



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDO PINHEIRO DE SOUZA NETO

**AÇÃO DA METFORMINA *IN VIVO* E *IN VITRO* EM MODELO
EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO**

Londrina
2014

FERNANDO PINHEIRO DE SOUZA NETO

**AÇÃO DA METFORMINA *IN VIVO* E *IN VITRO* EM MODELO
EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia Experimental..

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S729a Souza Neto, Fernando Pinheiro de.
Ação da metformina *in vivo* e *in vitro* em modelo experimental de melanoma murino / Fernando Pinheiro de Souza Neto. – Londrina, 2014.
47 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Melanoma – Teses. 2. Agentes hipoglicêmicos – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Murideo – Teses. I. Armani, Alessandra Lourenço Cecchini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

FERNANDO PINHEIRO DE SOUZA NETO

**AÇÃO DA METFORMINA *IN VIVO* E *IN VITRO* EM MODELO
EXPERIMENTAL DE MELANOMA MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Patologia Experimental..

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Lourenço
Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dra. Sara Santos Bernardes Real Prado
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Londrina, 18 de julho de 2014

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Alessandra Lourenço Cecchini Armani, pela imprescindível orientação durante a realização deste trabalho.

À Profª Drª Sara Santos Bernardes, pela dedicação dada a este trabalho.

À Profª Drª Flavia Alessandra Guarnier, pela sua colaboração a este trabalho

À amiga de laboratório Poliana Camila Marinello pelas inúmeras dúvidas sanadas no decorrer do dia a dia de laboratório.

Aos colegas e amigos de laboratório, de mestrado e amigos do transcorrer do curso, por terem participado, inesquecível desta etapa da minha vida: Gabriela Melo, Cássio Nunes, Thamara Silva, Nichelle Vieira, Fernando Borges, Fernanda Paschoal, Kaliana Machado, LaisSabio por todo auxílio e colaboração.

Aos técnicos de laboratório de patologia, Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Dionízio Filho, pela assistência técnica prestada e colaboração.

Aos meus pais, Marina de Fátima da Silva e Fernando Pinheiro de Souza Filho, pelo amor incondicional, por serem os exemplos de pessoas esforçadas em proporcionar a mim e meus irmãos a educação que temos hoje.

Aos amigos maravilhosos que fiz em Londrina e aos que perduram até hoje. Aos meus amigos Guilherme, Eduardo e Ricardo por tantos anos morando juntos, por me aturarem tanto tempo. Ao amigo Wellington, por conhecê-lo só agora no mestrado, tendo a impressão de conhecê-lo há muito tempo.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente. Funcionários da UEL, da biblioteca, RU, serviço geral, sem vocês nossa vida seria muito mais difícil. Sou grato a todos que se empenham em uma UEL melhor.

A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento, duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor. A alegria de fazer o bem é a única felicidade verdadeira.

(Leon Tolstoi)

Souza Neto, Fernando Pinheiro. **Ação da metformina *in vivo* e *in vitro* em modelo experimental de melanoma murino.** 47f. Dissertação. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O melanoma cutâneo se origina de alterações dos melanócitos, células produtoras de melanina, sendo um dos cânceres mais letais. A metformina é uma droga usada para diabetes tipo dois, mas a partir dos anos 2000, estudos pré-clínicos e epidemiológicos demonstraram que a metformina reduz tanto o risco de desenvolvimento de câncer quanto sua mortalidade, fornecendo menos energia necessária ao crescimento tumoral. Indiretamente age ativando AMPK (adenina monofosfato quinase), enzima relacionada à homeostase energética, diminuindo vias anabólicas necessárias à proliferação celular. O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da metformina em modelo experimental de melanoma murino *in vitro* e *in vivo*, a fim de estudar a participação dos radicais livres na proliferação tumoral. No presente trabalho foram utilizados camundongos machos de 8-12 semanas da linhagem C57BL6. Implantados subcutaneamente na região dorsal (10^5 células de B16F10). Entre a implantação do tumor e o sacrifício do animal são 14 dias. O tratamento com metformina se inicia após 3 dias da implantação, permitindo avaliar a progressão tumoral. O tratamento com metformina foi por via intraperitoneal dado diariamente, na dose de 90mg/kg de camundongo diluída em PBS. *In vivo*, verificou-se se a metformina altera o EO no melanoma murino. Resultados *in vivo* foram que o tratamento com metformina (90mg/kg) via intraperitoneal reduziu consideravelmente o volume tumoral $p < 0.05$. Os níveis de MDA não foram alterados no tratamento com metformina. O grupo tumor metformina aumentou significativamente a capacidade antioxidante total comparado com o grupo controle ($p < 0.05$), sugerindo uma proteção sistêmica dada pela metformina ao aumento de espécies reativas. Foram realizados testes do tipo ELISA para detecção de citocinas como TGF- β (fator de crescimento tumoral do tipo β), um dos marcadores de imunossupressão e para VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), favorecendo o crescimento tumoral. Os resultados para LDH de ambos os grupos tumores, tanto o grupo tratado com PBS quanto o tratado com MET, estão elevados. Os níveis de VEGF no grupo tumor metformina está diminuído em relação ao seu grupo controle ($p < 0.05$), portanto, o tratamento com metformina foi suficiente em diminuir os níveis dessa citocina responsável pelo crescimento tumoral, via angiogênese. *In vitro* foi analisado os efeitos da metformina sobre células murinas (B16F10) de melanoma metastático, a mesma célula que foi implantada *in vivo*. As células foram expostas a metformina por 24 e 48 horas, nas concentrações de 6, 30, 1000 e 5000 μM . Estes resultados condizem com o teste de proliferação celular que em 24 horas e em 48 horas apresentam resultados semelhantes. As principais conclusões do estudo *in vivo* deste trabalho são: A metformina diminui o crescimento celular com diminuição do volume tumoral; o estresse oxidativo sistêmico no melanoma é baseado na diminuição de alguns parâmetros antioxidantes. Quando do tratamento com a metformina, esta reestabelece estes para a normalidade. O VEGF está diminuído quando metformina é usada no tratamento do tumor, indicando um possível alvo terapêutico. Os estudos *in vitro* indicam que a metformina é citotóxica, aumenta a apoptose e diminui a proliferação celular.

Palavras-chave: Melanoma. Metformina. Estresse oxidativo, B16F10. VEGF

Souza Neto, Fernando Pinheiro. **Metformin action *in vivo* and *in vitro* experimental model of murine melanoma**. 2014. 47p. Dissertation. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Cutaneous melanoma originates from changes in the melanocytes, cells that produce melanin, one of the most lethal cancers. Metformin is a drug used for diabetes type two, but from the 2000s, pre-clinical and epidemiological studies have shown that metformin reduces both the risk of developing cancer as their mortality, providing less energy needed for tumor growth. Act indirectly by activating AMPK (adenine monophosphate kinase), an enzyme related to energy homeostasis, decreasing metabolic pathways necessary for cellular proliferation. The objective was to evaluate the effect of metformin in an experimental model of murine melanoma *in vitro* and *in vivo* in order to study the role of free radicals in tumor proliferation. In this study were used males of 8-12 weeks of C57BL6 strain mice. Implanted subcutaneously in the dorsal region (105 B16F10 cells). Between tumor implantation and the sacrificial animal is 14 days. Metformin treatment starts after 3 days of deployment in order to evaluate tumor progression. Treatment with metformin was intraperitoneally given daily at a dose of 90mg / kg of mouse diluted in PBS. *In vivo*, we determined whether metformin amending EO in murine melanoma. *In vivo* results were that treatment with metformin (90 mg / kg) intraperitoneally significantly reduced tumor volume $p < 0.05$. MDA levels were not altered during the treatment with metformin. The tumor metformin group significantly increased the total antioxidant capacity compared with the control group ($p < 0.05$), suggesting a systemic protection given by metformin to increased reactive species. ELISA tests were performed for the detection of cytokines such as TGF- β (Tumor Growth Factor type β), one of immunosuppression markers and VEGF (vascular endothelial growth factor), favoring tumor growth. The results for both tumors LDH groups, both the treated group and the PBS treated with TEM are elevated. Os VEGF levels in the tumor metformin group is reduced compared to their control group ($p < 0.05$), therefore metformin treatment was sufficient to reduce the levels of this cytokine responsible for tumor growth, via angiogenesis. *In vitro* was analyzed the effects of metformin on murine cells (B16F10) metastatic melanoma, the same cell that was implanted *in vivo*. Cells were exposed metformin for 24 and 48 hours, at concentrations of 6, 30, 1000 and 5000 μM . These results are consistent with the cell proliferation test within 24 hours and within 48 hours had similar results. Key findings from the *in vivo* study of this work are: Metformin decreases cell growth with decreased tumor volume; the systemic oxidative stress in melanoma is based on the decrease in some antioxidant parameters. When treatment with metformin, this restores them to normal. VEGF is reduced when metformin is used in tumor treatment, indicating a possible therapeutic target. *In vitro* studies indicate that metformin is cytotoxic, enhances apoptosis and decreased cell proliferation.

Keywords: Melanoma. Metformin. Oxidative stress. B16F10. VEGF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diferenciação dos melanócitos	13
Figura 2 – Estrutura da AMPK.....	14
Figura 3 – Controle sobre a proliferação celular e tumoral pela metformina	15
Figura 4 – Vias influenciadas por mTOR.....	18
Figura 5 – Metformina atuando em células tumorais	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Proteína quinase ativado por AMP
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AKT	Proteína quinase B
BRAF	Protooncogene RAF do tipo B
B16F10	Células de melanoma murino metastático
CAT	Catalase
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ERK	Quinase regulada por sinais extracelulares
GSH	Glutathiona reduzida
KIT	Receptor tirosina quinase de melanócito
HDL	Lipoproteína de baixa densidade
HIF-1	Fator indutor de hipóxia do tipo 1
IGF-1	Hormônio semelhante à insulina do tipo 1
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LKB1	Quinase do fígado do tipo 1
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitose
MDA	Maloldialdeído
mTOR	O alvo mecanístico de rapamicina
MTT	(brometo de (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
MITF	fator de transcrição associado à microftalmia
MSH	Hormônio estimulante de melanócito
MSHR/MC1R	Receptor de MSH
NRAS	Gene da família RAS
$\cdot\text{O}_2^-$	Ânion radical superóxido
OCT1	Transportador orgânico catiônico-1
p53	Gene supressor de tumor
p16	inibidor de ciclina dependente de quinase 2A (CDKN2A)
PBS	Tampão salina fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PTEN	Fosfatase homóloga de tensina

P53	Supressor tumoral
RAF	Proteína de fibrosarcoma de aceleração rápida
RAS	Proteína de sarcoma de rato
ROS	Especies reativas de oxigênio
RNS	Especies reativas de nitrogênio
SOD	Superóxido dismutase
SUMO	modificador de ubiquitina que adiciona o peptídeo S
TGF- β	Fator de crescimento tumoral do tipo β
Tsc1/2	Esclerose tuberosa do tipo 1 ou 2
TUNEL	Deoxinucleotidiltransferase terminal dUTP
TRAP	Capacidade antioxidante total
VEGF	Fator de crescimento edotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	MELANOMA	11
1.2	GENÉTICA DO MELANOMA	12
1.3	METFORMINA	13
1.4	METFORMINA E CÂNCER	15
1.5	METFORMINA ATIVIDADE ANTICÂNCER	19
1.6	CÉLULAS DE MELANOMA MURINO DA LINHAGEM B16F10 E METFORMINA	20
1.7	ESTRESSE OXIDATIVO E METFORMINA	21
2	OBJETIVO	24
2.1	OBJETIVO GERAL	24
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
	CONCLUSÕES	25
	REFERÊNCIAS	26
	ANEXOS	31
	Artigo – Metformin reduces murine melanoma growth: participation of oxidative stress, VEGF and apoptosis	32
	Figuras do Artigo	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 MELANOMA

O melanoma cutâneo se origina a partir de alterações dos melanócitos, células produtoras de melanina, sendo um dos cânceres mais letais entre adultos jovens. Sua incidência tem aumentado drasticamente durante as últimas décadas (Tomic, Botton et al. 2011). O melanoma é o câncer de pele mais agressivo apresentando menor incidência (com 2.960 novos casos estimados em homens e 2.930 em mulheres) quando comparado ao câncer de pele não melanoma. As maiores taxas encontradas são na região sul, devido a sua população ser de pele mais clara (INCA 2014). A progressão do melanoma é caracterizada inicialmente por uma fase de crescimento radial, *in situ*, minimamente invasiva. Esta fase é seguida por um crescimento vertical, no qual o tumor ganha a capacidade de metástase. O melanoma tem uma alta capacidade de invasão podendo alcançar órgãos distantes do local inicial (Tomic, Botton et al. 2011).

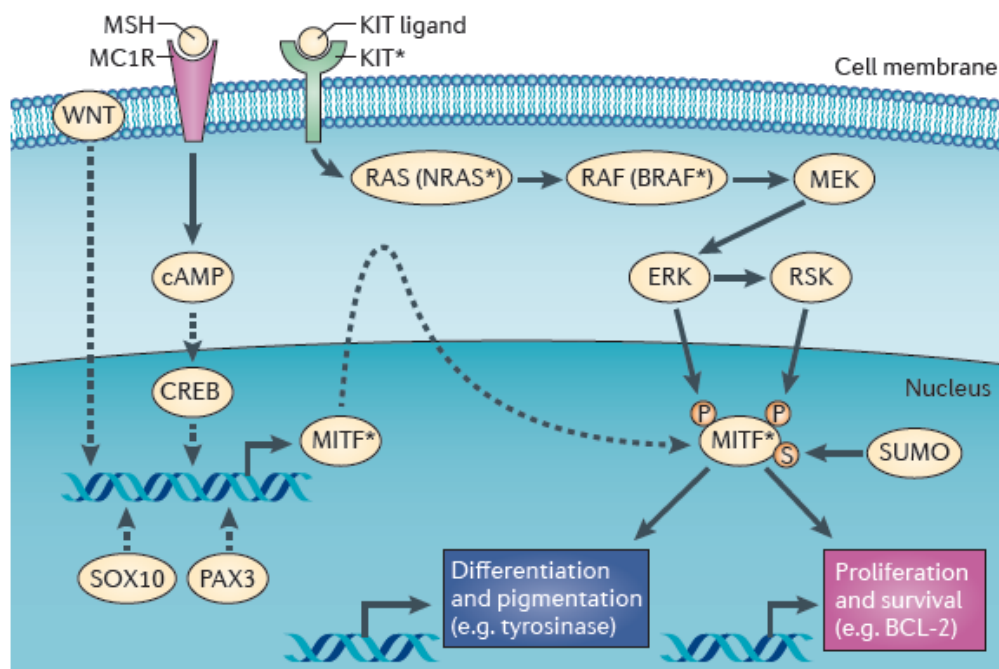
No geral, a capacidade de metástase é comumente devida a alterações na expressão de moléculas de adesão da família das caderinas, ocorrendo uma diminuição da E-caderina com aumento da expressão da N-caderina. Com estas mudanças, os melanócitos escapam do controle dos queratinócitos, esta capacidade de invasão da derme está associada a uma alteração na transição mesenquimal epitelial caracterizada por mudanças na expressão de moléculas de adesão como as caderinas, favorecendo a passagem pela membrana basal, interagindo com novos tipos celulares como os fibroblastos e células do endotélio vascular, facilitando a progressão tumoral e a metástase. Também ocorre a produção de metaloproteinases, como as colagenases 2 e 9, degradando o principal constituinte da membrana basal, que é o colágeno do tipo IV (Fukunaga-Kalabis, M. et al. 2008; Cerezo, Tichet. et al. 2013). O prognóstico de melanoma metastático em estadiamento IV (doença disseminada para órgãos distantes) é ruim, com uma taxa de sobrevida entre 6 a 9 meses após o diagnóstico (Cerezo, Tichet et al. 2013).

1.2 GENÉTICA DO MELANOMA

Alterações nos oncogenes ou genes supressores tumorais são dependentes de outros eventos, sendo poucas alterações exclusivas do melanoma. A via da NRAS (via RAS), que ativa RAF (proteína quinase) em resposta a ativação do receptor de fator de crescimento, encontra-se mutada em 15-20% dos melanomas (van't Veer, Burgering et al. 1989). Mutação em BRAF confere ativação independente de RAS que ativa a via das MAPK quinase (proteína quinase ativadora de mitose), sendo que mutação em BRAF e NRAS são raramente encontradas concomitantemente (Goel, Lazar et al. 2006). A perda da expressão do supressor tumoral p16, por mutação, deleção ou por silenciamento transcricional do *locus* CDKN2A também é frequente no melanoma (Yang, Rajadurai et al. 2005), e a mutação em BRAF e a deleção em CDKN2A favorece o desenvolvimento dessa neoplasia (Daniotti, Oggionni et al. 2004). Mutação ou deleção de PTEN (fosfatase homóloga de tensina) tem sido descrita em poucos casos de melanoma, porém, sua mutação ocorre comumente com a mutação em BRAF (Curtin, Fridlyand et al. 2005). Mutação em BRAF tem sido identificada em aproximadamente 50% dos casos de melanomas, a grande maioria causada por exposição intermitente ao sol (Flaherty, Hodi et al. 2012). A via da PTEN, um supressor tumoral, é conhecida por regular numerosos processos celulares, tendo sua função melhor descrita na inativação da via PI3K (fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato) que leva a sobrevivência celular, alteração no metabolismo e organização do citoesqueleto (Flaherty, Hodi et al. 2012; Laplante and Sabatini 2012).

Outras alterações genéticas, tal como amplificação de MITF (fator de transcrição associado à microftalmia) que é regulada pelo hormônio estimulante de melanócito (MSH), que se liga ao seu receptor MSHR/MC1R (receptor de MSH) também podem ser encontradas no melanoma. Indivíduos ruivos apresentam variações gênicas nesse receptor, favorecendo o desenvolvimento do melanoma (Flaherty, Hodi et al. 2012). Outros oncogenes, como os de linhagem restrita, (linhagens de melanócitos) como MITF e KIT (receptor tirosina quinase de melanócito) contribuem para um potencial metastático do melanoma (Gupta, Kuperwasser et al. 2005). MITF fosforilado ativa a via das MAPK favorecendo a proliferação do melanócito, tendo um regulador SUMO (modificador de ubiquitina) que adiciona o peptídeo S, representado na figura 1 (Flaherty, Hodi et al. 2012).

Figura 1 – Diferenciação de melanócitos via MITF (Flaherty, Hodi et al. 2012)



1.3 METFORMINA

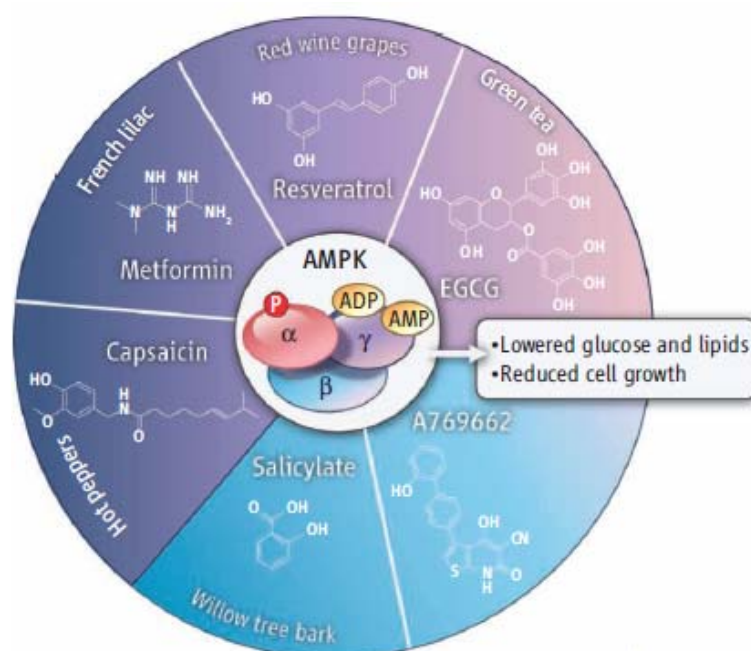
A metformina pertence à classe das biguanidas, derivada da planta *Galega officinalis*. A metformina é um agente anti-hiperglicemiante oral, usado pela primeira vez na clínica no final dos anos 1950, tornando-se, vinte anos depois, medicamento de primeira escolha para pacientes diabéticos do tipo 2 (Scherthaner and Scherthaner 2007; Apampa 2012). No fígado a metformina diminui a síntese de glicose, via gliconeogênese, diminui a quebra do glicogênio, via glicogenólise, levando assim a uma menor liberação de glicose pelo fígado (Apampa 2012). No plasma a metformina diminui a produção de insulina em jejum e pós-prandial, diminuindo a resistência à insulina. Ela também reduz os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumenta os de alta densidade (HDL). No trato gastrointestinal atua diminuindo a absorção de glicose (Apampa 2012).

A terapia com metformina é muito segura, mas tem seus efeitos adversos em 20-30% dos pacientes, (Salpeter, Greyber et al. 2010). Os principais efeitos são gastrointestinais, como náusea, diarreia, anorexia, cólicas abdominais e inchaço (Apampa 2012). Diminuição de vitamina B12 também é encontrada em pacientes que usam metformina, provavelmente devido à diminuição da absorção de cianocobalamina (vitamina B12) na parte distal do intestino (Powers and D'alessio

2011).A associação de metformina e acidose láctica é rara, mas ocorrendo deve-se interromper seu uso (Apampa 2012).

A Metformina atua ativando uma enzima reguladora do metabolismo celular, a proteína quinase dependente de adenosina monofosfatoquinase (AMPK), que monitora mudanças na energia intracelular, (Shaw and Cantley 2012). A homeostase energética celular é regulada por poucas proteínas, incluindo isoformas musculares como, glicogenofosforilase e fosfofrutoquinase, enzimas responsáveis pela glicogenólise e glicólise respectivamente, ativadas quando há diminuição de ATP. Diferentemente da enzima frutose 1,6-bifosfatase, que está envolvida com a gliconeogênese, inibida com a diminuição de ATP(Hardie, Ross et al. 2012). No entanto o principal sensor energético em todas as células eucarióticas é a AMPK (Hardie 2007). Sua ativação ocorre em resposta à vários mecanismos estressores, como diminuição na concentração intracelular de adenosina 5'-trifosfato (ATP), aumento na concentração de adenosina 5'difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP), e uma vez ativada, a AMPK reestabelece os níveis intracelular de ATP induzindo vias catabólicas e inibindo vias anabólicas (Hardie, Ross et al. 2012). AMPK é uma enzima heterotrimérica composta por uma subunidade α catalítica, qinase serina-treonina, e duas subunidades regulatórias (β e γ), representadas na figura 2.

Figura 2 – AMPK e suas três subunidades(α , β e γ), e substancias que ativam AMPK (Evans, Donnelly et al. 2005)

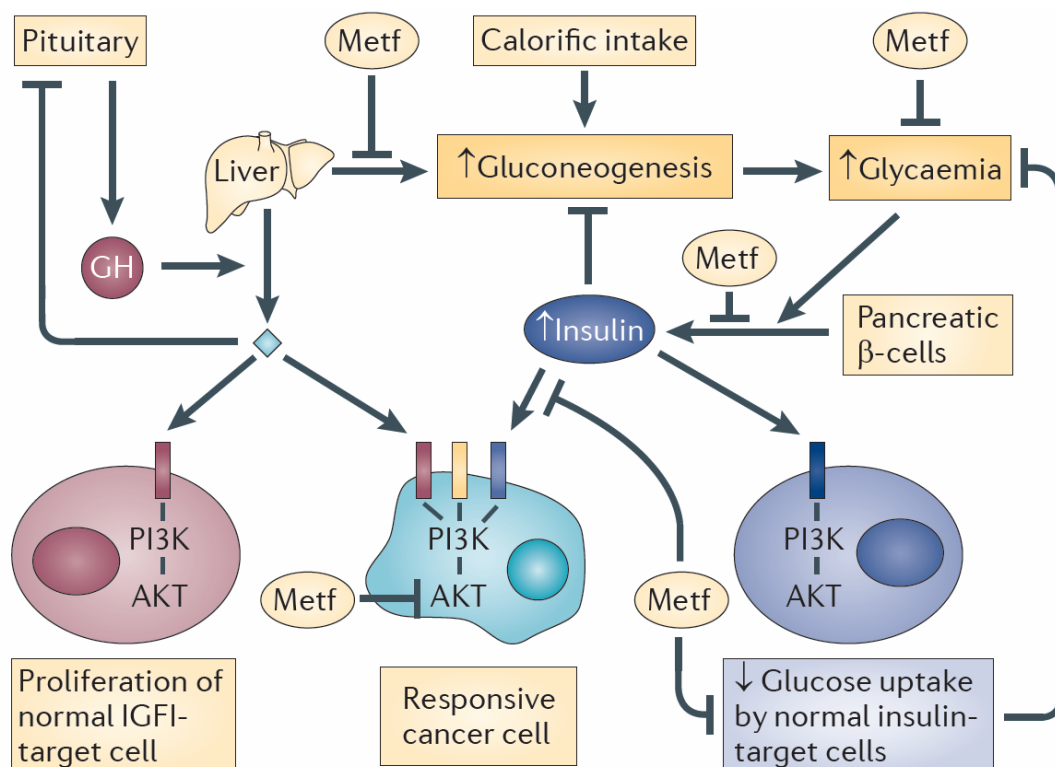


1.4 METFORMINA E CÂNCER

Em 2005 um estudo do Reino Unido, que acompanhou pacientes diabéticos tipo 2, encontrou uma menor incidência de câncer nos pacientes que faziam uso da metformina. (Evans, Donnelly et al. 2005; Natali and Ferrannini 2006). Desde então estudos tem confirmado que pacientes diabéticos tratados com metformina tem de 25 a 40% menos chances de ter câncer, comparado com os pacientes que fazem uso de insulina ou que usam sulfonilurías, drogas que estimulam a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas. A figura 3 mostra o efeito da metformina no diabetes tipo 2 atrelado ao efeito anticâncer. O tratamento com metformina é um dos tratamentos mais antigos e barato, comumente prescritos no mundo, cerca de 120 milhões de prescrições anualmente (Taubes 2012).

Estudos evidenciaram que a metformina ativa AMPK em tecidos humanos e murinos (Shaw, Lamia et al. 2005). O mecanismo exato pelo qual a metformina atua permanece desconhecido, mas provavelmente não ativa diretamente LKB1 ou AMPK (Hardie 2006).

Fig.3 – Controle da proliferação celular e crescimento tumoral pela metformina por inibição da AKT (Pollak 2012).



A ativação da AMPK pela metformina provavelmente é indireta, já que, a metformina atua diretamente na mitocôndria inibindo o complexo I da cadeia respiratória, uma inibição fraca, porém específica. Sua ação inibitória máxima no complexo I da cadeia respiratória é de aproximadamente 40% (El-Mir, Nogueira et al. 2000; Owen, DORAN et al. 2000; Viollet, Guigas et al. 2012). A metformina também exerce seu efeito inibitório na mitocôndria diminuindo produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) bloqueando seletivamente o fluxo de elétrons através do complexo I da cadeia respiratória (Kane, Anderson et al. 2010).

A ação principal da metformina nos hepatócitos é devido à expressão do receptor OCT1 (transportador orgânico catiônico-1), no qual adentra a célula (Shu, Sheardown et al. 2007), deleção do gene OCT1 em camundongos reduziu a absorção de metformina no hepatócito. Polimorfismo desse gene em humanos acarreta em uma redução da ação da metformina em baixar os níveis de glicose sanguínea (Shu, Sheardown et al. 2007), sendo sua concentração aumentada no fígado, área periportal, na ordem de micromolar (Wilcock and Bailey 1994).

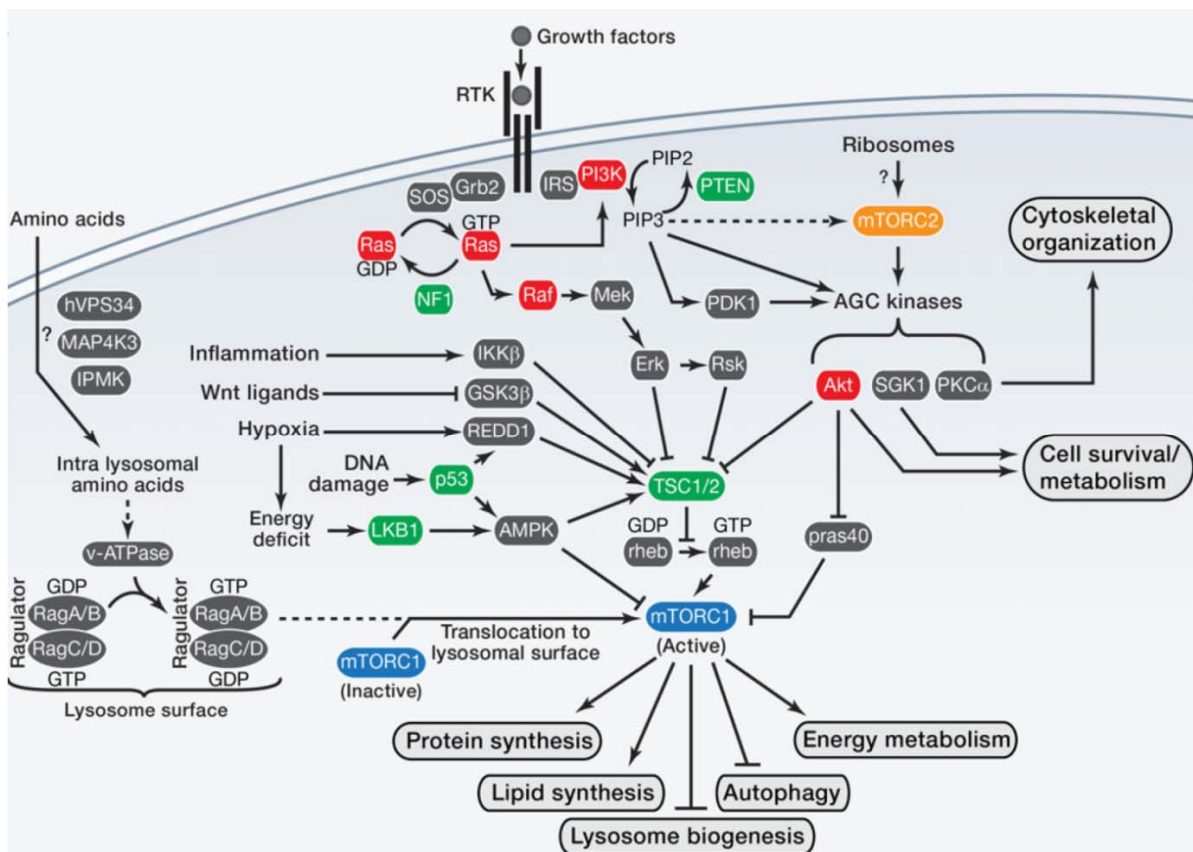
A metformina apresenta sua ação farmacológica essencialmente via AMPK, no entanto, estudos *in vitro* com células cancerosas podem ser independentes de AMPK, como a autofagia (Rattan, Giri et al. 2011; Tomic, Botton et al. 2011). Um estudo recente (Tomic, Botton et al. 2011) mostrou que em melanócitos humanos normais que expressavam AMPK, a metformina não afeta a viabilidade celular. Sugerindo uma ação da metformina, evidenciando uma regulação tumor específica.

Rocha et al (2011) mostraram que o tratamento combinado de metformina e paclitaxel (quimioterápico) levou a um aumento quantitativo na ativação de AMPK e uma redução drástica na sinalização na via mTOR, levando a uma diminuição acentuada no volume tumoral em camundongos imunodeficientes inoculados subcutaneamente com células de câncer de pulmão. A via mTOR integra uma variedade de estímulos ambientais, regulando o crescimento do organismo e sua homeostase, com participação em um número cada vez maior de patologias, como câncer, diabetes tipo 2, obesidade, doenças neurodegenerativas e no envelhecimento. (Laplanche and Sabatini 2012; Johnson, Rabinovitch et al. 2013). A proteína mTOR controla muitos processos que geram ou usam grande quantidade de energia e nutrientes, tendo uma importância no comportamento celular básico

como no crescimento e na proliferação (Laplante and Sabatini 2012). A atividade antineoplásica da metformina via ativação de AMPK é mediada através da inibição da sinalização de mTORC1 (mTOR complexo-1), levando a inibição de síntese de proteínas e proliferação celular (Figura 4) (Zakikhani, Dowling et al. 2006; Viollet, Guigas et al. 2012). A mTORC1 é ativado por pelo menos cinco sinais, sejam intracelulares ou extracelulares, são eles: fatores de crescimento, estresse, estado energético, nível de oxigênio e amino ácidos, que controlam os principais processos como síntese de proteína de lipídeos e autofagia (Figura 4). (Laplante and Sabatini 2012).

A proteína Tsc1/2 regula negativamente mTORC1, atuando como um supressor tumoral (Inoki, Zhu et al. 2003). Tsc1/2 transmitem muitas das sinalizações que ativam mTORC1 como fatores de crescimento, insulina e o hormônio semelhante a insulina (IGF-1), estimulando a via da PI3K (fosfoinositídeo-3-quinase) e da Ras (protótipo de uma família de proteína G) vias responsáveis pela sobrevivência e pela proliferação celular, ativando as proteínas Raf-1, MEK e ERK que são membros da família das MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos). Citocinas pro-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF α), podem também ativar mTORC1 através de mecanismos semelhantes a fatores de crescimento (Laplante and Sabatini 2012).

Figura 4 – Regulação da via mTORC1 e mTORC2. Via mTORC1 regulada por fatores de crescimento, amino ácidos, estresse, estado energético e hipóxia. A mTORC2 é ativada por fatores de crescimento. Proteínas marcadas em vermelho são oncogenes e proteínas marcadas em verde são supressores tumorais (Laplante and Sabatini 2012).



Dano no DNA (ácido desoxirribonucleico) sinaliza para mTORC1, por diversas vias, todas dependentes da transcrição de p53. A lesão no DNA induz a expressão de supressores tumorais como Tsc2 e Pten (fosfatase e tensina homologa deletada em cromossomo 10) causando uma diminuição considerável na sinalização do eixo PI3K- mTORC1 (Feng, Zhang et al. 2005), e ainda, a lesão de DNA pode ativar AMPK através de um mecanismo dependente de Sestrin 1/2 (Budanov and Karin 2008).

Assim como a AKT (Proteína quinase B) a AMPK atua diretamente na mTORC1, em resposta a hipóxia ou baixo estado energético, por inibição alostérica da mTORC1 (Gwinn, Shackelford et al. 2008).

1.5 METFORMINA ATIVIDADE ANTICÂNCER

Recentemente, evidências genéticas mostram que AMPK exerce atividade de supressor tumoral *in vivo* (Faubert, Boily et al. 2013). Células com AMPK inativadas promovem um desvio de via metabólica para obtenção de energia, aumentando a via da glicólise, independentemente da concentração de oxigênio, onde há a utilização de seus substratos para a formação de macromoléculas necessárias para a proliferação celular. Essas alterações se dão pelo aumento do fator de transcrição induzível por hipóxia (HIF-1 α), regula a síntese de mRNA de pelo menos oito enzimas glicolíticas, um dos principais indutores de muitas vias fisiológicas de células cancerosas, e do VEGF (fator de crescimento vascular endotelial) que estimula a angiogênese em direção ao tumor. Semelhança metabólica nesses tipos de células, e também em células cancerosas, conhecido como efeito de Warburg, onde há o aumento da glicólise e de lactato (Nelson, Cox et al. 2009; Choi and Park 2013; Faubert, Boily et al. 2013).

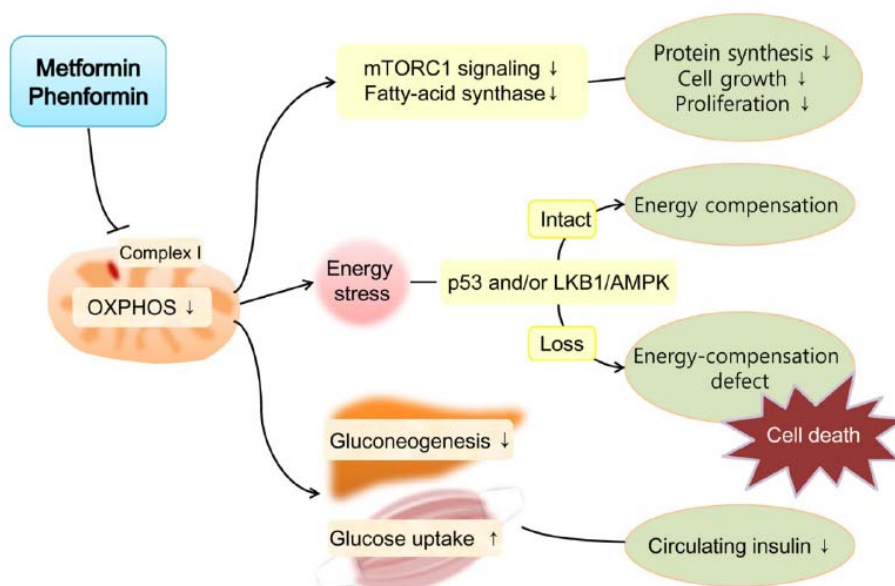
Metformina pode ativar AMPK em células tumorais diminuindo a síntese de proteínas e lipídeos via inibição da sinalização de mTORC1, limitando seu crescimento e proliferação (Choi and Park 2013). Porém, paradoxalmente AMPK pode estar ligada ao aumento da resistência ao estresse, tornando viáveis células cancerosas em ambiente de estresse, como hipóxia e metástase (Jeon, Chandel et al. 2012). A AMPK pode ainda tornar o estado redox elevado de uma célula cancerosa, via pentose fosfato, pela síntese de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) que tem um importante papel na prevenção de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Barger and Plas 2010). Assim, é possível que ativação da AMPK possa permitir que células cancerosas, sob condições de estresse energético ou deficiente de glicose sobrevivam. (Choi and Park 2013). Este aparente efeito contraditório da AMPK, ora inibindo o crescimento do câncer, via mTORC1, ora melhorando a sobrevivência da célula em um ambiente estressor, é provavelmente devido à diferenças específicas do tipo celular (Choi and Park 2013).

A metformina além de ativar AMPK, por inibir parcialmente a fosforilação oxidativa, levando a um nível reduzido de ATP. Este mecanismo induz estresse energético em células cancerosas, tornando-as susceptíveis a crises energéticas podendo levar a morte celular na presença de certas mutações funcionais, como por exemplo LKB1/AMPK ou em p53. Sem essas mutações que

suplantam a necessidade de ATP, a célula cancerígena torna-se viável, como se observa na figura 5 (Choi and Park 2013). Desse modo o estudo sobre a metformina, e seus mecanismos de ação, tem sua importância no tratamento de vários tipos de câncer, em diferentes estadiamentos e mutações que a célula cancerígena pode conter (Lee, Kim et al. 2012; Choi and Park 2013).

Cerezo e colaboradores (2013) realizaram estudo utilizando células de melanoma humano e demonstra o efeito da metformina contra a invasão e o desenvolvimento de metástase, por regular fatores relacionados à (EMT) transição mesenquimal epitelial, e seu efeito anti-metástase dependente do eixo AMPK/p53.

Figura 5 – Mecanismo de ação da metformina em células cancerígenas (Choi and Park 2013).



1.6 CÉLULAS DE MELANOMA MURINO DA LINHAGEM B16F10 E METFORMINA

Fidler e Nicolson (1976) realizaram pela primeira vez estudos com as células B16. A linhagem B16F10 é muito utilizada para o estudo do melanoma uma vez que é altamente agressiva cresce facilmente em frascos de cultura, e possui capacidade de gerar tumores subcutâneos ou metástases pulmonares em camundongos da linhagem C57/BL6 de acordo com o método de inoculação utilizado (Hart 1979).

Tomic e colaboradores (2011) realizaram um estudo no qual foram utilizados diferentes tipos celulares de melanoma (A375, SK-Mel 28, WM -9 e G361),

melanócitos normais e até mesmo células de pacientes com melanoma. No estudo foi utilizado metformina para ver seu efeito na proliferação celular, morte celular, e ainda, o mecanismo pelo qual a metformina atua via autofagia e apoptose. Mostrando que a metformina só exerce sua ação em melanócitos alterados e não em melanócitos normais, sugerindo uma ação tumor específica da metformina. Foi também utilizado o modelo da B16F10 em camundongos C57BL6 onde se verificou uma diminuição do tumor sólido implantado no dorso do animal, 2.5×10^5 células de B16F10, tratados com metformina via intraperitoneal dissolvida em PBS na dose de 2mg/camundongo/dia, iniciando o tratamento cinco dias após a implantação do tumor.

Janjetovic e colaboradores (2011) estudaram o efeito anti-melanoma da metformina em células de melanoma murino B16F10 *in vitro* e *in vivo*, via aloenxerto em camundongos C57BL6. Foi visto o bloqueio da proliferação de B16F10, em células tratadas com metformina devido ao aumento da apoptose e da autofagia associada com a indução de dano mitocondrial e estresse oxidativo, independente de AMPK. A ação antiproliferativa da metformina em células B16F10 induziu autofagia, apoptose, e estresse oxidativo via despolarização da membrana mitocondrial. Nesse estudo, *in vitro*, observou-se um aumento de p53, diminuição de Bcl-2, aumento de estresse oxidativo e autofagia, mostrando uma possível ação anticancerígena da metformina, modificando estas vias de crescimento celular. *In vivo* tratamento com metformina, via oral, nestes camundongos com melanoma foi observado uma diminuição significativa do peso tumoral nos animais tratados (Janjetovic, Harhaji-Trajkovic et al. 2011).

1.7 ESTRESSE OXIDATIVO E METFORMINA

O estresse oxidativo é um fenômeno que ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) e as defesas antioxidantes, podendo resultar tanto na diminuição destas defesas quanto no aumento da formação de ERO e ERN (HALLIWELL 2007). Há processos exógenos e endógenos de geração de radicais livres. As principais fontes endógenas são as enzimas, que podem indiretamente produzir ERO e ERN. A enzima xantina oxidase, a qual converte xantina a ácido úrico, converte oxigênio a radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) durante este processo, e a enzima óxido nítrico sintase

(NOS), que produz a espécie reativa óxido nítrico (NO) (Kohen and Gati 2000). Outras fontes endógenas de ERO e ERN são a ativação das células do sangue durante o processo inflamatório e durante o processo de isquemia-reperfusão, cuja formação de alta produção de radicais livres resulta em danos oxidativos (Kohen and Gati 2000). São consideradas fontes exógenas o ar poluente, gases naturais deletérios, ozônio, alta concentração de oxigênio, radiação ionizante e não-ionizante, invasão de bactéria patogênica, vírus e toxinas (Kohen and Gati 2000).

Dentre as ERO formadas, podemos destacar o radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$), ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), os radicais peroxil e alcoxil (LOO^{\cdot} e LO^{\cdot}), o oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), e os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e orgânicos (LOOH). Além das ERO, também estão envolvidos em processos redoxas ERN, tais como NO, peroxinitrito (ONOO^-) e espécies reativas de enxofre (HALLIWELL 2007). Essas espécies são fundamentais em diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a sobrevivência e a homeostase celular, com um equilíbrio refinado entre sua formação e remoção. Estresse oxidativo está envolvido em numerosas condições patológicas, como câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes melito, aterosclerose bem como no envelhecimento celular (Valko, Leibfritz et al. 2007; Salmon, Richardson et al. 2010).

A associação de estresse oxidativo e câncer já é bem conhecida, e está envolvida com inflamação crônica que ativa diversos fatores de transcrição como NF- κ B, AP-1, p53, HIF-1, entre outros, levando à expressão de muitos outros genes responsáveis por fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e reguladores do ciclo celular. Assim, o estresse oxidativo está envolvido no processo de proliferação celular, resistência à quimioterapia e radioterapia, na angiogênese tumoral e na metástase, podendo também estar envolvido iniciação do câncer, já que radicais livres podem induzir lesão de DNA e modular sua resposta ao dano (Barzilai and Yamamoto 2004; Reuter, Gupta et al. 2010). Tanto os ERO quanto as ERN podem danificar estruturas biológicas como proteínas, lipídeos, entre outras. Uma das moléculas resultante deste dano em lipídeos é o malondialdeído (MDA), que representa o processo de peroxidação lipídica originado por estresse oxidativo (Raghavan, Subramaniyam et al. 2012).

O estado redox celular é mantido tanto por vias enzimática quanto não enzimáticas, restabelecendo o ambiente redutor normal. De modo geral as condições de redução normalmente prevalecem. Sob condições normais, uma

eficiente defesa antioxidante tampona a ação oxidativa de ERO/ERN, minimizando os danos oxidativos e nitrosativos (Bachi, Dalle-Donne et al. 2012). As principais enzimas antioxidantes são: superóxido dismutase (SOD), catalase e glutationaperoxidase (GPx), que atuam em conjunto com glutationaredutase (GR) e com pequenas moléculas como α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico, vitamina A, ácido úrico e glutationa reduzida (GSH) (HALLIWELL 2007). O principal constituinte do tampão redox da célula são proteínas thióis, que juntas estão em uma concentração de 10-30 mM (Schafer and Buettner 2001). Uma importante defesa antioxidante não enzimática é a GSH, que é um tripeptídeo composto por (glicina, cisteína e glutamina) sendo encontrada em praticamente todas as células. A depleção nos níveis de GSH prejudica o estado redox da célula contra a ação tóxica dos radicais livres e essa molécula é um dos indicadores de estresse oxidativo mais utilizados na literatura científica (HALLIWELL 2007).

A metformina é um inibidor parcial do complexo I da cadeia respiratória que é um dos principais locais de produção de ânions superóxidos. Sabendo-se que a fosforilação oxidativa pode ocorrer duas direções de fluxo de elétrons: a direção normal dos complexos I, II, III e IV, e o fluxo reverso, o tratamento com metformina em mitocôndrias de fígado de rato mostrou que há diminuição de espécies reativas de oxigênio quando o fluxo reverso de elétrons é estimulado, diferentemente do tratamento com rotenona (inibidor padrão do complexo I), levando ao aumento de espécies reativas. Quando o fluxo de elétrons é normal a metformina não eleva a produção de espécies reativas de oxigênio e o mesmo não ocorre com a rotenona que diminui a produção de espécies reativas de oxigênio quando o fluxo de elétrons é normal (Ouslimani, Peynet et al. 2005; Batandier, Guigas et al. 2006; Kane, Anderson et al. 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da metformina em modelo experimental de melanoma murino *in vitro* e *in vivo*, a fim de verificar a participação dos radicais livres na proliferação tumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *In vivo*- Analisar o efeito antitumoral da metformina em células B16F10 implantadas subcutaneamente em camundongos C57/BL6; Estudar o envolvimento do estresse oxidativo sistêmico na progressão do tumor.

- *In vitro*- Verificar o efeito da metformina sobre os níveis de tióis totais, viabilidade, proliferação e morte celular.

CONCLUSÕES

In vivo

- O tratamento com a dose 90 mg/kg foi suficiente para diminuir o crescimento tumoral de B16F10 implantada via subcutânea no dorso de camundongos C57/BL6 em 46%
- A metformina diminuiu significativamente o VEGF circulante;
- Animais portadores do tumor apresentaram diminuição da atividade das enzimas eritrocitárias SOD e CAT e também diminuição dos níveis de GSH eritrocitária. O tratamento com metformina restabeleceu a atividade da catalase, os níveis de GSH e aumentou a capacidade antioxidante total quando comparada aos parâmetros de animais controle;

In vitro

- A diminuição da viabilidade celular em um período de incubação de 24 horas com a metformina só foi observada na concentração mais elevada, de 5mM;
- Na concentração de 5mM, o tratamento com metformina em um período de incubação de 24 horas foi capaz de induzir apoptose em células B16F10;
- Em um período de incubação de 24 horas, todas as concentrações de metformina testadas (6µM – 5mM) diminuíram os níveis de tióis totais nas células B16F10;
- Após 48 horas de incubação todas as concentrações de metformina testadas diminuíram a viabilidade de células B16F10, sendo equivalente com a diminuição da proliferação celular;
- Os resultados revelam a metformina como um agente terapêutico em potencial no tratamento do melanoma, por atuar, em parte, sobre mecanismos geradores de estresse oxidativo, tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol. 105: 121-126.
- Alamdari, D. H., E. Kostidou, et al. (2005). "High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein." Free Radical Biology and Medicine 39(10): 1362-1367.
- Apampa, B. (2012). "Pharmacology and safe prescribing of metformin." Nurse Prescribing 10(12): 597-602.
- Bachi, A., I. Dalle-Donne, et al. (2012). "Redox proteomics: chemical principles, methodological approaches and biological/biomedical promises." Chemical reviews 113(1): 596-698.
- Barger, J. F. and D. R. Plas (2010). "Balancing biosynthesis and bioenergetics: metabolic programs in oncogenesis." Endocrine-related cancer 17(4): R287-R304.
- Barzilai, A. and K.-I. Yamamoto (2004). "DNA damage responses to oxidative stress." DNA repair 3(8): 1109-1115.
- Batandier, C., B. Guigas, et al. (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." Journal of bioenergetics and biomembranes 38(1): 33-42.
- Budanov, A. V. and M. Karin (2008). "p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling." Cell 134(3): 451-460.
- Cerezo, M., M. Tichet, et al. (2013). "Metformin blocks melanoma invasion and metastasis development in AMPK/p53-dependent manner." Molecular cancer therapeutics 12(8): 1605-1615.
- Choi, Y. K. and K.-G. Park (2013). "Metabolic roles of AMPK and metformin in cancer cells." Molecules and cells 36(4): 279-287.
- Curtin, J. A., J. Fridlyand, et al. (2005). "Distinct sets of genetic alterations in melanoma." New England Journal of Medicine 353(20): 2135-2147.
- Daniotti, M., M. Oggionni, et al. (2004). "BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma." Oncogene 23(35): 5968-5977.
- El-Mir, M.-Y., V. Nogueira, et al. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." Journal of Biological Chemistry 275(1): 223-228.
- Evans, J. M., L. A. Donnelly, et al. (2005). "Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients." Bmj 330(7503): 1304-1305.
- Faubert, B., G. Boily, et al. (2013). "AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo." Cell metabolism 17(1): 113-124.

- Feng, Z., H. Zhang, et al. (2005). "The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102(23): 8204-8209.
- Flaherty, K. T., F. S. Hodi, et al. (2012). "From genes to drugs: targeted strategies for melanoma." Nature Reviews Cancer 12(5): 349-361.
- Fruehauf, J. P. and V. Trapp (2008). "Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma?".
- Goel, V. K., A. J. Lazar, et al. (2006). "Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma." Journal of Investigative Dermatology 126(1): 154-160.
- Gupta, P. B., C. Kuperwasser, et al. (2005). "The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation." Nature genetics 37(10): 1047-1054.
- Gwinn, D. M., D. B. Shackelford, et al. (2008). "AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint." Molecular cell 30(2): 214-226.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C (2007). "Free radicals in biology and medicine." New York: Oxford, 2007 (4ed).
- Hardie, D. G. (2006). "Neither LKB1 nor AMPK are the direct targets of metformin." Gastroenterology 131(3): 973.
- Hardie, D. G. (2007). "AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy." Nature reviews Molecular cell biology 8(10): 774-785.
- Hardie, D. G., F. A. Ross, et al. (2012). "AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis." Nature reviews Molecular cell biology 13(4): 251-262.
- Hart, I. R. (1979). "The selection and characterization of an invasive variant of the B16 melanoma." The American journal of pathology 97(3): 587.
- Henry, L., C. Fabre, et al. (2013). "Clinical use of p - proteasome in discriminating metastatic melanoma patients: Comparative study with LDH, MIA and S100B protein." International Journal of Cancer 133(1): 142-148.
- INCA(2014). Retrieved 07.04.14, from <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>.
- Inoki, K., T. Zhu, et al. (2003). "TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival." Cell 115(5): 577-590.
- Janjetovic, K., L. Harhaji-Trajkovic, et al. (2011). "In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin." European journal of pharmacology 668(3): 373-382.
- Jeon, S.-M., N. S. Chandel, et al. (2012). "AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress." Nature 485(7400): 661-665.

Johnson, S. C., P. S. Rabinovitch, et al. (2013). "mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease." Nature 493(7432): 338-345.

Kane, D. A., E. J. Anderson, et al. (2010). "Metformin selectively attenuates mitochondrial H₂O₂ emission without affecting respiratory capacity in skeletal muscle of obese rats." Free Radical Biology and Medicine 49(6): 1082-1087.

Kohen, R. and I. Gati (2000). "Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress." Toxicology 148(2): 149-157.

Laplante, M. and D. M. Sabatini (2012). "mTOR signaling in growth control and disease." Cell 149(2): 274-293.

Lee, J. H., T. I. Kim, et al. (2012). "The effects of metformin on the survival of colorectal cancer patients with diabetes mellitus." International Journal of Cancer 131(3): 752-759.

Li, J., Y. Cui, et al. (2014). "The proliferation of malignant melanoma cells could be inhibited by ranibizumab via antagonizing VEGF through VEGFR1."

Marklund, S. and G. Marklund (1974). "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase." European Journal of Biochemistry 47(3): 469-474.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods 65(1): 55-63.

Natali, A. and E. Ferrannini (2006). "Effects of metformin and thiazolidinediones on suppression of hepatic glucose production and stimulation of glucose uptake in type 2 diabetes: a systematic review." Diabetologia 49(3): 434-441.

Nelson, D. L., M. M. Cox, et al. (2009). Lehninger principios de bioquímica, Omega.

Ouslimani, N., J. Peynet, et al. (2005). "Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells." Metabolism 54(6): 829-834.

Owen, M., E. DORAN, et al. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." Biochem. J 348: 607-614.

Panis, C., A. Herrera, et al. (2012). "Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy." Breast cancer research and treatment 133(1): 89-97.

Panis, C., A. C. Herrera, et al. (2013). "Screening of circulating TGF- β levels and its clinicopathological significance in human breast cancer." Anticancer research 33(2): 737-742.

Pollak, M. (2012). "The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update." Nature Reviews Cancer 12(3): 159-169.

Powers, A. C. and D. D'alessio (2011). "Endocrine pancreas and pharmacotherapy of diabetes mellitus and hypoglycemia." Goodman & Gillman's the pharmacological basis of therapeutics. 12th ed. McGraw Hill: 1237-1273.

Raghavan, S., G. Subramaniyam, et al. (2012). "Proinflammatory effects of malondialdehyde in lymphocytes." Journal of leukocyte biology 92(5): 1055-1067.

Rattan, R., S. Giri, et al. (2011). "Metformin attenuates ovarian cancer cell growth in an AMP - kinase dispensable manner." Journal of cellular and molecular medicine 15(1): 166-178.

Repetto, M., C. Reides, et al. (1996). "Oxidative stress in blood of HIV infected patients." Clinica chimica acta 255(2): 107-117.

Reuter, S., S. C. Gupta, et al. (2010). "Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?" Free Radical Biology and Medicine 49(11): 1603-1616.

Rocha, G. Z., M. M. Dias, et al. (2011). "Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth." Clinical Cancer Research 17(12): 3993-4005.

Salmon, A. B., A. Richardson, et al. (2010). "Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?" Free Radical Biology and Medicine 48(5): 642-655.

Salpeter, S., E. Greyber, et al. (2010). "Salpeter Posthumous EE. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus." Cochrane database syst rev1.

Schafer, F. Q. and G. R. Buettner (2001). "Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple." Free Radical Biology and Medicine 30(11): 1191-1212.

Schernthaner, G. and G. H. Schernthaner (2007). Metformin—from Devil to Angel. Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments, Springer: 77-86.

Shaw, R. J. and L. C. Cantley (2012). "Ancient Sensor for Ancient Drug." SCIENCE 336(6083): 813-814.

Shaw, R. J., K. A. Lamia, et al. (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." Science 310(5754): 1642-1646.

Shu, Y., S. A. Sheardown, et al. (2007). "Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action." Journal of Clinical Investigation 117(5): 1422-1431.

Taubes, G. (2012). "Cancer prevention with a diabetes pill?" Science 335(6064): 29-29.

Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues." Analytical biochemistry 27(3): 502-522.

Tomic, T., T. Botton, et al. (2011). "Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms." Cell death & disease 2(9): e199.

Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." The international journal of biochemistry & cell biology 39(1): 44-84.

van't Veer, L. J., B. Burgering, et al. (1989). "N-ras mutations in human cutaneous melanoma from sun-exposed body sites." Molecular and cellular biology 9(7): 3114-3116.

Vander Heiden, M. G. (2011). "Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens." Nature reviews Drug discovery 10(9): 671-684.

Victorino, V., C. Panis, et al. (2013). "Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women." Age 35(4): 1411-1421.

Viollet, B., B. Guigas, et al. (2012). "Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview." Clinical science 122(6): 253-270.

Wilcock, C. and C. Bailey (1994). "Accumulation of metformin by tissues of the normal and diabetic mouse." Xenobiotica 24(1): 49-57.

Yang, G., A. Rajadurai, et al. (2005). "Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma." Journal of Investigative Dermatology 125(6): 1242-1251.

Zakikhani, M., R. Dowling, et al. (2006). "Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells." Cancer research 66(21): 10269-10273.

ANEXOS

Metformin reduces murine melanoma growth: participation of oxidative stress, VEGF and apoptosis.

Fernando Pinheiro de Souza Neto, Sara Santos Bernardes^a, Poliana Camila Marinello^a, Rodrigo Cabral Luiz ^a, Rubens Cecchini^b, Flávia Alessandra Guarnier^c, Alessandra Lourenço Cecchini^a.

Corresponding author: Alessandra Lourenço Cecchini

E-mail: alcecchini@uel.br

Fax: +55 (43) 3371 42 67

Phone: +55 (43) 3371 4529

Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051-990, Paraná, Brasil.

^a Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^b Laboratory of Pathophysiology and Free Radicals, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil

^c Laboratory of Pathophysiology and muscle adaptation, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

ABBREVIATIONS:

TGF- β 1, transforming growth factor β 1; AMPK, adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase; H₂O₂, peroxide of hydrogen; O₂^{-•} Radical superoxide; TRAP, Total radical-trapping antioxidant parameter; SOD, superoxide dismutase; ROS, reactive oxygen species; MTT, 2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; PBS, phosphate-buffered saline; LDH, lactic dehydrogenase; MDA, malondialdehyde; ANOVA, analysis of variance; CAT, catalase; GSH, reduced glutathione; VEGF, vascular endothelial growth factor.

ABSTRACT:

This study provides evidence that metformin reduces murine melanoma growth, alters systemic oxidative stress and VEGF profiles. Metformin is an oral antihyperglycemic agent and drug of choice in type 2 diabetic patients with antiproliferative and antitumoral effects. We investigated the role of oxidative stress in a murine melanoma model (B16F10 subcutaneous implantation) treated with metformin and also *in vitro* in cultivated B16F10 cells. *In vivo* we analyzed some parameters of oxidative stress (SOD, CAT, GSH and TRAP) and some cytokines. *In vivo* increased systemic VEGF and LDH and increased oxidative stress, inhibiting the activity of SOD and catalase. Metformin treatment reduced tumor volume mainly reducing VEGF and decreases oxidative stress, catalase, GSH, and increase TRAP. The *in vitro* results indicate that metformin increases oxidative stress in melanoma B16F10 cells, due to reduction of thiol. Also it was evidenced an increase in cytostatic, cytotoxic and apoptosis at 5mM, in 24 hours of treatment.

Keywords: Melanoma. Metformin. Oxidative stress. B16F10. VEGF

1 INTRODUCTION

Cutaneous melanoma originates in melanocytes, melanin-producing cells, and is one of the most lethal cancers among young adults. Its incidence has increased during the last decades (Tomic, Botton et al. 2011). Prognosis in advanced disease is poor, with a survival rate between 6 to 9 months after diagnosis (Cerezo, Tichet et al. 2013). Therefore the need for new effective therapies, with strategies in metabolic enzymes for cancer therapy, such as metformin (Vander Heiden 2011).

Metformin, derived from the plant (*Galega officinalis*) an oral anti-hyperglycemic agent, is the drug of choice for type 2 diabetes (Scherthaner and Scherthaner 2007; Apampa 2012). Epidemiological studies have confirmed that diabetic patients that use metformin have 25-40% less chance to develop cancer (Evans, Donnelly et al. 2005; Taubes 2012). It has been described that metformin increase oxidative stress in murine melanoma cells (B16F10) by the increase in mitochondrial superoxide generation. This mechanism could be the responsible for the antitumoral effect (Janjetovic et al., 2011). Tomic, et al 2011 showed that, *in vivo*, metformin induced autophagy and apoptosis, and decreases the volume tumor of treated mice (2mg of metformin/mouse/day).

A known activity of metformin is inhibiting complex I of the mitochondrial electron-transport chain, and the anti-diabetes and anticancer effects can be explained through the activation AMPK (Choi and Park 2013). AMPK promotes catabolic pathways to generate more ATP, and inhibits anabolic pathways (Hardie, Ross et al. 2012). Therefore, the oxidative stress *status*, especially in murine melanoma model, has been little studied and also the type of cell death induced by metformin and the decrease in tumor growth may represent a better understanding of metformin treatment in melanoma.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *IN VIVO* MURINE CANCER MODEL AND TREATMENT WITH METFORMIN

In this assay, C57/BL6 mice, obtained from University of Londrina with 8 weeks of age (20-25 g) were divided into 4 groups: control treated with PBS (C+PBS), control treated with metformin (C+MET), Tumor treated with PBS (T+PBS)

and Tumor treated with metformin (T+MET) inoculated subcutaneously with B16F10 dissolved in DMEM, melanoma murine cells (10^5 cells/mouse). After 3 days, animals received intraperitoneal injection of metformin (90mg/kg) dissolved in PBS (Tomic, Botton et al. 2011). After 14 days the inoculation of B16F10 cells, mice were sacrificed and obtained blood of heart and followed by separation plasma and erythrocytes, with were washed 3x with 1ml of saline 0.9% and centrifuged for 5min at 4°C tree times. The mice had *ad libitum* access to food and water, animal experiments were approved by a local ethical committee of (CEA14636.2011).

2.2 VOLUME TUMOR

Volume tumor was calculated: $V = [W \times L \times (W+L)/2] \times 0,52$ tumor volume (V) was calculated by measuring the length (L) and width (W) (Rocha, Dias et al. 2011)

2.3 PLASMA BIOCHEMICAL ANALYSIS

Systemic transforming growth factor beta (TGF- β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) levels were determined by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturers' instructions (eBioscience[®]) at 450 nm. The results were expressed as pg x mL⁻¹. LDH quantification (Doles, Goiás, Brazil) was used to measure the levels of LDH released from the cytosol of damaged cells into the systemic, in order to estimate necrosis. The assay is based on the reduction of nicotinamide adenine dinucleotide by LDH. The absorbance was read at 490 nm using a microplate spectrophotometer (Multiskan GO; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.4 OXIDATIVE STRESS PARAMETERS

Total thiols in plasma were measured by the method of Hu (1994). Total thiol groups were calculated using a calibration curve prepared by GSH (Sigma Aldrich[®]). Results were expressed in nM of thiol. Plasma MDA was measured by High-performance liquid chromatography in a LC-20AT[®] HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), as described by (Victorino, Panis et al. 2013). Readings were obtained at

535 nm over 11 min at a flow rate of 0.8 mL/minute at 35°C, and results were expressed as nM of MDA. Measuring protein carbonyl by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Alamdari, Kostidou et al. 2005).

Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) of plasma was determined as described by (Repetto, Reides et al. 1996) modified by (Panis, Herrera et al. 2012). Chemiluminescence curves were obtained in a GloMax[®] luminometer 20/20 (Promega, Madison, USA), and the results are expressed in μM of Trolox.

Erythrocytes antioxidant analysis

Erythrocytes were obtained from heparinized blood and washed three times with 0.9% saline solution at 4°C. Catalase activity was determined as described by (Aebi 1984) modified by (Panis, Herrera et al. 2012). Absorbance kinetics was monitored in UV-1650 PC[®] UV-vis spectrophotometer at 240 nm (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Superoxide (SOD) activity was determined according to the method described by (Marklund and Marklund 1974) modified by (Panis, Herrera et al. 2012), at 420 nm. Final SOD results were expressed in USOD. Glutathione reduced (GSH) levels were determined with 30 μL of diluted erythrocytes at a ratio 1:100 in deionized water and incubated with 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) 60 μM in 1 M TRIS buffer according to the method described by (Tietze 1969) was measured at 412 nm and results were expressed in μM of GSH.

2.5 CELL CULTURE AND TREATMENT

The murine melanoma cell line (B16F10) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco[®] Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum and a 1% penicillin/streptomycin mixture. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C (Sanyo CO₂ Incubator; Sanyo, Kitanagoya, Aichi, Japan). The cytotoxicity, proliferation, and genotoxicity assays were performed by seeding 10⁵ cells in 24-well plates and culturing them in fresh culture media for 24 h. Cells were then exposed to metformin (Santa Cruz

Biotechnology, Dallas, TX, USA) at two clinically relevant concentrations (6 and 30 μM), because is the concentration minimum and maximum in the plasma, and two experimental concentrations (1000 and 5000 μM) for 24 h or 48 h. All experiments were performed in triplicate and repeated thrice.

2.5.1 *In vitro* Cytotoxicity and cell proliferation assays

The 2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole; bromide (MTT) assay (Mosmann 1983) were used to investigate the effect of metformin on cell viability by assessing alterations in mitochondrial function. Cell proliferation assays Cells were treated as previously described. After 24 h and 48 h of treatment, the cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and trypsinized. The cells were then suspended in trypan blue (0.05%) and only the viable cells were enumerated using a Neubauer chamber. Cells were classified as viable (without dye) and unviable (blue-dyed) to determine the cytostatic or cytotoxic effect of the treatment.

2.6 *IN VITRO* TUNEL ASSAY

Apoptosis was analyzed in adherent cells using the DeadEnd Colorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA). The experimental procedures were carried out according to the manufacturer's protocol, and the coverslips were photographed using an Olympus BX3-URA Fluorescence System Microscope. Twenty photos were taken randomly.

2.7 DETERMINATION OF THIOL TOTAL *IN VITRO*

Total thiol levels was analyzed as previously described (Panis, Herrera et al. 2013) with resuspended and lysed cells B16F10, treated or not with metformin

2.8 STATISTICAL ANALYSIS

Comparisons were performed as follows: Control (no tumor) treated or no with metformin group and Tumor treated or no with metformin group. *In vivo* all data

are expressed as arithmetic means and standard errors of means (SEM). The Shapiro–Wilk W test verified the normality of the data. Data were compared by One-way ANOVA with Tukey's post test. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. Pearson's correlation test was used in data with normal distribution and Spearman's correlation test in data with no normal distribution. Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. All the statistical analyses were performed using Graphpad Prism[®] version 5.0 (GraphPad Software). *In vitro* Data, expressed as the mean \pm standard error of the mean, were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post test. Two-way ANOVA was used to analyze the proliferation and cell viability curves, with the Bonferroni post-hoc test was considered statistically significant ($*p < 0.05$). Data was analyzed using GraphPad Prism (version 5; San Diego, CA, USA).

3 RESULTS

3.1 *IN VIVO RESULTS*

Metformin treatment significantly reduced the tumor volume ($p < 0.0001$) (Figure 1a). The systemic LDH levels increased in the melanoma group when compared with control ($p < 0.001$) (Figure 1b), and metformin treatment did not modify these levels. The systemic VEGF also increased in the melanoma group and metformin significantly altered this parameter, restoring it to control levels ($p < 0.05$) (Figure 1c). The systemic TGF- β 1 did not alter (Fig 1d).

The erythrocytic SOD activity was significantly reduced in both groups melanoma and metformin treated in relation to metformin control group ($p < 0.05$) (Figure 2a). Erythrocytic catalase activity reduced in melanoma mice and metformin treatment restored it to control levels ($p < 0.05$) (Figure 2b). Erythrocytic GSH decreased in tumor-bearing mice compared to control group ($p < 0.05$), and metformin treatment restored this parameter to control levels (Figure 2c). The plasmatic TRAP was not different in melanoma group but the metformin treatment of melanoma mice significantly increased when compared to control group ($p < 0.05$) (Figure 2d). The plasmatic total thiol levels did not alter in any analyzed group (Figure 2e). The plasmatic MDA and carbonyl protein levels did not present modifications between groups (Figure 3a and 3b).

3.2 IN VITRO RESULTS

Metformin treatment reduced cell proliferation after 24 hours of exposure only in the concentration of 5000 μM ($p < 0.001$), and in all concentrations after 48 hours of exposure (Figure 4a). The MTT assay demonstrated that metformin reduced cell viability after 24 hours of exposure at 5000 μM ($p < 0.05$) (Figure 4b) and after 48 hours, in all of the concentrations used ($p < 0.05$) (Figure 4c). The apoptosis increased only at metformin 5000 μM ($p < 0.05$) (Figure 4d). All metformin concentrations reduced the total thiol levels ($p < 0.05$) (Figure 4e). Spearman's correlation test was made. MTT 24h x TUNEL was a negative correlation ($r = -0.515$, $p = 0.0036$). MTT 24h x Thiol was a positive correlation ($r = 0.4698$, $p = 0.0205$). Thiol x TUNEL was a negative correlation ($r = -0.5384$, $p = 0.0066$).

4 DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Metformin effects *in vitro* and *in vivo* in murine melanoma models have been studied in the last years (Tomic et al., 2011; Janjetovic et al., 2011). It was previously demonstrated that metformin, administered orally, could reduce the tumor size in a B16F10 melanoma cell model (Janjetovic et al., 2011). However, in spite of some mechanisms of drug action that have already been described *in vitro* (Janjetovic et al., 2011), the drug effects on tumor size *in vivo* remain unexplained.

In this paper, we observed that metformin was able to reduce the tumor volume and this effect was associated with a significant reduction in the plasmatic VEGF levels. This growth factor induces angiogenesis, which is an important mediator in tumor progression (Li, Cui et al. 2014). The VEGF decreasing after metformin treatment in the melanoma model had never been described. LDH circulating levels, which is considered a nonspecific tumor marker reflecting necrosis, commonly present in tumor cells due to its accelerated growth (Henry, Fabre et al. 2013) was increased in the animals with melanoma and although metformin treatment had reduced tumor size, it had no effect in LDH, indicating that or metformin impeach the cell to grow or it is killing the cells by other mechanisms. Aiming to analyze melanoma capacity to induce immunosuppression, we investigated the circulating TGF- β 1, and we concluded that in 14 days experimental time there was no alterations in their levels, and metformin treatment did not modify

this profile. Taking into consideration that melanosomes produce free radicals (Fruehauf and Trapp 2008), oxidative stress *in vivo* was investigated. As metformin activity is inhibiting complex I of the mitochondrial electron-transport chain, initially the anti diabetes and anticancer effects of metformin could be explained through activation AMPK. (Choi and Park 2013). This inhibition of complex 1 of mitochondria of rat liver with metformin showed that there is a decrease of reactive oxygen species (Kane, Anderson et al. 2010). According to our *in vivo* results, it was observed that the activity of erythrocytic antioxidant enzymes, SOD and catalase was significantly reduced in mice bearing melanoma, suggesting that these animals may present oxidative stress because of the decrease enzymatic antioxidants. Metformin was able to restore the catalase activity to control levels. The reduced glutathione (GSH) was decreased in animals with tumor. The increased systemic oxidative stress in the animals could characterize the tumoral microenvironment, once it has been demonstrated in literature that patients with melanoma tumors showed increased systemic oxidative stress, which decreases after surgical tumor resection (Gadjeva, Dimov & Georgieva, 2008). Metformin was able to restore the catalase activity and GSH to control levels and this effect probably interfered with the viability of tumor cells. Even though lipid peroxidation was not observed when metformin was used, it was previously described that metformin *in vitro* could increase oxidative stress in murine melanoma cells, by the increase in mitochondrial superoxide generation (Janjetovic et al., 2011). Melanoma did not interfere with the plasmatic TRAP and total thiol levels, but we observed an increase in TRAP in animals bearing tumor that were treated with metformin. This effect could reflect a mobilization tissue antioxidant defenses by metformin (Halliwell and Gutteridge, 2007). *In vivo* metformin did not interfere with the plasmatic total thiol levels and prooxidant markers as MDA and carbonyl protein.

The metformin treatment in control group did not alter any analyzed parameter, reinforcing the melanoma tumor model as viable. Tomic et al., (2011) demonstrated that metformin present a selective action in tumor cells and it had no effect in normal melanocytes, which is an indicator of the drug security. To compare the metformin mechanisms of action *in vivo* and *in vitro*, we analyzed the drug effects in B16F10 cells in culture. Metformin was able to significantly reduce cell proliferation after 24 hours of exposure only at 5000 μ M, and this effect was cytotoxic since the cell viability analyzed in the MTT assay and the apoptosis demonstrated the same

pattern. However, after 48 hours, all metformin concentrations reduced cell proliferation and this effect was cytotoxic too, since the MTT assay demonstrated that cell viability was reduced. The analysis of the intracellular total thiol levels demonstrated that metformin induced its consumption, since it was reduced in all of the used drug concentrations.

Based on the *in vivo* and *in vitro* results concluding remarks must be emphasized. Metformin significantly reduced the tumor progression acting mainly as an important mediator of angiogenesis decreasing circulating VEGF. Furthermore, it seems that metformin may play a role on the systemic oxidative stress, as SOD was significantly decreased. This decrease could be by two mechanisms: (a) by the inhibition of SOD activity by its substrate anion radical superoxide; (b) by the consumption of SOD by the excess of anion superoxide. The (a) hypothesis is more viable as catalase is also decreased in tumor bearing mice; if H_2O_2 is not produced by the dismutation of $O_2^{\cdot-}$. Metformin decreased cell proliferation and viability in B16F10 cells, inducing apoptosis cell death and impairing the antioxidant cell defenses through the decrease in thiol content. The relationship between the cell viability and thiol suggest that metformin is cytotoxic though increasing oxidative stress *in vitro*, differently of *in vivo*, that treatment with metformin decrease oxidative stress. Further studies are necessary to understand metformin's effects *in vivo* but this drug has been shown to be a promising agent in melanoma therapy.

REFERENCES

- Aebi, H. (1984). "Catalase in vitro." Methods Enzymol.**105**: 121-126.
- Alamdari, D. H., E. Kostidou, et al. (2005). "High sensitivity enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method for measuring protein carbonyl in samples with low amounts of protein." Free Radical Biology and Medicine**39**(10): 1362-1367.
- Apampa, B. (2012). "Pharmacology and safe prescribing of metformin." Nurse Prescribing**10**(12): 597-602.
- Balch, C. M., J. E. Gershenwald, et al. (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." Journal of Clinical Oncology**27**(36): 6199-6206.
- Choi, Y. K. and K.-G. Park (2013). "Metabolic roles of AMPK and metformin in cancer cells." Molecules and cells**36**(4): 279-287.

Evans, J. M., L. A. Donnelly, et al. (2005). "Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients." Bmj**330**(7503): 1304-1305.

Fruehauf, J. P. and V. Trapp (2008). "Reactive oxygen species: an Achilles' heel of melanoma?". Expert Rev Anticancer Ther. 2008 Nov;8(11):1751-7. doi: 10.1586/14737140.8.11.1751.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C (2007). "Free radicals in biology and medicine." New York: Oxford, 2007 (4ed

Henry, L., C. Fabre, et al. (2013). "Clinical use of p - proteasome in discriminating metastatic melanoma patients: Comparative study with LDH, MIA and S100B protein." International Journal of Cancer 133(1): 142-148.

Hu, M.-L. (1994). "Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma." Methods in enzymology**233**: 380-385.

Janjetovic, K., L. Harhaji-Trajkovic, et al. (2011). "In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin." European journal of pharmacology 668(3): 373-382.

Kane, D. A., E. J. Anderson, et al. (2010). "Metformin selectively attenuates mitochondrial H₂O₂ emission without affecting respiratory capacity in skeletal muscle of obese rats." Free Radical Biology and Medicine**49**(6): 1082-1087.

Li, J., Y. Cui, et al. (2014). "The proliferation of malignant melanoma cells could be inhibited by ranibizumab via antagonizing VEGF through VEGFR1."

Marklund, S. and G. Marklund (1974). "Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase." European Journal of Biochemistry**47**(3): 469-474.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods**65**(1): 55-63.

Panis, C., A. C. Herrera, et al. (2013). "Screening of circulating TGF- β levels and its clinicopathological significance in human breast cancer." Anticancer research**33**(2): 737-742.

Panis, C., A. Herrera, et al. (2012). "Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy." Breast cancer research and treatment**133**(1): 89-97.

Repetto, M., C. Reides, et al. (1996). "Oxidative stress in blood of HIV infected patients." Clinica chimica acta**255**(2): 107-117.

Rocha, G. Z., M. M. Dias, et al. (2011). "Metformin amplifies chemotherapy-induced AMPK activation and antitumoral growth." Clinical Cancer Research**17**(12): 3993-4005.

Schernthaner, G. and G. H. Schernthaner (2007). Metformin—from Devil to Angel. Pharmacotherapy of Diabetes: New Developments, Springer: 77-86

Taubes, G. (2012). "Cancer prevention with a diabetes pill?" Science**335**(6064): 29-29.

Tomic, T., T. Botton, et al. (2011). "Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms." Cell death & disease**2**(9): e199.

Vander Heiden, M. G. (2011). "Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens." Nature reviews Drug discovery**10**(9): 671-684.

Victorino, V., C. Panis, et al. (2013). "Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women." Age**35**(4): 1411-1421.

Fig.1 – Tumor growth parameters in 14 days B16F10 bearing C57/BL6 mice treated with metformin. C57BL6 mice were subcutaneously inoculated with 10^5 cells in 50 μ l of DMEM without bovine fetal serum in dorsal region, and treated 3 days later by injection of vehicle (PBS) or metformin (2mg/mouse/day) administered i.p. over a period of 11 days. **a.** Tumor volume; **b.** Plasma lactate dehydrogenase; **c.** Plasma VEGF; **d.** Plasma TGF- β . C: Control; T: Tumor; PBS: Phosphate saline buffer; MET: Metformin. The statistical significance of the differences was analyzed by t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post test, and $p < 0.05$ considered significant. * $p < 0.05$ significantly different from the C+PBS. # $p < 0.05$ significant different from the C+MET. + $p < 0.05$ significantly different from T+PBS. The mean \pm SEM of three independent experiments.

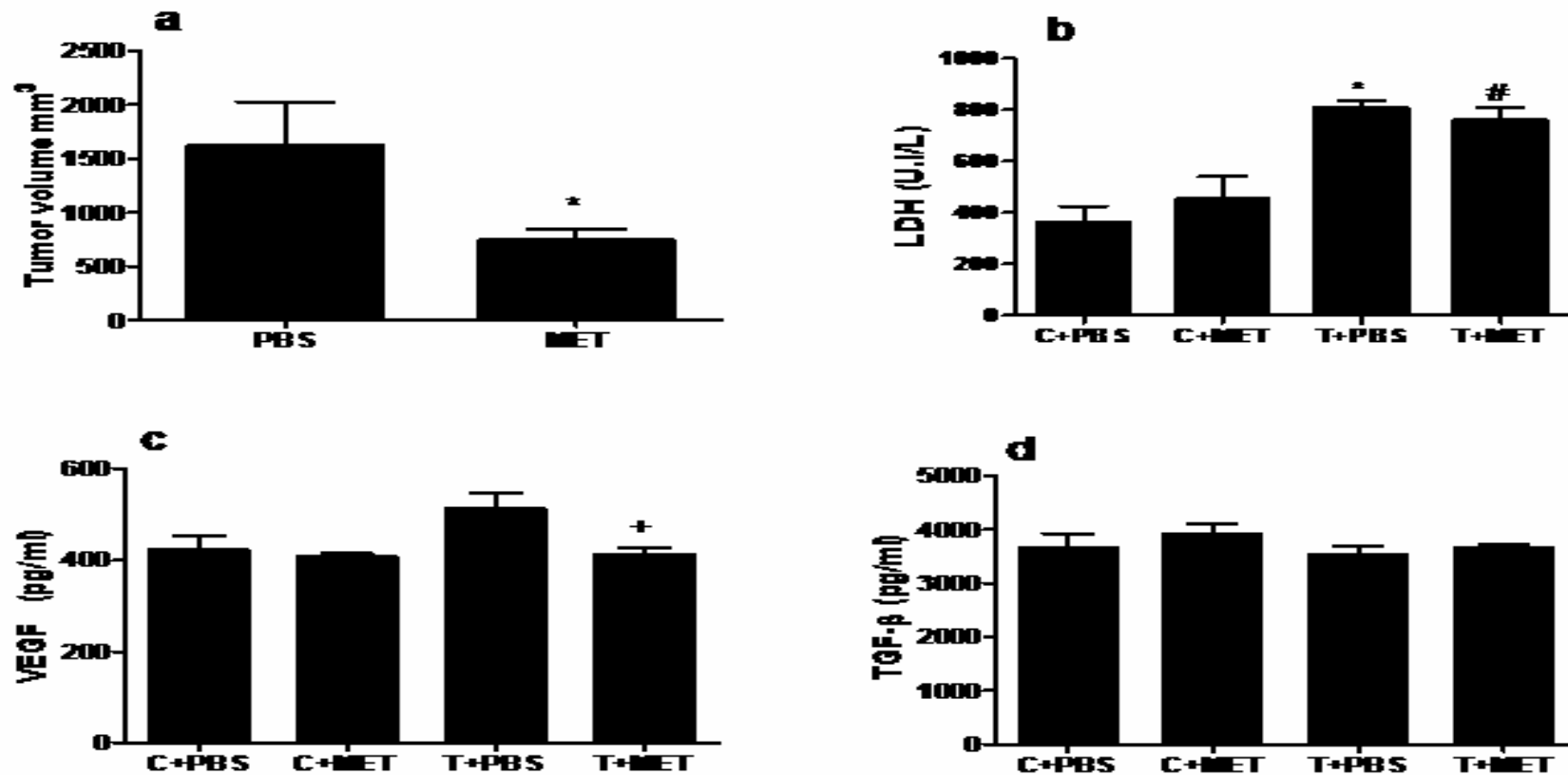


Figure 2 – Systemic antioxidant parameters in B16F10 bearing mice treated with metformin. a. Erythrocyte superoxide dismutase activity; b. Erythrocyte catalase activity; c. Erythrocyte glutathione reduced (GSH). d. Plasma Total-trapping antioxidant capacity; e. Plasma thiol. C: Control; T: Tumor; PBS: Phosphate saline buffer; MET: Metformin; SOD: Superoxide dismutase; GSH: reduced glutathione. The statistical significance of the differences was analyzed by t-test or one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post test, and $p < 0.05$ considered significant. * $p < 0.05$ significantly different from the C+PBS. # $p < 0.05$ significant different from the C+MET. The mean \pm SEM of three independent experiments.

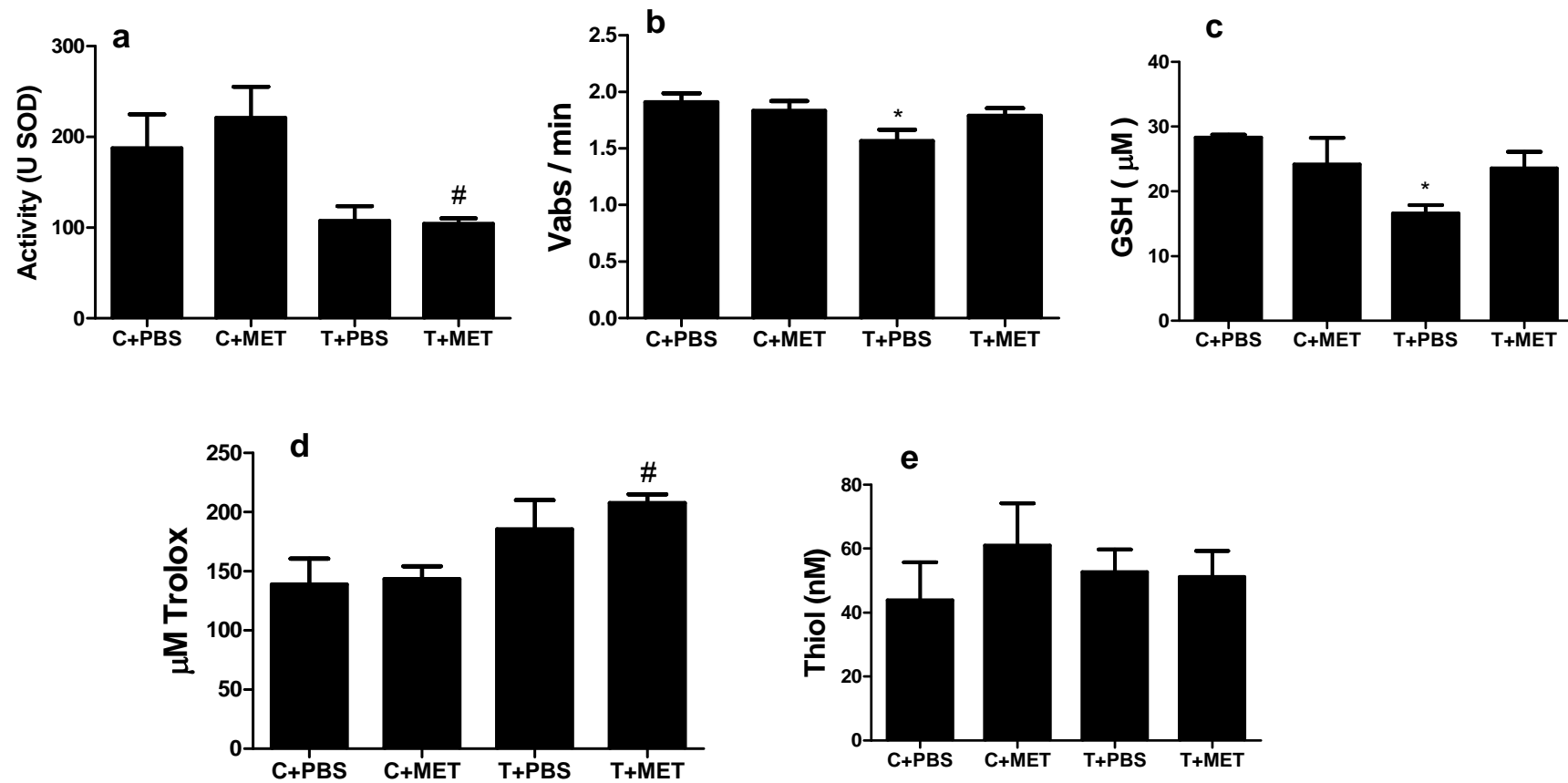


Figure 3 – Systemic lipid and protein oxidation parameters in B16F10 bearing mice treated with metformin. **a.** Plasma malondialdehyde; **b.** Plasma Carbonyl protein. C: Control; T: Tumor; PBS: Phosphate saline buffer; MET: Metformin; MDA: Malondialdehyde of three independent experiments.

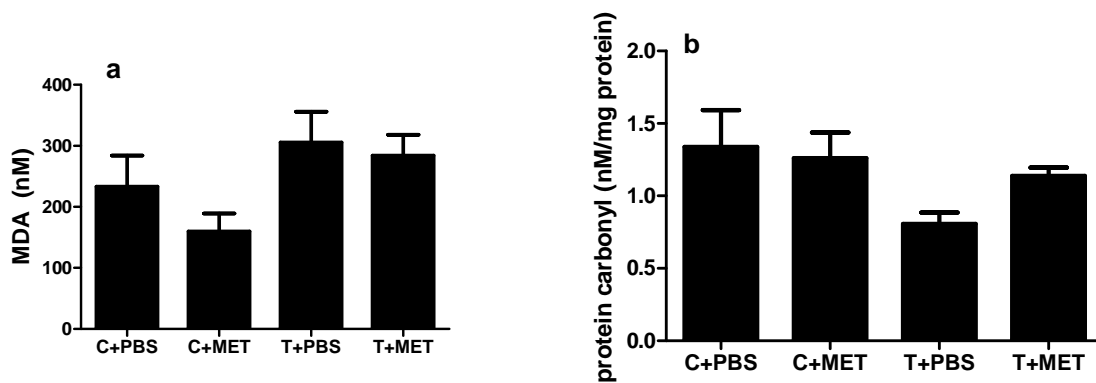


Figure 4 – *In vitro* parameters of B16F10 cells treated with metformin. Cells were cultivated in 24 – well plates with metformin 6, 30, 1000 e 5000 μM . **a.** Cell proliferation assays; **b.** MTT assay in 24 hours treated cells; **c.** MTT assay in 48 hours treated; **d.** TUNEL assay in 24 hours treated adherent cells; **e.** Total thiol in 24 hours treated cells homogenates. * $p < 0.05$ significantly different from the Control (C). The mean \pm SEM of three independent experiments.

