

Tratamento com metformina em células de Câncer de Mama e sua influência na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS)

Metformin treatment in Breast Cancer cells and its influence on the production of reactive oxygen species (ROS)

DOI:10.34119/bjhrv5n5-212

Recebimento dos originais: 05/09/2022

Aceitação para publicação: 06/10/2022

Jennifer Yumie Sonobe Hable

Acadêmica em Medicina

Instituição: Centro Universitário de Brasília (CEUB)

Endereço: SEPN 707/907, Campus Universitário - DF, CEP: 70790-075

E-mail: jennifer.yumie@sempreceub.com

Daniel Caires Campos

Acadêmico em Medicina

Instituição: Centro Universitário de Brasília (CEUB)

Endereço: SEPN 707/907, Campus Universitário - DF, CEP: 70790-075

E-mail: daniel.caires@sempreceub.com

Bárbara Yasmin Garcia Andrade

Mestrado em Biologia Animal

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP)

Endereço: Avenida Bandeirantes, 3900, Subsetor Oeste Onze - SP, CEP: 14040-030

E-mail: barbarayasmi@gmail.com

Sônia Nair Bão

Pós-Doutorado em Ciências Biológica

Instituição: Universidade de Brasília (UNB)

Endereço: Asa Norte, Brasília - DF, CEP: 70910-900

E-mail: snbao2009@gmail.com

Luciana Ramalho de Farias

Doutorado em Biologia Molecular

Instituição: Centro Universitário de Brasília (CEUB)

Endereço: SEPN 707/907, Campus Universitário - DF, CEP: 70790-075

E-mail: luciana.farias@ceub.edu.br

RESUMO

Objetivo: Avaliar a produção de EROs em células de câncer de mama submetidas ao tratamento com metformina, *in vitro*. Métodos: Realizado estudo caso-controle, através do cultivo da linhagem de células de câncer de mama MDA-MB-231, da análise da viabilidade das células após o tratamento com metformina, e comparação dos níveis de expressão gênica relacionada às proteínas Superóxido Dismutase, Catalase e Heme Oxigenase em células de câncer e controle após o tratamento com metformina. Resultados: A partir da análise de variância com um fator (one-way ANOVA), constatou-se que há comparação estatisticamente significativa entre o grupo controle e as concentrações 1,25mM, 10mM e 20mM, sendo essas concentrações

utilizadas nos ensaios para análise da expressão de enzimas antioxidantes. Os resultados da qPCR demonstraram que não houve alteração significativa nos níveis de expressão gênica destas enzimas em relação ao controle. Conclusão: Os estudos que investigam a relação entre a metformina e o estresse oxidativo em linhagens de células carcinogênicas mamárias ainda são escassos, apontando a necessidade em ampliar o desenvolvimento de pesquisas que investigam essa relação.

Palavras-chave: MDA-MB-231, expressão gênica, Neoplasia Mamária.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the production of ROS in breast cancer cells submitted to treatment with metformin, in vitro. **Methods:** A case-control study was carried out, through the cultivation of the MDA-MB-231 breast cancer cell line, the analysis of cell viability after treatment with metformin, and, finally, to compare the levels of gene expression related to the Superoxide Dismutase, Catalase and Heme Oxygenase proteins in cancer and control cells after metformin treatment. **Results:** From the analysis of variance with one factor (one-way ANOVA), it was found that there is a statistically significant comparison between the control group and the concentrations of 1.25mM, 10mM and 20mM, and these concentrations were used in the assays to analyze the expression of antioxidant enzymes. The qPCR results showed that there was no significant change in the gene expression levels of these enzymes in relation to the control. **Conclusion:** studies that investigate the relationship between metformin and oxidative stress in breast carcinogenic cell lines are still scarce, indicating the need to expand the development of research that investigates this relationship.

Keywords: MDA-MB-231, gene expression, Breast Câncer.

1 INTRODUÇÃO

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

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

Neste contexto, as células se tornam malignas devido à ocorrência de mutações genéticas que têm como consequência o aumento da sobrevivência e reprodução celular (JACQUELINE C. et al, 2017). Existem fatores de risco associados à doença, entre eles os genes BRCA1 e BRCA2 que estão relacionados ao aparecimento do câncer de mama

aumentando em até 80% o risco do seu desenvolvimento (LOPES A. et al, 2013), e as alterações em genes supressores de tumor (eg. TP53, PTEN) que provocam a perda dos seus fatores protetivos, e assim, aumentam em até 50% as chances de desenvolvimento desse tipo de câncer (CASCIATO D. A., 2008).

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

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

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

A metformina é uma droga utilizada no tratamento de diabetes e que tem apresentado bons resultados em pacientes com câncer de mama, surgindo como uma novo potencial na terapia anticâncer. Além de ter demonstrado uma menor incidência da doença em populações que fazem o uso da metformina (EVANS et al., 2002; LIBBY et al., 2009), em pacientes com câncer de mama foram observadas a inibição da proliferação tumoral, bem como o impedimento da colonização e a parada na fase G1 do ciclo celular, com consequente diminuição da mortalidade (ALIMOVA et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) possuem papéis fisiológicos cruciais na manutenção da função biológica tanto das células normais, quanto das cancerosas. Nesse contexto, estão relacionadas a transdução de sinal, resposta inflamatória e autofagia. Entretanto, em conjunto com o estresse oxidativo são considerados prejudiciais para as células, pois podem

danificar o DNA celular, oxidar ácidos graxos e aminoácidos, e desativar algumas enzimas e seus cofatores (TONG et al., 2015). Dessa forma, essas alterações biológicas eventualmente levam à destruição tecidual.

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

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

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

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

2 MÉTODOS

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

2.1 CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS

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

2.2 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

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

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

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

Por fim, as placas foram lidas a 595 nm no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). A porcentagem de inibição do crescimento celular foi determinada através da comparação da densidade celular das células tratadas com as células controle, sendo essa comparação determinada pela fórmula: porcentagem de inibição = $(1 - \text{densidade da célula do grupo tratado}) / \text{densidade da célula do grupo controle}$.

2.3 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

Cerca de 750×10^3 células por poço foram plaqueadas para análise da expressão gênica. Após 24 horas de incubação, três das quatro amostras receberam tratamento com 200 µL de metformina diluída em água e meio, enquanto a outra formou o grupo controle. Cada poço teste recebeu uma concentração diferente de metformina - 1,25mM, 10mM e 20mM. Após o tempo

de exposição de 24 horas, as células foram submetidas a extração de RNA utilizando o kit *Power SYBR® Green Cells-to-CT™* (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante.

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

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

2.4 DESENHO DE INICIADORES

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

A sequência de nucleotídeos para desenho desses iniciadores, assim como do gene que serão utilizados como padrão, estão disponíveis no banco de dados GenBank. Os iniciadores foram desenhados através da ferramenta disponível na plataforma Primer3 Plus.

2.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

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

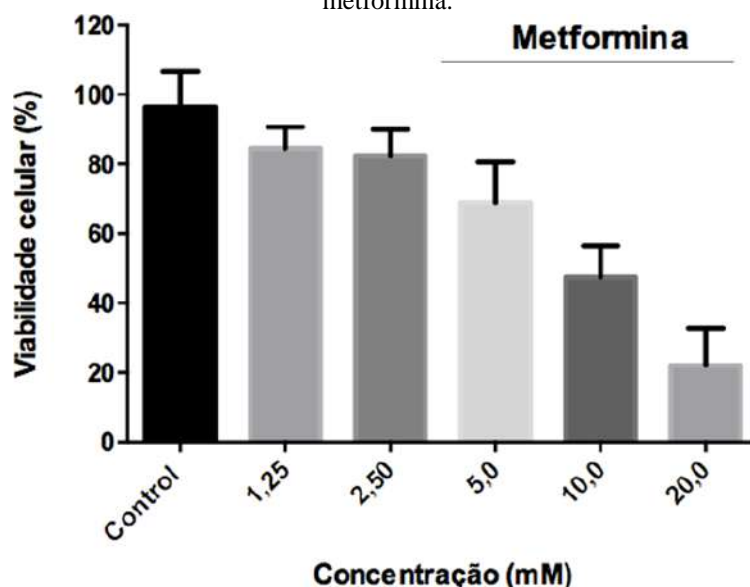
A comparação do perfil de expressão dos genes relacionados a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e heme oxigenase (HMOX) foi realizada através da quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e Schmittgen, 2001). A PCR em Tempo Real foi realizada em reações de 12 µL contendo 6 µL do Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix

(Fermentas®), 1 µL de cada par de iniciadores (direto e reverso) à concentração de 0,1 µM, 2 µL de cDNA e 2 µL de água no equipamento Applied Biosystems® 7500 *Fast Real-Time PCR System* utilizando o *SYBR® Green* como indicador de fluorescência. As reações foram montadas em placas de 96 poços de 0,1 mL (Applied Biosystem®) e centrifugadas por 1 min a 4000 rpm a fim de evitar possíveis diferenças no volume final das reações. Os parâmetros do ciclo de amplificação foram desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida por 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 50 segundos e anelamento/extensão a 60°C por 48 segundos

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

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



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

A partir da análise de variância com um fator (one-way ANOVA), constatou-se que a comparação entre o grupo controle e a concentração de 1,25mM, a concentração de 2,5mM e a de 1,25mM, a concentração de 2,5mM e 5mM não são estatisticamente significativos. Em

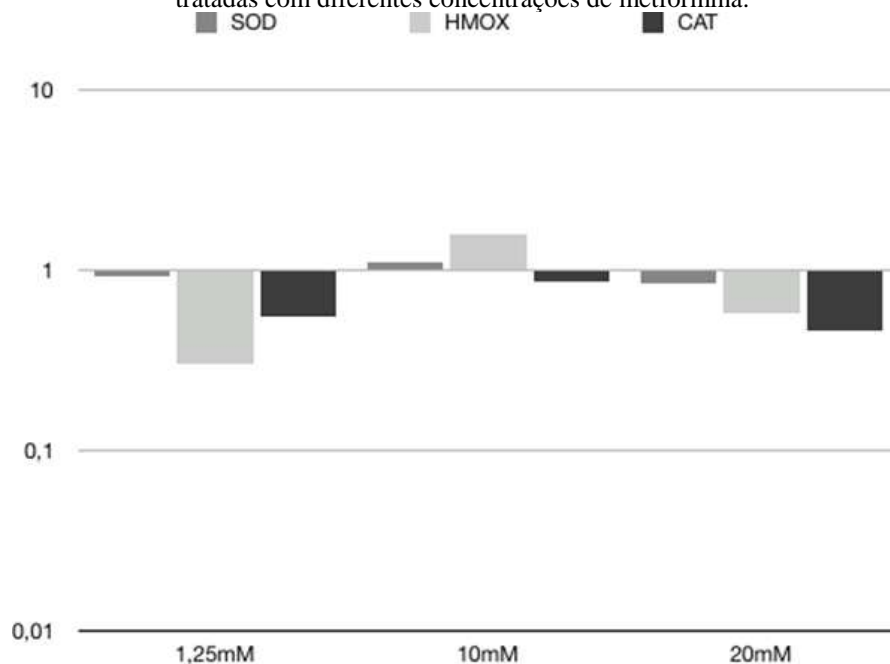
relação a comparação com o controle, houve significância ao relacionar com as concentrações 5mM, 10mM e 20mM. Além disso, entre outras comparações significativas, destacam-se a relação entre 1,25mM com 10mM, 1,25mM com 20mM e 10mM com 20mM.

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

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

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

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



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

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o tratamento com metformina possa proporcionar um benefício de sobrevivência para as células saudáveis quando adicionado à terapia de determinadas doenças, foi possível observar, através dos resultados, que o fármaco acarreta malefícios às células da linhagem de câncer de mama MDA-MB-231, uma vez que gerou diretamente efeitos inibitórios dose-dependente na proliferação celular, principalmente com o uso de concentrações maiores que 5mM. Porém, não observamos uma influência significativa da metformina na expressão das enzimas antioxidantes SOD, CAT e HMOX. Ainda nesse sentido, os estudos que investigam a relação entre a metformina e o estresse oxidativo em linhagens de células carcinogênicas mamárias ainda são escassos. Tal fato indica a necessidade de um aprofundamento das pesquisas que tratam do tema, com o intuito de fornecer mais uma abordagem terapêutica no combate ao câncer de mama.

REFERÊNCIAS

1. AFANAS'EV, I. **Reactive oxygen species signaling in cancer: caparison with aging.** Aging and disease. Vol. 2,3: 219-30. 2011
2. ALIMOVA, I., et al. **Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro.** Cell Cycle 8:6, 909-915; 15, 2009.
3. CASCIATO, D. A. **Manual de Oncologia Clinica.** Tecmed. São Paulo. 2008.
4. Evans DG, Lalloo F. **Risk assessment and management of high risk familial breast cancer.** J Med Genet. 2002 Dec;39(12):865-71. doi: 10.1136/jmg.39.12.865. PMID: 12471197; PMCID: PMC1757211.
5. FOULKES W., et al. **Germ-line BRCA1 mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer.** Clin Cancer Res 3:2465-9. 1997.
6. JACQUELINE, C. et al. **Cancer: a disease at crossroads of trace-off.** Evol. App. 10:215-225, 2017
7. LIBBY, G., et al. **New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes.** Diabetes Care. 32:1620-1625, 2009.
8. LOPES, A. et al. **Oncologia para graduação.** São Paulo: LeMar, 2013.
9. MINISTÉRIO DA SAÚDE. INCA. **Estimativa de Câncer no Brasil.** Brasil. 2018
10. OWEN, M. R., et al. **Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain.** Biochem J 348: 607-614, 2000.
11. SCHEXNAYDER et al. **Metformin Inhibits Migration and Invasion by Suppressing ROS Production and COX2 Expression in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells.** Int. J. Mol. Sci.19: 3692, 2018
12. SHARMA, P. & KUMAR, S. **Metformin inhibits human breast cancer cell growth by promoting apoptosis via a ROS-independent pathway involving mitochondrial dysfunction: pivotal role of superoxide dismutase (SOD).** Cellular Oncology. 41:637– 650. 2018
13. TONG, L., et al. **Reactive oxygen species in redox cancer therapy.** Cancer Letters. doi: 10.1016/ j.canlet.2015.07.008. 2015.
14. WHEATON et al. **Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis.** eLife, 3:e02242, 2014.
15. WILLIAMS et al. **Metformin induces a senescence-associated gene signature in breast cancer cells.** J. Health Care Poor Underserved, 24: 93–103, 2013.