular causada pela antraciclina na concentração de IC_{25} (0,18 mM) e IC_{50} (0,36 mM) (Figura 9A), quando comparado à antraciclina em monoterapia. A utilização da doxorrubicina é limitada por provocar cardiotoxicidade severa e irreversível nas usuárias, de modo que esquemas terapêuticos que permitam a diminuição das doses utilizadas da droga são de grande valia na clínica oncológica. Adicionalmente, o tratamento concomitante de metformina e doxorrubicina em modelos animais preveniu a cardiotoxicidade induzida pela antraciclina por meio da ativação de AMPK e de seus efeitos antioxidantes (ASHOUR et al., 2012). Considerando que a cardiotoxicidade provocada pela doxorrubicina decorre da produção de radicais livres que deterioram irreversivelmente os cardiomiócitos, pode-se especular que a adição da metformina aos esquemas antineoplásicos baseados em antraciclinas pode conferir benefícios extra proliferativos, os quais incluem, possivelmente, a proteção cardíaca.

Podemos observar que os regimes combinados entre o paclitaxel e a metformina também provocaram redução na proliferação celular (Figura 9B). O aumento significante da dose na monoterapia com o taxano não reflete em maior inibição da proliferação celular (Figura 7), portanto, regimes que proporcionam o uso de doses menores do taxano, potencializando a redução na proliferação celular podem ser vistas como terapias mais seguras e eficazes no combate ao TNBC. A combinação das duas drogas na concentração de IC_{50} estimada resultou em aumento de 23,65% na inibição da proliferação celular, quando comparado ao efeito do taxano em monoterapia (0,25 µM). Interessantemente, ao compararmos essa combinação (paclitaxel 0,25 µM + metformina 54 mM) com paclitaxel 0,5 µM (dobro da IC_{50}), observamos aumento de 22,50% na inibição da proliferação celular,

indicando que o emprego de doses maiores do taxano com a metformina 54 mM não apresenta benefício em potencializar a inibição da proliferação celular de MDAMB231. Entretanto, como já discutido, a própria segurança de concentrações tão elevadas de metformina, quando comparadas àquelas de sua ação hipoglicemiante, permanece desconhecida. Sendo assim, nos sentimos motivados em investigar o efeito de doses baixas e sabidamente seguras de metformina na atividade antiproliferativa de paclitaxel e doxorrubicina em linhagem TNBC MDAMB231.

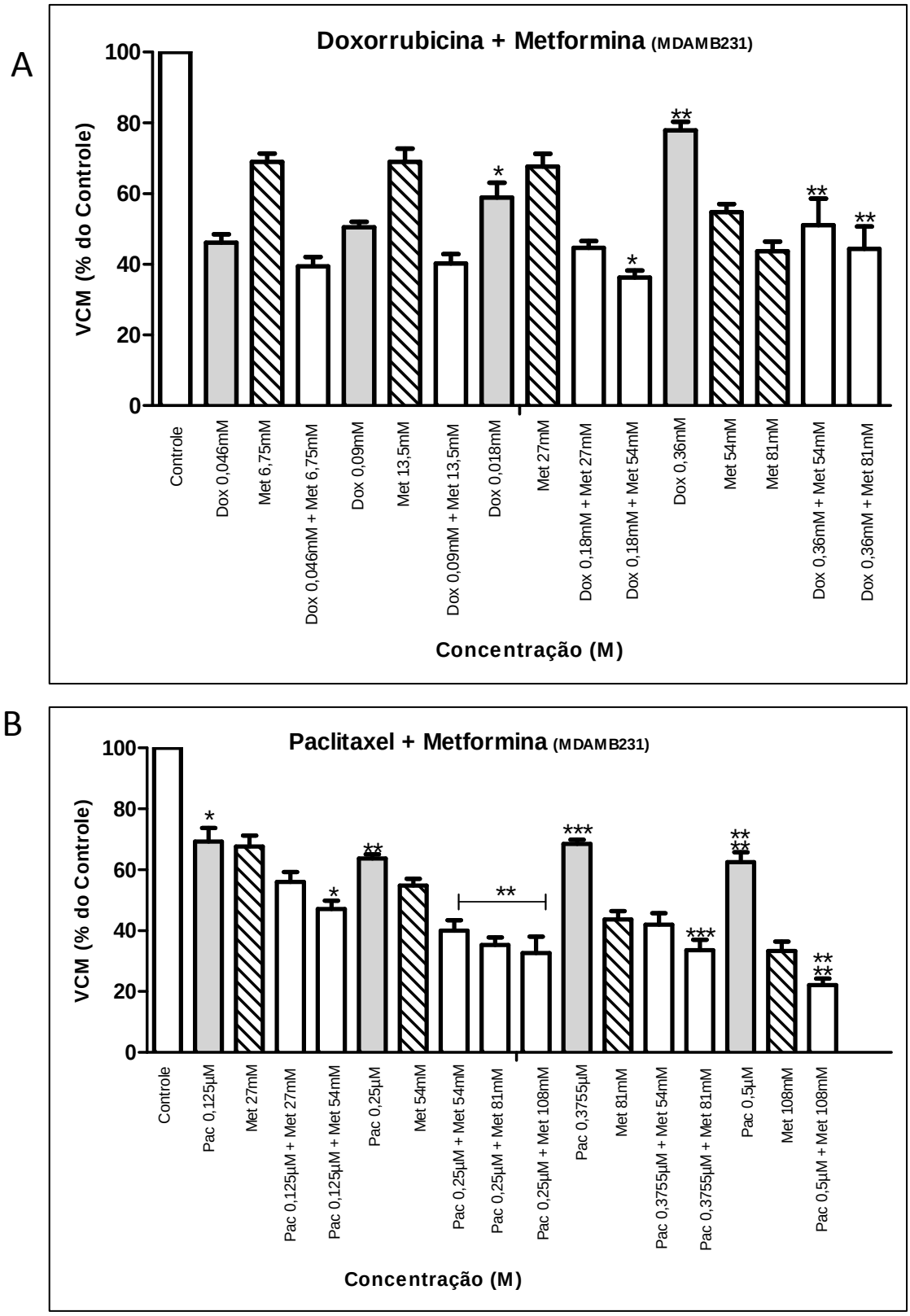


Figura 9: (A) Efeitos da combinação entre a metformina e doxorrubicina na proliferação celular da linhagem MDAMB231, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. *p < 0,05 quando comparado à condição doxorrubicina 0,18 mM. **p < 0,05 quando comparado à

condição doxorrubicina 0,36 mM. (B) Efeitos da combinação entre a metformina e paclitaxel na proliferação celular da linhagem MDAMB231, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. *p < 0,05 quando comparado à condição paclitaxel 0,125 µM **p < 0,05 quando comparado à condição Paclitaxel 0,25 µM ***p < 0,05 quando comparado à condição paclitaxel 0,375 µM ****p < 0,05 quando comparado à condição paclitaxel 0,5 µM. Os resultados representam a média e desvio padrão (±) de 3 experimentos independentes.

4.3. CONCENTRAÇÕES BAIXAS DE METFORMINA POTENCIALIZAM OS EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS DO PACLITAXEL, MAS NÃO DA DOXORRUBICINA, NA LINHAGEM TNBC MDAMB231

Os resultados mostrados até o presente momento evidenciam o marcado efeito antiproliferativo da metformina em duas circunstâncias distintas, porém igualmente interessantes para o controle do TNBC: i) metformina, em sua IC_{50} (54 mM), promove redução significativa da proliferação de MDAMB231; ii) metformina, em concentrações elevadas quando comparadas às empregadas no manejo do DM2, potencializa o efeito antiproliferativo de doxorrubicina e paclitaxel. Entretanto, intrigados pelas observações do estudo epidemiológico realizado por Jiralerspong e colaboradores (JIRALERSPONG et al., 2009), no qual mulheres portadoras de CAM em uso da metformina apresentaram uma pCR maior do que aquelas sob outras terapias antidiabéticas, fomos motivados a avaliar o possível benefício do uso de metformina em dose baixa (10 µM) em terapia combinada com doxorrubicina ou paclitaxel no tratamento do CAM, administrados nas concentrações listadas na Tabela 5.

Adicionalmente, foi comprovado que pacientes diabéticos usuários de metformina apresentam incidência significativamente inferior de câncer (Tabela 2) do que aqueles em outras terapias hipoglicemiantes diferentes da metformina. Por fim, há de se considerar que doses baixas de metformina são seguras mesmo em pacientes não diabéticos (BODMER et al., 2008). Vale salientar que, como metformina 10 µM em monoterapia, não teve ação antiproliferativa em nenhuma das duas linhagens de CAM incluídas neste trabalho, conduzimos experimentos tanto em MDAMB231 e MCF7 objetivando determinar se o possível efeito benéfico da dose baixa de metformina em politerapia com doxorrubicina ou paclitaxel pode

ocorrer nos dois subtipos de CAM ou se é fenômeno preponderante em um subtipo em detrimento do outro.

Os resultados compilados na Figura 10 revelam que o efeito antiproliferativo do paclitaxel, observado em ambas as linhagens de CAM, de cerca de 40% e 50% em MDAMB231 e MCF7, respectivamente, foi aumentado pela adição de metformina 10 µM somente na linhagem de TNBC, mas não na de CAM luminal A. De fato, a proliferação celular diminuiu de 68,48% para 46,49% com o tratamento das células de TNBC com paclitaxel na concentração de 0,375 µM (IC_{75}) e paclitaxel 0,375 µM associado à metformina 10 µM, respectivamente. Cumpre ressaltar que embora não tenhamos encontrado significância estatística entre os tratamentos da linhagem MDAMB231 quando paclitaxel foi adicionado em sua IC_{50}, isto é, 0,25 µM, a proliferação celular diminuiu de 63,65% para 46,77% com paclitaxel em monoterapia e em terapia combinada com metformina 10 µM, respectivamente, sendo a diferença entre as variações na proliferação celular nas duas condições experimentais (paclitaxel em IC_{50} ou IC_{75}) de apenas 5,11%. Desse modo, do ponto de vista clínico, em que se vislumbra sempre o risco-benefício dos tratamentos ao paciente, compreendemos que não vale aumentar a dose de paclitaxel para sua IC_{75}, mas mantê-la em sua IC_{50}, conferindo à paciente de CAM maior possibilidade de tolerar o tratamento por não aumentar as chances de desenvolvimento de neurotoxicidade.

Há poucos relatos na literatura documentando ensaios de avaliação da atividade antineoplásica da terapia combinada composta por paclitaxel e metformina. Em uma das publicações, Rocha e colaboradores (ROCHA et al., 2011) testaram a eficácia da combinação de drogas na linhagem de CAM luminal A MCF7, bem como na linhagem de câncer de pulmão H549, e notaram que há sinergismo entre paclitaxel e metformina em ambas as linhagens (MCF7: paclitaxel 1 nM + metformina 1 mM; H549: paclitaxel 1 nM + metformina 10 mM). Entretanto, o sinergismo não mudou na linhagem MCF7 quando a concentração de paclitaxel foi aumentada para 10 nM, enquanto que o efeito foi progressivo na linhagem H549. Confrontando esses dados com os derivados do presente trabalho, especulamos que, dada a menor sensibilidade da linhagem MCF7 à metformina, se comparada à linhagem MDAMB231, é possível que a concentração que empregamos de

metformina (1 mM, Rocha et al. vs. 10 µM, este estudo) não tenha sido suficiente para promover sinergismo entre as duas drogas.

Por outro lado, Iliopoulos e colaboradores (ILIOPOULOS, HIRSCH, STRUHL K, 2011) induziram formação de tumor em xenotransplantados com células MDAMB231 e verificaram sinergismo entre paclitaxel e metformina na redução da taxa de crescimento do tumor e no prolongamento da remissão da doença. Vale destacar, no entanto, que a concentração de metformina utilizada pelo grupo foi dez vezes maior do que a empregada no nosso estudo, isto é, 100 µM, da qual não se tem certeza da segurança às pacientes de CAM.

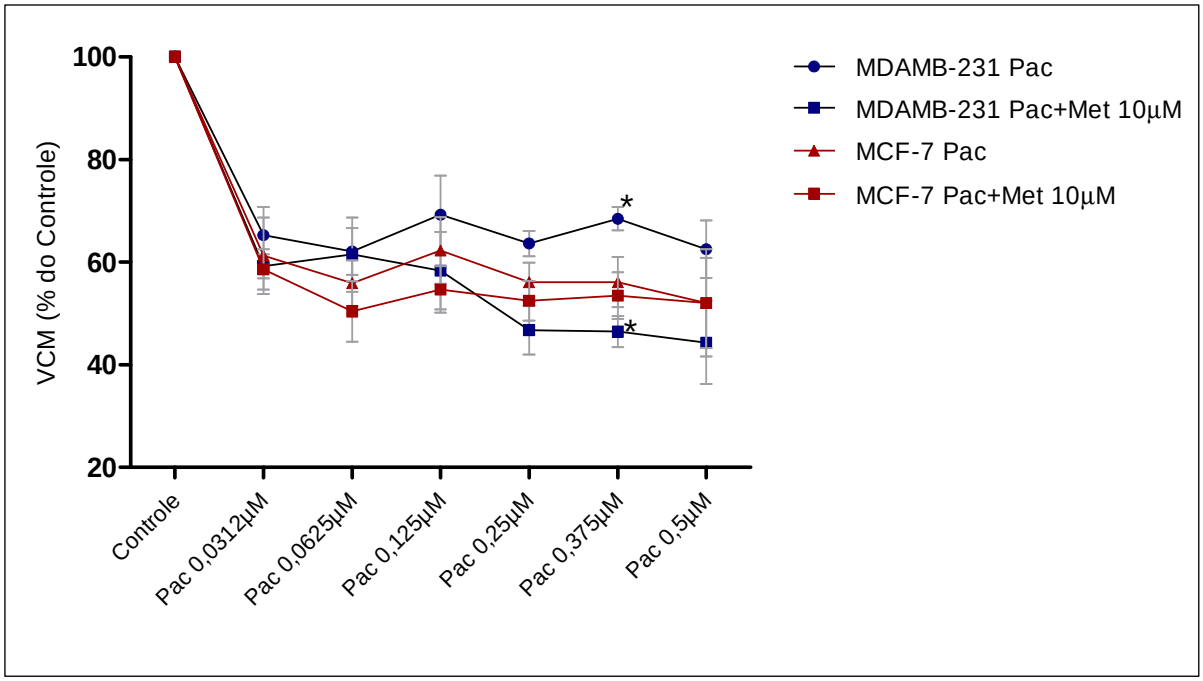


Figura 10: Efeitos da combinação entre a metformina (10 µM) e paclitaxel na proliferação celular da linhagem MDAMB231, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. *p < 0,05 quando comparado à condição Paclitaxel 0,375 µM. Os resultados representam a média e desvio padrão (±) de 3 experimentos independentes.

Em contraste ao observado com paclitaxel, metformina 10 µM não potencializou o efeito antiproliferativo da doxorrubicina na linhagem de TNBC tampouco na linhagem de CAM luminal A (Figura 11). Estudos realizados por Iliopoulos e colaboradores relataram o benefício da adição de doses consideradas baixas pelos autores de metformina (100 a 300 µM) nos esquemas terapêuticos com

doxorrubicina. Esses pesquisadores (ILIOPOULOS, HIRSCH, STRUHL K, 2011) reportaram que a combinação da antraciclina com a metformina em modelos animais transfectados com diferentes linhagens de CAM impediu o crescimento tumoral e preveniu o relapso da doença. A combinação das duas drogas permitiu diminuir em quatro vezes a concentração da doxorrubicina necessária à observação de seu efeito antineoplásico (ILIOPOULOS, HIRSCH, STRUHL K, 2011). Muito embora a diminuição da dose de doxorrubicina possa conferir proteção à paciente contra a cardiotoxicidade provocada pela droga, a segurança do uso de metformina nas concentrações de 100 a 300 µM permanece desconhecida. Considerando que as decisões dos esquemas terapêuticos se valem da análise de risco-benefício para o paciente, é fundamental que se avalie a possível toxicidade da dose empregada pelos autores com fins ao esclarecimento da aplicabilidade clínica da combinação proposta pelo grupo. Hirsch e colaboradores (HIRSCH et al., 2009) por sua vez, relataram que a metformina (100 a 300 µM) reduziu eficientemente a população de células com o fenótipo $CD44^{high}/CD24^{low}$, característico de células tronco tumorais. Ademais, quando combinada com a doxorrubicina em modelos animais xenográficos, a metformina reduziu a massa tumoral e retardou a recorrência da doença, comparado à antraciclina em monoterapia. Enquanto as ressalvas quanto às doses de metformina utilizadas pelos autores foram previamente destacadas, consideramos importante avaliarmos, sob nossas condições experimentais, o efeito da metformina 10 µM sobre as células tronco tumorais em modelos de TNBC, as quais são consideradas células iniciadoras do câncer dado seu potencial de auto renovação e de agressividade tumoral.

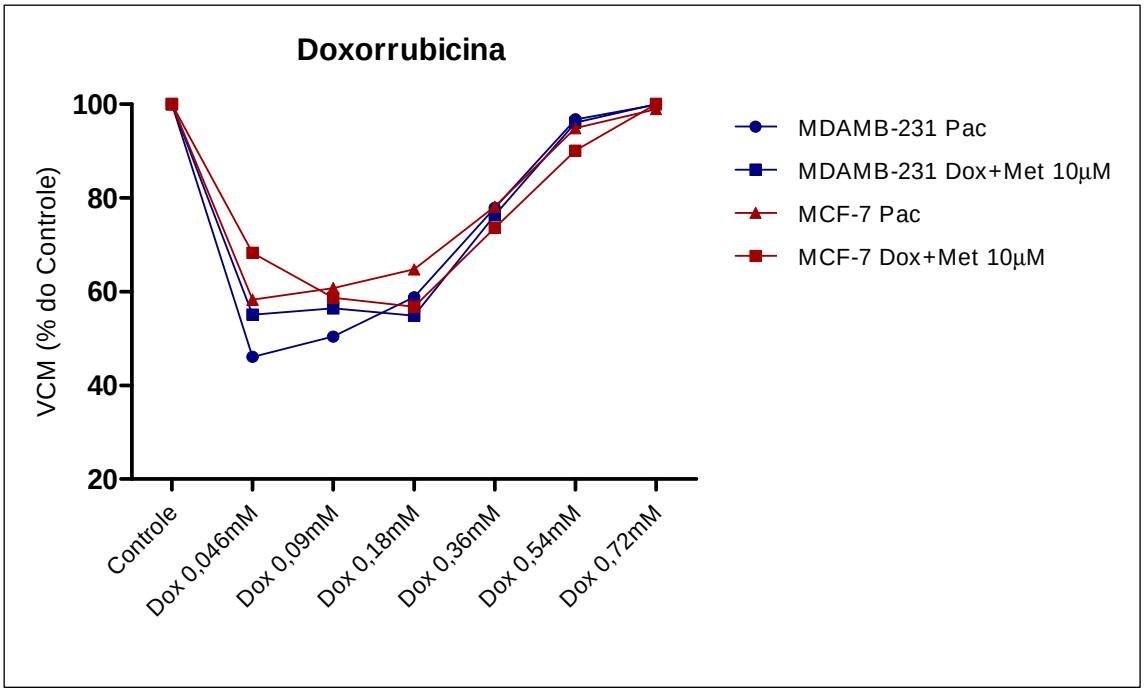


Figura 11: Efeitos da combinação entre a metformina (10 µM) e doxorrubicina na proliferação celular da linhagem MDAMB231, em tratamento de 24 horas, avaliada pelo método de MTT. Células não tratadas foram utilizadas como controle. Teste ANOVA de uma via com post test de Bonferroni. Os resultados representam a média e desvio padrão (±) de 3 experimentos independentes.

4.4. O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE TNBC MDAMB231 É MODULADO DIFERENCIALMENTE POR CONCENTRAÇÕES DISTINTAS DE METFORMINA E PELA COMBINAÇÃO SINÉRGICA ENTRE METFORMINA E PACLITAXEL.

Classicamente, o paclitaxel exerce sua ação antineoplásica por meio da interação com a β-tubulina promovendo a sua polimerização e formação de microtúbulos estáveis, mesmo na ausência de GTP e proteínas associadas aos microtúbulos, essenciais para o processo. Assim, o paclitaxel inibe a despolimerização dos microtúbulos bloqueando o ciclo em G2/M (revisado por GUIMARAES et al., 2013). Conclui-se, portanto, que o paclitaxel é quimioterápico dependente de fase específica do ciclo celular e age exclusivamente em células que estejam na fase de mitose (M) do mesmo. Sendo assim, questionamos, inicialmente, se a combinação de metformina e paclitaxel exerce efeitos sobre o ciclo celular de células de TNBC (MDAMB231).

Os dados compilados na Figura 12 sugerem perfil extremamente intrigante de controle diferencial do ciclo celular por concentrações distintas de metformina, bem como pela combinação de paclitaxel e metformina em concentrações variadas de ambos os fármacos empregados concomitantemente. Em concordância com informações bem estabelecidas na literatura, observamos preponderância da fase G0/G1 do ciclo celular, em relação às demais fases do mesmo, na condição de controle, em que as células não receberam tratamento farmacológico algum. Por sua vez, em relação ao controle, metformina 10 µM tende a aumentar o número de células na fase G0/G1, enquanto diminui a fração de células na fase G2/M do ciclo celular. O fenômeno é intensificado na presença de metformina 27 mM (IC_{25} da droga), situação em que a quantidade de células na fase G2/M parece ser reduzida próximo à metade daquela observada com metformina 10 µM. Fato notório é o aumento da fração de células na fase sub-G0, marcada por células em estágio de morte celular avançado. De modo análogo, Liu e colaboradores (LIU et al., 2009) observaram parada do ciclo celular de células MDAMB231 na fase G1 quando as mesmas foram tratadas com metformina 20 mM. É importante mencionar que consta na literatura que a metformina diminui a expressão de ciclina D1, regulador do ciclo celular essencial para a progressão da fase G1 (revisado por MELOCHE & POUYSSÉGUR 2007). Por outro lado, o tratamento de células MDAMB231 com metformina 54 mM (IC_{50} da droga) culminou com a restauração da fração de células em fase G0/G1 do ciclo celular aos valores da condição controle. Aliado a isso, houve aumento da quantidade de células na fase G2/M, bem como na fase sub-G0, apontando para incremento no número de células em morte celular tardia sob a condição experimental. Por sua vez, conforme esperado e previamente discutido, paclitaxel 0,25 µM (IC_{50} da droga) causou parada do ciclo celular na fase G2/M.

Ao avaliarmos o efeito da combinação de paclitaxel com metformina sobre o ciclo celular de MDAMB231, constatamos fato tanto inusitado quanto intrigante. A administração concomitante de paclitaxel (IC_{50} = 0,25 µM) e metformina (10 µM) resultou em aumento da fração de células na fase G2/M. Os achados podem explicar, ao menos parcialmente, o sinergismo observado entre as duas drogas nos experimentos de proliferação celular. Isso porque, de acordo com o mecanismo de ação do paclitaxel, a droga exerce sua ação antineoplásica majoritariamente em células em fase de mitose (M) do ciclo celular. Logo, a metformina 10 µM parece

favorecer a ação antineoplásica do paclitaxel (IC_{50} = 0,25 µM). Em contraste, o tratamento da linhagem de TNBC MDAMB231 com paclitaxel (IC_{50} = 0,25 µM) e metformina (IC_{50} = 54 mM) aumentou consideravelmente o número de células na fase sub-G0, mecanismo que justifica, ao menos em parte, a ação citotóxica da metformina contra MDAMB231 quando essa é empregada em sua IC_{50}. Interessantemente, nessa condição experimental, a quantidade de células em G2/M foi reduzida pelo tratamento. Essa observação é sugestiva de que o sinergismo observado entre paclitaxel e metformina, quando ambas as drogas são administradas em suas IC_{50}, decorre do favorecimento do mecanismo de ação citotóxico da metformina pelo paclitaxel; embora não se possa descartar o contrário.

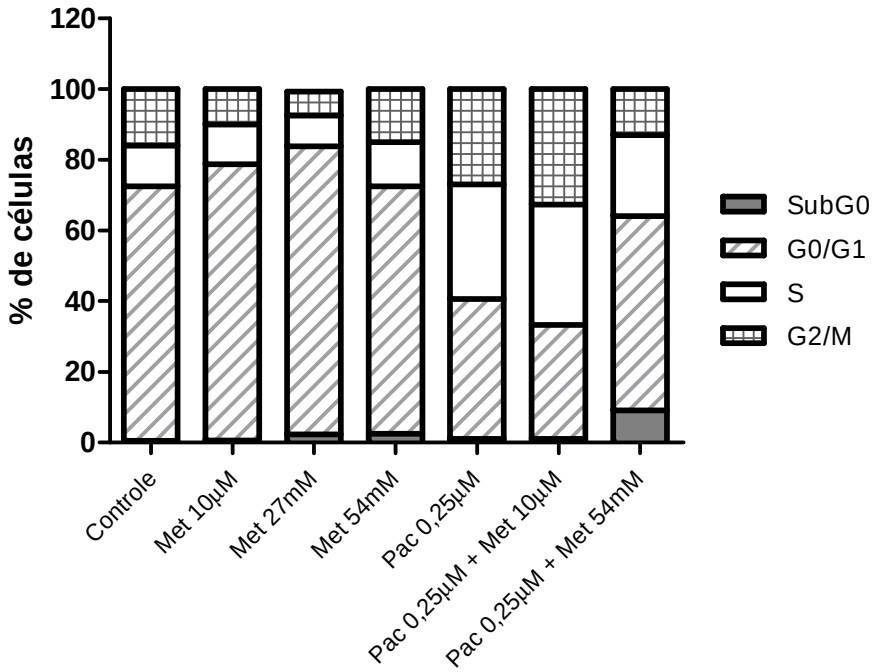


Figura 12: Análise do ciclo celular na linhagem MDAMB231 tratadas por 24 com doses crescentes de metformina, paclitaxel na IC50 estimada (0,25 µM) e a combinação entre paclitaxel e metformina em diferentes concentrações (paclitaxel 0,25 µM + metformina 10 µM; paclitaxel 0,25 µM + metformina 54 mM). As análises foram feitas no equipamento BD Accuri® C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra utilizando o canal FL-2 (585nm).

Em suma, nosso estudo apresenta evidências de que o sinergismo entre paclitaxel e metformina é mútuo, sendo o efeito resultante sobre o ciclo celular dependente da concentração de metformina utilizada como estratégia terapêutica.

Enquanto ambas as condições de tratamento, bem como o emprego de metformina 54 mM como monoterapia, parecem eficazes quanto ao controle da proliferação celular de MDAMB231, cumpre salientar que a segurança do uso de metformina em doses dramaticamente maiores àquelas empregadas no controle de DM2, cuja toxicidade baixa é bem estabelecida, permanece desconhecida. Entretanto, nosso grupo pretende conduzir ensaios de toxicidade *in vivo* com fins à determinação da segurança do uso de doses altas de metformina em regimes terapêuticos curtos e longos. Outrossim, se comprovarmos que as referidas doses de metformina são seguras, é importante estratificar a população de TNBC para determinar características capazes de direcionar a escolha do esquema terapêutico mais adequado a cada subpopulação da doença. Por fim, é oportuno informar que, de nosso conhecimento, esses dados são inéditos.

4.5. METFORMINA INIBE A ATIVAÇÃO CONSTITUTIVA DE ERK1/2 NA LINHAGEM MDAMB231 DE MODO INDEPENDENTE DA DOSE QUANDO EMPREGADA EM MONOTERAPIA, MAS SOMENTE EM CONCENTRAÇÕES ELEVADAS QUANDO USADA EM COMBINAÇÃO COM PACLITAXEL OU DOXORRUBICINA

Com o intuito de compreendermos melhor o papel da metformina no regime terapêutico do TNBC, realizamos análises de expressão proteica da proteino cinase ERK1/2, através da técnica de Western Blot. O racional para a investigação se pauta em três aspectos relevantes: i) estudos apontam que a ativação da via de MEK/ERK1/2 está correlacionada com perfil mais agressivo do CAM, como é o caso dos TNBC (ADEYINKA et al., 2002; SIVARAMAN et al., 1997), ii) tumores triplo-negativos comumente apresentam superexpressão de EGFR e amplificação ou mutação do oncogene KRAS resultando na super-ativação da via de ERK1/2 (revisado por MIRZOEVA et al., 2009); iii) a associação da via de ERK/12 à quimiorresistência ao paclitaxel, quimioterápico rotineiramente empregado na terapia do TNBC (MACKEIGAN et al., 2002).

Conforme mostrado na Figura 13, nossos resultados experimentais são sugestivos de ativação constitutiva da via de sinalização celular de MEK/ERK 1/2 na linhagem MDAMB231, posto que a condição experimental em que as células não

receberam nenhum tratamento farmacológico (controle) apresentou marcada expressão de ERK 1/2 fosforilado em detrimento da síntese sustentada de ERK total. Interessantemente, a metformina reverteu a ativação constitutiva da via de sinalização celular em questão, independente da concentração empregada (10 µM, 27 mM e 54 mM), salientando que esse pode ser um dos mecanismos antiproliferativos da droga na linhagem MDAMB231. Notamos, ainda, que o tratamento com paclitaxel 0,25 µM, bem como de sua combinação com metformina 10 µM não reverteu a ativação constitutiva de ERK1/2 em MDAMB231, de modo que a via de sinalização celular não parece ser o mecanismo de ação responsável pelo efeito sinérgico das duas drogas, nessa condição experimental, no controle da proliferação das células de TNBC. Entretanto, o tratamento de MDAMB231 com doses maiores de metformina (54 mM) em conjunto com o taxano (0,25 µM) reverteu a ativação constitutiva da via de MEK/ERK1/2 na linhagem de TNBC, explicando, ao menos em parte, o sinergismo entre as duas drogas mediado pela inibição da via capaz de conferir quimiorresistência ao paclitaxel. Cumpre notar que a doxorrubicina diminuiu a expressão de ERK1/2 total; além disso, combinação com a metformina 54mM resultou em decréscimo da fosforilação de ERK1/2. Assim, postulamos que: i) a redução da expressão de ERK total pode comprometer o sinergismo entre doxorrubicina e metformina na linhagem MDAMB231 e/ou ii) a ativação constitutiva da via não consiste em fator associado à quimiorresistência à doxorrubicina, uma vez que mesmo revertendo o fenômeno, a metformina não confere benefícios à ação da antraciclina no controle da proliferação celular de MDAMB231.

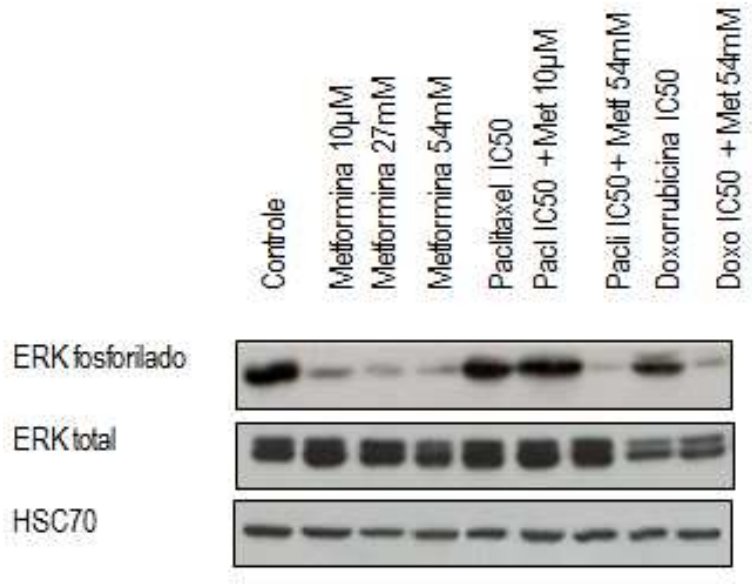


Figura 13: Análise da expressão e fosforilação no resíduo Thr202/Tyr204 da proteino cinase ERK1/2, por Western Blot, na linhagem MDAMB231, tratada por 24 com doses crescentes de metformina, paclitaxel na IC50 estimada (0,25 µM) e a combinação entre paclitaxel e metformina em diferentes concentrações (paclitaxel 0,25 µM + metformina 10 µM; paclitaxel 0,25 µM +metformina 54 mM). Utilizou-se o HSC70 como controle interno dos experimentos.

A ativação constitutiva na via de ERK1/2 retratada nos nossos estudos pode ser explicada pelo fato da linhagem celular MDAMB231 expressar EGFR (SUBIK et al., 2010) e KRAS mutado, resultando em expressão de variante de ERK com maior ativação do que a proteína selvagem (LEE et al., 2013). Importante frisar que tanto EGFR quanto Ras são reconhecidos reguladores da atividade de ERK1/2.

Liu e colaboradores (LIU et al., 2009) reportaram a inibição da fosforilação de ERK1/2 utilizando diferentes doses de metformina (10 mM a 40 mM) em tratamentos de 24h na linhagem MDAMB231. Nossos resultados, no entanto, mostram que a inibição da ativação constitutiva de ERK1/2 ocorre até em doses muito mais baixas de metformina (10 µM). Ainda, assim como no estudo de Liu et al. (LIU et al., 2009), o efeito não parece ser dose dependente, pois o aumento da concentração de metformina não diminuiu expressivamente a fosforilação de ERK1/2.

A reversão da ativação de ERK1/2 observada na combinação de metformina e paclitaxel, ambas na IC_{50} estimada, deve-se à ação da biguanida, pois o tratamento com paclitaxel em monoterapia não alterou a ativação de ERK1/2. Essa

reversão pode, ao menos parcialmente, explicar o aumento significativo da inibição da proliferação celular de MDAMB231 causada pela combinação das drogas (59,9%) se comparado ao paclitaxel em monoterapia (36,34%). Isso porque a via de MEK/ERK1/2 está, sabidamente relacionada à sobrevivência celular. Cumpre ressaltar, ainda, que vários estudos documentaram que o tratamento com paclitaxel, em diferentes linhagens celulares e concentrações diversas (1 a 1000nM) resulta na ativação da via de ERK1/2 (MACKEIGAN et al., 2002; OKANO & RUSTGI, 2001), resultando na aquisição de fenótipo resistente ao taxano. Ademais, a inibição farmacológica de ERK1/2 por meio do uso de inibidores da via da MAPK resultou em aumento significativo de apoptose induzida pelo paclitaxel em linhagens de CAM, pulmão e ovário, quando comparado às drogas em monoterapia (SEIDMAN et al., 2001; MACKEIGAN et al., 2002; MACKEIGAN et al., 2000).

4.6 ENSAIOS DE MODELAGEM MOLECULAR SUGEREM QUE METFORMINA NÃO INTERAGE DIRETAMENTE COM ERK1/2 NEM MEK1/2

Não obstante o benefício bem estabelecido do uso de metformina no manejo do DM2, bem como das evidências crescentes de sua ação antineoplásica, os mecanismos de ação por meio dos quais a droga modula as funções celulares não estão completamente esclarecidos. Dentre os mecanismos de ação já descritos estão a inibição da absorção intestinal de glicose, a ativação de AMPK (resultando na inibição de mTOR), a inibição do complexo I da cadeia respiratória, a inibição de células tronco tumorais (logo, de células iniciadoras do câncer), redução de IGF1, inibição da ciclina D1, aumento da ativação de RagGTPase (DOWLING et al., 2007; ALJADA & MOUSA, 2012; OWEN, DORAN, & HALESTRAP, 2000; e EL-MIR et al., 2000 KALENDER et al., 2010; VAZQUEZ-MARTIN et al., 2010). Embora tenha sido reportado que a metformina reduz a expressão de ERK fosforilado em células de câncer de pulmão KRAS mutado (dados ainda não publicados, KITAGAWA et al,), não há relatos acerca do modo de ação da droga sobre a proteína. Como nossos resultados também apontam para importante participação de ERK no mecanismo antineoplásico da metformina na linhagem MDAMB231, tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com paclitaxel, nos sentimos motivados a avaliar se a ação da metformina sobre ERK é direta ou indireta. Para tanto, nos valemos de ensaios *in silico* de modelagem molecular, os quais revelaram que a energia de

ligação da metformina tanto com MEK quanto com ERK não é favorável à interação direta entre as duas moléculas, quando comparado às energias de ligação de inibidores bem estabelecidos das proteínas de interesse. Sendo assim, sugerimos que a ação da metformina sobre a via de MEK/ERK se dá de modo indireto.

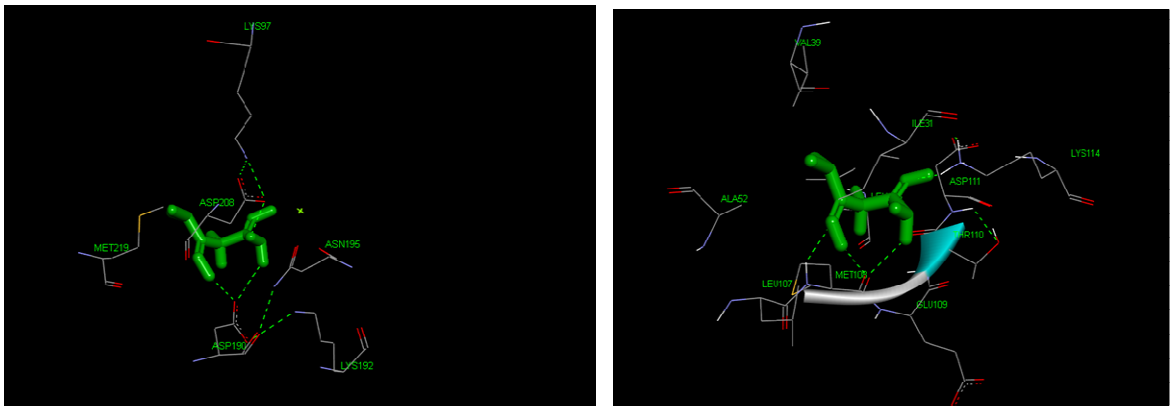
Tabela 11 - Estudos de ancoragem molecular entre a metformina e MEK. Foram utilizados dois inibidores da proteinocinase descritos na literatura (5Y01384 e PD98059) como controles das análises através dos valores da energia de ligação (Kcal/mol).

Docking com MEK1	
Ligante	**Energia de Ligação (Kcal/mol)**
5Y01384 (4AN3)	-8.7
PD98059	-9.0
Metformina	-5.4

Tabela 12 - Estudos de ancoragem molecular entre a metformina e ERK. Foram utilizados três inibidores da proteinocinase descritos na literatura (norathyriol, FR180204 e 19A) como controles das análises através dos valores da energia de ligação (Kcal/mol).

Docking com ERK2	
Ligante	**Energia de Ligação (Kcal/mol)**
Norathyriol (3SA0)	-7.8
FR180204 (1TVO)	-7.5
19A (2OJG)	-7.4
Metformina	-4.5

Nossos resultados nos permitem sugerir que, dentre outros possíveis mecanismos antineoplásicos, a metformina atua como inibidor indireto de mTOR (pela modulação de AMPK ou via RagGTPase) e de ERK, explicando, portanto, seu uso potencial no tratamento do TNBC, um dos grandes desafios da clínica oncológica contemporânea.



Metformina - MEK1/2 Metformina - ERK1/2

Figura 14: Estruturas representativas das análises de ancoragem molecular da metformina/MEK1/2 e metformina/ERK1/2.

4.7 METFORMINA, EM CONCENTRAÇÃO BAIXA OU ALTA, NÃO INDUZ APOPTOSE EM CÉLULAS DE TNBC MDAMB231, MAS POTENCIALIZA A INDUÇÃO DE APOPTOSE PELO PACLITAXEL DE MODO APARENTEMENTE DOSE-DEPENDENTE.

Os resultados dos experimentos que avaliaram o efeito da metformina e paclitaxel, em combinação, sobre o ciclo celular de MDAMB231, nos levaram a investigar a possível contribuição da ocorrência de apoptose e necrose como mecanismos de controle da proliferação celular da linhagem de TNBC. Para tanto, realizamos o ensaio de anexina V FITC/PI. Durante a ocorrência de apoptose há alterações celulares diversas, dentre elas a perda da simetria da membrana plasmática, resultando na exposição de fosfatidilserina (FS) na face externa da membrana celular. Essa translocação também ocorre na necrose, mas a permeabilidade da membrana diferencia os dois processos, pois no início da apoptose as células ainda estão com a membrana íntegra e na necrose as células estão permeáveis. A anexina V é uma proteína de ligação aos fosfolipídios cálcio-dependentes que possui elevada afinidade para a FS, mas não é capaz de penetrar na membrana plasmática de células viáveis, de modo a se ligar apenas nas células com a exposição da FS na face externa da membrana plasmática. Na análise dessa ligação por citometria de fluxo a anexina é conjugada a um fluorocromo (FITC) e se utiliza um intercalante de DNA (PI) que somente atua nas células permeáveis (revisado por Vermes et al., 1995). Esse ensaio permite a classificação das células

em: viáveis (anexina V FITC - e PI -), apoptóticas em estágio inicial (anexina V FITC + e PI -), apoptóticas avançadas (anexina V FITC + e PI +) e necróticas (anexina V FITC – e PI +).

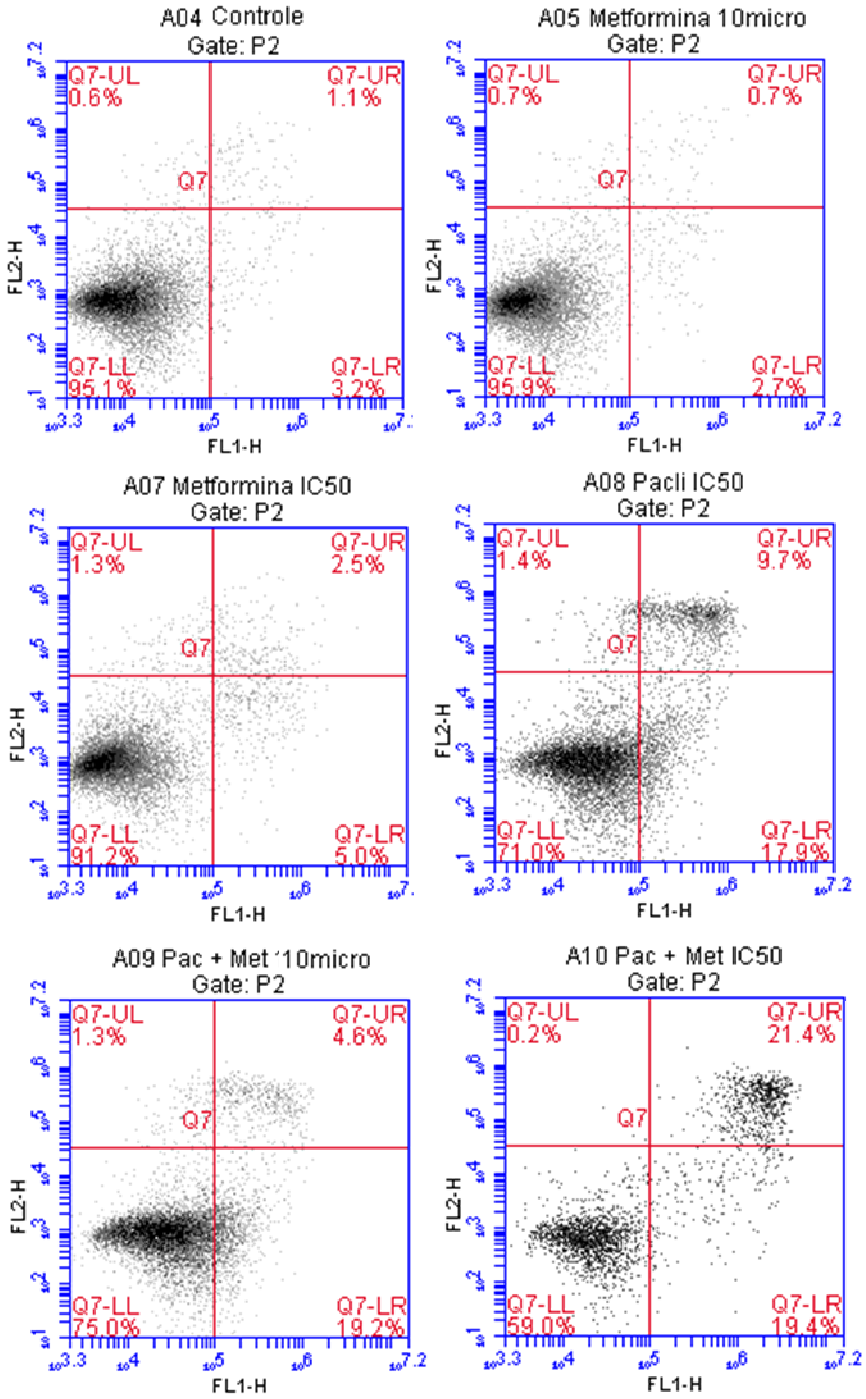


Figura 15: : Ensaio de anexina V FITC/PI realizado na linhagem MDAMB231 tratadas por 24 com metformina (metformina 10 µM e metformina 54 mM), paclitaxel na IC50 estimada (0,25 µM) e a combinação entre paclitaxel e metformina em diferentes concentrações (paclitaxel 0,25 µM +

metformina 10 µM; paclitaxel 0,25 µM + metformina 54 mM). As análises foram feitas no equipamento BD Accuri® C6 FlowCytometer, utilizando o software Summit v.4.3. Foram adquiridos 10.000 eventos (células) por amostra utilizando o canal FL-1 (530 nm) para a anexina V-FITC e o FL-2 (585 nm) para o PI.

Os resultados compilados na Figura 15 mostram que a monoterapia com metformina não induziu a morte das células MDAMB231 por apoptose ou necrose, independente da concentração da droga utilizada (10 µM ou 54 mM). De fato, apenas uma fração pequena do total de células avaliadas foi afetada pelos fenômenos, a saber: i) metformina 10 µM: 2,7% e 0,7% das células sofreram apoptose inicial e tardia, respectivamente, e 0,7%, necrose; ii) metformina 54 mM: 5% e 2,5% de células apoptóticas iniciais e tardias, respectivamente, e 1,3% de células necróticas. Por sua vez, paclitaxel em monoterapia em sua IC_{50} (0,25 µM) induziu apoptose inicial e tardia em 17,9% e 9,7% das células, respectivamente, e 1,4% das células sofreram necrose. A combinação de paclitaxel 0,25 µM e metformina 10 µM praticamente manteve inalterada a fração de células em apoptose inicial (19,2%), mas reduziu a fração de células apoptóticas tardias a aproximadamente metade daquela observada com paclitaxel sozinho, isto é 4,6%, enquanto que a percentagem de células necróticas permaneceu inalterada (1,3%). Por outro lado, o tratamento de MDAMB231 com paclitaxel 0,25 µM e metformina 54 mM aumentou o percentual de células em apoptose tardia para 21,4%, manteve inalterada a percentagem de células em apoptose inicial (19,4%) e praticamente aboliu a ocorrência de necrose (0,2%).

Nossos resultados estão em concordância com aqueles obtido por Zhuang e Miskimins (ZHUANG & MISKIMINS, 2008) que descreveram que a administração de metformina 8 mM por três dias a um painel de linhagens de CAM induziu apoptose em todas elas, exceto na MDAMB231. Em contraste, Liu e colaboradores (LIU et al., 2009) mostraram que metformina induziu apoptose em linhagens de CAM, incluindo MDAMB231, por meio de fenômeno que parece envolver a clivagem de PARP.

Ao confrontarmos os dados ora obtidos com os resultados derivados dos experimentos de influência de metformina e paclitaxel na proliferação celular, no

ciclo celular e na ativação da via de ERK1/2 em MDAMD231, encontramos aspectos que valem reflexão.

Tabela 13 - Dados compilados do presente estudo

Condição Experimental	Morte Celular Total Induzida (Apoptose + Necrose) (%)	Efeito no Ciclo Celular (Fase Prevalente)	Modulação da Via de ERK1/2 (Fosforilação de ERK1/2)	Percentual de Células Mortas (MTT) (%)
Metformina 10 µM	4,1%	+ G0/G1	- P-ERK 1/2	9,8%
Metformina 54 mM	8,8%	+ Sub-G0	- P-ERK 1/2	45,23%
Paclitaxel 0,25 µM	29,0%	+ G2/M	+ P-ERK 1/2	36,34%
Metformina 10 µM + Paclitaxel 0,25 µM	24,7%	+ G2/M	+ P-ERK 1/2	53,2%
Metformina 54 mM + Paclitaxel 0,25 µM	41,0%	- G2/M + Sub-G0	- P-ERK 1/2	59,9%

+: aumento; - : redução; P-ERK ½: ERK 1/2 fosforilado

Embora a porcentagem total de morte celular induzida via apoptose e necrose por metformina seja pequena, 4,1% (10 µM) e 8,8% (54 mM), a avaliação dos resultados do efeito da droga sobre o ciclo celular de MDAMB231 revelou incremento da fração de células na fase sub-G0 à medida em que se aumentou a concentração da mesmo de 10 µM para 54 mM. Se considerarmos a totalidade das células, apenas uma pequena parcela delas estava na fase sub-G0; aspecto concordante com o valor discreto, ainda que dobrado, de indução de morte celular por apoptose e necrose por metformina 54 Mm em comparação com a droga na concentração de 10 µM. Por outro lado, enquanto ambas as concentrações de metformina resultaram em reversão da fosforilação aparentemente constitutiva de ERK 1/2 em MDAMB231, fato que poderia contribuir com o efeito antineoplásico da metformina contra a linhagem de TNBC, essa somente reduziu a proliferação celular quando administrada em doses elevadas (10 µM vs. 54 mM, 9,8% vs. 45,23%, respectivamente). A observação nos leva a especular que a metformina, possivelmente, deflagra outros mecanismos de ação, como a indução de autofagia ou a inibição do complexo 1 da cadeia respiratória, dentre outros, os quais resultam na morte de células MDAMB231. O uso de paclitaxel 0,25 µM promoveu morte

celular por apoptose e necrose em 29% das células MDAMB231, valor compatível com o percentual de células mortas notadas nos experimentos de proliferação celular pelo método de MTT (36,34%). Apesar da parada do ciclo celular de MDAMB231 na fase G2/M, favorecendo seu mecanismo de ação previamente discutido, a eficácia antineoplásica limitada de paclitaxel na linhagem de TNBC estudada pode decorrer, ao menos em parte, da sustentação da fosforilação constitutiva de ERK 1/2, já relacionada à quimiorresistência ao taxano (MACKEIGAN et al., 2002; OKANO & RUSTGI, 2001). Por sua vez, a combinação de metformina 10 µM com paclitaxel 0,25 µM, embora tenha descrito sinergismo quanto à ação antineoplásica contra MDAMB231 (53,20% de células mortas pelo método de MTT), manteve constante o percentual de efeito mediado pela indução de apoptose e necrose quando comparado ao paclitaxel sozinho; novamente apontando que metformina exerce sua ação antiproliferativa por meio de outros mecanismos de ação na linhagem de TNBC estudada. De todo modo, a constância do efeito apoptótico/necrótico referida pode ser resultante do fato de que, apesar de haver aumento da fração de células em fase G2/M no ciclo celular de MDAMB231, tal a favorecer o efeito citotóxico do paclitaxel, nessa condição experimental, a metformina não foi capaz de reverter a fosforilação de ERK 1/2. Como já mencionado, a ativação da via de sinalização celular de ERK 1/2 se relaciona à quimiorresistência ao taxano. Por fim, quando ambas as drogas são administradas à linhagem MDAMB231 em suas IC_{50} (metformina 54 mM e paclitaxel 0,25 µM), o percentual total de células mortas por apoptose e necrose aumentou para 41%, valor mais próximo à diminuição da proliferação celular investigado pelo método de MTT (59,9% de células mortas). É notório que, nessa condição experimental, alguns aspectos se mostram de extrema relevância: i) houve reversão da ativação constitutiva de ERK 1/2 em MDAMB231, tal a favorecer a citotoxicidade de paclitaxel; ii) houve aumento da fração de células na fase sub-G0, marcada por células mortas. De fato, dos 41% de células mortas por apoptose e necrose, 21,4% derivaram de efeito apoptótico tardio nas células MDAMB231, fato que pode justificar o aumento do número de células na fase sub-G0. Tomados em conjunto, ainda nessa última condição experimental, nossos dados corroboram com discussão prévia que aponta para sinergismo mútuo da ação de metformina e paclitaxel contra células de TNBC MDAMB231.

Por fim, analisados em conjunto, nossos resultados1 nos induzem à ponderação importante quanto ao possível modelo de mecanismos celulares envolvidos no efeito de metformina como ferramenta terapêutica contra o TNBC (Figura 16), bem como sobre a estratificação dos referidos mecanismos em relação aos esquemas antineoplásicos mediados pela metformina, tanto em monoterapia quanto em terapia combinada com paclitaxel.

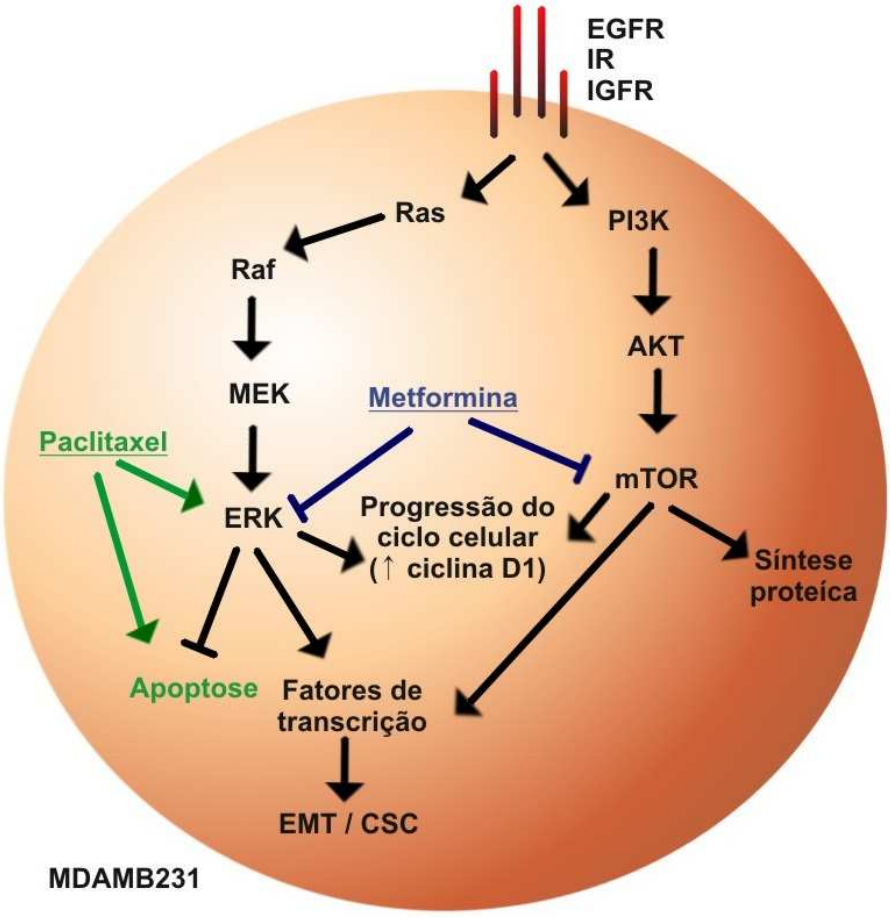


Figura 16: Modelo de mecanismos celulares possivelmente modulados pela metformina na linhagem de TNBC MDAMB231.Em preto, vias ativadas pela interação de fatores de crescimento com seus receptores, ou pela ativação constitutiva dos mesmos, como é o caso do EGFR na MDAMB231. Em azul, a ação dupla e indireta da metformina sobre a inibição das vias de Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. Em verde, efeitos do paclitaxel sobre ERK e as consequências sobre a sensibilidade de MDAMB231 à droga. EMT = Transição epitélio mesênquima; CSC = Células tronco tumorais.

Conforme o modelo proposto, a interação de fatores de crescimento com seus receptores do tipo tirosino cinase, aliada à ativação constitutiva dos mesmos como

acontece em relação ao EGFR em porção significativa dos TNBC, resulta na ativação de vias de sinalização celular como as de Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. Enquanto não podemos excluir a contribuição da segunda via no fenômeno observado no presente estudo, nossos resultados são sugestivos de ativação constitutiva da primeira via na linhagem de TNBC MDAMB231. Como resultado, dentre outras ações celulares, observa-se: i) progressão do ciclo celular da fase G0/G1 pelo aumento da expressão de ciclina D1; ii) aumento da síntese proteica de modo geral favorecendo o desenvolvimento e a progressão do tumor; iii) aumento da expressão de fatores de transcrição que contribuem, dentre outros, com o fenótipo EMT/CSC; esse relacionado à auto renovação de células consideradas iniciadoras do câncer, bem como à agressividade do tumor e à quimiorresistência a diversos agentes antineoplásicos; iv) inibição da apoptose, logo incremento da proliferação celular.

Ao passo que o efeito de metformina como inibidor indireto de mTOR tem sido explorado na literatura, nossos resultados mostram que a metformina reverte a ativação constitutiva de ERK 1/2 em MDAMB231, mas o faz por meio de inibição indireta da proteína. Isso porque nossas análises *in silico* de modelagem molecular revelaram que a interação direta da metformina tanto com MEK quanto com ERK é energeticamente desfavorável. Sendo assim, ainda que tenhamos que comprovar com experimentos futuros, propomos que a metformina pode atuar, em células de TNBC MDAMB231, como inibidor indireto duplo de ERK 1/2 e mTOR. Se esse for mesmo o caso, o resultado do uso de metformina no controle do TNBC é múltiplo e envolve, dentre outras ações: i) parada do ciclo celular na fase G0/G1 pela diminuição da expressão de ciclina D1; ii) redução global da síntese proteica mediada por mTOR, de modo a comprometer o desenvolvimento e a progressão do tumor; iii) diminuição da expressão de fatores de transcrição que contribuem, dentre outros, com o fenótipo EMT/CSC; logo, melhorando o desfecho da doença em termos de relapso, surgimento de metástase e sensibilidade aos diversos agentes antineoplásicos; iv) indução da apoptose e /ou de outros mecanismos de morte celular.

A Figura 16 mostra, ainda, que o paclitaxel exerce sua ação antineoplásica, dentre outros fatores, pela indução de apoptose de células tumorais. Entretanto, foi

observado que o paclitaxel pode ativar ERK, de modo a comprometer sua atividade antiproliferativa. De fato, a ativação de ERK tem sido atribuída como mecanismo de quimiorresistência à droga. Assim, por inibir a ativação constitutiva de ERK em células de TNBC MDAMB231, a metformina tem efeito antineoplásico sinérgico com o paclitaxel no controle da doença.

Por fim, vale discutir os regimes terapêuticos à base de metformina determinados como eficazes contra TNBC (MDAMB231), ao menos em nossos estudos *in vitro*. Nosso trabalho trouxe à luz três estratégias de tratamento potencialmente eficazes contra a doença: i) metformina em dose alta 54 mM (IC_{50}); ii) paclitaxel 0,25 µM (IC_{50}) + metformina 10 µM (concentração compatível com os níveis circulantes da droga como hipoglicemiantes orais); iii) paclitaxel 0,25 µM (IC_{50}) + metformina 54 mM (IC_{50}). Antes de tudo, é de fundamental importância reiteramos que a segurança do uso de doses altas de metformina ainda requer avaliação quanto à sua segurança em seres humanos. Independente disso, postulamos que o benefício antineoplásico da metformina pode decorrer de, mas não exclusivamente, em células TNBC MDAMB231 (Figura 17): i) metformina 54 mM: reversão da ativação constitutiva de ERK; ii) paclitaxel 0,25 µM + metformina 10 µM: aumento da fração de células na fase G2/M do ciclo celular de modo a favorecer a ação do paclitaxel, embora não exerça, nessas condições, efeito de reversão da ativação constitutiva de ERK capaz de comprometer o efeito citotóxico do paclitaxel; iii) paclitaxel 0,25 µM + metformina 54 mM: sinergismo quanto à indução de apoptose, aumento da fração de células na fase sub-G0 que parece ser importante para a ação de metformina contra a doença e reversão da ativação constitutiva de ERK, tal a reverter a quimiorresistência ao paclitaxel pelas células TNBC MDAMB231. Cumpre enfatizar, no entanto, que outros mecanismos de ação precisam ser investigados, como descrito na Figura 17.

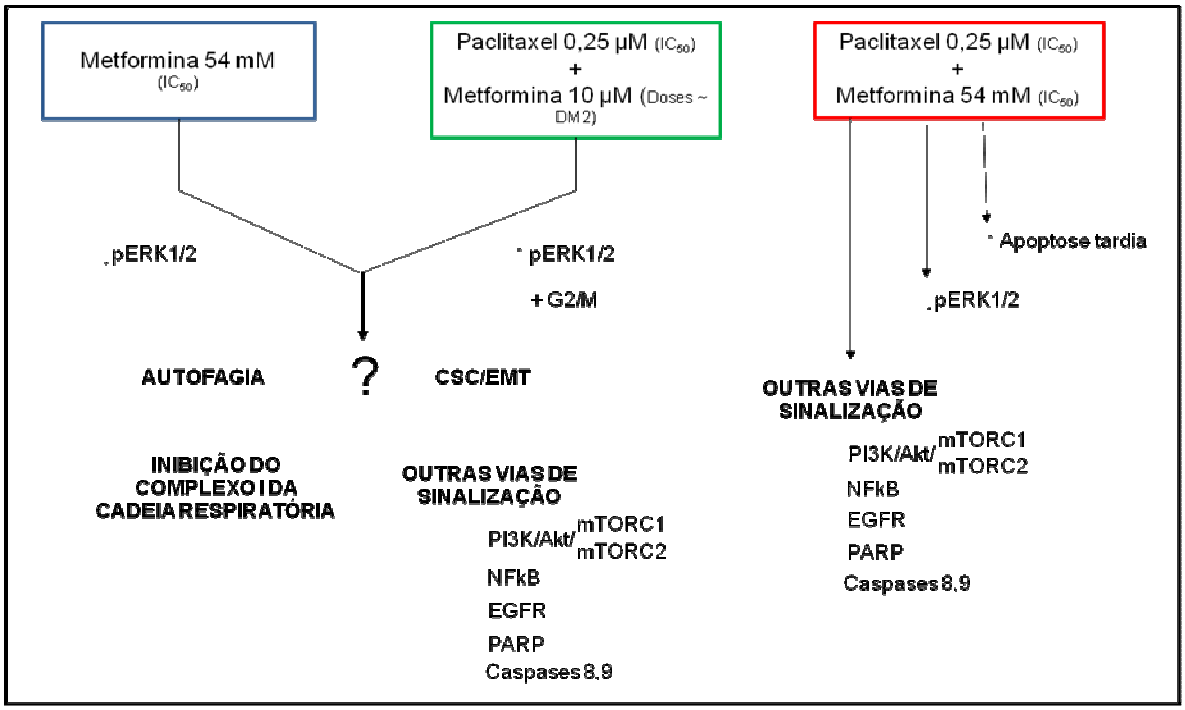


Figura 17: Esquemas terapêuticos antineoplásicos eficazes na linhagem de TNBC MDAMB231, à base de metformina, determinados no presente estudo, e os possíveis mecanismos celulares deflagrados. EMT = Transição epitélio mesênquima; CSC = Células tronco tumorais.

5. CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho nos permitem concluir que:

1- Metformina tem ação antiproliferativa, dose-dependente, em linhagens de câncer de mama representativas do subtipo luminal A (MCF7) e TNBC (MDAMB231);
2- Concentrações elevadas de metformina potencializam o efeito antineoplásico de doxorrubicina e paclitaxel; entretanto, se usada em doses baixas compatíveis com as empregadas no manejo do diabetes mellitus 2, somente potencializa o efeito antineoplásico de paclitaxel na linhagem de TNBC MDAMB231;
3- O ciclo celular de células de TNBC MDAMB231 é modulado diferencialmente por concentrações distintas de metformina e pela combinação sinérgica entre metformina e paclitaxel;
4- Metformina inibe a ativação constitutiva de ERK1/2 na linhagem MDAMB231 de modo independente da dose quando empregada em monoterapia, mas somente em concentrações elevadas quando usada em combinação com paclitaxel ou doxorrubicina.
5- A ação de metformina sobre ERK parece ser indireta, conforme observado em ensaios *in silico* de modelagem molecular;
6- Metformina, em concentração baixa ou alta, não induz apoptose em células de TNBC MDAMB231, mas potencializa a indução de apoptose pelo paclitaxel de modo aparentemente dose-dependente;
7- Metformina e paclitaxel parecem ter sinergismo mútuo sobre a proliferação celular de MBAMB231;
8- Nossos achados evidenciam que, dentre outros possíveis mecanismos, a metformina atua como inibidor indireto de ERK, possivelmente também de mTOR, explicando, portanto, seu uso potencial no tratamento do TNBC, um dos grandes desafios da clínica oncológica.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Dada a relevância clínica do presente estudo, nosso grupo pretende prosseguir com as investigações da aplicabilidade da metformina em regimes terapêuticos contra o TNBC, conforme descrito a seguir:

1. Investigar os resultados do presente estudo em outras linhagens de TNBC (Tabela 14), com o objetivo de confirmar a validade do uso de metformina, tanto em monoterapia quanto em terapias combinadas, e de modo a possibilitar estratificação inicial das populações de TNBC em subpopulações com peculiaridades quanto à sensibilidade às estratégias terapêuticas propostas.

Tabela 14 - Linhagens de TNBC a serem empregadas na continuação do presente estudo e suas características genotípicas

Linhagem de TNBC	*Características genotípicas*
MBDMB231	Claudin low
HCC 1937	P53 -, BRCA1 mutada
HCC 1187	P53 +
HCC70	P53 +
HCC 1599	P53 – Crescimento em suspensão e em esferas

2. Conduzir ensaios em diferentes condições experimentais, com o intuito de melhor compreendermos as condições ideais para se obter os benefícios clínicos da metformina, como monoterapia ou em politerapia combinada com agentes antineoplásicos convencionais, no tratamento do TNBC, a saber: i) avaliação da ordem cronológica de administração dos fármacos; ii) investigação do efeito de diversas concentrações de metformina e das demais drogas a serem avaliadas; iii) modulação do efeito da metformina sob condições metabólicas variadas.
3. Concluir os estudos de determinação dos mecanismos de ação da metformina como monoterapia ou em politerapia combinada com agentes antineoplásicos

convencionais, no tratamento do TNBC: investigação do possível envolvimento de PI3K, AKT, mTOR (mTORC1 e mTORC2), AMPK, EGFR, PARP, caspases 8 e 9, NFκB, dentre outros.

4. Determinar se o benefício clínico do uso de metformina como monoterapia ou em politerapia combinada com agentes antineoplásicos convencionais, no tratamento do TNBC envolve o fenótipo de CSC/EMT (cultivo de células na presença e na ausência de soro fetal bovino, sendo que nessa última condição as células crescem em mamosferas que costumam apresentar o fenótipo de CSC e investigar marcadores de CSC e EMT, como nanog, oct-4, nestina, ZEB-1, E-caderina, N-caderina, CD44 e CD24).
5. Conduzir ensaios *in vivo*: i) toxicidade dos regimes terapêuticos promissores à base de metformina em esquemas agudos e crônicos; ii) indução de tumores em xenotransplantados em camundongos imunodeprimidos com as linhagens que apresentarem efeito promissor por meios dos ensaios *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS

ADEYINKA A. et al. Activated mitogen-activated protein kinase expression during human breast tumorigenesis and breast cancer progression. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 6, p.1747-1753, 2002.

AHN J. et al. Adiposity, adult weight change, and postmenopausal breast cancer risk. **Archives of Internal Medicine**, v. 167, n. 19, p. 2091-2102, 2007.

ALGIRE C. et al. Diet and tumor LKB1 expression interact to determine sensitivity to anti-neoplastic effects of metformin in vivo. **Oncogene**, v. 30, n. 10, p. 1174-1182, 2010.

ALIMOVA I. N. et al. Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. **Cell Cycle**, v. 8, n. 6, p. 909–915, 2009.

ALJADA A.; MOUSA S. A.; Metformin and neoplasia: implications and indications. **Pharmacology & Therapeutics**, v.133, n.1, p.108-115, 2012.

ALÒ P. L. et al. Fatty acid synthase (FAS) predictive strength in poorly differentiated early breast carcinomas. **Tumori**, v. 85, n. 1, p. 35–40, 1999.

American Cancer Society. Cancer Facts e Figures 2013. Disponível em: < http://www.cancer.org/acs/groups/content/@epidemiologysurveilance/documents/document/acspc-036845.pdf>. Acesso em: 15 de Abril de 2013.

ANDERS C. K.; CAREY L. A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. **Clinical Breast Cancer**, v.9. n.2, p73-81, 2009

ARSLAN, C.; DIZDAR, O.; ALTUNDAG, K. Pharmacotherapy of triple-negative breast cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 10, n. 13, p. 2081-2093, 2009.

ASHOUR A. E. et al. Metformin Rescues the Myocardium from Doxorubicin-Induced Energy Starvation and Mitochondrial Damage in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, 2012.

BAILEY, C. J.; TURNER, R. C. Drug Therapy: Metformin. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 9, p. 574-579, 1996.

BASU S. et al. Comparison of triple-negative and estrogen receptor-positive/progesterone receptor-positive/HER2-negative breast carcinoma using quantitative fluorine-18 fluorodeoxyglucose/positron emission tomography imaging parameters: a potentially useful method for disease characterization. **Cancer**, v.112, n.5, p. 995-1000, 2008.

BAYRAKTAR S. et al. Effect of metformin on survival outcomes in diabetic patients with triple receptor-negative breast cancer. **Cancer**, v118, n.5, p. 1202-1211, 2012.

BELFIORE, A.; MALAGUARNERA, R. Insulin receptor and cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 18, n. 4, p. R125-R147, 2011.

BODMER M. et al. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. **Diabetes Care**, v. 33, n.6, p.1304-1308, 2010.

BODMER, M. et al. Metformin, Sulfonylureas, or Other Antidiabetes Drugs and the Risk of Lactic Acidosis or Hypoglycemia: A nested case-control analysis. **Diabetes Care**, v. 31, n. 11, p. 2086–2091, 2008.

BOWKER S. L. et al. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. **Diabetes Care**, v. 29, n.2, p. 254-258, 2006.

BRENTON J. D. et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 29, p. 7350-7360, 2005.

BRUNMAIR B. et al. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? **Diabetes**, v.53, n. 4, p. 1052-1059, 2004.

BULL, S. B. et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplifications is associated with poor survival in node-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 1, p. 86-96, 2004.

BUZZAI M. et al. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. **Cancer Research**, v. 67, n. 14, p. 6745–6752, 2007.

CAREY L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **The Journal of American Medical Association**, v. 295, n. 21, p. 2492-2502, 2006.

CAREY L. et al. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience ? **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 7, n. 12, p. 683-692, 2010.

CAREY, L. A. et al. The Triple Negative Paradox: Primary Tumor Chemosensitivity of Breast Cancer Subtypes. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 8, p. 2329-2334, 2007.

CARLING D. The AMP-activated protein kinase cascade - a unifying system for energy control. **Trends Biochemical Sciences**, v.29, n.1, p. 18-24, 2004

CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. **Nature**, v. 410, n. 6824, p. 37-40, 2001.

CHARFARE, H.; LIMONGELLI, S.; PURUSHOTHAM, A. D. Neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **The British Journal of Surgery**, v. 92, n. 1, p. 14-23, 2005.

CHEANG M.C.U. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368-1376, 2008.

CHEANG M.C.U. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHUTHAPISITH, S. et al. Breast cancer subtypes identified by the ER, PR and HER-2 status in Thai women. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 2, p. 459-462, 2012.

CONNOLLY J. et al. Recommendations for the reporting of breast carcinoma. **Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology**, 2004.

CREIGHTON C. J. et al. The molecular profile of luminal B breast cancer**. Biologics**, v. 6, p. 289-297, 2012.

CUFÍ A. et al. Metformin against TGFβ-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT): from cancer stem cells to aging-associated fibrosis. **Cell Cycle**, v. 9, n. 22, p. 4461–4468, 2010.

CURRIE C. J.; Poole C.D.; Gale E.A. The influence of glucose-lowering therapies on cancer risk in type 2 diabetes. **Diabetologia**, v.59, n.9, p.1766-1777, 2009.

CUSI K.; CONSOLI A.; DEFRONZO R. A. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 81, n.11, p. 4059-4067,1996.

DEFRONZO, R. A., GOODMAN, A. M. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. **New England Journal Of Medicine**, v. 333, n. 9, p. 541-549, 1995.

DETAILLE D. et al. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. **Diabetes**, v.54, n.7, p. 2179-2187, 2005.

DOWLING R. J. et al. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 22, p. 10804-10812, 2007.

DOWSETT M. et al. Assessment of Ki67 in Breast Cancer: Recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer Working Group. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 22, p. 1656-1664, 2011.

EL-MIR M. Y, et al. Neuroprotective role of antidiabetic drug metformin against apoptotic cell death in primary cortical neurons. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 34, n.1, p. 77-87, 2008

EL-MIR M. Y et al. Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n.1, p. 223-228, 2000.

ELSTON C. W.; ELLIS I. O.; PINDER S. E. Prognostic factors in invasive carcinoma of the breast. **Clinical Oncology**, v.10, n.1, p. 14-17,1998.

EVANS J. M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ**, v. 330, n. 7503; p. 1304-1305, 2005.

FORETZ M. et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. **Journal of Clinical Investigation**, v.120, n.7, p. 2355-2369, 2010.

FRASCA F. et al. The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 23-27, 2008.

FREEDMAN, G. M. et al. Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. **Cancer**, v. 115, n. 5, p. 946-951, 2009.

GOLDHIRSCH A. et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 18, n. 7, p. 1133-1144, 2007.

GONG L. et al. Metformin pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Pharmacogenetics Genomics**, v. 22, n.11, p. 820-827, 2012.

GOODARZI M. O.; BRYER-ASH M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. **Diabetes Obesity and Metabolism**, v. 7, n.6, p. 654-665, 2005.

GUIMARAES I. S. et al. Conventional Cancer Treatment. In: **Cancer treatment: Conventional and innovative approaches**, Ed. In Tech, 2013, "In press"

GWINN D. M. et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Molecular Cell**, v. 30, n. 2, p. 214–226, 2008.

HADAD S. et al. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 128, n. 3, p. 783-794, 2011.

HAFFTY B. G. et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, 2006.

HARDIE D.G. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of energy status. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5179-5183, 2003.

HARDIE D. G. Neither LKB1 nor AMPK are the direct targets of metformin. **Gastroenterology**, v. 131, n. 3, p. 973, 2006.

HE X. et al. Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 23, n. 7, p. 1771-1780, 2012.

HEITZ F. et al. Cerebral metastases in metastatic breast cancer: disease-specific risk factors and survival. **Annals of Oncology**, v. 22, n. 7, p. 1571-1581, 2011.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. R76.1-R76.17, 2007.

HINKE S. A et al. Methyl succinate antagonises biguanide-induced AMPK-activation and death of pancreatic beta-cells through restoration of mitochondrial electron transfer. **British Journal of Pharmacology**, v. 150, n. 8, p. 1031-1043, 2007.

HIRSCH H. A. et al. Metformin selectively targets cancer stem cells, and acts together with chemotherapy to block tumor growth and prolong remission. **Cancer Research**, v.69, n.19, p. 7507-751, 2009.

HUNDAL R. S. Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 49, n. 12, p. 2063-2069, 2000.

IBANEZ L. et al. Metformin treatment to prevent early puberty in girls with precocious pubarche. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n.8, p. 2888-2891, 2006.

ILIOPOULOS, D.; HIRSCH, H. A.; STRUHL, K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. **Cancer Research**, v. 71, n. 9, p. 3196-3201, 2011.

INOKI, K.; ZHU, T.; GUAN, K.L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. **Cell,** v. 115, n. 5, p. 577-590, 2003.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012 – Incidência de Câncer no Brasil, 2011. Disponível em: < http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf >. Acesso em: 15 de Abril de 2013.

JADVAR, H.; ALAVI, A.; GAMBHIR, S. S. 18F-FDG uptake in lung, breast, and colon cancers: molecular biology correlates and disease characterization. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 50, n. 11, p. 1820-1827, 2009.

JIRALERSPONG S. et al. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. **Journal of Clinical Oncolology**, v.27, n.20, p. 2009-3297-3302, 2009.

JOENSUU, H.; GLIGOROV, J. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. 2012. **Annals of Oncology**, v. 23, suppl. 6, p. vi40-vi45, 2012.
Journal of Computational Chemistry, v. 31, n. 2; p. 455–462, 2010.

KALENDER A. et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. **Cell Metabolism**, v. 11, n. 5, p. 390-401, 2010.

KAO J. et al. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6146, 2009.

KASHIWAGI S. et al**.** Advantages of adjuvant chemotherapy for patients with triple-negative breast cancer at Stage II: usefulness of prognostic markers E-cadherin and Ki67. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. R122, 2011.

KENNECKE H. et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal Of Clinical Oncology**, v. 28, n. 20, p. 3271-3277, 2010.

KIM T. et al. p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 5, p. 875-883, 2011.

KITAGAWA et al. Metformin prolongs survival in a K-rasLA2 lung cancer mouse model by inhibiting cancer stem cells and tumor growth. Johns Hopkins University. Abstract number 2269, **Annual AACR Meeting,** 2013.

KREIKE B. et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 9, n. 5, p. R65, 2007.

LARSSON, S. C.; MANTZOROS, C. S.; WOLK, A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, n. 4, p. 856-862, 2007.

LEE H. W, et al. Real-time single-molecule co-immunoprecipitation analyses reveal cancer-specific Ras signalling dynamics**. Nature Communications**, v. 4, p. 1505 2013.

LEE M. S. et al. Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. **BMC Cancer**, v.18. n.11, p. 1120, 2011.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121; p., 2750-2767, 2011.

LI D. et al. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. **Gastroenterology**, v. 137, n. 2, p. 482-488, 2009.

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**, v. 32, n. 9, p. 1620-1625, 2009.

LIEDTKE, C. et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 8, p. 1275-1281, 2008.

LIPSCOMBE L. L. et al. Diabetes mellitus and breast cancer: a retrospective population-based cohort study. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 98, n. 3, p. 349–356, 2006.

LIU B. et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 13, p. 2031-2040, 2009.

LIU B. et al. Potent anti-proliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. **Cell Cycle**, v. 10, n.17, p. 2959-2966, 2011.

LIU H. et al. Metformin and the mTOR inhibitor Everolimus (rad001) Sensitize Breast Cancer Cells to the Cytotoxic Effect of Chemotherapeutic Drugs in vitro. **Anticancer Research**, v.32, n.5; p.1627-1638, 2012.

LU S et al. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. **Modern Pathology**, v. 26, n. 4, p. 485-495, 2013.

MADEIRA K. P. et al. Triple negative breast cancer: clinicopathological characteristics, challenges and therapy. In: CHEN, G. (Ed.). **Estrogen Receptors: Mechanisms, Structure and Role in Disease**. New York: Nova Publishers, cap. 7, 2012.

MAITI B. et al. The association of metabolic syndrome with triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 121, n. 2, p. 479-483, 2010.

MANI S. A. et al. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704-715, 2008.

MARCHESINI G. et al. Metformin in non-alcoholic steatohepatitis. **Lancet**, v. 358, n. 9285, p. 893–894, 2001.

MCDERMOTT, S. P.; WICHA, M. S. Targeting breast cancer stem cells. **Molecular Oncology**, v. 4, n. 5, p. 404-419, 2010

MACKEIGAN J. P.; COLLINS TS, TING JP. MEK inhibition enhances paclitaxel-induced tumor apoptosis. **The Jornal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 38953-38956, 2000.

MACKEIGAN J. P.; et al. Inactivation of the Antiapoptotic Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt Pathway by the Combined Treatment of Taxol and Mitogen-activated

Protein Kinase Kinase Inhibition1. **Clinical Cancer Research**, vol.8, n.7; p 2091-2099, 2002.

MELOCHE S.; POUYSSÉGUR J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. **Oncogene**, v. 26, n.22, p. 3227-3239, 2007.

MERIC-BERNSTAM, F.; GONZALEZ-ÂNGULO, A. M. Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 13, p. 2278-2287, 2009.

MILGRAUM L. Z. et al. Enzymes of the fatty acid synthesis pathway are highly expressed in in situ breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 3, n. 11, p. 2115-2120, 1997.

MINAMI, C.A.; CHUNG, D.U.; CHANG, H.R. Management options in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 5; p. 175–199, 2011.

MINEMATSU, T.; GIACOMINI, K. M. Interactions of tyrosine kinase inhibitors with organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion proteins. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 531-539, 2011.

MISBIN R.I. et al. Phenformin-associated lactic acidosis: pathogenesis and treatment. **Annals Of Internal Medicine**, v. 87, n. 5, p. 591–595, 1977.

MIRZOEVA O.K. et al. Basal subtype and MAPK/ERK kinase (MEK)-phosphoinositide 3-kinase feedback signaling determine susceptibility of breast cancer cells to MEK inhibition. **Cancer Research**, v.69, n.2, p 565-572, 2009.

MISBIN R.I. et al. Phenformin-associated lactic acidosis: pathogenesis and treatment. **Annals Of Internal Medicine**, v. 87, n. 5, p. 591–595, 1977.

MOGHETTI P. et al. Metformin Effects on Clinical Features, Endocrine and Metabolic Profiles, and Insulin Sensitivity in Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized, Double-Blind, Placebo- Controlled 6-Month Trial, followed by Open, Long-Term Clinical Evaluation. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 85, n. 1, p. 139-146, 2000.

MONAMI M. et al. Metformin and cancer occurrence in insulin-treated type 2 diabetic patients. **Diabetes Care**, v. 34, n. 1, p. 129-131, 2011.

MORIMOTO L. M. et al. Body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States). **Cancer Causes & Control**, v. 13, n. 8, p. 741-751, 2002.

NEVE R. M. et al. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**, v. 10, n. 6, p. 515-527, 2006.

NIRAULA S. et al. Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 135, n. 3, p. 821-830, 2012.

OKANO J.; RUSTGI A. K. Paclitaxel induces prolonged activation of the Ras/MEK/ERK pathway independently of activating the programmed cell death machinery. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n.22, p.19555-19564, 2001

OLIVIER M. et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 1157-1167, 2006.

OPDAM F. L. et al. Lapatinib for Advanced or Metastatic Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 17, n. 4, p. 536-542, 2012.

ORCHARD T. J. et al. The Effect of Metformin and Intensive Lifestyle Intervention on the Metabolic Syndrome: The Diabetes Prevention Program Randomized Trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 142, n. 8, p. 611-619, 2005.

OWEN M. R.; DORAN E.; HALESTRAP A. P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **The Biochemical Journal**, v.348, n.3. p. 607-614, 2000.

PAGE D. L. Prognostic indicators in breast cancer and who needs them. **Anatomic Pathology**, v. 2; p. 35–52, 1997.

PARKER J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160-1167, 2009.

PEROU C. M. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. **The Oncologist**, v. 16, suppl. 1, p. 61-70, 2011.

PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

PINHO A. V.; ROOMAN, I.; REAL, F. X. p53-dependent regulation of growth, epithelial-mesenchymal transition and stemness in normal pancreatic epithelial cells. **Cell Cycle**, v. 10, n. 8, p. 1312-1321, 2011.

PRAT A. et al. Molecular Characterization of Basal-Like and Non-Basal-Like Triple-Negative Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 18, n. 2, p.123-133, 2013.

PRAT A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

PRAT A.; PEROU C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5-23, 2010.

QI, M.; ELION, E. A. MAP kinase pathways. **Journal of Cell Science**, v. 118, pt. 16, p. 3569-3572, 2005.

RAKHA E. A. et al. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. **Histopathology**, v. 50, n. 4, p. 434–438, 2007.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.

RANGEL L. B. A. et al. Angiotensin II stimulates renal proximal tubule Na(+)-ATPase activity through the activation of protein kinase C. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1564, n. 2, p. 310-p316, 2002.

ROCHA G. Z. et al. Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n.12, p. 3993-4005, 2011.

ROSS J. F. et al. Targeted Therapy in Breast Cancer - The HER-2/*neu* Gene and Protein. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 3, n. 4, p. 379-398, 2004.

ROUZIER R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 16, p. 5678-5685, 2005.

SALPETER S. R. et al. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database Of Systematic Reviews**, v. 14, n. 4, 2010.

SHAW R. J. et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science**, v. 310, n. 5754, p. 1642-1646, 2005.

SEIDMAN, R. et al. The role of ERK 1/2 and p38 MAP-kinase pathways in taxol-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells. **Experimental Cell Research**, v268, p. 84–92, 2001.

SHEN Z. et al. The tumor suppressor gene LKB1 is associated with prognosis in human breast carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 7, p. 2085-2090, 2002.

SINGH, A.; SETTLEMAN, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4741-4751, 2010.

SIVARAMAN V. S. et al. Hyperexpression of mitogen-activated protein kinase in human breast cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v.99, n.7; 1478–1483, 1997.

SLAMON D. J. et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 783-792, 2001.

SOARES H. P. et al., Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e57289, 2013.

SORLIE T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001.

SPECHT J. M. et al. Tumor Metabolism and Blood Flow as Assessed by Positron Emission Tomography Varies by Tumor Subtype in Locally Advanced Breast Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 10, p. 2803-2810, 2010.

STAMBOLIC V. et al. Utility of metformin in breast cancer treatment, is neoangiogenesis a risk factor? **Breast Cancer Research And Treatment**, v. 114, n. 2, 2009.

STRACK, T. Metformin: a review. **Drugs Today**. v. 44, p. 303-314, 2008.

SUBIK K. et al. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 20, n.4, p. 35-41, 2010.

TAVASSOLI, F. A.; DEVILEE, P. (Eds.) World Health Organization: Tumors of the Breast and Female Genital Organs (2nd edn.). **IARC Press**, Lyon: WHO/IARC, 2003.

THIKE A. A. et al. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. **Modern Pathology**, v. 23, n. 1, p. 123-133, 2010.

THOMSON D. M. AMP-activated protein kinase phosphorylates transcription factors of the CREB family. **Journal of Applied Physiology**, v. 104, n. 2, p 429-38, 2008.

TOWLER M. C.; HARDIE D. G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. **Circulation Research**, v.100, n.3, p. 328-341, 2007.

TROTT, O.; OLSON, A. J. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v31, n.2, p 455-461, 2010.

VAKLAVAS, C.; FORERO-TORRES, A. How do I treat "triple-negative" disease. **Current Treatment Options in Oncology**,v. 12, n. 4, p. 369-388, 2011.

VAZQUEZ-MARTIN A. et al. Metformin regulates breast cancer stem cell ontogeny by transcriptional regulation of the epithelial-mesenchymal transition (EMT) status. **Cell Cycle**, v.9, n. 18, p. 3807-3814, 2010.

VAZQUEZ-MARTIN, A.; OLIVERAS-FERRAROS, C.; MENENDEZ, J. A. The antidiabetic drug metformin suppresses HER2 (erbB-2) oncoprotein overexpression

via inhibition of the mTOR effector p70S6K1 in human breast carcinoma cells. **Cell Cycle**, v. 8, n. 1, p. 88-96, 2009.

VERMES I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v.184, n. 1, p.39–51, 1995.

VIALE G. The current state of breast cancer classification. **Annals Of Oncology**, v. 23, suppl. 10, p. 207-210, 2012.

VIOLLET B. et al. AMPK: Lessons from transgenic and knockout animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, n. 14, p. 19-44, 2009.

VOGEL C. L. et al. Efficacy and safety of Trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 3, p. 719-726, 2002.

WARSHAMANA-GREENE G. S. et al. The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1563-1571, 2005.

WEIGELT B.; REIS-FILHO J. S. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. **Breast Cancer Research**, v 12, n. 4, p. 2734, 2010.

WOLFF A. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 1, p.118-145, 2007.

WU J. et al. Response and prognosis of taxanes and anthracyclines neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative breast cancer. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 137, n. 10, p. 1505-1510, 2011.

XIANG X. et al. AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 321, n. 1, p. 161-167, 2004.

YAGATA H.; KAJIURA Y.; YAMAUCHI H.; Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. **Breast Cancer**, v, 8, n.3, p. 165-173, 2011.

YANG X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 16, n. 3, p. 439-443, 2007.

ZANCAN P. et al. Fructose-2,6-bisphosphate counteracts guanidinium chloride-, thermal-, and ATP-induced dissociation of skeletal muscle key glycolytic enzyme 6-phosphofructo-1-kinase: A structural mechanism for PFK allosteric regulation**.** **Archives of Biochemistry Biophysics,** v. 467, n. 2, p. 275-282, 2007.

ZHOU G. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, n .8, p. 1167-1174, 2001.

ZHUANG Y, MISKIMINS WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. **Journal of Molecular Signal**, v.3, n. 18, 2008.