



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

POLIANA CAMILA MARINELLO

**PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO
MECANISMO DE AÇÃO DA METFORMINA NA
CITOTOXICIDADE E NOS PROCESSOS DE INDUÇÃO
EXPERIMENTAL DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA
COM DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

Londrina
2015

POLIANA CAMILA MARINELLO

**PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO
MECANISMO DE AÇÃO DA METFORMINA NA
CITOTOXICIDADE E NOS PROCESSOS DE INDUÇÃO
EXPERIMENTAL DE RESISTÊNCIA À QUIMIOTERAPIA
COM DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

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

Orientador: Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M338p Marinello, Poliana Camila.

Participação do estresse oxidativo no mecanismo de ação da metformina na citotoxicidade e nos processos de indução experimental de resistência à quimioterapia com doxorubicina em células de adenocarcinoma mamário humano / Poliana Camila Marinello. – Londrina, 2015.
116 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Mamas – Câncer – Teses. 2. Agentes hipoglicêmicos – Teses. 3. Estresse oxidativo – Teses. 4. Doxorubicina – 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

POLIANA CAMILA MARINELLO

**PARTICIPAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO MECANISMO DE
AÇÃO DA METFORMINA NA CITOTOXICIDADE E NOS PROCESSOS
DE INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE RESISTÊNCIA À
QUIMIOTERAPIA COM DOXORRUBICINA EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profo. Dro. Isaías Dichi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Carolina Panis
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE

Profa. Dra. Karen Barros Parron Fernandes
Universidade Norte do Paraná – UNOPAR

Londrina, 21 de Agosto de 2015

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelas oportunidades que me foram dadas na vida, por sempre abrir todas as portas, me guiar, proteger e colocar pessoas especiais no meu caminho. Somente com a certeza de que Ele olha por nós é que encontramos forças para superar nossos problemas, limitações e seguir em frente rumo à realização de nossos sonhos.

Agradeço à minha família que sempre me apoiou e incentivou em minhas escolhas. Aos meus pais Jane e Carlos, por terem me proporcionado uma ótima formação e educação, por me apoiarem nas minhas decisões, por estarem presentes em todos os momentos, por serem excelentes professores e amigos. Aos meus irmãos, Diego e José Carlos, pela amizade, companheirismo, apoio e pelo simples fato de existirem na minha vida e serem meus irmãos. Ao meu namorado Guilherme, por me ouvir todos os dias, com a maior atenção e carinho possíveis, por ser meu amigo e companheiro, por me apoiar e me ajudar em tudo, e por me fazer tão feliz.

À professora Dr^a. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, por todo o seu apoio, compreensão, incentivo, ajuda e amizade durante a realização desse trabalho. Pelas oportunidades que ela me deu, por acreditar no meu potencial e contribuir das mais diversas maneiras para o meu aprendizado e evolução profissional.

Ao professor Dr. Rubens Cecchini por ter me acolhido em seu laboratório, pelos vastos conhecimentos compartilhados e pelo apoio e suporte em todas as etapas de realização deste trabalho. À professora Dr^a. Carolina Panis, pela colaboração importantíssima durante o desenvolvimento do trabalho, por sua disponibilidade em ajudar e por ter aceitado participar da banca examinadora.

Agradeço também aos professores Rodrigo Cabral Luiz, Flávia Alessandra Guarnier, e Jair Tonon por todo o apoio, amizade e ajuda. À professora Dr^a. Halha O. Saridakis, minha primeira orientadora na graduação, a pessoa que sempre e que mais me incentivou a seguir por este caminho. Gratidão, carinho e admiração enormes!

Aos amigos e técnicos do laboratório, Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, por toda assistência fundamental e diária, pelos ensinamentos, apoio, paciência e amizade. Muito obrigada por todo o carinho com o qual vocês ensinam a todos do laboratório e cuidam para que o nosso trabalho seja realizado da melhor maneira possível. Obrigada, é muito gostoso trabalhar com vocês.

Agradeço também aos amigos que conheci na pós-graduação, em especial à minha amiga de todas as horas e grande colaboradora nesse trabalho, Thamara N. Xavier da Silva, obrigada por sua amizade, apoio e dedicação, tenho certeza de que aprendemos muito juntas durante esses anos. Ao Fernando H. Borges, Nichelle Antunes Vieira, Fernanda P. Blegniski, Kaliana Machado, Ana Carolina Conchon Costa, Laís Sábio, Fernando Pinheiro, Larissa Juliani Sanches, Gabriela P. Melo, Cássio Nunes, Amanda F. Neves e Heloíza Bordini, meus agradecimentos pela agradável convivência, compreensão, companheirismo e ajuda ao longo dos anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado e à Fundação Araucária pelo financiamento do projeto.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, para o meu crescimento pessoal e profissional e que tornam meus dias mais felizes.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

- Madre Tereza de Calcutá

MARINELLO, Poliana Camila. **Participação do estresse oxidativo no mecanismo de ação da metformina na citotoxicidade e nos processos de indução experimental de resistência à quimioterapia com doxorubicina em células de adenocarcinoma mamário humano**. 2015. 116 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres no mundo todo. A metformina é uma droga antihiperlipemizante segura e eficaz, amplamente utilizada no tratamento do diabetes tipo 2. Nos últimos anos, o seu uso tem sido associado a menor incidência de câncer e, por esses motivos, os seus efeitos na proliferação de células de câncer de mama e na sensibilização dessas células ao tratamento têm sido investigados. Pesquisas recentes demonstram que a metformina reduz a proliferação de células de câncer de mama sensíveis e é capaz de resensibilizar células com múltipla resistência a drogas. Entretanto, os mecanismos de ação da metformina ainda não foram totalmente esclarecidos, e a sua capacidade de sensibilizar as células tumorais ao tratamento nunca foi descrita. Portanto, o objetivo desse trabalho foi investigar a participação do estresse oxidativo (EO) nos mecanismos de citotoxicidade da metformina em células de adenocarcinoma mamário humano positivas para receptores hormonais e triplo negativas, MCF-7 e MDA-MB- 231, respectivamente, e investigar os efeitos da metformina no processo de indução experimental de resistência à doxorubicina. Para a análise da participação do EO nos mecanismos de citotoxicidade da droga, avaliou-se o padrão de morte celular, a presença de danos oxidativo ao DNA, parâmetros de estresse oxidativo e efeito da metformina sobre algumas proteínas de sinalização importantes no controle do crescimento e proliferação celular (ERK1/2, AKT, TGF – β 1 e p53). Para isso, quatro concentrações diferentes da droga foram utilizadas: duas clinicamente relevantes, que correspondem às concentrações plasmáticas encontradas em indivíduos após tratamento (6 e 30 μ M), e duas experimentais (1000 e 5000 μ M). Para a investigação dos efeitos da metformina no processo de indução de resistência à doxorubicina, as células foram expostas a concentrações crescentes do quimioterápico e a metformina foi associada em diferentes momentos, simultaneamente e através de um pré-tratamento. Foram analisados o estado oxidativo celular ao longo do processo de indução da quimiorresistência, os níveis de óxido nítrico (NO) e os efeitos da droga em vias que poderiam relacionar-se com a quimiorresistência, como a p53, NF- κ B, Nrf2 e TGF- β 1. Com base nos primeiros resultados (em células sensíveis), escolhemos uma concentração de metformina que identificamos como não citotóxica (6 μ M) para ser estudada no modelo de indução de resistência à doxorubicina. Os resultados demonstraram que a metformina, nas células de câncer de mama sensíveis, é citotóxica a partir de concentrações clinicamente relevantes (30 μ M) e que esse efeito ocorre através da indução simultânea de estresse oxidativo, dano de DNA e aumento dos níveis citoplasmáticos de TGF- β 1. Além disso, a droga, em concentrações mais elevadas (1000 e 5000 μ M), induz apoptose celular, diminui a ERK1/2 e a Akt (5000 μ M), e aumenta os níveis nucleares de p53 (1000 e 5000 μ M). No processo de indução de quimiorresistência, o pré-tratamento com metformina preveniu a resistência à doxorubicina nas duas linhagens celulares estudadas, além

de sensibilizar as células MCF-7 ao quimioterápico. Essa prevenção ocorreu através da geração de estresse oxidativo, redução nos níveis de NO, aumento de p53 nuclear e de TGF- β 1 citoplasmático, e redução de Nrf2 nuclear. Esses resultados ajudam a entender os mecanismos de ação da metformina em células MCF-7 e MDA-MB-231 e sugerem que o tratamento com a droga pode exercer efeito benéfico na prevenção da resistência à doxorrubicina, ressaltando a potencial utilidade clínica da metformina como adjuvante na terapia do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de mama. Metformina. Estresse oxidativo. Quimioresistência.

MARINELLO, Poliana Camila. **Participation of oxidative stress in the mechanisms of metformin action in cytotoxicity and in the process of experimental induction of doxorubicin resistance in human adenocarcinoma breast cancer cells.** 2015. 116 p. Thesis (Doctoral in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Breast cancer is the second type of the most frequent neoplasia among women worldwide. Metformin is a safe and effective anti-hyperglycemic drug widely used in the treatment of type 2 diabetes. In the last years, its use has been associated with a lower cancer incidence and, for these reasons, their effects on breast cancer cells proliferation and in the sensitization of these cells to treatment have been investigated. Current research demonstrated that metformin reduces proliferation of breast cancer cells and sensitize multidrug resistance cells. However, the metformin mechanisms of action has not yet been fully elucidated, and its interference with the process of chemoresistance induction has never been described. Therefore, the objective of this study was to investigate the involvement of oxidative stress (OS) in the mechanism of metformin cytotoxicity in human mammary adenocarcinoma cells positive for hormone receptors and triple negative, MCF-7 and MDA-MB-231, respectively, and investigate the metformin effects in the process of experimental doxorubicin resistance induction. For the analysis of the participation of OS in the mechanisms of drug cytotoxicity, it was evaluated the cell death pattern, the presence of oxidative DNA lesions, oxidative stress parameters and the drug effect on some important signaling proteins involved in the control of cell growth and proliferation, such as ERK1/2, AKT, TGF - β 1 and p53. Four different concentrations of metformin were used: two clinically relevant, corresponding to plasmatic concentrations found in patients after diabetes treatment (6 e 30 μ M), and two experimental (1000 and 5000 μ M). For the investigation of metformin participation in the process of chemoresistance induction, the cells were exposed to increasing concentrations of the chemotherapeutic and metformin was associated at different times, simultaneously and through a pretreatment. It was evaluated the cellular oxidative status during the process of chemoresistance induction, the nitric oxide (NO) levels and the drug effects on pathways that could be related to chemoresistance, such as p53, NF-kB, Nrf2 and TGF- β 1. Based on the first results (in sensitive cells), we chose a non-cytotoxic metformin concentration (6 μ M) to be studied in the model of doxorubicin resistance induction. The results demonstrated that metformin is cytotoxic to tumor cells from clinically relevant concentrations (30 μ M) and that this effect occurs by the simultaneous induction of oxidative stress, DNA damage and increase in cytoplasmic TGF- β 1. In addition, at higher concentrations, the drug induces apoptosis (1000 and 5000 μ M), reduces the ERK1 / 2 and Akt (5000 μ M), and increases nuclear p53 (1000 and 5000 μ M). In the process of chemoresistance induction, metformin pretreatment prevented the doxorubicin resistance in both cell lines, as well as sensitize MCF-7 cells to chemotherapy. This prevention occurred by the generation of oxidative stress, reduction in the NO levels, increases in nuclear p53 and cytoplasmic TGF- β 1, and reduction of nuclear Nrf2. These findings helps to understand the metformin mechanism of action on MCF-7 and in MDA-MB-231 breast cancer cells and suggests that metformin treatment could

exert a beneficial role in the prevention of doxorubicin chemoresistance, highlighting the potential clinical utility of metformin as adjuvant during breast cancer treatment.

Keywords: Breast cancer. Metformin. Oxidative stress. Chemoresistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Diferentes formas de seleção de células resistentes | 28 |
| Figura 2 – Ativação da via PI3K/Akt/mTOR..... | 31 |
| Figura 3 – Participação da metformina nos mecanismos de ressensibilização ao tratamento com tamoxifeno em células MCF-7 em co-cultura com fibroblastos..... | 41 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| Akt | <i>Protein kinase B</i> – proteína quinase B. |
| AMPK 5' | <i>AMP-activated Protein Kinase</i> – quinase de adenosina monofosfato. |
| AP-1 | <i>Activator Protein 1</i> – proteína ativadora. |
| ASK1 | <i>Apoptosis Signal-regulation Kinase 1</i> – quinase reguladora do sinal de apoptose. |
| BCA2 | <i>Breast cancer associated gene 2</i> – gene associado ao câncer de mama 2. |
| BCRP | <i>Breast cancer resistance protein</i> – proteína de resistência do câncer de mama. |
| BRCA1 | <i>Breast cancer 1, early onset</i> – câncer de mama 1, de início precoce. |
| CAT | Catalase |
| CSC | <i>Cancer stem cells</i> – células tronco tumorais. |
| ERN | Espécies reativas de nitrogênio. |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio. |
| GPx | Glutaciona peroxidase. |
| GSH | Glutaciona reduzida. |
| HER-2 | <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i> – receptor para o fator de crescimento epidermal humano 2. |
| IGF-1 | <i>Insulin-like growth factor-1</i> – fator de crescimento semelhante a insulina 1. |
| IGF-1R | <i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i> – receptor de fator de crescimento semelhante a insulina 1. |
| IR | <i>Insulin receptor</i> – receptor de insulina. |
| IRS1 | <i>Insulin receptor substrate 1</i> – substrato para receptor de insulina 1. |
| IRS2 | <i>Insulin receptor substrate 2</i> – substrato para receptor de insulina 2. |
| MAPK | <i>Mitogen-activated protein kinases</i> – proteína quinase ativada por mitogeno. |
| MDA | Malondialdeído. |
| MDR | <i>Multi-drug resistance</i> – resistência a múltiplas drogas. |
| MDR1 | <i>Multi-drug resistance gene</i> – gene de resistência a múltiplas drogas. |
| MRP1 | <i>Multi-drug resistance-associated protein 1</i> – proteína associada a resistência a múltiplas drogas 1. |

| | |
|--------------|--|
| MSRE | Moduladores seletivos para receptor de estrogênio. |
| MSRP | Moduladores seletivos para receptor de progesterona. |
| mTOR | <i>Mammalian target of rapamycin</i> – alvo mamífero da rapamicina. |
| mTORC1 | <i>mTOR complex 1</i> – complexo 1 da mTOR. |
| mTORC2 | <i>mTOR complex 2</i> – complexo 2 da mTOR. |
| NAPD | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato. |
| NF-kB | <i>Nuclear factor kB</i> – fator nuclear kappa B. |
| NO | <i>Nitric oxide</i> – óxido nítrico. |
| Nrf2 | <i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> – fator de transcrição nuclear associado ao E2. |
| PARP | <i>Poly ADP ribose polymerase</i> – poli-ADP-ribose polimerase. |
| PDK1 | <i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i> – proteína quinase dependente de 3-fosfoinositídeo 1. |
| P-gp | <i>P-glycoprotein</i> – glicoproteína-P. |
| PI3K | <i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> – fosfatidilinositol 3-quinase. |
| PIP2 | <i>Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate</i> – fosfatidilinositol 4,5-bifosfato. |
| PIP3 | <i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i> - fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato. |
| PTEN | <i>Phosphatase and tensin homolog</i> – homólogo da fosfatase e da tensina. |
| p53 | proteína p53. |
| RAPTOR | <i>Regulatory associated protein of mTOR</i> – proteína reguladora associada ao mTOR. |
| RE | Receptor de estrogênio. |
| RE- α | Receptor de estrogênio alfa. |
| RE- β | Receptor de estrogênio beta. |
| RH | Receptores hormonais. |
| Rheb | <i>Ras homolog enriched in brain</i> – homólogo do Ras enriquecido no cérebro. |
| RP | Receptor de progesterona. |
| RP-A | Receptor de progesterona A. |
| RP-B | Receptor de progesterona B. |
| RTK | <i>Receptor tyrosine kinases</i> – receptor do tipo tirosina quinase. |

| | |
|----------------|---|
| SNP | <i>Single nucleotide polymorphism</i> – polimorfismos em um único nucleotídeo. |
| SOD | superóxido dismutase. |
| Sp-1 | <i>Specificity protein 1</i> – proteína de especificidade 1. |
| S6K1 | <i>p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i> – quinase 1 de S6 ribossomal. |
| TGF- β 1 | <i>Transforming growth factor beta 1</i> – fator de crescimento transformante β 1. |
| TIGAR | <i>TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator</i> – gene regulador de glicólise e apoptose induzido pela TP53. |
| TP53 | <i>Tumor protein P53</i> – gene proteína tumoral p53. |
| Trx | Tiorredoxina. |
| TrxIP | <i>Thioredoxin interaction protein</i> – proteína ligadora de tiorredoxina. |
| TrxR | <i>Thioredoxin reductase</i> – tiorredoxina redutase. |
| TSC2 | <i>Tuberous sclerosis complex 2</i> – complexo 2 da esclerose tuberosa ou tuberina. |
| VEGF | <i>Vascular endothelial growth factor</i> – fator de crescimento vascular endotelial. |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 | CÂNCER DE MAMA | 16 |
| 1.2 | CÂNCER DE MAMA E ESTRESSE OXIDATIVO | 17 |
| 1.3 | TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA | 19 |
| 1.4 | RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA | 27 |
| 1.5 | LINHAGEM CELULAR MCF-7 E MDA-MB-231 | 35 |
| 1.6 | METFORMINA | 35 |
| 1.7 | METFORMINA E O CÂNCER DE MAMA..... | 38 |
| 1.8 | METFORMINA E RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA..... | 39 |
| 2 | OBJETIVO | 43 |
| 2.1 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 43 |
| 3 | ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO | 44 |
| | CONCLUSÃO | 45 |
| | REFERÊNCIAS | 46 |
| | APÊNDICES | 54 |
| | APÊNDICE A – Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β 1 induction..... | 55 |
| | APÊNDICE B – Metformin pretreatment prevents doxorubicin resistance induction in human MCF-7 cells through oxidative stress generation, induction of p53 and TGF- β 1 and decrease of Nrf2 pathway..... | 88 |

1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1 CÂNCER DE MAMA

4 O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo, e é
5 responsável por 22% dos novos casos de câncer a cada ano. O espectro de
6 anormalidades proliferativas nos lóbulos e ductos mamários inclui hiperplasia,
7 hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo. Dentre esses últimos, o
8 carcinoma ductal infiltrante é o tipo histológico mais comum e compreende entre 80 e
9 90% do total de casos (INCA, 2014).

10 O estadiamento do câncer de mama é baseado na classificação dos tumores
11 malignos, TNM, proposta pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), conforme
12 as características do tumor primário (T) dos linfonodos das cadeias de drenagem
13 linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de
14 metástases à distância (M). Aproximadamente 5% dos pacientes com essa neoplasia
15 maligna apresentam metástases quando descobrem a doença pela primeira vez, mas
16 a grande maioria desenvolve meses ou anos após o diagnóstico e tratamento inicial
17 (BRASIL, 2004).

18 O câncer de mama é uma doença muito heterogênea, sendo classificado em
19 diferentes subtipos de acordo com o perfil de expressão gênica das células tumorais
20 (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2003): subtipo luminal, subtipo com
21 superexpressão de receptor para o fator de crescimento epidermal 2 (HER-2), triplo-
22 negativo, basal-símile e subtipo normal-símile (RINGNÉR; STAAF; JONSSON, 2013).
23 O subtipo luminal é caracterizado pela presença de receptores hormonais, como de
24 estrogênio (RE) e ou receptores de progesterona (RP) pelas células tumorais, e é
25 dividido em luminal A e B (RINGNÉR; STAAF; JONSSON, 2013). Os dois subtipos
26 apresentam RE e RP, porém o luminal A apresenta baixos índices de proliferação
27 celular e grau histológico, enquanto que o luminal B apresenta maiores taxas de
28 proliferação celular e maior grau histológico. Já o subtipo HER-2 apresenta
29 superexpressão de receptor HER-2 (RINGNÉR; STAAF; JONSSON, 2013), e o triplo-
30 negativo (TN) não possui nenhum dos três receptores (RE, RP e HER-2).

31

1 Além da classificação que relaciona receptores de membrana, o câncer de
2 mama pode ser ainda subdividido em basal-símile, cujas células tumorais apresentam
3 perfil de expressão gênica semelhante às células basais, e subtipo semelhante a
4 mama normal, onde a massa de células mutadas assemelham-se às células normais
5 da mama (RINGNÉR; STAAF; JONSSON, 2013), com expressão de genes
6 característicos de células adiposas relativamente elevada e um baixo nível de
7 expressão de genes de células epiteliais luminais, com RE e RP (RAKHA; REIS-
8 FILHO; ELLIS, 2008).

9 É importante ressaltar que esses subtipos de câncer de mama estão
10 associados com resultados clínicos diferentes, sendo que os pacientes com tumores
11 luminais apresentam um melhor prognóstico e os pacientes com tumores triplo-
12 negativos e basais apresentam um pior prognóstico (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS,
13 2008). As diferentes características das células tumorais e o fenótipo do câncer de
14 mama auxiliam na escolha do tratamento e também a prever o local mais provável de
15 metástases. Pacientes com tumores que possuem receptores endócrino-positivos são
16 mais propensos a desenvolverem metástases ósseas, enquanto que pacientes com
17 tumores triplo-negativos, são mais propensos a desenvolverem metástases
18 pulmonares (JOLLY et al., 2012).

20 1.2 CÂNCER DE MAMA E ESTRESSE OXIDATIVO

21
22 O estresse oxidativo e a ativação de vias sinalizadoras redox acompanham a
23 patogenia do câncer de mama. Estresse oxidativo crônico e a inflamação têm sido
24 indicados como os principais mediadores durante a carcinogênese e progressão da
25 doença (PANIS et al., 2012). Pacientes com câncer de mama em estágios avançados
26 que nunca receberam quimioterapia possuem elevados níveis de estresse oxidativo
27 com altos índices de lipoperoxidação e óxido nítrico e atividade reduzida de enzimas
28 antioxidantes como a catalase, por exemplo (PANIS, et al., 2011).

29 Entretanto, a idéia de que o estresse oxidativo funciona apenas como agente
30 lesivo tem mudado nos últimos anos. Hidroperóxidos lipídicos e produtos oxigenados
31 provenientes da degradação peroxidativa de lipídeos, assim como os iniciadores
32 desse processo, as espécies reativas de oxigênio (ERO), podem participar de

1 cascatas transdutoras de sinais, no controle da proliferação celular, e na indução da
2 diferenciação, maturação e apoptose (GAGO-DOMINGUEZ; JIANG; CASTELAO,
3 2007). Alguns trabalhos mostraram inclusive o aumento da lipoperoxidação como um
4 mecanismo preventivo no câncer de mama (GAGO-DOMINGUEZ; JIANG;
5 CASTELAO, 2007; GAGO-DOMINGUEZ et al., 2005).

6 Neste contexto, o sistema antioxidante tiorredoxina, formado pela tiorredoxina
7 (Trx), tiorredoxina redutase (TrxR), proteína ligadora de tiorredoxina (TrxIP), e a
8 nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) é um exemplo de que o estresse
9 oxidativo pode funcionar como modulador de importantes vias intracelulares. A
10 tiorredoxina-1, a isoforma citoplasmática da tiorredoxina, é o principal antioxidante
11 oxidoreductase intracelular e encontra-se normalmente em seu estado reduzido,
12 quando as proteínas intracelulares são oxidadas, a tiorredoxina as reduz, tornando-se
13 oxidada. Normalmente, a tiorredoxina oxidada é rapidamente reduzida, por ação da
14 tiorredoxina redutase e da NADP (SUN et al., 2012).

15 Estudos recentes têm demonstrado papel regulador da apoptose por esse
16 sistema. Parece que, em seu estado reduzido a Trx liga-se à quinase reguladora do
17 sinal de apoptose 1 (ASK1), e inibe a sua capacidade de induzir apoptose mediada
18 por estresse e citocinas. Da mesma forma, quando a Trx encontra-se oxidada, ela
19 dissocia-se da ASK1 e estimula a apoptose. Além disso, o ambiente reduzido,
20 mediado pela tiorredoxina, é necessário para que fatores de transcrição redox-
21 sensíveis se liguem ou não ao DNA, como o p53 e o fator nuclear kB (NF-kB),
22 ressaltando a importância desse sistema no controle do ciclo celular e reparo de DNA
23 lesado (LU; HOLMGREN, 2012).

24 A TrxIP tem a função de se ligar à Trx reduzida e inibi-la, bloqueando suas
25 atividades e sua interação com outros fatores, inclusive com a ASK1, atuando portanto
26 como uma proteína pró-apoptótica. Expressão elevada de TrxR e diminuída de TrxIP
27 foi associado a um pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (CADENAS
28 et al., 2010).

29 Ainda com relação aos sistemas antioxidantes, já foi investigada a relação entre
30 polimorfismos em um único nucleotídeo (SNP) em enzimas antioxidantes como a
31 superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT)
32 associado ao maior risco de desenvolvimento de câncer. Esses resultados mostraram

1 que SNP dessas enzimas não puderam ser correlacionados a maior incidência de
2 câncer de mama (CRAWFORD et al., 2012). Entretanto, essas enzimas e o controle
3 redox parecem possuir papel importante na progressão do câncer de mama, pacientes
4 em estágios iniciais da doença apresentam, sistemicamente, redução na atividade da
5 CAT, níveis diminuídos de 8-isoprostanos e de glutathiona reduzida (GSH), altos
6 índices de lipoperoxidação e de malondialdeído (MDA) (PANIS et al., 2012). Com a
7 progressão da doença, o estresse oxidativo é intensificado, com redução significativa
8 da CAT e da capacidade antioxidante total e aumento ainda maior da lipoperoxidação
9 e dos níveis de óxido nítrico (NO) e MDA (PANIS et al., 2012). Como visto, o estresse
10 oxidativo está presente na progressão da doença e, portanto, é relevante investigar a
11 sua participação na modulação de diferentes vias intracelulares durante o tratamento.

12

13 1.3 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

14

15 Embora o tratamento e diagnóstico do câncer de mama tenha tido um
16 significativo progresso nas últimas duas décadas, a doença continua sendo uma das
17 principais responsáveis por morte de mulheres no mundo todo. Importantes avanços
18 na abordagem da doença aconteceram nos últimos anos, principalmente no que diz
19 respeito a cirurgias menos mutilantes, assim como a busca da individualização do
20 tratamento (BRASIL, 2004). O tratamento varia de acordo com o estadiamento da
21 doença, suas características biológicas, bem como das condições da paciente (idade,
22 estado menopausal, comorbidades e preferências). As modalidades de tratamento
23 podem ser divididas em local (cirurgia e radioterapia) e sistêmicas (hormônio-terapia,
24 quimioterapia e terapia biológica) (BRASIL, 2004).

25

A conduta habitual no tratamento consiste de cirurgia, seguida por radioterapia.
26 O tratamento sistêmico é determinado de acordo com o risco de recorrência (idade da
27 paciente, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, grau de diferenciação),
28 assim como das características tumorais que irão ditar a terapia mais apropriada
29 (BRASIL, 2004). O fenótipo da célula tumoral auxilia na escolha da terapia.
30 Recentemente, o termo terapia alvo tem sido empregado para descrever novas drogas
31 que foram planejadas com base no conhecimento da patologia molecular fundamental
32 da doença, visando marcadores moleculares específicos (WICKI; ROCHLITZ, 2012).

1 Dentre as terapias alvo, temos aquelas que são destinadas ao tratamento do
2 câncer de mama luminal A e B, que possuem receptores hormonais. O estrogênio,
3 através de interação com seu receptor (RE), exerce efeito indutor de proliferação e
4 exerce papel importante na patogenia do câncer de mama (REIS-FILHO;
5 WESTBURY; PIERGA, 2006). Diversos medicamentos estão disponíveis atualmente
6 visando diminuir seus efeitos, seja interagindo diretamente com seu receptor, com a
7 utilização de moduladores seletivos para RE (MSRE), como exemplo o tamoxifeno,
8 ou por inibição da produção sistêmica do hormônio, com a utilização de inibidores de
9 aromatase, como o anastrozol (REIS-FILHO; WESTBURY; PIERGA, 2006). A
10 progesterona também participa da patogenia do câncer de mama, muitos tipos de
11 carcinomas além de RE também expressam RP, e por isso também tem sido
12 desenvolvidos moduladores seletivos para RP (REIS-FILHO; WESTBURY; PIERGA,
13 2006).

14 O RE possui atividade transcricional. É constituído por um domínio que se liga
15 ao DNA, um domínio que interage com o ligante e um domínio N-terminal com função
16 ativadora (WILLIAMS; LIN, 2013). Após a ativação pelo ligante, o RE regula a
17 transcrição de genes – alvo através da ligação com elementos reguladores chamados
18 de elementos responsivos ao estrogênio. O estrogênio também modula a expressão
19 gênica através da interação com outros fatores de transcrição, como a proteína
20 ativadora 1 (AP-1) e a proteína de especificidade 1 (Sp-1), que controlam o
21 crescimento e proliferação celular (ZHAO; DAHLMAN-WRIGHT; GUSTAFFSON,
22 2008). Além das ações nucleares, o RE também exerce efeitos não genômicos
23 através da interação com receptores para fatores de crescimento situados na
24 membrana celular e componentes que regulam negativamente vias transdutoras de
25 sinais, no citoplasma (WILLIAMS; LIN, 2013).

26 Os RE são divididos em dois subtipos, alfa (RE- α) e beta (RE- β), que possuem
27 ações diferentes de acordo com o tecido. Esses receptores localizam-se no cérebro,
28 útero, ossos, mama, ovário e fígado (HADJI, 2012; ZHAO; DAHLMAN-WRIGHT;
29 GUSTAFFSON, 2008). Uma diferença observada entre os subtipos alfa e beta do RE
30 é no sítio da AP-1, na presença de estrogênio o RE- α induz atividade da AP-1,
31 enquanto que o RE- β não apresenta nenhum efeito (ZHAO; DAHLMAN-WRIGHT;
32 GUSTAFFSON, 2008). Já foi descrito que o RE- α é superexpresso na maioria dos

1 cânceres de mama, enquanto que o RE- β encontra-se diminuído nas células tumorais
2 (ROGER et al., 2001). Dessa forma, o RE- α é considerado um marcador prognóstico
3 para a resposta à hormônio-terapia, e a caracterização do RE- α nas amostras
4 tumorais é um procedimento padrão na oncologia clínica (WILLIAMS; LIN, 2013).

5 O Tamoxifeno é um MSRE de primeira geração e possui atividade antagônica
6 de RE na mama, sendo considerado primeira escolha para tratamento do câncer de
7 mama em mulheres antes do climatério sendo também eficaz na prevenção da doença
8 (HADJI, 2012). Entretanto, a utilização do medicamento aumenta os riscos de câncer
9 endometrial, acidente vascular encefálico, embolia pulmonar e trombose venosa
10 profunda em mulheres com idade igual ou superior a 50 anos, limitando sua utilização
11 na prevenção da doença em mulheres após o climatério (FISCHER et al., 1998). Isso
12 ocorre porque o tamoxifeno exibe efeito agonista em RE no endométrio, estimulando
13 a proliferação do tecido (HADJI, 2012). Os MSRE também exercem efeito agonista
14 em RE nos ossos e sistema cardiovascular enquanto que nos receptores localizados
15 na mama e no miométrio, o efeito predominante é antagônico (GRODSTEIN et al.,
16 1996).

17 Apesar do relativo sucesso do tratamento com tamoxifeno, já foi demonstrado
18 que os inibidores de aromatase (anastrozol, letrozol) são mais eficientes como
19 primeira escolha na terapia adjuvante do câncer de mama e possuem menos efeitos
20 adversos nos casos avançados da doença (PARIDAENS et al., 2008). Isso ocorre
21 porque os MSRE bloqueiam apenas a atividade transcricional do receptor, mas não
22 reduzem os níveis absolutos do hormônio livre, o que acontece com a utilização de
23 inibidores de aromatase (KNUTSON; LANGE, 2014).

24 A progesterona também medeia a proliferação e o desenvolvimento da mama
25 através da interação do hormônio com seu receptor, que possui duas isoformas: A
26 (RP-A) e B (RP-B), com alvos de transcrição específicos e com capacidade de mediar
27 funções teciduais específicas (KNUTSON; LANGE, 2014). De maneira geral, RP-A
28 está relacionado com a capacidade reprodutiva e RP-B, com o desenvolvimento da
29 glândula mamária, regulando positivamente um importante fator parácrino que
30 direciona a expansão lobular durante a gravidez, o RANKL (ativador do receptor do
31 ligante do fator nuclear κ -B) (KNUTSON; LANGE, 2014). Esse fator possui expressão
32 aumentada em mais de duas vezes em carcinomas de mama invasivos quando

1 comparados à mama normal e é necessário para a expansão da glândula mamária e
2 para iniciação tumoral mediada por progesterona em estudos utilizando camundongos
3 (TANOS et al., 2013). O RP também possui atividade transcricional, após interação
4 com o ligante, o RP-B é fosforilado na Ser234 e é translocado para o núcleo, onde
5 ativa a expressão de genes relacionados à progressão do ciclo celular, proliferação e
6 sobrevivência celular (MOORE et al., 2000).

7 Os moduladores seletivos de receptores de progesterona (MSRP) são
8 responsáveis pela inibição da atividade transcricional desse receptor, porém, de
9 maneira geral, apresentam eficácia limitada e elevados índices de efeitos colaterais,
10 devendo ser indicados apenas para pacientes que possuem RP com alta atividade
11 transcricional, e não levando-se em conta apenas a positividade para expressão
12 desse receptor (KNUTSON; LANGE, 2014).

13 Ainda dentro das terapias alvo, existem aquelas que são específicas para o
14 tratamento do câncer de mama onde as células superexpressam o receptor HER-2.
15 Existem quatro subtipos conhecidos deste receptor (1, 2, 3 e 4) que se agrupam
16 formando dímeros, que são classificados como receptores transmembrana do tipo
17 tirosina-quinase e são capazes de desencadear a ativação de vias sinalizadoras a
18 favor da proliferação, motilidade e invasão celular tanto na forma de homo, como
19 heterodímeros (HOWE; BROWN, 2011). Estudos mostram que de 20 a 30% dos
20 carcinomas de mama superexpressam especificamente o receptor HER2 e essa
21 expressão aumentada é mais frequente em células que não possuem receptores para
22 estrogênio (RE) do que nas que possuem (THERY et al., 2014; HOWE; BROWN,
23 2011).

24 A sinalização intracelular induzida pelo receptor ocorre através da
25 transfosforilação no domínio intracitoplasmático de tirosina quinase, que inicia a
26 transdução de sinal através da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK)
27 e da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), que regula proliferação, apoptose,
28 diferenciação e migração celular (THERY et al., 2014). Esse tipo de câncer possui
29 características mais agressivas do que os subtipos luminal A e B, e o alvo de sua
30 terapia consiste na administração de um anticorpo monoclonal específico para HER2,
31 o trastuzumabe, ou da administração de inibidores de tirosina quinase de
32 EGFR/HER2, como o lapatinibe (CADOO; FORNIER; MORRIS, 2013; HOWE;

1 BROWN, 2011). O aumento de recorrência local após mastectomia é maior nesse
2 subtipo da doença quando comparado aos subtipos luminal A e B, mas não quando
3 comparado ao basal símile (CADOO; FORNIER; MORRIS, 2013). Já foi demonstrado
4 experimentalmente, através da utilização de camundongos transgênicos para HER-2,
5 que o tratamento preventivo com lapatinibe retarda o desenvolvimento de tumores de
6 mama positivos para HER-2 (HOLLANDER; SAVAGE; BROWN, 2013).

7 Existem ainda células tumorais que não expressam receptores hormonais (para
8 estrogênio e progesterona) nem amplificação do gene *HER-2*, são as chamadas
9 linhagens triplo-negativas. O fato do subtipo basal símile normalmente apresentar um
10 fenótipo triplo negativo tem sido responsável por uma confusão na classificação desse
11 subtipo, frequentemente sendo tratado como sinônimo para câncer de mama triplo
12 negativo (LEIDY; KHAN; KANDIL, 2014). Entretanto, o câncer de mama basal símile
13 é definido como o subtipo que expressa genes característicos de células basais ou
14 mioepiteliais (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008). Além das funções estruturais,
15 vários dos produtos desses genes característicos de células basais tem sido
16 implicados na proliferação celular, supressão de apoptose, migração e ou invasão
17 celular (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008). Entretanto, apesar de boa parte dos
18 tumores de mama basal símile não apresentarem receptores hormonais e receptor
19 HER-2, já foi descrito que de 15 a 45% desses tumores podem acabar apresentando
20 pelo menos um desses receptores (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008), não sendo
21 correto portanto classificar esse subtipo como triplo-negativo. Além disso, nem todos
22 os cânceres de mama triplo-negativos apresentam um genótipo basal símile (RAKHA;
23 REIS-FILHO; ELLIS, 2008).

24 Diferentemente dos tumores luminiais, o câncer de mama basal símile é mais
25 comum em mulheres com elevada paridade, menarca precoce e primeira gestação
26 antes dos 26 anos de idade (LEIDY; KHAN; KANDIL, 2014). Molecularmente, já foi
27 descrito que esse subtipo da doença possui frequentemente mutação nos genes
28 supressores tumorais *TP53* (aproximadamente 83% de frequência) e *BRCA1* (câncer
29 de mama 1, início precoce), responsável pelo reparo de quebras de dupla fita de DNA,
30 além de apresentar expressão aumentada de proteínas relacionadas com o ciclo
31 celular, como a ciclina E, angiogênese, como o VEGF (fator de crescimento vascular
32 endotelial), e proteínas anti-apoptóticas, como a $\alpha\beta$ -cristalina (LEIDY; KHAN; KANDIL,

1 2014; RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2008). Comparado com todos os tipos da doença,
2 o basal símile possui o pior prognóstico, com grandes taxas de metástases,
3 frequentemente viscerais (principalmente cérebro e pulmões) (LEIDY; KHAN;
4 KANDIL, 2014).

5 O câncer de mama triplo negativo corresponde a aproximadamente 15% de
6 todos os tipos de câncer de mama e a sua incidência é relativamente maior em
7 mulheres mais jovens e com mutação no gene supressor tumoral *BRCA1* (CADOO;
8 FORNIER; MORRIS, 2013). Tanto os cânceres de mama basal símile como triplo-
9 negativos não possuem tratamento específico sendo a quimioterapia sistêmica com
10 antraciclinas e taxanos bastante indicada (HOWE; BROWN, 2011). Além desses
11 agentes, também são frequentemente empregados agentes quimioterápicos
12 baseados em platina (cisplatina, carboplatina), inibidores de poli-ADP-ribose
13 polimerase (PARP), terapia anti-angiogênica, com um anticorpo monoclonal que se
14 liga ao VEGF e, nos tumores basal símile onde ocorre expressão de HER-2, o
15 lapatinibe também é indicado (LEIDY; KHAN; KANDIL, 2014; HANAHAN;
16 WEINBERG, 2011).

17 O subtipo da doença semelhante a mama normal ainda não foi muito bem
18 caracterizado, mas estudos demonstram que esse tipo de câncer de mama parece
19 não responder à quimioterapia neoadjuvante (ROUZIER et al., 2005). Entretanto, esse
20 tipo parece possuir melhor prognóstico quando comparado ao basal símile (RAKHA;
21 REIS-FILHO; ELLIS, 2008). Os objetivos da quimioterapia no contexto tratamento
22 adjuvante é reduzir a probabilidade de recorrência da doença e prolongar a sobrevida
23 dos pacientes (WARDLEY, 2006). Já na quimioterapia neoadjuvante, os principais
24 objetivos são reduzir o tamanho tumoral e aumentar a possibilidade de serem
25 realizadas cirurgias conservadoras de mama (WARDLEY, 2006). Entre todos os
26 pacientes com câncer de mama indicados para terapia adjuvante, aproximadamente
27 metade acaba sendo tratada com quimioterapia, a outra metade acaba recebendo
28 terapia hormonal ou cirurgia e/ou radioterapia (WARDLEY, 2006).

29 Os agentes citotóxicos mais ativos incluem antraciclinas, taxanos, agentes
30 antimetabólitos, alcalóides da vinca, quimioterápicos baseados em platina e inibidores
31 de PARP (ESTEVA et al., 2001). Essa grande variedade de agentes tem sido utilizada,
32 isoladamente ou em associação, na tentativa de induzir remissão em pacientes em

1 que a quimioterapia inicial falhou (ESTEVA et al., 2001). Enquanto na quimioterapia
2 adjuvante a combinação de agentes é frequentemente utilizada, no tratamento da
3 doença metastática, a abordagem terapêutica com um único agente é preferida
4 (ALKEN; KELLY, 2013). Nesse último caso, vários fatores devem ser considerados
5 para a escolha do melhor agente a ser utilizado, como por exemplo quais foram os
6 medicamentos utilizados na terapia adjuvante, o tempo de recorrência após terapia
7 adjuvante, duração da resposta às terapias utilizadas previamente (terapia – alvo,
8 quimioterapia), além de fatores relacionados ao paciente, como a localização da
9 doença metastática e a presença de comorbidades (ALKEN; KELLY, 2013).

10 Em vários países, a quimioterapia padrão adotada para o tratamento do câncer
11 de mama em estágios iniciais é a combinação de antraciclina com administração de
12 taxanos de forma simultânea ou sequencial (WARDLEY, 2006). Cada vez mais têm
13 sido utilizados tratamentos com regimes sequenciais em bloco, com três ou quatro
14 ciclos de antraciclina, seguidos por um ciclo de taxanos ou ciclofosfamida,
15 metotrexato e 5-fluorouracil (WARDLEY, 2006). Dentro da classe das antraciclina, os
16 agentes comumente utilizados para o tratamento do câncer de mama são a
17 doxorrubicina e o seu epímero, a epirrubicina (KHASRAW; BELL; DANG, 2012). As
18 antraciclina apresentam diferentes mecanismos de ação e são indicadas tanto para
19 o tratamento do câncer de mama metastático como na quimioterapia adjuvante em
20 estágios iniciais da doença (ESTEVA et al., 2001). Dentre os mecanismos de ação
21 dessa classe de quimioterápicos, incluem-se a capacidade de ligação com grupos
22 fosfolipídicos da membrana celular, alterando sua fluidez, assim como o transporte de
23 íons (ESTEVA et al., 2001). Também promovem a formação de espécies reativas de
24 oxigênio, induzindo lesões celulares e morte celular, são capazes também de formar
25 ligações interfilamentares com o DNA, bloqueiam a síntese de DNA e RNA e diminuem
26 a atividade da topoisomerase II, promovendo a ruptura dos filamentos da
27 macromolécula (DNA) (ESTEVA et al., 2001). A principal diferença entre a
28 doxorrubicina e a epirrubicina consiste no fato de que o tempo de meia-vida médio do
29 último agente e de seu metabólito, o epirrubicinol, são menores do que os da
30 doxorrubicina e do doxorrubicinol e conseqüentemente, os agentes possuem
31 diferentes perfis de toxicidade (KHASRAW; BELL; DANG, 2012; ESTEVA et al., 2001).
32 A epirrubicina apresenta menor toxicidade cardíaca e hematológica quando

1 comparada à doxorubicina, porém ambas as drogas apresentam eficácia semelhante,
2 e por essa razão a epirrubicina oferece vantagens ao ser inserida em regimes
3 terapêuticos onde outros medicamentos cardiotoxicos são associados, como o
4 trastuzumabe, por exemplo (KHASRAW; BELL; DANG, 2012). Já foi descrito que a
5 utilização de antraciclinas no tratamento de pacientes por aproximadamente seis
6 meses reduziu as taxas de morte por câncer de mama em cerca de 38%, para
7 pacientes com idade no momento do diagnóstico menor ou igual a 50 anos, e em 20%
8 para mulheres diagnosticadas com 50 a 69 anos de idade (ALKEN; KELLY, 2013).

9 Os taxanos vieram anos após a introdução das antraciclinas e existem duas
10 drogas comercialmente disponíveis dessa classe, o paclitaxel e o docetaxel (ALKEN;
11 KELLY, 2013). O equilíbrio entre as formas polimerizadas e despolimerizadas de
12 microtúbulos é necessário para a divisão celular (ALKEN; KELLY, 2013). O paclitaxel
13 é um produto natural obtido através da casca da árvore *Taxus brevifolia* que se liga
14 reversivelmente à subunidade beta da tubulina e induz a sua polimerização, rompendo
15 esse equilíbrio e levando à interrupção do ciclo celular na fase G2/M. O docetaxel é
16 um produto semi-sintético do teixo europeu *Taxus baccata L.* e também age
17 impedindo a divisão celular, por impedir a despolimerização de microtúbulos, (ALKEN;
18 KELLY, 2013). Os taxanos, de forma geral também são bastante utilizados tanto na
19 terapia adjuvante como neoadjuvante e no tratamento da doença metastática
20 (WARDLEY, 2006).

21 Outros medicamentos frequentemente usados na terapia adjuvante são os
22 agentes antimetabólicos, definidos como drogas que interferem com os processos
23 metabólicos normais dentro das células, sendo duas vias principalmente descritas, as
24 responsáveis pela síntese de purinas e pirimidinas (KAYE, 1998). Dentro dessa classe
25 de medicamentos, alguns são bastante utilizados na terapia do câncer de mama,
26 como o metotrexato, 5-fluorouracil e a capecitabina (JOENSUU; GLIGOROV, 2012).
27 O metotrexato inibe a enzima dihidrofolato redutase, reduzindo as reservas
28 intracelulares de folatos reduzidos e conseqüentemente, reduzindo a síntese de
29 purinas e pirimidinas (KAYE, 1998). A 5-fluorouracil pertence à classe dos análogos
30 de nucleosídeos e age substituindo os nucleosídeos em suas funções celulares
31 normais, podendo ser incorporados na síntese de DNA e RNA e também podem agir
32 inibindo a enzima timidilato sintase, levando ao desbalanço das reservas de

1 nucleotídeos intracelulares, que culmina na incorporação de uracil na cadeia de DNA
2 (KAYE, 1998). A capecitabina também é um análogo de nucleosídeo e é administrada
3 por via oral, sofrendo biotransformação no fígado e nas células tumorais e dando
4 origem ao 5-fluorouracil (KAYE, 1998).

5 Os alcalóides da vinca com propriedades antineoplásicas usados em
6 quimioterapia têm como representantes a vincristina, a vinblastina, a vinorelbina e a
7 vindesina (MOUDI et al., 2013). A vincristina e a vinblastina são extraídas diretamente
8 da planta *Catharanthus roseus* G., enquanto que a vinorelbina e a vindesina são
9 obtidas por semi-síntese (MOUDI et al., 2013). O principal mecanismo de ação dessa
10 classe de agentes é a interação com a tubulina, prejudicando a função dos
11 microtúbulos, interrompendo o ciclo celular na metáfase (MOUDI et al., 2013).

12 Como falado anteriormente, o câncer de mama basal símile, por apresentar
13 frequentemente mutação em BRCA, podem ser tratados com quimioterápicos
14 baseados em platina e inibidores de PARP (LEIDY; KHAN; KANDIL, 2014). Os
15 primeiros são representados pela cisplatina e carboplatina e seus mecanismos
16 antineoplásicos baseiam-se na indução de quebra de dupla fita de DNA, que
17 normalmente é reparado por mecanismos de recombinação homóloga envolvendo o
18 gene *BRCA*, sendo as células deficientes nesse gene susceptíveis a esses
19 medicamentos (LEIDY; KHAN; KANDIL, 2014). Já os inibidores de PARP, como o
20 olaparibe, desencadeiam morte celular após dano de DNA em células deficientes de
21 *BRCA*, uma vez que a enzima é responsável pelo reparo de DNA por excisão de bases
22 (LEIDY; KHAN; KANDIL, 2014).

23 Embora diferentes estratégias terapêuticas estejam disponíveis para o
24 tratamento do câncer de mama, em seus diferentes subtipos, um grande problema
25 encontrado atualmente é o crescente aparecimento de células tumorais resistentes
26 aos medicamentos utilizados. Os principais mecanismos de resistência serão
27 discutidos a seguir.

28

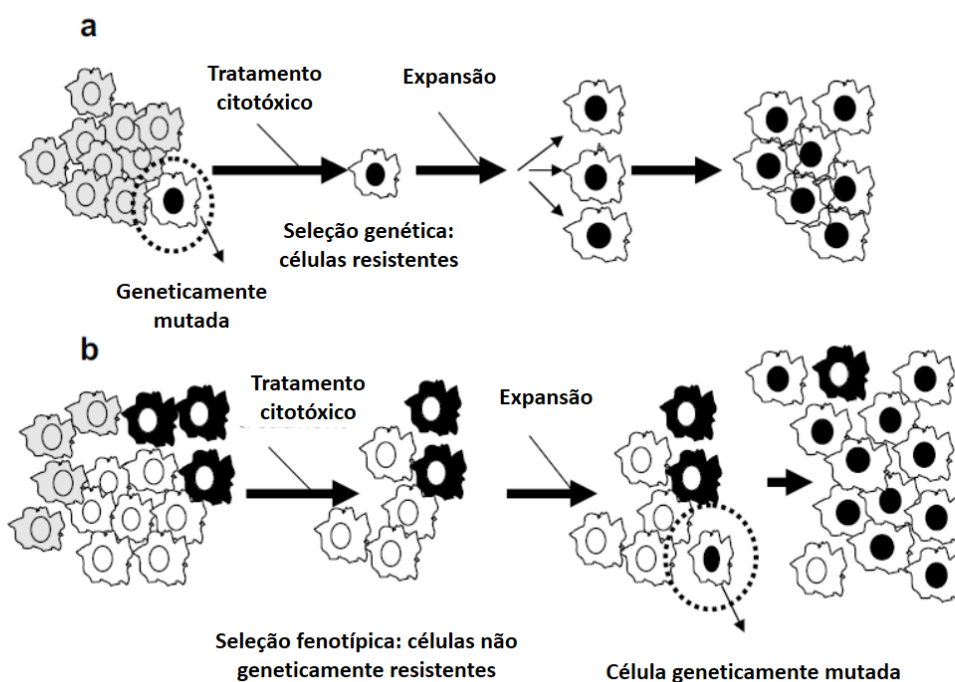
29 1.4 RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO NO CÂNCER DE MAMA

30

31 A resistência ao tratamento do câncer de mama constitui um obstáculo
32 importante para a melhora da sobrevida dos pacientes acometidos por essa doença.

1 Os eventos causadores de resistência são selecionados de maneira darwiniana, e
 2 podem depender da base histológica e genética do tumor, do estágio clínico da
 3 doença e do tratamento prévio utilizado (LORD; ASHWORTH, 2013). Uma população
 4 de células neoplásicas malignas pode tornar-se resistente a partir da seleção de uma
 5 célula geneticamente resistente através do tratamento com o agente citotóxico ou
 6 através da seleção de uma subpopulação de células com características fenotípicas
 7 relacionadas à resistência, sendo que nesse caso, a expansão dessas variáveis
 8 aumenta as chances de que células geneticamente mutadas (resistentes) sejam
 9 geradas, como ilustrado na figura 1 (PRADOS et al., 2012).

10



11

12 **Figura 1.** Diferentes formas de seleção de células resistentes. Seleção de células resistentes a partir
 13 de células geneticamente resistentes (a) ou fenotipicamente resistentes (b). Adaptado de Prados et al.
 14 (2012).

15

16 Com relação à terapia endócrina, nem todos os pacientes com câncer de mama
 17 metastático positivo para RH respondem ao tratamento (HASSON et al., 2013). Além
 18 disso, boa parte dos pacientes que respondem inicialmente ao tratamento, irão
 19 eventualmente adquirir resistência (HASSON et al., 2013). Os mecanismos
 20 responsáveis pela resistência a esse tipo de tratamento podem ser divididos em três

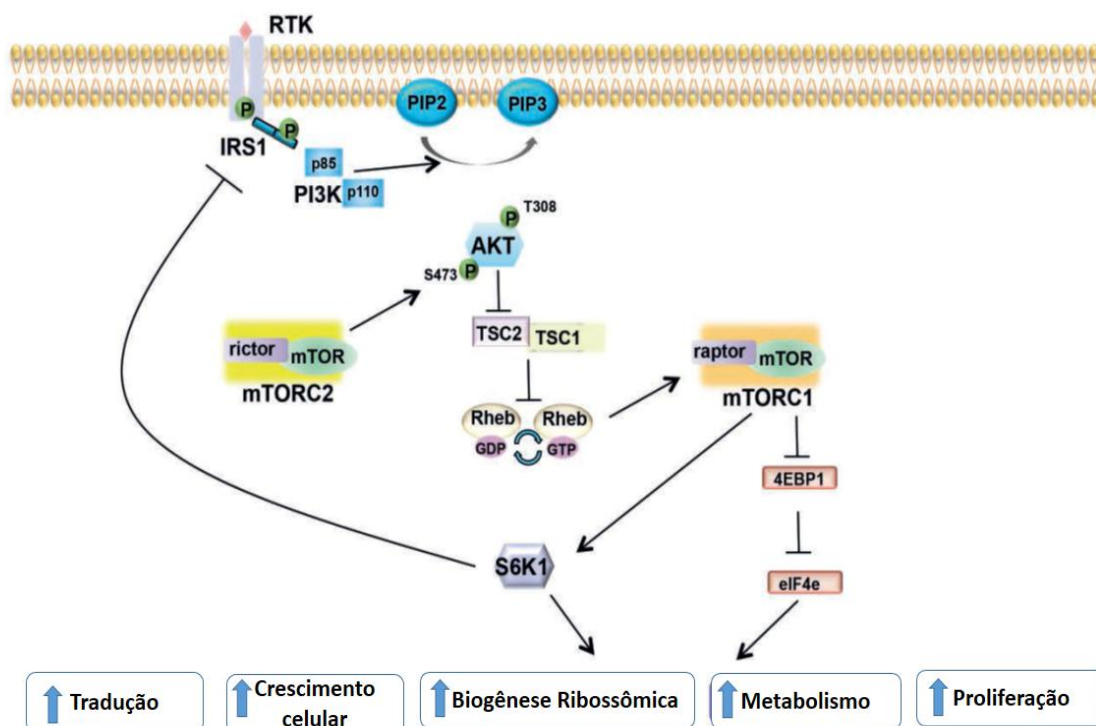
1 categorias principais, a primeira inclui a desregulação de componentes da via do RE
2 propriamente, como perda da expressão de RE- α , modificações pós-traducionais e a
3 atividade alterada de co-ativadores e co-repressores da via do estrogênio em células
4 tumorais (HASSON et al., 2013). A segunda categoria consiste na alteração do ciclo
5 celular e de moléculas sinalizadoras de sobrevivência, os mecanismos ainda não
6 estão completamente definidos mas parece que ocorre uma indução de reguladores
7 do ciclo celular, como a proteína Myc, ciclinas E1 e D1, controlando a progressão da
8 fase G1 da divisão celular, e uma supressão de reguladores negativos do ciclo, como
9 as proteínas p21 e p27, que inativam a ciclina E1 e a ciclina A, promovendo assim um
10 favorecimento da proliferação celular (HASSON et al., 2013). A terceira categoria
11 inclui a ativação de vias sinalizadoras que estimulam proliferação e sobrevivência
12 celular na presença de inibidores da via do RE, dentro dessas vias destacam-se as
13 vias do EGF, do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), a via da PI3K, da
14 proteína quinase B (Akt) e a via do alvo mamífero da rapamicina (mTOR), a via
15 PI3K/Akt/mTOR (HASSON et al., 2013).

16 Vários fatores contribuem para a ativação rápida da via PI3K/Akt/mTOR, como
17 quinases (enzimas que transferem fosfato da molécula de ATP para um substrato
18 específico) e substâncias que regulam a localização de seus alvos (muitas delas,
19 promovendo sua ligação ao lado interno da membrana celular) (HASSON et al., 2013).
20 A cadeia de eventos que leva a ativação da via PI3K/Akt/mTOR e as consequências
21 decorrentes dessa ativação estão ilustrados na figura 2. A ativação clássica começa
22 com a ligação de um fator de crescimento extracelular, como por exemplo o EGF, IGF-
23 1 ou mesmo a insulina a um receptor do tipo tirosina quinase da superfície da
24 membrana celular, após a ligação, o receptor sofre dimerização, se autofosforila e
25 recruta proteínas adaptadoras, como por exemplo o substrato para receptor de
26 insulina 1 e 2 (IRS1 e IRS2) (HASSON et al., 2013). A ativação da PI3K ocorre através
27 do recrutamento e ativação da PI3KIA, a classe da PI3K mais envolvida no câncer,
28 pelo receptor do tipo tirosina quinase (RTK) fosforilado (HASSON et al., 2013). A
29 PI3KIA possui uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade reguladora (p85),
30 e é responsável pela fosforilação do PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato),
31 transformando-o em PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), que é um segundo
32 mensageiro que promove a translocação da Akt para a membrana celular (HASSON

1 et al., 2013). Um importante regulador dessa etapa é o homólogo da fosfatase e da
2 tensina (PTEN) e o inositol polifosfato-4-fosfatase, tipo II, que desfosforilam PIP3 e
3 PIP 2, respectivamente (MILLER et al., 2011).

4 A Akt é uma proteína quinase de serina (Ser) e treonina (Thr), a translocação
5 da Akt para a membrana permite a sua fosforilação e consequente ativação de outra
6 quinase, a quinase dependente de fosfoinositídeo 1 (Pdk1), que por sua vez fosforila a
7 Akt na Thr 308 (HASSON et al., 2013). Entretanto a ativação completa da Akt ocorre
8 somente quando o complexo 2 do mTOR (mTORC2) a fosforila na Ser473, após sua
9 ativação, Akt se dissocia da membrana e transloca-se para o citoplasma e para o
10 núcleo, onde fosforila várias proteínas envolvidas na tradução, metabolismo,
11 proliferação, sobrevivência celular e angiogênese, inclusive o complexo 2 da
12 esclerose tuberosa (TSC2), também chamado de tuberina (HASSON et al., 2013). O
13 TSC2 normalmente age inibindo o Rheb (homólogo do Ras enriquecido no cérebro),
14 e consequentemente a ativação do seu alvo, o mTOR (HASSON et al., 2013). Dessa
15 forma a fosforilação de TSC2 pela Akt permite a ativação de mTOR, que é uma
16 proteína quinase do tipo serina/treonina que funciona como subunidade catalítica de
17 dois complexos, o mTORC1 (quando o mTOR encontra-se complexado como a
18 proteína reguladora associada ao mTOR, a RAPTOR) e o mTORC2 (quando o mTOR
19 complexa-se com o companheiro insensível a rapamicina, o rictor) (HASSON et al.,
20 2013). Os principais efeitos do mTORC1 é induzir 4E-BP1 e a kinase 1 de S6
21 ribossomal (S6K1), que aumentam a tradução de proteínas relacionadas com a
22 proliferação e sobrevivência celular, já o mTORC2 possui como principal função a
23 ativação da Akt (HASSON et al., 2013). É importante ressaltar que mutações na via
24 da PI3K é a alteração genética mais comum no câncer de mama que possui RH, e
25 ocorre em mais de 70% desses cânceres (MILLER et al., 2011).

26



1
2 **Figura 2-** Ativação da via PI3K/Akt/mTOR. Adaptado de Hasson et al. (2013).
3

4 Com relação ao câncer de mama com superexpressão de HER-2, cerca de
5 40% dos pacientes não respondem ao tratamento com trastuzumabe e muitos dos
6 que respondem, acabam desenvolvendo resistência dentro de um ano após o início
7 do tratamento com o medicamento (THERY et al., 2014). Como visto anteriormente,
8 a ativação de HER-2 envolve redes complexas de vias sinalizadoras intracelulares e,
9 por esse motivo, os mecanismos de resistência são classificados de acordo com
10 alterações genéticas ou ambientais dos receptores do tipo tirosina quinase e seus
11 efetores, chamada de resistência de novo, ou de acordo com a ativação de vias
12 sinalizadoras alternativas que ignoram a inibição de HER-2 após exposição ao seu
13 antagonista, chamada de resistência adquirida (THERY et al., 2014).

14 O receptor HER-2, assim como outros receptores da família do HER (como
15 EGFR, HER-3 e HER-4) apresenta domínios extracelulares, ou ectodomínios, que
16 consistem de dois domínios de ligação a ligantes semelhante ao IGF (domínios I e III)
17 e dois domínios ricos em cisteína (II e IV), normalmente envolvidos nos processos de
18 dimerização (THERY et al., 2014). É importante ressaltar que o HER-2 apresenta
19 naturalmente uma conformação aberta, independente de ligante, que favorece sua

1 homo ou heterodimerização, que induz a transfosforilação no domínio
2 intracitoplasmático tirosina/quinase e a consequente ativação da sinalização
3 intracelular (THERY et al., 2014).

4 Dentro da resistência de novo, três mecanismos já foram descritos, como a
5 presença de enzimas chamadas sheddases, ou secretases, como a ADAM10 (uma
6 desintegrina e metaloproteínase 10) que são capazes de clivar os ectodomínios de
7 HER-2 e ativá-lo, mediando portanto a resistência ao trastuzumabe, mas não ao
8 lapatinibe (THERY et al., 2014; LIU et al., 2006). Outro mecanismo para esse tipo de
9 resistência inclui a presença de polimorfismos em receptores que reconhecem a
10 porção constante (porção Fc) do Trastuzumabe, uma vez que esse medicamento é
11 um anticorpo monoclonal e um de seus mecanismos de ação inclui a citotoxicidade
12 mediada pela interação antígeno-anticorpo (THERY et al., 2014). O terceiro
13 mecanismo consiste nas mudanças da transmissão de sinais, como mutações em
14 proteínas que inibem a ativação da via da PI3K/Akt/mTOR, como a PTEN ou a PI3KCA
15 (subunidade catalítica da PI3K) (THERY et al., 2014).

16 Com relação à resistência adquirida à terapia com trastuzumabe e lapatinibe,
17 também existem três principais mecanismos descritos, como a superexpressão de
18 outros receptores do tipo tirosina quinase ou de seus ligantes, como o HER-3 e o HER-
19 1, a ligação entre HER-2 e IGF-1R (receptor do fator de crescimento semelhante à
20 insulina) e em alguns casos até a heterotrimerização, com a associação entre HER-2,
21 HER-3 e IGF-1R também já foi descrita (THERY et al., 2014; HUANG et al., 2010). O
22 terceiro mecanismo de resistência adquirida refere-se aos tumores com
23 superexpressão de HER-2 e que também apresentam receptores hormonais, uma vez
24 que existe um aumento na sinalização do RE em resposta ao tratamento com
25 trastuzumabe e com lapatinibe, sendo recomendável nesses casos associar ao
26 tratamento a terapia endócrina (THERY et al., 2014).

27 Como visto anteriormente, a quimioterapia é amplamente utilizada no
28 tratamento do câncer de mama, porém as células tumorais frequentemente
29 desenvolvem mecanismos de resistência a esse tipo de tratamento. Esses
30 mecanismos podem se dar através da exclusão da droga para fora da célula,
31 deficiência na ativação da pró-droga em sua forma ativa, aumento na sua
32 detoxificação, aumento da capacidade reparativa celular após injúria ou mesmo a

1 deficiência em promover uma resposta apropriada na célula, capaz de induzir
2 apoptose (PRADOS et al., 2012). Algumas células que são resistentes a uma droga
3 em especial frequentemente apresentam resistência cruzada a outros tipos de drogas,
4 estruturalmente distintas, esse tipo de fenômeno é conhecido como resistência a
5 múltiplas drogas (MDR) (PRADOS et al., 2012). Nos últimos anos, esse fenômeno tem
6 sido bastante estudado e a glicoproteína-P (P-gp) possui participação importante nos
7 seus mecanismos (NAKANISHI; ROSS, 2012). A P-gp é codificada pelo gene *MDR1*
8 e é uma proteína transportadora dependente de ATP, que possui participação
9 importante nos mecanismos de secreção e detoxificação celular, sendo responsável
10 pelo efluxo ativo de quimioterápicos e conseqüentemente, resistência ao tratamento
11 (NAKANISHI; ROSS, 2012). Além da P-gp, já foram identificadas outras duas
12 proteínas envolvidas nesse mesmo mecanismo, a proteína associada a resistência a
13 múltiplas drogas 1 (MRP1) e a proteína de resistência do câncer de mama (BCRP),
14 todas essas proteínas já foram isoladas em linhagens celulares de câncer de mama
15 humano MDR, isoladas através de seleção *in vitro* (NOGUCHI; KATAYAMA;
16 SUGIMOTO, 2014; NAKANISHI; ROSS, 2012).

17 Algumas vias de sinalização intracelular parecem estar relacionadas com a
18 sensibilidade das células tumorais ao tratamento, por exemplo, já foi descrito que a
19 via da PI3K/Akt parece regular a expressão da BCRP (NAKANISHI; ROSS, 2012).
20 Além disso, outras vias parecem possuir papel importante nesse processo como a via
21 do p53, NF- κ B, o fator de transcrição nuclear associado a E2 (Nrf2), e o fator de
22 crescimento transformante β 1 (TGF- β 1), que serão discutidas a seguir.

23 A proteína p53 é um fator de transcrição capaz de inibir a tumorigênese através
24 da regulação da transcrição de genes responsáveis pelo controle da parada do ciclo
25 celular, apoptose, crescimento celular e tradução de proteínas (HASTY; CHRISTY,
26 2013). Além disso, o p53 também possui participação em outros processos que
27 independem de sua ação sobre a transcrição, como a capacidade de ativação em
28 resposta ao estresse genotóxico intracelular, como dano de DNA, hipóxia e ativação
29 de oncogenes, e posterior indução de programas supressores tumorais como a
30 parada no ciclo celular e apoptose (JIN; LEVINE, 2001). O p53 também é responsável
31 pela inibição da via do mTOR, uma via importante para o crescimento e sobrevivência
32 celular. O mecanismo de inibição envolve a ativação da quinase de adenosina

1 monofosfato (AMPK) (FENG et al., 2005). Mutações no p53 foram associadas com
2 pior prognóstico clínico e resistência à quimioterapia tanto em pacientes como em
3 células tumorais em cultura (MASCIARELLI et al., 2013).

4 Alguns quimioterápicos ao agirem induzindo danos de DNA, como a
5 doxorrubicina, por exemplo, podem induzir a ativação do NF-kB, o que poderia limitar
6 a sensibilidade ao tratamento (WU et al., 2006; BANIN et al., 1998). Já foi descrito que
7 a doxorrubicina ativa a via do NF-kB em células de câncer de mama BT474 e que a
8 inibição farmacológica dessa via aumenta os efeitos citotóxicos da droga (TAPIA et
9 al., 2007). Além disso, a ativação da via do NF-kB foi correlacionada com resistência
10 à doxorrubicina (INGLES-ESTEVE et al., 2012), isso pode ocorrer porque a ativação
11 dessa via induz a produção de proteínas antiapoptóticas (DALMASES et al., 2013).
12 Muitos agentes quimioterápicos também acabam induzindo apoptose celular através
13 da geração de ERO, dentro desse contexto, o papel do Nrf2 na sensibilidade ao
14 tratamento também é muito importante. O Nrf2 é um fator de transcrição que regula
15 moléculas antioxidantes, enzimas detoxificadoras e proteínas de efluxo de drogas,
16 sendo responsável pela proteção de células neoplásicas contra o estresse oxidativo,
17 apoptose (através da indução de Bcl-2), e pela detoxificação de drogas
18 antineoplásicas (CHEN et al., 2012). Já foi relatado que os níveis basais de Nrf2 em
19 diferentes linhagens tumorais correlaciona-se com a sensibilidade à quimioterapia (HU
20 et al., 2010). Especificamente em células de câncer de mama, níveis menores de Nrf2
21 e proteínas de detoxificação reguladas por esse fator constituíram um fenótipo mais
22 frequente em células mais sensíveis ao tratamento com doxorrubicina e paclitaxel (HU
23 et al., 2010).

24 Ainda dentro de proteínas relacionadas com a resposta ao tratamento no
25 câncer de mama, alguns trabalhos relataram a participação do TGF- β 1 como um fator
26 contribuidor para a quimiorresistência em diferentes tipos de câncer, como no câncer
27 do trato biliar (YAMADA et al., 2013), em glioblastomas (HELD-FEINDT et al., 2012),
28 no carcinoma hepatocelular (KIM et al., 2012) e no câncer de mama (YU et al., 2010).
29 Portanto, o papel do TGF- β 1 no câncer de mama é paradoxal, embora sua ação como
30 um supressor tumoral canônico na mama seja inquestionável, há evidências de que
31 este pode participar de mecanismos relacionados com a progressão do câncer de

1 mama (BARCELLOS-HOFF; AKHURST, 2009), sendo portanto necessário que sua
2 participação seja melhor investigada.

3 Como visto, a resistência ao tratamento no câncer de mama limita a eficácia
4 dos diferentes tipos de agentes disponíveis atualmente para o tratamento dessa
5 doença. Portanto, a descoberta de novas alternativas terapêuticas, assim como a
6 compreensão dos mecanismos responsáveis pela indução da quimioresistência são
7 muito importantes e possibilitam o desenvolvimento de novas estratégias visando
8 aumentar a eficácia do tratamento. Por esses motivos, a ação de diferentes drogas,
9 novas ou não, nessa neoplasia maligna, vem sendo estudadas nos últimos anos.
10 Neste trabalho o enfoque foi dado sobre o efeito da metformina no câncer de mama
11 hormônio dependente e triplo negativo, utilizando-se como modelo células MCF-7
12 (RE+ e RP+) e MDA-MB-231 (triplo negativas).

13

14 1.5 LINHAGEM CELULAR MCF-7 E MDA-MB-231

15

16 MCF-7 é uma linhagem celular de câncer de mama isolada em 1970 de uma
17 mulher caucasiana de 69 anos de idade. A linhagem foi derivada de efusão pleural
18 proveniente de um carcinoma ductal de mama invasivo e possui receptores para
19 estrogênio e progesterona, não possuindo superexpressão de HER-2 (SOULE et al.,
20 1973). Essa linhagem tem sido amplamente utilizada desde então como uma
21 ferramenta para se estudar *in vitro* o câncer de mama positivo para receptores
22 hormonais.

23 A linhagem MDA-MB-231 foi isolada através de efusão pleural de uma paciente
24 com câncer de mama de 51 anos de idade, em 1973 (CAILLEAU et al., 1974). A
25 linhagem é negativa para RE, RP e para HER-2, sendo muito utilizada para estudos
26 do câncer de mama triplo negativo (NEVE et al., 2006).

27 1.6 METFORMINA

28 A metformina é um anti-hiperglicemiante oral amplamente utilizado no
29 tratamento do diabetes tipo 2 (NATHAN et al., 2009). O fármaco pertence à classe
30 das biguanidas e seus principais efeitos anti-hiperglicemiantes consistem na redução
31 da gliconeogênese hepática, diminuição da absorção gastrointestinal de glicose e

1 aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos muscular e adiposo (GONZALEZ-
2 ÂNGULO; MERIC-BERNSTAM, 2010). Além disso, a metformina diminui a beta-
3 oxidação de ácidos graxos e facilita o transporte de glicose por aumentar a
4 translocação do transportador da glicose (GLUT4) para a membrana celular no tecido
5 adiposo e muscular (SCARPELLO; HOWLETT, 2008). A metformina é capaz ainda de
6 melhorar indiretamente a função das células β pancreáticas, uma vez que ao
7 aumentar a sensibilidade à insulina, reduz a toxicidade da glicose sobre essas células
8 (SCARPELLO; HOWLETT, 2008).

9 O principal mecanismo de ação da metformina se deve, pelo menos em parte,
10 a ativação da AMPK, uma quinase importante na regulação da expressão de proteínas
11 necessárias para a gliconeogênese, e que também participa em vias envolvidas na
12 proliferação e crescimento celular (SCARPELLO; HOWLETT, 2008; ZHOU et al.,
13 2001). O crescimento celular e a proliferação são regulados coordenadamente por
14 vários sinais, incluindo fatores de crescimento, disponibilidade de nutrientes e energia
15 (ATP intracelular) (GONZALEZ-ÂNGULO; MERIC-BERNSTAM, 2010). A via de
16 sinalização do IGF-1 é ativada quando nutrientes estão disponíveis, enquanto que a
17 via da AMPK é ativada quando as células estão privadas de energia (TOWLER;
18 HARDIE, 2007). Nos mamíferos, a insulina promove a síntese de proteínas, lipídeos
19 e glicogênio, enquanto que a AMPK inibe essas vias biossintéticas (TOWLER;
20 HARDIE, 2007). O efeito da insulina na síntese proteica se deve à sua interação com
21 seu receptor na membrana celular (IR), uma vez ligada, a insulina estimula a
22 autofosforilação da região intracelular do seu receptor que fosforila IRS1 (BELFIORE
23 et al., 2009). Quando fosforilados em tirosina, IRS 1 se ligam e ativam a PI3K, que é
24 responsável pela maior translocação do transportador de glicose GLUT-4 para a
25 membrana, além de ativar a via da Akt que culmina na ativação da via sinalizadora do
26 alvo mamífero da rapamicina, o mTOR (Gonzalez-Ângulo; Meric-Bernstam, 2010). A
27 ativação da AMPK, entretanto, fosforila a TSC-2 em sítios diferentes inibindo a mTOR
28 (Gonzalez-Ângulo; Meric-Bernstam, 2010).

29 O mecanismo exato pelo qual a metformina leva à ativação da AMPK ainda não
30 foi completamente esclarecido, mas pode ocorrer indiretamente devido a inibição do
31 complexo I da cadeia respiratória, o que resulta em diminuição da síntese de ATP e
32 aumento da relação AMP/ATP, levando à ativação dessa quinase (ZOU et al., 2004).

1 A AMPK também pode ser ativada através de sua fosforilação no aminoácido treonina
2 172 e essa fosforilação é regulada pela serina-treonina quinase LKB1 (ZOU et al.,
3 2004). Sabe-se que a LKB1 pode ser ativada pelo aumento da concentração de
4 espécies reativas de nitrogênio (ERN) (ZOU et al., 2004). Já foi descrito que a
5 metformina aumenta os níveis de ERO em células endoteliais aórticas bovinas, e que
6 a depleção mitocondrial, ou a superexpressão da enzima SOD, bem como a inibição
7 da óxido nítrico sintase, resultava em ausência de ativação de AMPK nesse modelo,
8 indicando que a metformina induz ativação dessa quinase através da geração de ERN
9 (ZOU et al., 2004). Isso poderia ser explicado porque ao interferir no complexo I da
10 cadeia respiratória mitocondrial a metformina aumentaria a produção de radical ânion
11 superóxido (O_2^{\bullet}), que ao interagir com o óxido nítrico intracelular dá origem a outro
12 radical altamente reativo, o peroxinitrito ($ONOO^-$), que poderia ativar LKB1 e
13 conseqüentemente, a AMPK.

14 No músculo esquelético, a ativação da AMPK aumenta a capacidade de
15 contração muscular para estimular a captação de glicose (Gonzalez-Ângulo; Meric-
16 Bernstam, 2010). Embora o mecanismo ainda não seja perfeitamente conhecido, isso
17 pode ocorrer devido a capacidade da AMPK inibir a via da mTOR, que é ativada pela
18 insulina e exerce uma regulação por *feedback* na sinalização da insulina através da
19 regulação negativa do IRS 1 (Gonzalez-Ângulo; Meric-Bernstam, 2010). Uma vez que
20 o mTOR é inibido, essa regulação negativa deixaria de ocorrer (Gonzalez-Ângulo;
21 Meric-Bernstam, 2010). Além disso, no fígado e no tecido adiposo a AMPK diminui a
22 expressão de proteínas necessárias para a gliconeogênese, diminuindo a secreção
23 de insulina e conseqüentemente a sinalização da insulina em favor do crescimento
24 celular (Gonzalez-Ângulo; Meric-Bernstam, 2010).

25 Como visto, a sinalização intracelular mediada por IGF-1 e insulina exercem
26 papéis fundamentais no crescimento celular normal. Entretanto, também são
27 encontradas mediando fenótipos malignos de crescimento celular, uma vez que essas
28 vias frequentemente encontram-se desreguladas em diferentes tumores. Com base
29 nisso, a via sinalizadora da PI3K/Akt/mTOR consiste num importante alvo para
30 terapias visando a redução do crescimento tumoral e por isso a metformina tem sido
31 estudada como uma possível alternativa terapêutica em diferentes modelos de câncer,
32 inclusive no de mama.

1 1.7 METFORMINA E CÂNCER DE MAMA

2
3 Recentemente tem sido demonstrado que o uso regular da metformina em
4 pacientes diabéticos pode reduzir o risco de incidência de câncer (LEONE et al., 2014;
5 QUINN et al., 2013). No câncer de mama, o uso desse medicamento no momento do
6 diagnóstico foi associado com melhora nas propriedades clínico-patológicas das
7 pacientes, como menor incidência de tumores basal-símile e com grau histológico III
8 (AKSOY; SENDUR; ALTUNDAQ, 2013). Além disso, pacientes diabéticos com câncer
9 de mama tratados com metformina, apresentaram maior sensibilidade à radioterapia
10 do que pacientes diabéticos que recebiam outro medicamento e pacientes não
11 diabéticos (FERRO et al., 2013). Após essas e outras evidências sobre o papel da
12 metformina no câncer, vários trabalhos utilizando linhagens celulares de câncer de
13 mama têm sido desenvolvidos com o intuito de esclarecer os mecanismos de ação da
14 droga nesse tipo de câncer.

15 Em células MCF-7, já foi relatado que a metformina é capaz de induzir apoptose
16 através da interrupção das células na fase G1, diminuição dos níveis de ciclina D e
17 aumento da expressão de p21 (MALKI; YOUSSEF, 2011). Além disso, a droga
18 aumenta os níveis de p53 e Bax e reduz os níveis de Bcl-2, além de aumentar a
19 ativação de SAPK/JNK (proteína quinase ativada por estresse/c-Jun NH2-terminal
20 quinase), conhecidas por possuírem papel regulador na apoptose (MALKI; YOUSSEF,
21 2011). Essa ativação se dá através da regulação negativa da via da ERK (MALKI;
22 YOUSSEF, 2011). Na mesma linhagem celular, a metformina potencializou a ação do
23 tamoxifeno sobre a inibição do crescimento celular (MA et al., 2014).

24 Dowling e colaboradores (2007) concluíram que a ação da metformina sobre
25 MCF-7 ocorre através da inibição de mTOR, e isso está relacionado ao aumento da
26 atividade de AMPK, sendo esse aumento dependente de LKB1. A droga age inibindo
27 o crescimento tanto em células de câncer de mama com RH como em células triplo-
28 negativas, como demonstrado por Hadad e colaboradores (2013), sendo que o efeito
29 parece ser mediado pela ativação de AMPK e indução da parada do ciclo celular na
30 fase G1. Entretanto, apesar do conhecido efeito mitocondrial da metformina, Marini e
31 colaboradores (2013) observaram que a droga inibe a enzima hexoquinase 1 e 2,
32 fundamental para a glicólise anaeróbia, em células de câncer de mama triplo-

1 negativas, *in vitro* e *in vivo*. Essa observação indica que a metformina dificulta um
2 aspecto fundamental da biologia de células neoplásicas, uma vez que se sabe que a
3 quantidade de ATP oriunda da glicólise nessas células é cerca de cinquenta vezes
4 maior do que em células normais (MARINI et al., 2013).

5 Recentemente, Buac e colaboradores (2013) demonstraram que a resposta de
6 células tumorais de mama à metformina pode estar associada ao gene associado ao
7 câncer de mama 2, o *BCA2*, que está superexpresso em mais de 50% dos tumores
8 de mama. O *BCA2* codifica uma E3 ligase e funciona como um inibidor endógeno da
9 ativação da AMPK em células de câncer de mama, e sua importância na resposta à
10 metformina justificaria o fato da metformina não possuir ação protetora contra o câncer
11 de mama em todas as mulheres (BUAC et al., 2013). O efeito do *BCA2* sobre a AMPK
12 ocorre provavelmente devido à sua ligação com alguma proteína responsável pela
13 fosforilação de AMPK, favorecendo a posterior degradação da proteína pelo sistema
14 proteossomal (BUAC et al., 2013). Os autores observaram que a associação da
15 metformina com um inibidor de *BCA2* é uma estratégia mais eficiente no tratamento
16 do câncer de mama do que a droga utilizada sozinha (BUAC et al., 2013).

17 Portanto, pode-se concluir que apesar do crescente interesse na metformina
18 como alvo de estudos no câncer de mama, os mecanismos de ação desse fármaco
19 na doença ainda não foram completamente esclarecidos.

20

21 1.8 METFORMINA E RESISTÊNCIA AO TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

22

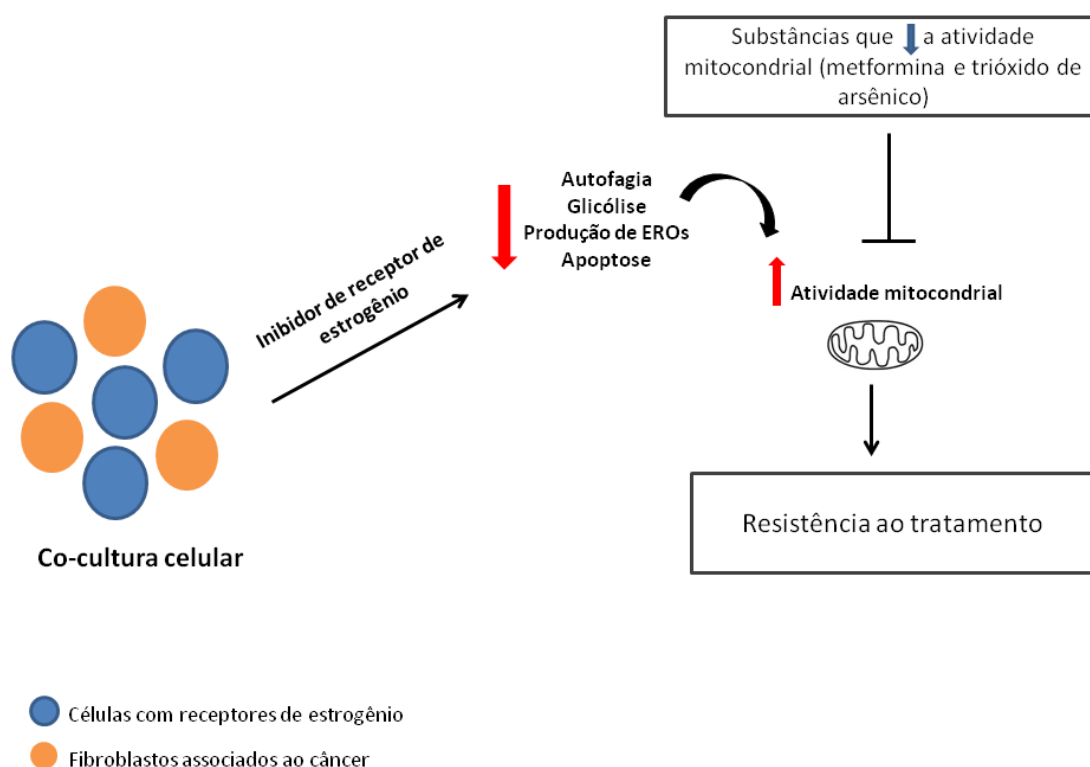
23 A influência da metformina na resistência ao tratamento do câncer de mama
24 ainda não foi muito estudada. Kim e colaboradores (2011) observaram que a droga é
25 capaz de reduzir a expressão de P-gp, que está diretamente relacionada à MDR, em
26 células MCF-7 sensíveis e resistentes à terapia com doxorubicina. Essa modificação
27 na expressão da proteína foi relacionada com a redução na ativação do NF- κ B (KIM
28 et al., 2011).

29 Já foi previamente descrito que a metformina possui ação citotóxica intensa
30 sobre as chamadas células tronco tumorais (CSC) (SONG et al., 2012). A existência
31 desse tipo de célula neoplásica (CSC) resistente à terapia com trastuzumabe, poderia
32 explicar as altas taxas de resistência primária à monoterapia com trastuzumabe

1 encontradas em pacientes com câncer de mama com superexpressão de HER-2
2 (CUFI et al., 2012). Baseado nisso, Cufi e colaboradores (2012) investigaram se a
3 metformina poderia apresentar efeitos citotóxicos, e ressensibilizar células tumorais;
4 enxertadas em camundongos à terapia com trastuzumabe. O enxerto foi feito
5 utilizando-se células JIMT, que foram isoladas de metástase pleural de um paciente
6 clinicamente resistente ao medicamento. Os autores observaram que enquanto o
7 tratamento dos animais com trastuzumabe durante sete semanas não foi capaz de
8 reduzir o tamanho tumoral, a administração sistêmica de metformina utilizada
9 isoladamente resultou em diminuição significativa tumoral, e a associação dos dois
10 agentes potencializou essa redução. Nesse estudo, a citotoxicidade da metformina
11 nas células tumorais foi comprovadamente maior nas CSC quando comparado às
12 outras células neoplásicas, sugerindo que o efeito da metformina sobre essas células
13 é suficiente para reestabelecer a resposta ao tratamento com trastuzumabe *in vivo*,
14 em células com resistência primária ao medicamento.

15 Martinez-Outschoorn e colaboradores (2011) observaram que a metformina
16 reduzia a resistência ao tratamento com tamoxifeno, *in vitro*. Essa resistência era
17 mediada através da interação com o microambiente tumoral, uma vez que a co-cultura
18 de MCF-7 e fibroblastos presentes no estroma, diminuía as taxas de apoptose em
19 resposta ao tratamento com o medicamento quando comparado com as células
20 cultivadas sozinhas. Os autores mostraram que a resistência nesse contexto ocorre
21 devido à indução pelo tamoxifeno, em co-cultura com os fibroblastos, da
22 superexpressão do gene regulador da glicólise e apoptose induzido pela TP53 (gene
23 *TIGAR*), um gene regulado pela p53 que simultaneamente inibe a glicólise, autofagia,
24 apoptose e diminui a geração de ERO, promovendo assim o metabolismo oxidativo
25 mitocondrial e protegendo a célula neoplásica da apoptose induzida pelo tamoxifeno.
26 Isso sugere que o aumento da função mitocondrial está relacionado com a resistência
27 ao tamoxifeno, o que foi comprovado através da utilização de substâncias que
28 diminuem a atividade mitocondrial, como a metformina e o trióxido de arsênio, e
29 subsequente recuperação da sensibilidade celular ao medicamento. Esse mecanismo
30 está ilustrado na figura 3. Além disso, os autores observaram que a co-cultura de
31 MCF-7 com fibroblastos também induzia resistência, na mesma linhagem celular, a
32 outras drogas como por exemplo à doxorrubicina e ao veliparib, que possuem

1 mecanismos de ação completamente diferentes do tamoxifeno, mostrando que o
 2 microambiente tumoral e a atividade mitocondrial exercem papel importante no
 3 mecanismo geral de indução de resistência a drogas (MARTINEZ-OUTSCHOORN et
 4 al., 2011).



5
 6 **Figura 3.** Participação da metformina nos mecanismos de ressensibilização ao tratamento com
 7 tamoxifeno em células MCF-7 em co-cultura com fibroblastos.

8
 9 O trabalho mais recente onde se investigou o efeito da metformina na
 10 resistência ao tratamento do câncer de mama foi realizado por Qu e colaboradores
 11 (2014). Esse estudo demonstrou que a metformina reverte a MDR e a transição
 12 epitelial-mesenquimal em células MCF-7 e células MDA-MB-231, e que esse efeito é
 13 mediado através da ativação de AMPK. Entretanto, apesar desse efeito observado,
 14 nenhum trabalho investigou a participação da metformina no processo de indução da
 15 resistência ao tratamento com quimioterápicos. Além disso, apesar de a metformina
 16 seguir apresentando ao longo dos anos potencial promissor como adjuvante no
 17 tratamento do câncer de mama, os mecanismos pelos quais a droga exerce efeito

1 antiproliferativo sobre as células de câncer de mama ainda não foram completamente
2 esclarecidos.

3 Baseado nisso, o presente trabalho buscou investigar a participação do
4 estresse oxidativo nos mecanismos de citotoxicidade da metformina em células MCF-
5 7 e MDA-MB-231 e investigar os efeitos da metformina no processo de indução
6 experimental de resistência à doxorrubicina. Para a análise da participação do EO nos
7 mecanismos de citotoxicidade da droga, avaliou-se o padrão de morte celular, a
8 presença de danos oxidativo ao DNA, parâmetros de estresse oxidativo e efeito da
9 metformina sobre algumas proteínas de sinalização importantes no controle do
10 crescimento e proliferação celular (ERK1/2, AKT, TGF – β 1 e p53). Para isso, quatro
11 concentrações diferentes da droga foram utilizadas: duas clinicamente relevantes, que
12 correspondem às concentrações plasmáticas encontradas em indivíduos após
13 tratamento (6 e 30 μ M), e duas experimentais (1000 e 5000 μ M). Para a investigação
14 dos efeitos da metformina no processo de indução de resistência à doxorrubicina, as
15 células foram expostas a concentrações crescentes do quimioterápico e a metformina
16 foi associada em diferentes momentos, simultaneamente e através de um pré-
17 tratamento. Foram analisados o estado oxidativo celular ao longo do processo de
18 indução da quimiorresistência, os níveis de óxido nítrico (NO) e os efeitos da droga
19 em vias que poderiam relacionar-se com a quimiorresistência, como a p53, NF- κ B,
20 Nrf2 e TGF- β 1. A concentração da metformina utilizada nesse experimento foi
21 baseada nos primeiros resultados (obtidos em células sensíveis) e uma concentração
22 não citotóxica (6 μ M) foi escolhida.

23

24

25

26

27

28

29

30

31

1 2 OBJETIVOS

2

3 Investigar a participação do estresse oxidativo nos mecanismos de
4 citotoxicidade da metformina em células MCF-7 e MDA-MB-231 e investigar os efeitos
5 da metformina no processo de indução de resistência experimental à doxorrubicina.

6 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

7 Caracterizar a citotoxicidade da metformina em células MCF-7 e MDA-MB-231,
8 especificando o padrão de morte celular, em diferentes concentrações.

9 Investigar os efeitos antiproliferativos da metformina em células MCF-7 e MDA-
10 MB-231, em diferentes concentrações.

11 Avaliar os efeitos da metformina, em diferentes concentrações, sobre o
12 estresse oxidativo celular, dano de DNA e na expressão de ERK1/2, AKT, TGF – β 1
13 e p53.

14 Avaliar os efeitos do pré-tratamento e tratamento simultâneo com metformina
15 na indução experimental de resistência à quimioterapia com doxorrubicina.

16 Avaliar o estresse oxidativo intracelular, os níveis de óxido nítrico e a expressão
17 de p53, NF-kB, Nrf2 e TGF- β 1 ao longo do processo de indução de resistência à
18 terapia com doxorrubicina.

19 Avaliar como a metformina age no estresse oxidativo intracelular, nos níveis de
20 óxido nítrico e nas vias do p53, NF-kB, Nrf2 e TGF- β 1 ao longo do processo de
21 indução de resistência à doxorrubicina.

22

23

24

25

26

27

28

29

30

3 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho originou dois artigos científicos que serão incluídos nessa tese como apêndices. Ambos foram realizados na Universidade Estadual de Londrina, nos laboratórios de Patologia Molecular e no laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres.

O primeiro trabalho foi submetido para publicação na revista “Plos One” e intitula-se “*Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β 1 induction.*” O artigo está formatado de acordo com as normas da revista “Plos One”.

O segundo trabalho intitula-se “*Metformin pretreatment prevents doxorubicin resistance induction in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells through oxidative stress generation, induction of p53 and TGF- β 1 and decrease of Nrf2*”.

1 4 CONCLUSÃO

2
3 Com os resultados apresentados nesses trabalhos pode-se concluir que a
4 citotoxicidade da metformina nas células MCF-7 e MDA-MB-231 envolve
5 preferencialmente indução de apoptose. Esse processo está fortemente relacionado
6 com o aumento do estresse oxidativo, que provoca lesões oxidativas de DNA celular
7 e conseqüente aumento de p53 e apoptose celular. Além disso, a droga aumenta os
8 níveis de TGF- β 1, o que provavelmente contribui para a apoptose em resposta ao
9 dano de DNA. A metformina exerce efeito antiproliferativo sobre as células analisadas,
10 e esse efeito provavelmente está relacionado com a diminuição da expressão de
11 ERK1/2 e Akt.

12 Com relação à participação da metformina nos mecanismos de indução
13 experimental de resistência à doxorrubicina, os resultados sugerem que a droga pode
14 exercer um papel benéfico na prevenção desse processo. Esse efeito relaciona-se
15 com a capacidade da metformina de modular o estresse oxidativo celular, os níveis
16 de NO e os níveis de p53, NF- κ B, Nrf2 e TGF- β 1.

17 Entretanto, estudos mais detalhados devem ser feitos para investigar os efeitos
18 da metformina *in vivo*, tanto no contexto de células tumorais sensíveis como
19 resistentes aos diferentes tratamentos disponíveis, para que sejam estabelecidos a
20 segurança e o potencial uso dessa droga clinicamente como adjuvante na terapia do
21 câncer de mama.

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

- 1 CRAWFORD, A., FASSETT, R. G., GERAGHTY, D. P., KUNDE, D. A., BALL, M. J.,
2 ROBERTSON, I. K., COOMBES, J. S. Relationships between single nucleotide
3 polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. **Gene**. v.501, p.89-103, 2012.
4
- 5 CUFI, S., COROMINAS-FAJA, B., VAZQUEZ-MARTIN, A., OLIVERAS-FERRAROS,
6 C., DORCA, J., BOSCH-BARRERA, J., MARTIN-CASTILLO, B., MENENDEZ, J. A.
7 Metformin-induced preferential killing of breast cancer initiating CD44+CD24-/low
8 cells is sufficient to overcome primary resistance to trastuzumab in HER2+ human
9 breast cancer xenografts. **Oncotarget**. v. 3, n. 4, p. 395-398, 2012.
10
- 11 DALMASES, A., GONZÁLEZ, I., MENENDEZ, S., ARPÍ, O., COROMINAS, J. M.,
12 SERVITJA, S., TUSQUETS, I., CHAMIZO, C. et al. Deficiency in p53 is required for
13 doxorubicin induced transcriptional activation of NF- κ B target genes in human breast
14 cancer. **Oncotarget**. v. 5, n. 1. [Epub ahead of print], 2013.
15
- 16 DOWLING, R. J., ZAKIKHANI, M., FANTUS, I. G., POLLAK, M., SONENBERG, N.
17 Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in
18 breast cancer cells. **Cancer Res**. v. 67, n. 22, p. 10804-10812, 2007.
19
- 20 ESTEVA, F. J., VALERO, V., PUSTZAI, L., BOEHNKE-MICHAUD, L., BUZDAR, A.
21 U., HORTOBAGYI, G. N. Chemotherapy of metastatic breast cancer: what to expect
22 in 2001 and beyond. **Oncologist**. v. 6, n. 2, p. 133-46, 2001.
23
- 24 FENG, Z., ZHANG, H., LEVINE, A. J., JIN, S. The coordinate regulation of the p53
25 and mTOR pathways in cells. **Proc Natl Acad Sci**. v.102, n. 23, p. 8204–8209, 2005.
26
- 27 FERRO, A., GOYAL, S., KIM, S., WU, H., TAUNK, N. K., SCHIFF, D., PIRLAMARLA,
28 A., HAFFTY, B. G. Evaluation of Diabetic Patients with Breast Cancer Treated with
29 Metformin during Adjuvant Radiotherapy. **Int J Breast Cancer**. v. 2013, p. 659723-
30 659731, 2013.
31
- 32 FISHER, B., COSTANTINO, J. P., WICKERHAM, D. L., REDMOND, C. K.,
33 KAVANAH, M., CRONIN, W. M., VOGEL, V., ROBIDOUX, A., *et al*. Tamoxifen for
34 prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and
35 Bowel Project P-1 Study. **J Natl Cancer Inst**. v. 90, p. 1371 – 1388, 1998.
36
- 37 GAGO-DOMINGUEZ, M.; JIANG, X.; CASTELAO, J. E. Lipid peroxidation, oxidative
38 stress genes and dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. **Breast**
39 **Cancer Res**. v.9, p.201-212, 2007.
40
- 41 GAGO-DOMINGUEZ, M. CASTELAO, J. E., PIKE, M. C., SEVANIAN, A., HAILE, R.
42 W. Role of lipid peroxidation in the epidemiology and prevention of breast cancer. In:
43 (Ed.). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. United States, v.14, 2005. p.2829-39.
44
- 45 GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MERIC-BERNSTAM, F. Metformin: a therapeutic
46 opportunity in breast cancer. **Clin Cancer Res**. v.16, p.1695-1700, 2010.
47

- 1 GRODSTEIN, F., STAMPFER, M. J., GOLDHABER, S. Z., MANSON, J. E.,
2 COLDITZ, G. A., SPEIZER, F. E., WILLETT, W. C., HENNEKENS, C. H. Prospective
3 study of exogenous hormones and risk of pulmonary embolism in women. **Lancet**. v.
4 348, n. 9033, p. 983 – 987, 1996.
- 5
6 HADAD, S. M., HARDIE, D. G., APPLEYARD, V., THOMPSON, A. M. Effects of
7 metformin on breast cancer cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle.
8 **Clin Transl Oncol**. [Epub ahead of print], 2013.
- 9
10 HADJI, P. The evolution of selective estrogen receptor modulators in osteoporosis
11 therapy. **Climacteric**. v. 15, n. 6, p. 513 – 526, 2012.
- 12 HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. v.
13 144, n. 5, p. 646 – 674, 2011.
- 14
15 HASSON, S. P., RUBINEK, T., RYVO, L., WOLF, I. Endocrine Resistance in Breast
16 Cancer: Focus on the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/ Mammalian Target of
17 Rapamycin Signaling Pathway. **Breast Care**. v. 8, p. 248–255, 2013.
- 18
19 HASTY, P., CHRISTY, B. A. p53 as an intervention target for cancer and aging.
20 **Pathobiol Aging Age Relat Dis**. v. 3, DOI: 10.3402/pba.v3i0.22702, 2013.
- 21 HELD-FEINDT, J., SCHMELZ, S., HATTERMANN, K., MENTLEIN, R., MEHDORN,
22 H. M., SEBENS, S. The neural adhesion molecule L1CAM confers chemoresistance
23 in human glioblastomas. **Neurochem Int**. v. 61, n. 7, p. 1183-1191, 2012.
- 24
25 HOLLANDER, P., SAVAGE, M. I., BROWN, P. H. Targeted therapy for breast cancer
26 prevention. **Frontiers in Oncology**. v.3, p. 250 – 265, 2013.
- 27
28 HOWE, L. R., BROWN, P. H. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast
29 cancer. **Cancer Prev Res**, v. 4, n. 8, p. 1149- 1157, 2011.
- 30
31 HU, L., MIAO, W., LOIGNON, M., KANDOUZ, M., BATIST, G. Putative
32 chemopreventive molecules can increase Nrf2-regulated cell defense in some human
33 cancer cell lines, resulting in resistance to common cytotoxic therapies. **Cancer**
34 **Chemother Pharmacol**. v. 66, n. 3, p. 467-74, 2010.
- 35
36 HUANG, X., GAO, L., WANG, S., MCMANAMAN, J. L., THOR, A. D., YANG, X.,
37 ESTEVA, F. J., LIU, B. Heterotrimerization of the growth factor receptors erbB2,
38 erbB3, and insulin-like growth factor-i receptor in breast cancer cells resistant to
39 herceptin. **Cancer Res**. v. 70, n. 3, p. 1204-1214, 2010.
- 40
41 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2014. **Incidência do**
42 **Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
- 43
44 INGLES-ESTEVE, J., MORALES, M., DALMASES, A., GARCIA-CARBONELL, R.,
45 JENE-SANZ, A., LOPEZ-BIGAS, N., IGLESIAS, M., RUIZ-HERGUIDO, C. et al.
46 Inhibition of specific NF-kappaB activity contributes to the tumor suppressor function
47 of 14-3-3sigma in breast cancer. **PLoS One**. v. 7, n. 5, e38347, 2012.
- 48

- 1 JIN, S., LEVINE, A. J. The p53 functional circuit. **Journal of Cell Science**, v. 114, p.
2 4139-4140, 2001.
- 3
- 4 JOENSUU, H., GLIGOROV, J. Adjuvant treatments for triple-negative breast
5 cancers. **Ann Oncol.** v. 6, p. 40-45, 2012.
- 6
- 7 JOLLY, T., WILLIAMS, G.R., JONES, E., MUSS, H. B. Treatment of metastatic breast
8 cancer in women aged 65 years and older. **Womens Health (Lond Engl)**. v. 8, n. 4,
9 p. 455-71, 2012.
- 10 KAYE, S. B. New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact.
11 **Br J Cancer**. v. 78, p. 1–7, 1998.
- 12 KHASRAW, M., BELL, R., DANG, C. Epirubicin: Is it like doxorubicin in breast
13 cancer? A clinical review. **Breast**. v. 21, n. 2, p. 142 – 149, 2012.
- 14 KIM, W. D., KIM, Y. W., CHO, I. J., LEE, C. H., KIM, S. G. E-cadherin inhibits nuclear
15 accumulation of Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. **J Cell Sci**. v.
16 125, p. 1284-1295, 2012.
- 17
- 18 KIM, H. G., HIEN, T. T., HAN, E. H., HWANG, Y. P., CHOI, J. H., KANG, K. W.,
19 KWON, K. I., KIM, B. H, et al. Metformin inhibits P-glycoprotein expression via the
20 NF- κ B pathway and CRE transcriptional activity through AMPK activation. **Br J**
21 **Pharmacol.** v. 162, n. 5, p. 1096-1108, 2011.
- 22
- 23 KNUTSON, T. P., LANGE, C. A. Tracking progesterone receptor-mediated actions in
24 breast cancer. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 142, p. 114–125, 2014.
- 25 LEIDY, J., KHAN, A., KANDIL, D. Basal-Like Breast Cancer Update on
26 Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features. **Arch Pathol Lab**
27 **Med.** v. 38, p. 37 – 44, 2014.
- 28
- 29 LEONE, A., GENNARO, E. D., BRUZZESE, F., AVALLONE, A., BUDILLON, A. New
30 perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. **Cancer**
31 **Treat Res.** v. 159, p. 355-376, 2014.
- 32
- 33 LIU, P. C., LIU, X., LI, Y., COVINGTON, M., WYNN, R., HUBER, R., HILLMAN, M.,
34 YANG, G. et al. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain
35 sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. **Cancer Biol Ther.** v.
36 5, n. 6, p. 657-664, 2006.
- 37
- 38 LORD, C. J., ASHWORTH, A. Mechanisms of resistance to therapies targeting
39 BRCA-mutant cancers. **Nat Med.** v. 19, n. 11, p. 1381-1388, 2013.
- 40
- 41 LU, J.; HOLMGREN, A. Thioredoxin System in Cell Death Progression. **Antioxid**
42 **Redox Signal.** v. 17, n. 12, p. 1738 – 1747, 2012.

- 1 MA, J., GUO, Y., CHEN, S., ZHONG, C., XUE, Y., ZHANG, Y., LAI, X., WEI, Y., et al.
2 Metformin enhances tamoxifen-mediated tumor growth inhibition in ER-positive
3 breast carcinoma. **BMC Cancer**. v. 14, n. 1, p. 172-192, 2014.
4
- 5 MALKI, A.; YOUSSEF, A. Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human
6 MCF breast cancer via targeting ERK signaling. **Oncol Res**, v. 19, n. 6, p. 275-85,
7 2011.
- 8 MARTINEZ-OUTSCHOORN, U. E.; GOLDBERG, A.; LIN, Z.; KO, Y.;
9 FLOMENBERG, N.; WANG, C.; PAVLIDES, S.; PESTELL, R. G.; et al. Anti-estrogen
10 resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be
11 overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. **Cancer**
12 **Biology & Therapy**. v. 12, n.10, p. 924–938, 2011.
- 13 MASCIARELLI, S., FONTEMAGGI, G., DI AGOSTINI, S., DONZELLI, S.,
14 CARCARINO, E., STRANO, S., BLANDINO, G. Gain-of-function mutant p53
15 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of culture tumor cells.
16 **Oncogene**, doi: 10.1038/onc.2013.106. [Epub ahead of print]. 2013.
17
- 18 MARINI, C., SALANI, B., MASSOLLO, M., AMARO, A., ESPOSITO, A. I., ORENGO,
19 A. M., CAPITANIO, S., EMIONITE, L. et al. Direct inhibition of hexokinase activity by
20 metformin at least partially impairs glucose metabolism and tumor growth in
21 experimental breast cancer. **Cell Cycle**. v. 12, n. 22, p. 3490-3499, 2013.
22
- 23 MILLER, T.W., REXER, B. N., GARRETT, J. T., ARTEAGA, C. L. Mutations in the
24 phosphatidylinositol 3-kinase pathway: Role in tumor progression and therapeutic
25 implications in breast cancer. **Breast Cancer Res**. v. 13, p. 224 – 232, 2011.
26
- 27 MOORE, M. R., CONOVER, J. L., & FRANKS, K. M. Progestin effects on long-term
28 growth, death, and Bcl-xL in breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**.
29 v. 277, p. 650–654, 2000.
30
- 31 MOUDI, M., GO, R., YIEN, C. Y. S., NAZRE, M. Vinca alkaloids. **Int J Prev Med**. v.
32 4, n. 11, p. 1231–1235, 2013.
33
- 34 NATHAN, D. M., BUSE, J. B., DAVIDSON, M. B., FERRANNINI, E., HOLMAN, R. R.,
35 SHERWIN, R., ZINMAN, B. Medical management of hyperglycemia in type 2
36 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a
37 consensus statement of the American Diabetes Association and the European
38 Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care**. v. 32, p. 193–203, 2009.
39
- 40 NAKANISHI, T., ROSS, D. D. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): its
41 role in multidrug resistance and regulation of its gene expression. **Chin J Cancer**. v.
42 31, n. 2, p. 73–99, 2012.
43
- 44 NEVE RM, CHIN K, FRIDLAND J, YEH J, BAEHNER FL, FEVR T, CLARK L,
45 BAYANI N, COPPE JP, TONG F, SPEED T, SPELLMAN PT, DEVRIES S, LAPUK A,
46 WANG NJ, KUO WL, STILWELL JL, PINKEL D, ALBERTSON DG, WALDMAN FM,

- 1 MCCORMICK F, DICKSON RB, JOHNSON MD, LIPPMAN M, ETHIER S, GAZDAR
2 A, GRAY JW. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally
3 distinct cancer subtypes. **Cancer Cell**. v.10, n.6, p.515-27, 2006.
4
- 5 NOGUCHI, K., KATAYAMA, K., SUGIMOTO, Y. Human ABC transporter
6 ABCG2/BCRP expression in chemoresistance: basic and clinical perspectives for
7 molecular cancer therapeutics. **Pharmgenomics Pers Med**. v. 7, p. 53–64, 2014.
8
- 9 PANIS, C., HERRERA, A. C., VICTORINO, V. J., CAMPOS, F. C., FREITAS, L. F.,
10 DE ROSSI, T., COLADO SIMÃO, A. N., CECCHINI, A. L., CECCHINI, R. Oxidative
11 stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to
12 paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**. v. 133, n. 1, p.
13 89-97, 2011.
- 14 PANIS, C., VICTORINO, V. J., HERRERA, A. C., FREITAS, L. F., DE ROSSI, T.,
15 CAMPOS, F. C., COLADO SIMÃO, A. N., BARBOSA, D. S., PINGE-FILHO, P.
16 CECCHINI, R., CECCHINI, A. L. Differential oxidative status and immune
17 characterization of the early and advanced stages of human breast cancer. **Breast**
18 **Cancer Res Treat**. v. 133, n. 1, p. 881-8, 2012.
19
- 20
- 21 PARIDAENS, R. J., DIRIX, L. Y., BEEEX, L. V., NOOIJ, M., CAMERON, D. A.,
22 CUFER, T., PICCART, M. J., BOGAERTS, J., et al. Phase III study comparing
23 exemestane with tamoxifen as first-line hormonal treatment of metastatic breast
24 cancer in postmenopausal women: the European Organisation for Research and
25 Treatment of Cancer Breast Cancer Cooperative Group. **J Clin Oncol**. v. 26, p.
26 4883–4890, 2008.
27
- 28 PRADOS, J., MELGUIZO, C., ORTIZ, R., VELEZ, C., ALVAREZ, P. J., ARIAS, J. L.,
29 RUIZ, M. A. et al. Doxorubicin-Loaded Nanoparticles: New Advances in Breast
30 Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**. v. 12, p. 1058-
31 1070, 2012.
32
- 33 QU C, ZHANG W, ZHENG G, ZHANG Z, YIN J, HE Z. Metformin reverses multidrug
34 resistance and epithelial– mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-
35 activated protein kinase (AMPK) in human breast cancer cells. **Mol Cell Biochem**. v.
36 386, p. 63- 71, 2014.
37
- 38 QUINN, B. J., KITAGAWA, H., MEMMOTT, R. M., GILLS, J. J., DENNIS, P. A.
39 Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. **Trends Endocrinol**
40 **Metab**. v. 24, n. 9, p. 469-80. 2013
41

- 1 RAKHA, E. A., REIS-FILHO, J. S., ELLIS, I. O. Basal-Like Breast Cancer: A Critical
2 Review. **Journal of Clinical Oncology**. v. 26, n. 15, p. 2568-2581, 2008.
- 3 REIS-FILHO, J. S.; WESTBURY, C.; PIERGA, J. Y. The impact of expression
4 profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. In: (Ed.). **J Clin**
5 **Pathol**. v.59, p.225-31, 2006.
- 6 RINGNÉR, M., STAAF, J., JONSSON, G. Nonfamilial breast cancer subtypes.
7 **Methods Mol Biol**. v. 973, p. 279-295, 2013.
- 8 ROGER, P., SAHLA, M. E., MÄKELÄ, S., GUSTAFSSON, J. A., BALDET, P.,
9 ROCHEFORT, H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in
10 proliferative preinvasive mammary tumors. **Cancer Res**. v. 61, n. 6, p. 2537–41,
11 2001.
- 12
- 13 ROUZIER, R., PEROU, C. M., SYMMANS, W. F., IBRAHIM, N., CRISTOFANILLI,
14 M., ANDERSON, K., HESS, K. R., STEC, J. Breast cancer molecular subtypes
15 respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**. v. 11, n. 16, p.
16 5678-85, 2005.
- 17
- 18 SCARPELLO, J. H. B., HOWLETT, H. C. S. Metformin therapy and clinical uses.
19 **Diabetes and Vascular Disease Research**. v. 5, p. 157-169, 2008.
- 20
- 21 SOTIRIOU, C., PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J**
22 **Med**. v. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.
- 23 SONG, C. W., LEE, H., DINGS, R. P., WILLIAMS, B., POWERS, J., SANTOS, T. D.,
24 CHOI, B. H., PARK, H. J. Metformin kills and radiosensitizes cancer cells and
25 preferentially kills cancer stem cells. **Sci Rep**. v. 2, p. 362-371, 2012.
- 26 SOULE, H. D., VAZQUEZ, J., LONG, A., ALBERT, S., BRENNAN, M. A human cell
27 line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v.
28 51, n. 5, p. 1409-16, 1973.
- 29 SUN, Y., ROWEHL, L. M., HUANG, L., MACKENZIE, G. G., VRANKOVA, K,
30 KOMNINO, D., RIGAS, B. Phospho-ibuprofen (MDC-917) suppresses breast
31 cancer growth: an effect controlled by the thioredoxin system. **Breast Cancer Res**. v.
32 14, n. 1, p. 20 – 32, 2012.
- 33 TANOS, T., SFLOMOS, G., ECHEVERRIA, P. C., AYYANAN, A., GUTIERREZ, M.,
34 DELALOYE, J. F., RAFFOUL, W., FICHE, M. *et al*. Progesterone/RANKL is a major
35 regulatory axis in the human breast. **Sci Transl Med**. v. 5, p. 182ra155, 2013.
- 36
- 37 TAPIA, M. A., GONZALEZ-NAVARRETE, I., DALMASES, A., BOSCH, M.,
38 RODRIGUEZ-FANJUL, V., ROLFE, M., ROSS, J. S., MEZQUITA, J. *et al*. Inhibition
39 of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to
40 doxorubicin. **Cell Cycle**. v. 6, n. 18, p. 2284-2292, 2007.
- 41

- 1 THERY, J., SPANO, J., AZRIA, D., RAYMOND, E., LLORCA, F.P. Resistance to
2 human epidermal growth factor receptor type 2-targeted therapies. **European**
3 **Journal of Cancer**. v. 50, p. 892– 901, 2014.
4
- 5 TOWLER, M. C., HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase in metabolic control
6 and insulin signaling. **Circ Res**. v. 100, p. 328–41, 2007.
7
- 8 WARDLEY, A. Capecitabine: Expanding Options for the Treatment of Patients with
9 Early or Locally Advanced Breast Cancer. **Oncologist**. v. 11, p. 20 – 26, 2006.
10
- 11 WICKI, A.; ROCHLITZ, C. Targeted therapies in breast cancer. **Swiss Med Wkly**, v.
12 142, p. w13550, 2012.
- 13 WILLIAMS, C., LIN, C. Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and
14 clinical implications. *Ecancermedicalsecience*. v. 7, p. 370 – 382, 2013.
15
- 16 WU, Z. H., SHI, Y., TIBBETTS, R. S., MIYAMOTO, S. Molecular linkage between the
17 kinase ATM and NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. **Science**. v.
18 311, n. 5764, p. 1141-1146, 2006.
19
- 20 YAMADA, D., KOBAYASHI, S., WADA, H., KAWAMOTO, K., MARUBASHI, S.,
21 EGUCHI, H., ISHII, H., NAGANO, H. et al. Role of crosstalk between interleukin-6
22 and transforming growth factor-beta 1 in epithelial-mesenchymal transition and
23 chemoresistance in biliary tract cancer. **Eur J Cancer**. v. 49, n. 7, p. 1725-1740,
24 2013.
25
- 26 YU, Y., WANG, Y., REN, X., TSUYADA, A., LI, A., LIU, L. J., WANG, S. E. Context-
27 dependent bidirectional regulation of the MutS homolog 2 by transforming growth
28 factor β contributes to chemoresistance in breast cancer cells. **Mol Cancer Res**. v.
29 8, n. 12, p. 1633-42, 2010.
30
- 31 ZHAO, C., DAHLMAN-WRIGHT, K., GUSTAFFSON, J. Estrogen receptor β : an
32 overview and update. **Nuclear Receptor Signaling**. v. 6, e003, 2008.
33
- 34 ZHOU, G., MYERS, R., LI, Y., CHEN, Y., SHEN, X., Fenyk-Melody, J., WU, M.,
35 VENTRE, J. et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin
36 action. **J Clin Invest**. v. 108, n. 8, p. 1167-1174, 2001.
37
- 38 ZOU, M. H., KIRKPATRICK, S. S., DAVIS, B. J., NELSON, J. S., WILES, W. G.,
39 SCHLATTNER, U., NEUMANN, D., BROWNLEE, M. et al. Activation of the AMP-
40 activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of
41 mitochondrial reactive nitrogen species. **J Biol Chem**. v. 279, p. 43940-43951,
42 2004.
43
44
45
46

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

APÊNDICES

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18 **APÊNDICE A** - Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human
19 breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and
20 transforming growth factor β 1 induction.

21

22

23

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Mechanism of metformin action in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells involves oxidative stress generation, DNA damage, and transforming growth factor β 1 induction.

Short title: Metformin as a potential adjuvant in the treatment of breast cancer

Poliana Camila Marinello ^a, Thamara Nishida Xavier da Silva ^b, Carolina Panis ^c, Amanda Fouto Neves ^a, Kaliana Larissa Machado ^a, Fernando Henrique Borges ^c, Flávia Alessandra Guarnier ^b, Sara Santos Bernardes ^a, Júlio Cesar Madureira de-Freitas-Junior ^d, José Andrés Morgado-Díaz ^d, Rodrigo Cabral Luiz ^a, Rubens Cecchini ^c, Alessandra Lourenço Cecchini ^a.

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

^b Laboratory of Pathophysiology and Muscle Adaptation, State University of Londrina

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

^d Brazilian National Cancer Institute, INCA, Rio de Janeiro, Brazil.

Corresponding author: Alessandra Lourenço Cecchini

1 E-mail: alceccchini@uel.br

2 Fax: +55 (43) 3371 42 67

3 Phone: +55 (43) 3371 4529

4 Laboratório de Patologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso

5 Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051-990, Paraná,

6 Brasil.

7 **Abbreviations:**

8 ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases 1 and 2; AKT, protein kinase B; TGF- β 1,
9 transforming growth factor β 1; AMPK, adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase;
10 mTOR, mammalian target of rapamycin; HER-2: human epidermal growth factor receptor 2;
11 TNBC: triple negative breast cancer; MTT, 2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-
12 1,3-thiazole; bromide; PBS, phosphate-buffered saline; EB, ethidium bromide; AO, acridine
13 orange; MDA, malondialdehyde; 8-OH-dG: 8-hydroxy-2-deoxyguanosine; ANOVA, analysis
14 of variance; SOD: superoxide dismutase; OS: oxidative stress.

15

1 **Abstract**

2 The participation of oxidative stress in the mechanism of metformin action in breast
3 cancer has not been fully elucidated. We investigated the effects of clinical (6 and 30 μ M) and
4 experimental concentrations of metformin (1000 and 5000 μ M) in MCF-7 and in MDA-MB-
5 231 cells, verifying cytotoxicity, oxidative stress, DNA damage, and intracellular pathways
6 related to cell growth and survival after 24 hours of drug exposure. The proliferation and
7 viability curves were made after 24/48 hours of treatment. Clinical concentrations of metformin
8 decreased metabolic activity of MCF-7 cells in the MTT assay, which showed increased
9 oxidative stress and DNA damage, although cell death and impairment in the proliferative
10 capacity was observed only at higher concentrations. The reduction in metabolic activity and
11 proliferation in MDA-MB-231 cells was present only at experimental concentrations after 24
12 hours of drug exposition, however after 48 hours, clinical concentrations reduced the
13 proliferation and cell viability. Oxidative stress and DNA damage was induced in this cell line
14 at experimental concentrations. The drug decreased cytoplasmic ERK1/2 and AKT and
15 increased nuclear p53 and cytoplasmic TGF- β 1 in both cell lines. These findings suggest that
16 metformin reduces cell survival by increasing reactive oxygen species, which induce DNA
17 damage and apoptosis. A relationship between the increase in TGF- β 1, p53 levels and the
18 decrease in ERK1/2 and AKT was also observed. These findings suggest that the mechanism
19 of action of metformin in both breast cancer cells lineage, whereas cell line specific, undergoes
20 redox changes in the cells in which proliferation and survival signaling are modified. Taken
21 together, these results highlight the potential clinical utility of metformin as an adjuvant during
22 the treatment of luminal and triple negative breast cancer.

23

24 **Keywords:** metformin, MCF-7, MDA-MB-231, oxidative stress, breast cancer

1 **Introduction**

2 Metformin is an anti-diabetic medication and a putative antineoplastic drug. Metformin
3 use, at the time of breast cancer diagnosis, has been associated with better clinical-pathological
4 characteristics and a lower incidence of triple negative and histological grade III tumors [1].
5 Metformin affects cancer through direct and indirect mechanisms. The direct mechanisms are
6 related to the capacity of metformin to reduce the proliferation of many breast cancer subtypes
7 *in vitro* [2]. One well-described mechanism for this anti-proliferative effect involves the
8 activation of adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) [3], which inhibits
9 the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, reducing translation initiation and
10 inhibiting cell growth [4]. The indirect mechanisms for the effects of metformin on cancer
11 include reductions in insulin levels and in the bioavailability of sex hormones [5]. Numerous
12 other studies have used breast cancer cells to investigate the mechanisms of action of metformin
13 [3,6-9].

14 Because oxidative stress modulates several intracellular pathways related to cellular
15 growth and death [10], it is reasonable to hypothesize that the ability of metformin to interfere
16 with breast cancer cell growth is related to its effect on the cellular redox status. Furthermore,
17 our group has shown that different oxidative stress statuses occur at distinct stages in breast
18 cancer patients [11]. Recently, it was demonstrated that metformin inhibited the proliferation
19 of MCF-7 cells due to the promotion of cell cycle arrest and the induction of cell apoptosis and
20 necrosis and was associated with increased cellular oxidative stress [12].

21 However, despite the related involvement of oxidative stress in metformin cytotoxicity
22 to MCF-7 cells, it is known that breast cancer is a heterogeneous disease, classified into
23 different subtypes according to the gene expression profile, such as luminal, subtype with
24 overexpression of HER2, triple-negative, basal-like and normal-like [13]. MCF-7 cells could

1 correspond to only one subtype of the disease, the luminal subtype, but it is known that
2 prognosis and treatment response differ between disease subtypes [13]. Triple negative breast
3 cancer (TNBC) represents 10 to 20% of all breast cancer in women and it is associated with
4 poor prognosis due to its aggressiveness, the absence of molecular treatment and resistance
5 against usual therapeutic methods [14]. Given this context, there is little information available
6 concerning the mechanisms of metformin cytotoxicity in TNBC, and none regarding the
7 participation of oxidative stress.

8 The proliferation and survival of breast cancer cells are strongly associated with several
9 signaling pathways, such as the phosphatidylinositide 3-kinase/protein kinase B (AKT),
10 transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and p53 pathways [15-17]. Most of these are
11 modulated by oxidative stress. With this in mind, we investigated the cytotoxic and anti-
12 proliferative mechanisms of metformin in two distinct human breast cancer cell lines; a human
13 breast cancer cell line positive for estrogen and progesterone receptors and negative for human
14 epidermal growth factor receptor 2 (HER-2 receptor), and a triple negative cell line, MCF-7
15 and MDA-MB-231, respectively. We evaluated the effects of the drug on oxidative stress, DNA
16 damage, and several important signaling pathways, the extracellular signal-regulated kinases
17 (ERK1/2), AKT, TGF- β 1, and p53 pathways.

18

19 **Materials and Methods**

20 **Cell culture and treatment**

21

22 MCF-7 (ATCC® HTB-22™; ATCC, Manassas, VA, USA) and MDA-MB-231 cells
23 (ATCC® HTB-26™; ATCC, Manassas, VA, USA) were grown in high glucose Dulbecco's
24 modified Eagle's medium (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10%

1 fetal bovine serum and a 1% penicillin/streptomycin mixture. Cells were maintained in a
2 humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C (Sanyo CO₂ Incubator; Sanyo, Kitanagoya, Aichi).
3 The cytotoxicity, proliferation and genotoxicity assays were performed by seeding 10⁵ cells in
4 24-well plates and culturing them in fresh culture media for 24 h. Cells were then exposed to
5 metformin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) at two clinically relevant concentrations (6
6 and 30 μM) and two experimental concentrations (1000 and 5000 μM) for 24 h or 48 h.
7 Immunocytochemistry and cell death assays were performed similarly: 10⁵ cells were cultured
8 on circular glass coverslips distributed in 24-well plates. To analyze oxidative stress parameters,
9 10⁶ cells were seeded in 25-cm² cell culture flasks, allowed to grow, and then exposed to
10 metformin as described above. All the experiments were performed in triplicate and repeated
11 thrice. The only technique performed with two time points of metformin exposure (24 and 48
12 h) was the proliferation assay; all other analyses were performed after 24 h of metformin
13 treatment.

14

15 **Cytotoxicity and cell proliferation assays**

16 **Cytotoxicity assays**

17 The 2-(3,5-diphenyltetrazol-2-ium-2-yl)-4,5-dimethyl-1,3-thiazole bromide (MTT)
18 assay [18] and neutral red assay [19] were used to investigate the effect of metformin on cell
19 viability by assessing alterations in mitochondrial and lysosomal function, respectively. For
20 MTT assay, histidine (1μM – hydroxyl radical $k = 3.0 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; singlet oxygen $k = 5 \times 10^7$
21 $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [20, 21], SOD (50U/mL, $k = 5.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [20] and Trolox (200μM, $k = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$
22 s^{-1}) [22] were used at metformin concentrations of 30 and 5000 μM for MCF-7 cells and at
23 1000 and 5000 μM for MDA-MB-231 cells to verify the participation of these reactive oxygen
24 species in metformin action on metabolic cellular activity.

1 **Cell proliferation assays**

2 Cells were treated as previously described. After 24 h and 48 h of treatment, the cells
3 were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and trypsinized. The cells were then
4 suspended in trypan blue (0.05%) and counted using a Neubauer chamber. Cells were classified
5 as viable (no staining) and unviable (blue staining) to determine the percentage of viable cells
6 and identify the cytostatic or cytotoxic effect of the treatment.

7 8 **Cell death patterns - Ethidium bromide (EB) and acridine orange** 9 **(AO) staining**

10 The rates of cellular apoptosis and necrosis were assessed by EB/AO staining. After
11 treatment, adherent cells were washed with PBS and incubated with 10 μ L PBS containing 10
12 μ g/mL of EB and 3 μ g/mL of AO, as described by Sun et al. [23]. The stained cells were
13 immediately visualized under an Olympus BX3-URA Fluorescence System Microscope
14 (Olympus Corporation, Tokyo). Twenty photos were taken of randomly selected areas of the
15 coverslips to ensure that the data obtained were representative.

16 17 **Oxidative stress parameters**

18 Catalase activity [24] and total thiol levels [25], with modifications, were measured to
19 determine the antioxidant profile of the cells. Lipid peroxidation was estimated by
20 chemiluminescence [26], and the malondialdehyde (MDA) content was determined by high-
21 performance liquid chromatography [27].

22 23 **DNA damage**

1 **The comet assay**

2 Single-cell gel electrophoresis (Comet assay) was performed according to the procedure
3 described by Tice et al. [28]. After treatment, the cells were harvested, suspended in low-
4 melting-point agarose (0.5%) and deposited on pre-gelatinized slides (1.5% agarose).
5 Subsequently, the slides were placed in an electrophoresis buffer (pH 13.0) for 20 min for DNA
6 denaturation. The slides were then submitted to alkaline electrophoresis (pH 13.0; 25 V; 300
7 mA; 4°C). All steps were performed under indirect light. Finally, the slides were treated with
8 pH-neutralizing buffer, fixed with ethanol, and stained with GelRed (33%). For each slide, 100
9 random nucleoids were blindly examined at a magnification of 400×, using a fluorescence
10 microscope (excitation filter: 420–490 nm; emission filter: 520 nm) connected to an image
11 capture system. To determine the % DNA in the tail of each nucleoid, CometScore™ freeware
12 (version: 1.5; TriTek, Sumerduck, VA) was used. Apoptotic/necrotic nucleoids with extensive
13 DNA damage were not included in the analysis. The mean value of the % DNA in the tail was
14 considered an index of DNA damage [29].

15

16 **Determination of free 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-Oh-dG)**

17 Oxidative DNA damage was investigated by determining free 8-Oh-dG, in culture
18 medium samples without fetal bovine serum, using the 8-Oh-dG EIA Kit (Cayman, Ann Arbor,
19 MI). The experimental procedures were conducted following the manufacturer's protocol.

20

21 **Immunocytochemistry labeling for p53, ERK1/2, AKT and TGF-** 22 **β1**

1 Immunocytochemistry analysis was performed on cells using the labeled streptavidin-
2 biotin method, with a LSAB KIT (DAKO Japan, Kyoto). The sections were incubated with
3 0.1% Triton X-100 solution for 1 h, washed 3 times in PBS, and treated for 40 min at room
4 temperature with 10% bovine serum albumin. Coverslips were then incubated overnight at 4°C
5 with the primary antibodies (anti-p53, anti-ERK1/2, anti-AKT and anti-TGF-β1, diluted 1:400;
6 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX). After secondary antibody treatment (2 h at room
7 temperature), horseradish peroxidase activity was visualized by treatment with H₂O₂ and 3,3'-
8 diaminobenzidine for 5 min. During the last step, the sections were weakly counterstained with
9 Harris' hematoxylin (Merck, Darmstadt). For each case, the primary antibody was omitted as a
10 negative control. The intensity and localization of the immunoreactivity was examined using a
11 photomicroscope (Olympus BX41; Olympus Corporation). Color images of representative
12 areas (400×) were digitally acquired for analysis. The images were processed using the ImageJ
13 program (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). After color deconvolution and
14 thresholding, the total labeled area was calculated and corrected for the total number of cells.
15 For p53 analysis, the percentage of cells with a labeled nucleus was calculated.

16

17 **Statistical analysis**

18 Data, expressed as the mean ± standard error of the mean, were analyzed using one-way
19 analysis of variance (ANOVA). Intergroup differences were analyzed by Dunnett's test, and p
20 < 0.05 was considered statistically significant (*p < 0.05, **p < 0.001, and ***p < 0.0001).
21 Data was analyzed using GraphPad Prism (version 5; San Diego, CA, USA). Two-way
22 ANOVA was used to analyze the chemiluminescence, proliferation and cell viability curves.

23

24 **Results**

1 **Cytotoxic effect of metformin**

2 To investigate the cytotoxic effect of metformin, four doses of metformin were tested
3 *in vitro* using MCF-7 and MDA-MB-231 cells. The 6 and 30 μM concentrations are clinically
4 relevant, corresponding to the plasma concentration range observed with a metformin dosage
5 of 850 mg/day. The 1000 μM and 5000 μM concentrations were used to investigate the
6 mechanisms of metformin-driven cytotoxicity. In the MTT assay, metformin significantly
7 reduced the cellular metabolic activity of MCF-7 cells at concentrations equal to or greater than
8 30 μM and had no effect at 6 μM (Fig. 1A, black columns), the same effect was observed in
9 MDA-MB-231 cells at 1000 and 5000 μM (Fig. 1A, gray columns). In the neutral red assay, a
10 reduction in MCF-7 metabolism was observed with 1000 and 5000 μM of metformin (Fig. 1B,
11 black columns) and with 5000 μM , but not 1000 μM , of metformin in MDA-MB-231 cells (Fig.
12 1B, gray columns). The proliferation curves demonstrated that 24 h of exposure to 1000 or 5000
13 μM metformin interfered with cell proliferation in both cell lines (Fig. 1C and 1D) and, after
14 48 h of exposure, the same profile was observed in MCF-7 cells (Fig. 1C) , but in MDA-MB-
15 231 all the metformin concentrations significantly reduced cell proliferation (Fig. 1D). The
16 concomitant evaluation of cell viability using trypan blue exclusion showed that metformin had
17 a cytotoxic effect on proliferation in both cell lines after 24 h at a concentration of 5000 μM
18 (Fig. 1E and 1F). After 48 h the cytotoxic effect of metformin was observed at concentrations
19 of 1000 and 5000 μM in MCF-7 cells (Fig. 1E) and at concentrations equal to or greater than
20 30 μM in MDA-MB-231 cells (Fig. 1F).

21

22 **Cell death induction by metformin**

23 As demonstrated by EB/AO staining, metformin significantly increased apoptosis in
24 MCF-7 and in MDA-MB-231 cells at 1000 and 5000 μM (Fig. 2A). The staining also

1 demonstrated that metformin treatment did not alter the necrosis rate in MCF-7 cells (Fig. 2B,
2 black columns) but induced necrosis in MDA-MB-231 cells at 1000 and 5000 μM (Fig. 2B,
3 gray columns).

4 5 **Metformin induces oxidative stress and DNA damage in human** 6 **breast cancer cells**

7 Quantification of total thiol levels demonstrated that metformin reduced cellular
8 antioxidant defenses at all concentrations used in MCF-7 cells and at concentrations equal to or
9 greater than 30 μM in MDA-MB-231 cells (Fig. 3A). Moreover, treatment increased the activity
10 of the antioxidant enzyme catalase at 1000 and 5000 μM metformin in MCF-7 cells and at 5000
11 μM in MDA-MB-231 cells (Fig. 3B). The chemiluminescence curves all differed, but the
12 increase in lipid peroxidation was only statistically significant after treatment with 1000 and
13 5000 μM of metformin in MCF-7 cells (Fig. 3C) and with 5000 μM in MDA-MB-231 cells
14 (Fig. 3D). However, the results of the MDA quantification showed that metformin increased
15 MDA in a dose-dependent, statistically significant manner, starting at a concentration of 30 μM
16 in MCF-7 cells and of 1000 μM in MDA-MB-231 cells (Fig. 3E).

17 The comet assay demonstrated that metformin increased DNA lesions at concentrations
18 equal to or greater than 30 μM in MCF-7 cells and at 5000 μM in MDA-MB-231 cells (Fig.
19 4A). The determination of free 8-Oh-dG demonstrated that metformin increased oxidative DNA
20 damage at concentrations equal to or greater than 30 μM in MCF-7 cells and at 1000 and 5000
21 μM in MDA-MB-231 cells (Fig. 4B).

22 23 **Role of ROS in metformin cytotoxicity**

1 To investigate which reactive species were involved in the oxidative stress-driven
2 cytotoxic mechanism of metformin in MCF-7 and MDA-MB-231 cells, two concentrations of
3 the drug that significantly reduced the cellular metabolic activity in the MTT assay were tested
4 (30 and 5000 μ M for MCF-7 and 1000 and 5000 μ M for MDA-MB-231). The cells were
5 stimulated with metformin in the presence or absence of different specific ROS scavengers:
6 superoxide dismutase (SOD), histidine, and trolox (superoxide anion, singlet oxygen and
7 hydroxyl radicals, and peroxy radical scavengers, respectively). In MCF-7 cells, at both
8 concentrations of the drug, the presence of all three scavengers restored cell metabolic activity
9 to control levels (Fig. 5A and B). In MDA-MB-231 cells, the use of SOD and histidine did not
10 alter the effects of metformin at a concentration of 1000 μ M, while trolox did alter them (Fig.
11 5C). All three scavengers restored cellular activity to control levels at a concentration of 5000
12 μ M (Fig. 5D).

13

14 **Metformin increases nuclear p53 and cytoplasmic TGF- β 1 and** 15 **reduces the cytoplasmic ERK1/2 and AKT**

16 Metformin exposure increased the nuclear p53 at 1000 and 5000 μ M in MCF-7 cells
17 and at 5000 μ M in MDA-MB-231 cells (Fig. 6A). The drug increased the cytoplasmic TGF-
18 β 1, at all the concentrations tested, in MCF-7 cells and, at concentrations equal to or greater
19 than 30 μ M, in MDA-MB-231 cells (Fig. 6B). At 5000 μ M, a significant reduction in
20 cytoplasmic AKT was observed in both cell lines (Fig. 6C). Cytoplasmic ERK 1/2 decreased
21 significantly with metformin concentrations of 5000 μ M in MCF-7 cells and 1000 and 5000
22 μ M in MDA-MB-231 cells (Fig. 6D). An illustrative panel showing the results of the
23 immunocytochemistry analysis of MCF-7 and MDA-MB-231 cells is available in the
24 supporting information 1 (Supporting information 1. A and B, respectively).

1

2 **Discussion**

3 The antineoplastic activity of metformin and its possible use as an adjuvant in traditional
4 cancer therapies have been highlighted in numerous types of cancer [30-32]. However, the
5 involvement of oxidative status underlying the mechanisms of the effects of metformin in
6 different cellular lineages of breast cancer is still poorly understood. Thus, herein, two different
7 cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) of human breast cancer were used to verify the effects
8 of metformin. Analysis of our results showed that metformin induced the same response pattern
9 in both cell lines, but in different concentrations, suggesting some particularity in the use of
10 metformin. In this report, we investigated the effects of several concentrations of metformin
11 and for this we chose to work with distant ranges of concentrations to verify whether the effects
12 of metformin could be achieved using clinical relevant concentrations or only at higher
13 concentrations, so-called experimental concentrations. The intensity of the cell response
14 towards different concentrations of metformin was different, although the response pattern was
15 similar.

16 After 24 hours, 30 μ M of metformin decreased metabolic activity of MCF-7 cells in the
17 MTT assay, although cell death was observed only at higher concentrations. The reduction in
18 metabolic activity in MDA-MB-231 cells was present only at experimental concentrations after
19 24 hours of drug exposition, however after 48 hours, clinical concentrations of metformin
20 significantly reduced the cell viability. In both cell lines, the observed reduction in the cellular
21 metabolism by MTT assay occurred through an oxidative stress-dependent mechanism, which
22 has not been previously described. The activation of AMPK is known to support the *in vitro*
23 anti-proliferative action of metformin in cancer cells [33]. However, this study demonstrated

1 that metformin cytotoxicity in MCF-7 and MDA-MB-231 cells is related to increased oxidative
2 stress and DNA damage.

3 The MTT assay measures cellular metabolic activity by NAD(P)H-dependent
4 oxidoreductases. It predominantly occurs in mitochondria, but may also occur in the presence
5 of non-mitochondrial pyridine nucleotide-dependent enzymes [18]. The basis of the method is
6 neutral red diffuses through the plasma membrane and concentrates in the lysosomes, which
7 measures lysosomal function based on the ability of viable cells to incorporate and bind the
8 supravital dye neutral red in the lysosomes [19].

9 When reducing cellular metabolism, metformin had a greater action on the MTT results,
10 which predominantly reflects mitochondrial function, than on the neutral red results, which
11 reflects lysosomal function. In fact, the concentrations that significantly reduced cell activity in
12 the neutral red assay in MCF-7 cells were equal to or greater than 1000 μM , whereas in the
13 MTT assay, they were equal to or greater than 30 μM . In the MDA-MB-231 cells, the same
14 was observed, but the reduction in cell activity was only achieved with higher concentrations,
15 from 1000 μM in the MTT assay, and 5000 μM in the neutral red assay. Despite the reduction
16 in cellular metabolic activity, the proliferative capacity of both cells lines was only impaired at
17 the experimental concentrations (1000 and 5000 μM) after 24 hours of drug exposure, via a
18 cytotoxic rather than a cytostatic effect, as indicated through the analysis of the trypan blue
19 staining (viability curve) and by the apoptosis induction at these doses. However, after 48 hours,
20 6 μM of metformin was cytostatic to MDA-MB-231 cells and 30 μM was cytotoxic, indicating
21 that this cell line was more sensitive to metformin effects after 48 hours of exposure. Relevant
22 comparisons between the results obtained herein and the results available in the literature are
23 difficult because previous research evaluating the impact of metformin on the viability of these

1 cell lines frequently used higher concentrations of the drug or increased periods of exposure
2 [34-36].

3 At concentrations of metformin equal to or greater than 30 μM , a dose-dependent
4 reduction in antioxidants and an increase in MDA levels were observed in MCF-7 cells,
5 indicating the occurrence of oxidative stress (OS). In MDA-MB-231 cells, the same parameters
6 were increased from a concentration of 1000 μM , however, despite it was possible to detect OS
7 at this concentration, other analyzed parameters (catalase activity and lipid peroxidation
8 estimated by chemiluminescence) is increased only at 5000 μM . The levels of free 8-Oh-dG,
9 which is DNA damage by reactive oxygen and nitrogen species, increased after metformin
10 treatment in both cell lines at the same concentrations that we detected OS, indicating oxidative
11 DNA damage. However, in MDA-MB-231 cells, in despite of the increase of free 8-Oh-dG
12 levels with metformin at 1000 μM , treatment increased DNA strand breaks, observed in the
13 comet assay, only at 5000 μM . This could happen because OS in these cells was more intense
14 with 5000 μM of metformin, with a greater increase in MDA levels. It is known that MDA is
15 a reactive aldehyde that interacts with intracellular proteins and DNA bases to induce mutagenic
16 lesions and cell death [20]. Thus, this reactive metabolite, derived from the lipid peroxidation
17 process, could be affecting the DNA structure in breast cancer cells during metformin exposure.
18 The participation of OS in the process of metformin-induced cytotoxicity to MCF-7 cells
19 became clear once the use of different scavengers recovered cell metabolic activity to control
20 levels. However, in the triple negative cell line, this was observed only with metformin at 5000
21 μM . At 1000 μM , only trolox was able to recover MDA-MB-231 vitality, which indicated that
22 trolox protected cells against oxidative membrane damage in both metformin 1000 and 5000
23 μM concentrations. The decrease in cellular vitality measured by the MTT assay in MDA-MB-
24 231 indicates that at metformin 5000 μM there is a more pronounced reduction in whole cell

1 activity, and consequently, in the production of superoxide anion, singlet oxygen and hydroxyl
2 radicals, suggesting that one of the mechanisms of cellular response to metformin action is
3 dependent on these oxygen species and that at this concentration, the scavengers are more
4 efficient.

5 Queiroz et al. (2014) studied the effects of metformin on MCF-7 cells and demonstrated
6 that 10000 μM of metformin increased cellular total reactive oxygen species after 72 h of drug
7 exposure [12]. The authors also demonstrated that the same concentration increased cellular
8 apoptosis and that OS was related to metformin-dependent apoptosis induction. However, at
9 this concentration (10000 μM), other mechanisms were associated with metformin effect, since
10 percentage of dead cells with the association of metformin and antioxidant enzymes was still
11 higher than the control group [12].

12 Our results show that incubating the cells for 24 h with a metformin concentration of
13 30 μM , an increase in the formation of MDA was verified, and that a significant increase in p53
14 nuclear levels was observed after treatment with experimental concentrations (1000 to 5000
15 μM) of metformin, in both cell lines. p53 is a well-known transcription factor that inhibits
16 tumorigenesis in mammals by regulating the transcription of a large number of genes
17 responsible for the control of cell cycle arrest, apoptosis, cell growth and protein translation
18 [37]. Furthermore, p53 presents transcription-independent activities, including the initiation of
19 cellular tumor suppression programs, such as apoptosis or cell cycle arrest, in response to
20 intracellular genotoxic stresses, such as DNA damage, hypoxia and oncogene activation [38].
21 p53 also inhibits the mTOR pathway via a mechanism that involves AMPK activation [39].
22 Therefore, the oxidative stress and DNA damage induced by metformin in this study could
23 contribute to the increase in p53 nuclear levels, thus reducing cell proliferation and leading to
24 apoptosis.

1 At 1000 and 5000 μ M of metformin, the expression of ERK1/2 and AKT were
2 significantly reduced. When ERK1/2 are activated, several nuclear and cytoplasmic effector
3 genes involved in diverse cancer-related responses, such as cell proliferation, survival,
4 differentiation, motility and angiogenesis, are broadly phosphorylated [40]. AKT is a positive
5 regulator of mTOR. Thus, the reduced expression of AKT could result in decreased mTOR
6 activation, contributing to the reduced cell proliferation observed in both cell lines.

7 The interplay between TGF- β 1 and ROS in tumorigenesis and cancer progression have
8 been related [41]. It is known that OS/ROS can influence TGF- β 1 signaling and increase its
9 expression as well as its activation, as well as TGF- β 1 can control ROS production directly or
10 by downregulating antioxidative systems [41]. Because its relation, we decided to investigate
11 if metformin treatment interfered in cellular TGF- β 1. All concentrations of metformin used
12 significantly increased cytoplasmic TGF- β 1 in MCF-7 cells and concentrations equal to or
13 greater than 30 μ M produced the same effect in MDA-MB-231. The role of TGF- β 1 in breast
14 cancer is paradoxical. Although its action as a tumor suppressor in the breast is unquestionable,
15 TGF- β 1 is frequently identified as a malignant molecule that drives breast cancer [15]. TGF- β 1
16 is a major regulator of the response to DNA damage. Thus, loss of responsiveness to this growth
17 factor could increase genomic instability through an ineffective DNA repair response and
18 checkpoint failure, leading to the apoptosis of aberrant cells [42]. Analysis of the present study
19 results suggests that the oxidative stress response of the cells to increased concentrations of
20 metformin is related in some degree with TGF- β 1 induction.

21 In conclusion, our data suggest that the pro-apoptotic effect of metformin in breast
22 cancer cells, whereas cell line specific, is related to an increase in oxidative stress, which
23 probably involves DNA damage and, consequently, the induction of p53. Moreover, the
24 metformin-induced increase in TGF- β 1 probably contributes to the induction of apoptosis in

1 response to DNA damage. Further studies are required to understand the effects of metformin
2 *in vivo* and to investigate the potential clinical utility of metformin as an adjuvant during breast
3 cancer treatment.

4 **Acknowledgments**

6 The authors are grateful to J.A. Vargas and P.S.R. Dionízio-Filho, from the Department
7 of General Pathology of the State University of Londrina, for their excellent technical
8 assistance.

10 **References**

- 11 [1] Aksoy S, Sendur MA, Altundag K. Demographic and clinico-pathological characteristics in
12 patients with invasive breast cancer receiving metformin. *Med Oncol.* 2013; 30(2):590-596.
13 DOI: 10.1007/s12032-013-0590-z.
- 14 [2] Dowling RJ, Niraula S, Stambolic V, Goodwin PJ. Metformin in cancer: translational
15 challenges. *J Mol Endocrinol.* 2012; 48(3):31-43. DOI: 10.1530/JME-12-0007.
- 16 [3] Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits
17 mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer*
18 *Res.* 2007; 67(22):10804-10812. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2310.
- 19 [4] Martinez-Outschoorn UE, Goldberg A, Lin Z, Ko Y, Flomenberg N, Wang C et al. Anti-
20 estrogen resistance in breast cancer is induced by the tumor microenvironment and can be
21 overcome by inhibiting mitochondrial function in epithelial cancer cells. *Cancer Biol Ther.*
22 2011; 12(10):924-938. DOI: 10.4161/cbt.12.10.17780.

- 1 [5] Campagnoli C, Berrino F, Venturelli E, Abbà C, Biglia N, Brucato T et al. Metformin
2 decreases circulating androgen and estrogen levels in nondiabetic women with breast cancer.
3 *Clin Breast Cancer*. 2013; 13(6):433-438. DOI: 10.1016/j.clbc.2013.08.012.
- 4 [6] Hadad SM, Hardie DG, Appleyard V, Thompson AM. Effects of metformin on breast cancer
5 cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle. *Clin Transl Oncol*. 2013; Epub ahead
6 of print.
- 7 [7] Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M, Yamagishi S. Metformin inhibits advanced glycation
8 end products (AGEs)-induced growth and VEGF expression in MCF-7 breast cancer cells by
9 suppressing AGEs receptor expression via AMP-activated protein kinase. *Horm Metab Res*.
10 2013; 45(5):387-90. DOI: 10.1055/s-0032-1331204.
- 11 [8] Song CW, Lee H, Dings RP, Williams B, Powers J, Santos TD et al. Metformin kills and
12 radiosensitizes cancer cells and preferentially kills cancer stem cells. *Sci Rep*. 2012; 2:362. DOI:
13 10.1038/srep00362.
- 14 [9] Malki A, Youssef A. Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast
15 cancer via targeting ERK signaling. *Oncol Res*. 2011; 19(6):275-285. DOI: 10.1007/s10495-
16 011-0614-0.
- 17 [10] Gago-Dominguez M, Jiang X, Castelao JE. Lipid peroxidation, oxidative stress genes and
18 dietary factors in breast cancer protection: a hypothesis. *Breast Cancer Res*. 2007; 9:201-212.
19 DOI: 10.1186/bcr1628.
- 20 [11] Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T et al. Oxidative
21 stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or
22 doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2012; 133(1):89-97. DOI:
23 10.1007/s10549-011-1693-x.

- 1 [12] Queiroz EAIF, Puukila S, Eichler R, Sampaio SC, Forsyth HL, Lees SJ et al. Metformin
2 Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Mediated by Oxidative Stress, AMPK and FOXO3a
3 in MCF-7 Breast Cancer Cells. *Plos One*. 2014; 9(5): e98207.
- 4 [13] Ringnér M, Staaf J, Jonsson G. Nonfamilial breast cancer subtypes. *Methods Mol Biol*
5 2013; 973: 279-295.
- 6 [14] Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, Mccue P, et al. Differences in breast
7 carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a
8 single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance,
9 Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 2007; 110(4):876-84.
- 10 [15] Barcellos-Hoff MH, Akhurst RJ. Transforming growth factor- β in breast cancer: too much,
11 too late. *Breast Cancer Res*. 2009; 11:202-208. DOI: 10.1186/bcr2224.
- 12 [16] Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer:
13 rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003; 4(4):257-262. DOI: 10.1007/s10911-012-9264-2.
- 14 [17] Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A, et al. An expression
15 signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects,
16 nd patient survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102(38):13550-13555. DOI:
17 10.1073/pnas.0506230102.
- 18 [18] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to
19 proliferation cytotoxic assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65:55-63. DOI: 10.1016/0022-
20 1759(83)90303-4.
- 21 [19] Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for
22 cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *J Tissue Culture Methods*. 1984; 9(1):7-9.

- 1 [20] Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radical in Biology and Medicine*. Fourth ed. Oxford
2 University Press, New York, 2007.
- 3 [21] Michaeli A, Feitelson J. Reactivity of singlet oxygen toward amino acids and
4 peptides. *Photochem Photobiol*. 1994; 59:284-298.
- 5 [22] Simic MG. Peroxyl radical from oleic acid. In Simic, MG. (ed.), *Autoxidation in Food and*
6 *Biological Systems*. Plenum, New York, pp. 17–26, 1980.
- 7 [23] Sun Y, Li Y, Wu H, Wu S, Wang YA, Luo D, et al. Effects of an indolocarbazole-derived
8 CDK4 inhibitor on breast cancer cells. *J Cancer*. 2011; 2:36-51. DOI: 10.7150/jca.2.36.
- 9 [24] Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984; 105:121-126.
- 10 [25] Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol*.
11 1994; 233: 380-385.
- 12 [26] Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an
13 assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*. 1991;
14 10(2):93-100.
- 15 [27] Victorino VJ, Panis C, Campos FC, Cayres RC, Colado-Simão AN, Oliveira SR, et al.
16 Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal
17 women. *AGE*. 2013; 35:1411-1421. DOI: 10.1007/s11357-012-9431-9.
- 18 [28] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell
19 gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol*
20 *Mutagen*. 2000; 35:206-221. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-
21 EM8>3.0.CO;2-J.
- 22

- 1 [29] Hartmann A, Agurell E, Beevers S, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, et al.
2 Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 2003;
3 18(1):45-51. DOI: 10.1093/mutage/18.1.45.
- 4 [30] Wurth R, Barbieri F, Florio T. New molecules and old drugs as emerging approaches to
5 selectively target human glioblastoma cancer stem cells. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:126586.
6 DOI: 10.1155/2014/126586.
- 7 [31] Lee H, Park HJ, Park CS, Oh ET, Choi BH, Williams B, et al. Response of breast cancer
8 cells and cancer stem cells to metformin and hyperthermia alone or combined. *PLoS One*. 2014;
9 9(2):e87979. DOI: 10.1371.
- 10 [32] Lin YC, Wu MH, Wei TT, Lin YC, Huang WC, et al. Metformin sensitizes anticancer
11 effect of dasatinib in head and neck squamous cell carcinoma cells through AMPK-dependent
12 ER stress. *Oncotarget*. 2013; 5(1):298-308.
- 13 [33] Gonzalez-Ângulo AM, Meric-Bernstam F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast
14 cancer. *Clin Cancer Res*. 2012; 16(6):1695-1700. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1805.
- 15 [34] Zhuang Y, Miskimins WK. Metformin Induces Both Caspase-Dependent and Poly(ADP-
16 ribose) Polymerase-Dependent Cell Death in Breast Cancer Cells. *Mol Cancer Res*. 2011; 9(5):
17 603-615.
- 18 [35] Hadad SM, Hardie DG, Appleyard V, Thompson AM. Effects of metformin on breast
19 cancer cell proliferation, the AMPK pathway and the cell cycle. *Clin Trans Oncol*. 2014; 16:
20 746-751.
- 21 [36] Zordoky BNM, Bark D, Soltys CL, Sung MM, Dyck JRB. The anti-proliferative effect of
22 metformin in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells is highly dependent on glucose
23 concentration: Implications for cancer therapy and prevention. *Biochimica et Biophysica Acta*.
24 2014; 1840(6): 1943-1957.

- 1 [37] Hasty P, Christy BA. p53 as an intervention target for cancer and aging. *Pathobiol Aging*
2 *Age Relat Dis.* 2013; 3. DOI: 10.3402/pba.v3i0.22702.
- 3 [38] Jin S, Levine AJ. The p53 functional circuit. *J Cell Sci.* 2001; 114: 4139-4140.
- 4 [39] Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR
5 pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(23):8204-8209. DOI:
6 10.1073/pnas.0502857102.
- 7 [40] Santarpia L, Lippman SL, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling
8 pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012; 16(1):103-119. DOI:
9 10.1517/14728222.2011.645805.
- 10 [41] Krstic J, Trivanovic D, Mojsilovic S, Santibanez JF. Transforming Growth Factor-
11 Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression.
12 *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 654594. Epub
- 13 [42] Qi S, den Hartog GJ, Bast A. Superoxide radicals increase transforming growth factor-
14 beta1 and collagen release from human lung fibroblasts via cellular influx through chloride
15 channels. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009; 237(1):111-118. DOI: 10.1016/j.taap.2009.02.019.
16

Figures

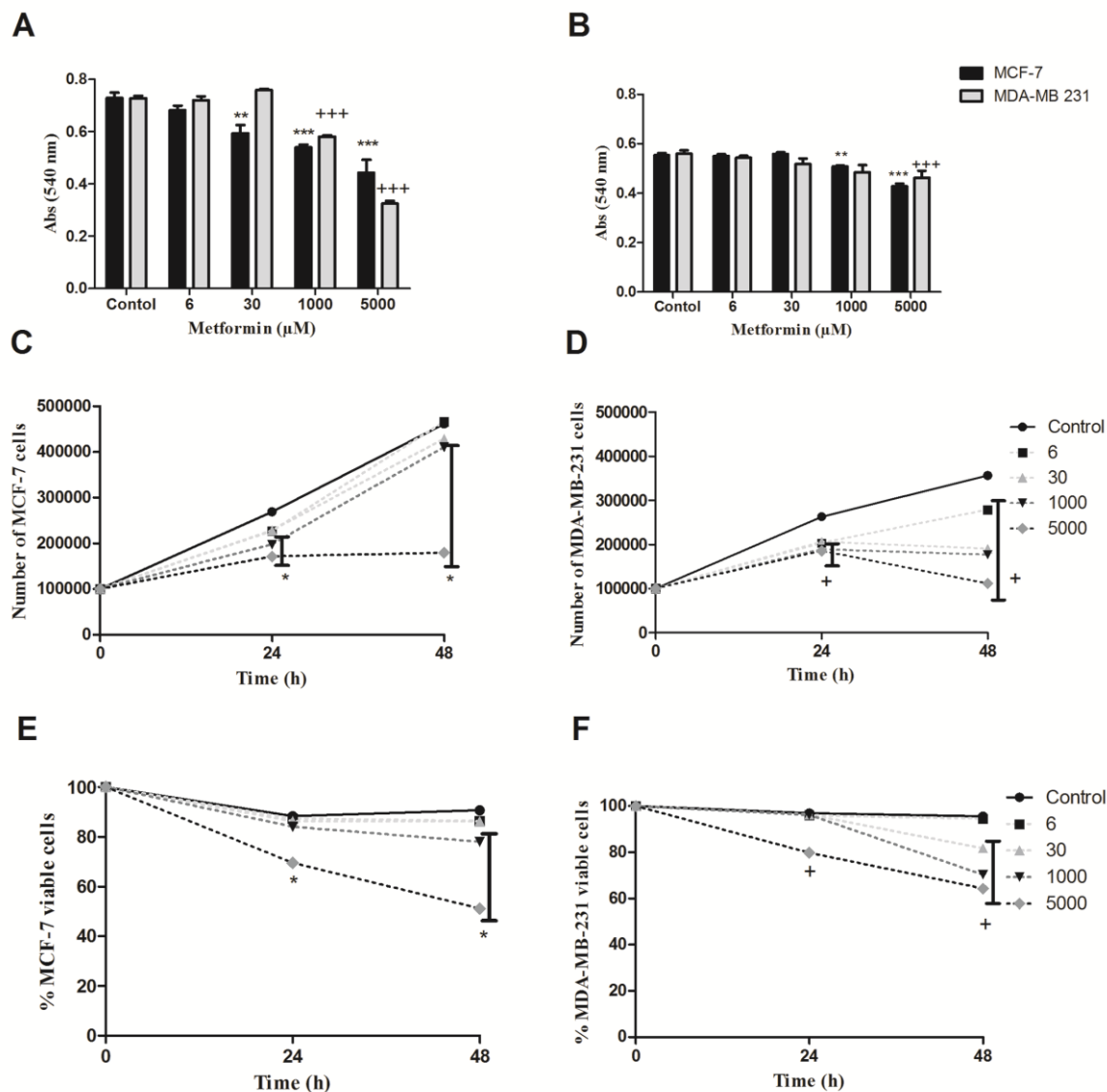


Figure 1: Cytotoxic effect of metformin in human breast cancer cells. Evaluation of metformin cytotoxicity at different concentrations (6, 30, 1000, and 5000 µM) in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns). A: MTT assay. B: Neutral red assay. C: Proliferation curve of MCF-7 cells. D: Proliferation curve of MDA-MB-231 cells. E: Viability curve obtained by trypan blue exclusion in MCF-7 cells. F: Viability curve obtained by trypan blue exclusion in MDA-MB-231 cells. Statistical analyses were performed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs. the MCF-7 cells control group. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.001$, +++ $p < 0.0001$ vs. the MDA-MB-231 cells control group.

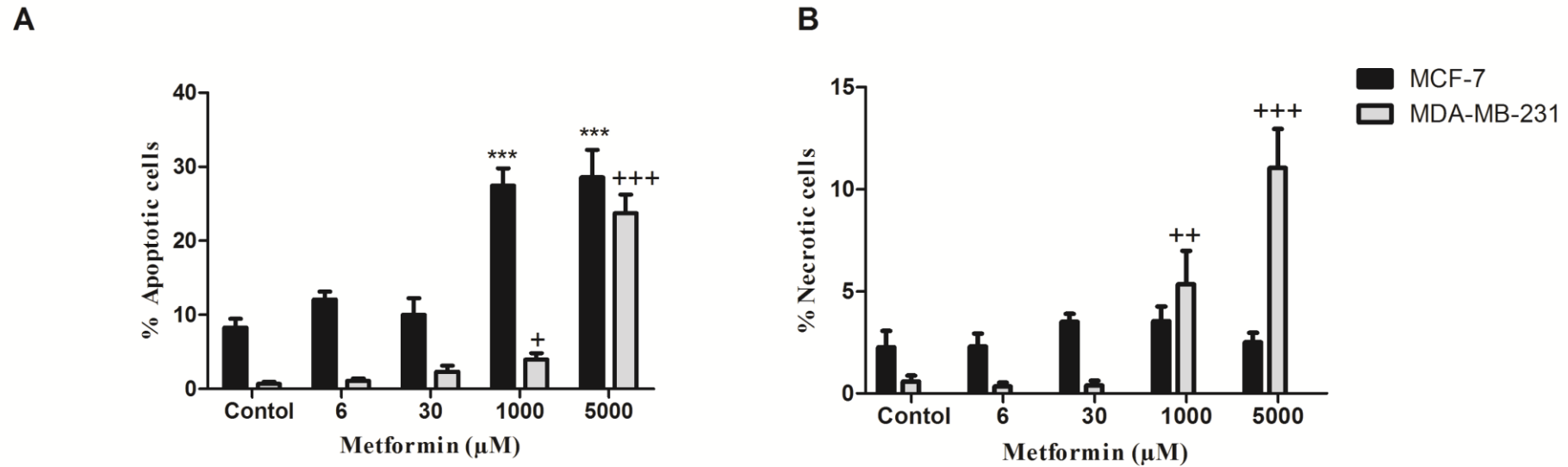


Figure 2: Metformin induces cell death in human breast cancer cells. Evaluation of cell death patterns in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) exposed to different metformin concentrations (6, 30, 1000, and 5000 µM) for 24 h by ethidium bromide and acridine orange staining. A: Apoptosis rate. B: Necrosis rate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs. the MCF-7 cells control group. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.001$, +++ $p < 0.0001$ vs. the MDA-MB-231 cells control group.

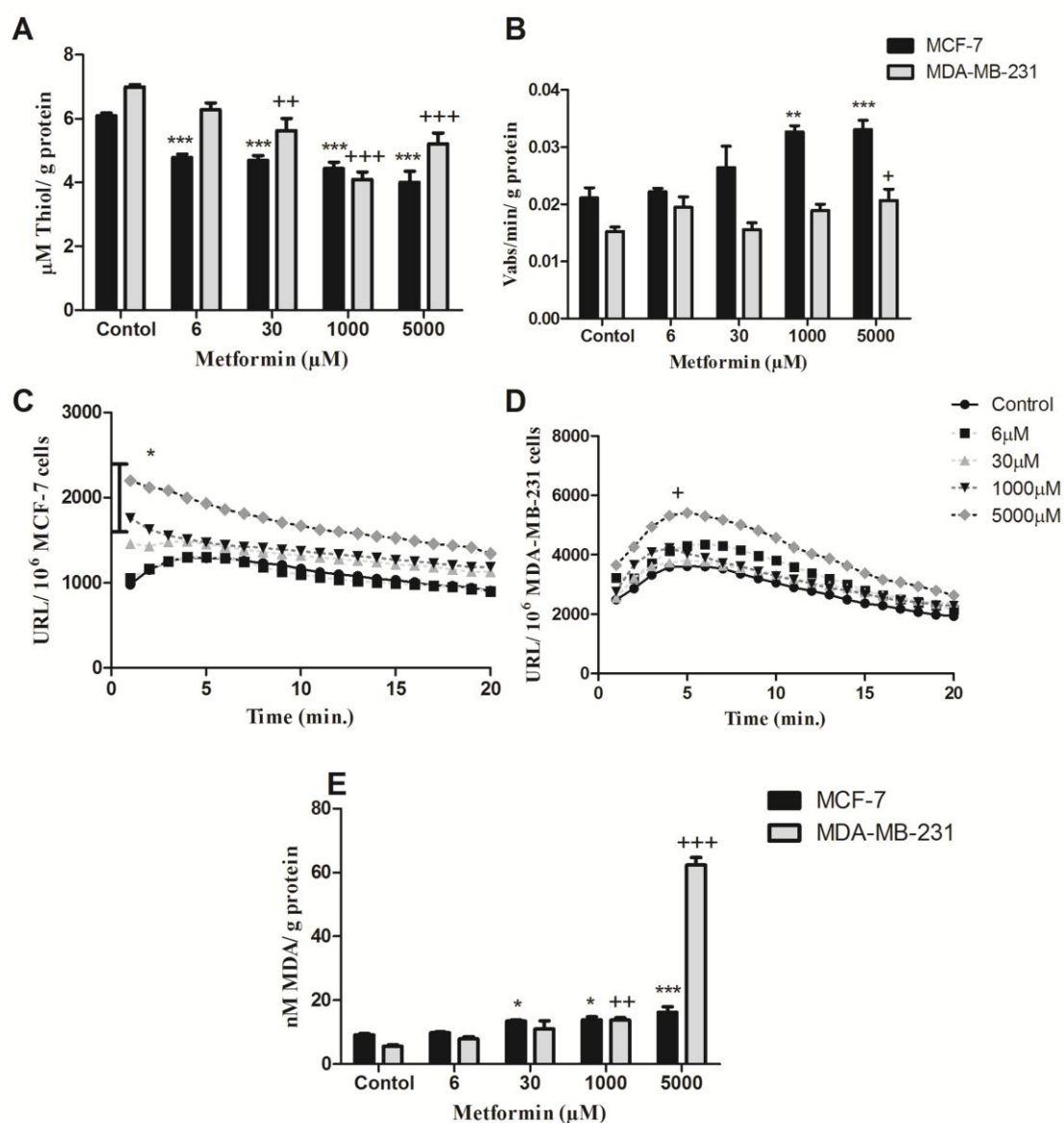


Figure 3: Metformin induces oxidative stress in human breast cancer cells. Evaluation of oxidative stress parameters in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) exposed to different metformin concentrations (6, 30, 1000, and 5000 μM) for 24 h. A: Total thiol levels. B: Catalase activity. C: Tert-Butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescence curves in MCF-7 cells. D: Tert-Butyl hydroperoxide-stimulated chemiluminescence curves in MDA-MB-231 cells E: Malondialdehyde levels. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs. the MCF-7 cells control group. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.001$, +++ $p < 0.0001$ vs. the MDA-MB-231 cells control group.

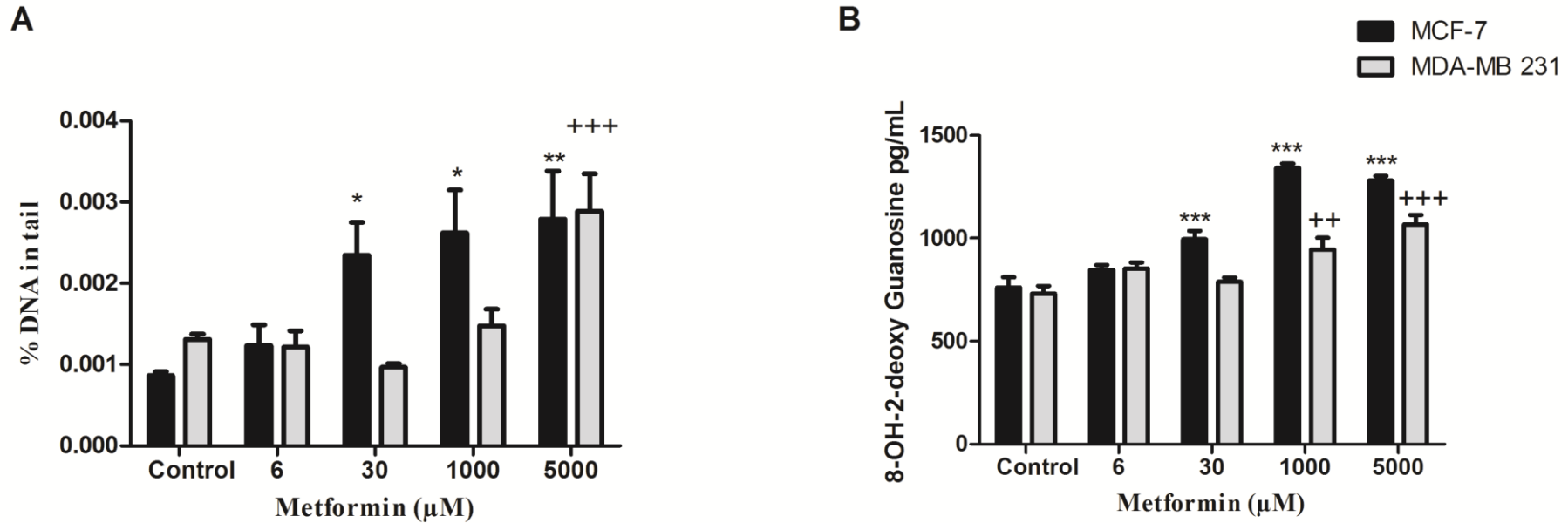


Figure 4: Metformin induces oxidative DNA damage in human breast cancer cells. Evaluation of oxidative DNA damage after metformin treatment at different concentrations (6, 30, 1000, and 5000 μM) in MCF-7 cells (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) after 24 h of exposure. A: Comet assay. B: Determination of free 8-hydroxy-2-deoxyguanosine. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs. the MCF-7 cells control group. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.001$, +++ $p < 0.0001$ vs. the MDA-MB-231 cells control group.

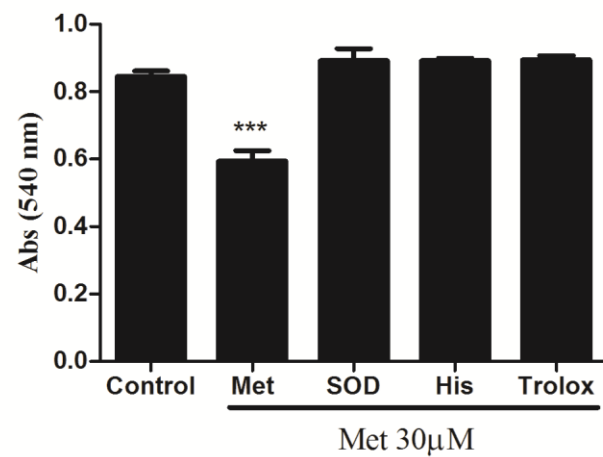
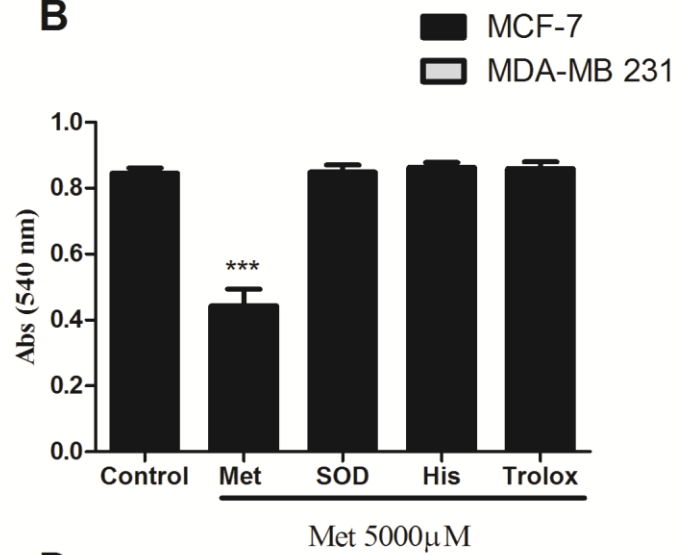
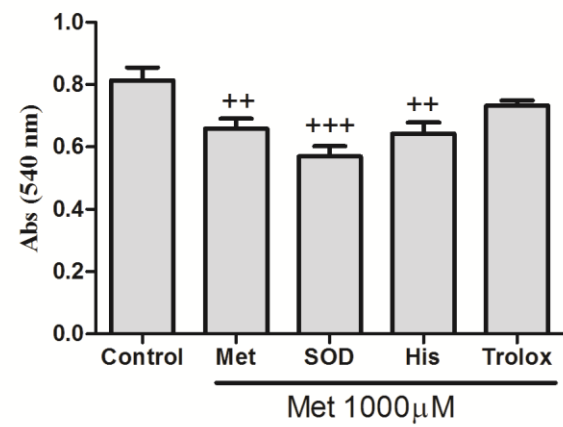
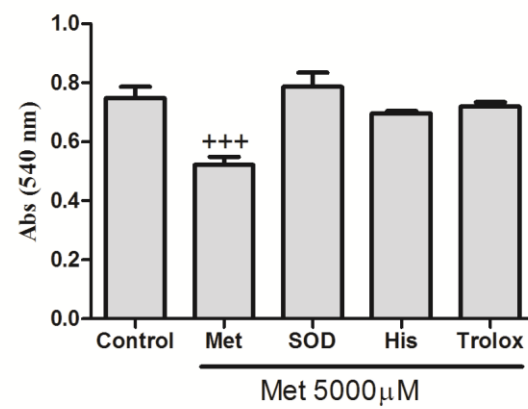
A**B****C****D**

Figure 5: Oxidative stress mediates metformin cytotoxicity in human breast cancer cells. Evaluation of cytotoxicity in human breast cancer cells by MTT assay after metformin treatment in the presence or absence of specific ROS scavengers: SOD (50U/mL), histidine (1 μ M), and trolox (200 μ M). A: MTT assay of MCF-7 cells treated with 30 μ M of metformin. B: MTT assay of MCF-7 cells treated with 5000 μ M of metformin. C: MTT assay of MDA-MB-231 cells treated with 1000 μ M of metformin. D: MTT assay of MDA-MB-231 cells treated with 5000 μ M of metformin. *p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001 vs. the MCF-7 cells control group. +p < 0.05, ++p < 0.001, +++p < 0.0001 vs. the MDA-MB-231 cells control group.

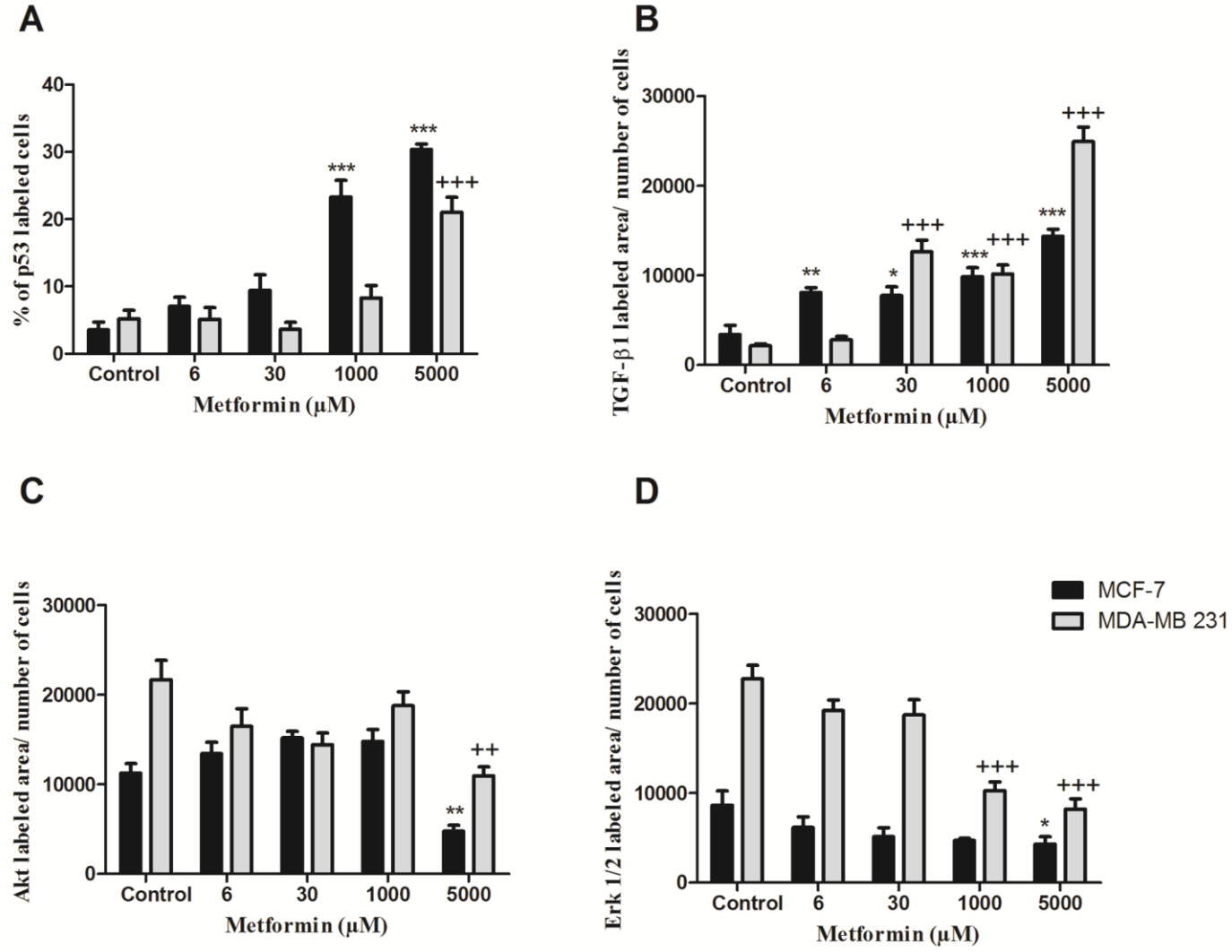
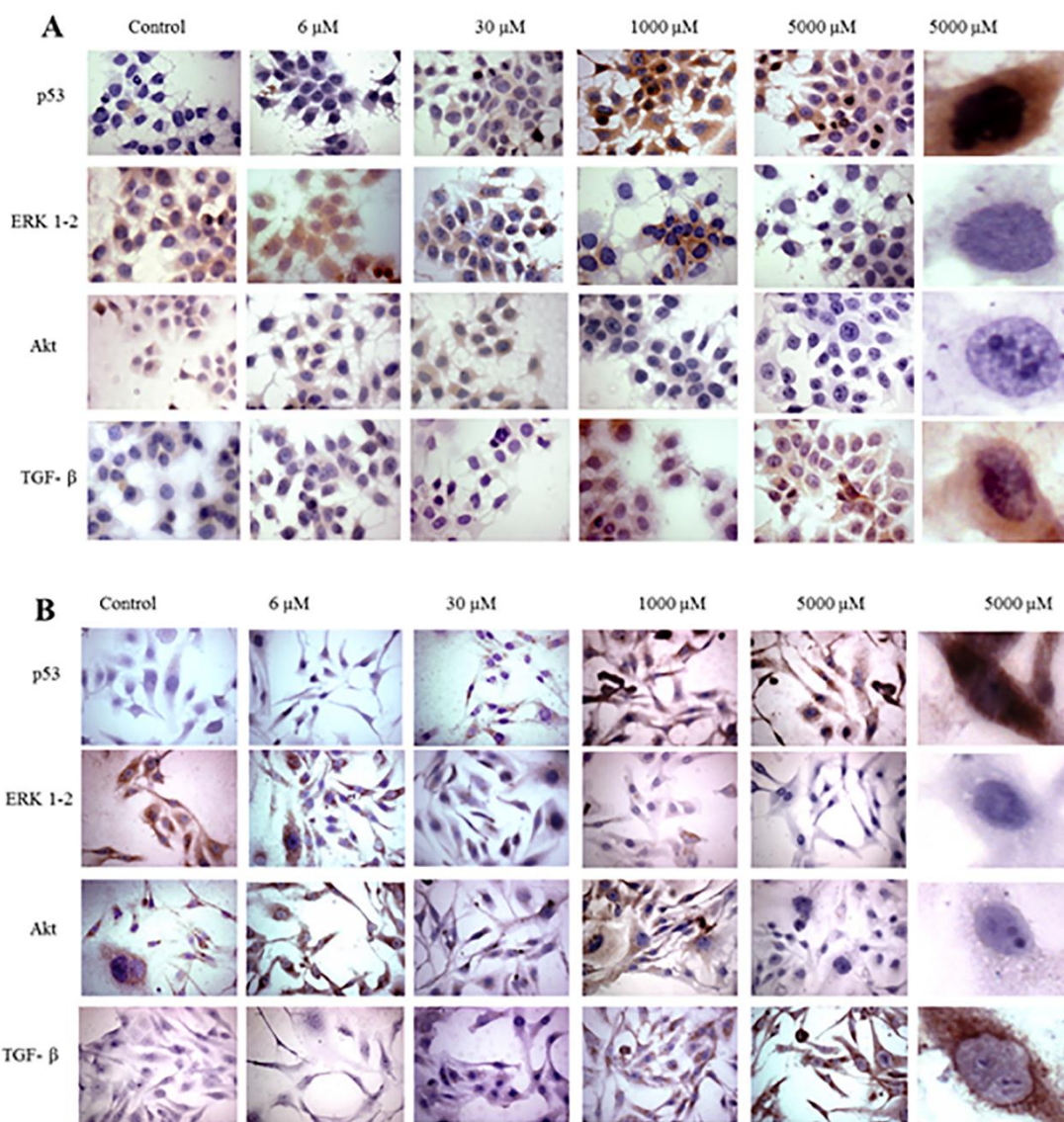


Figure 6: Metformin increases nuclear p53 levels and cytoplasmic TGF- β 1 levels and reduces the expression of ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells. Immunocytochemistry analysis of MCF-7 cells (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) exposed to different metformin concentrations (6, 30, 1000, and 5000 μ M) for 24 h. A: Quantitative results for p53. B: Quantitative results for TGF- β 1. C: Quantitative results for AKT. D: Quantitative results for ERK1/2. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ vs. the MCF-7 cells control group. + $p < 0.05$, ++ $p < 0.001$, +++ $p < 0.0001$ vs. the MDA-MB-231 cells control group.



Supporting information 1. Metformin increases nuclear p53 levels and cytoplasmic TGF- β 1 levels and reduces cytoplasmic ERK1/2 and AKT in human breast cancer cells. Immunocytochemistry analysis of MCF-7 cells (A) and MDA-MB-231 cells (B) exposed to different metformin concentrations (6, 30, 1000, and 5000 μM) for 24 h. Illustrative panel showing a picture selected for each experimental condition. For the metformin 5000 μM , where the effects were more pronounced, a picture focusing on a single cell was selected.

APÊNDICE B – Metformin pretreatment prevents doxorubicin resistance induction in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells through oxidative stress generation, induction of p53 and TGF- β 1 and decrease of Nrf2

1 **Metformin pretreatment prevents doxorubicin resistance induction in MCF-7 and**
2 **MDA-MB-231 human breast cancer cells through oxidative stress generation, induction**
3 **of p53 and TGF- β 1 and decrease of Nrf2**

4
5 Marinello PC¹, Panis C^{2,3}, Silva TNX², Borges FH², Neves AF¹, Aranome AM², Guarnier
6 FA², Luiz RC¹, Cecchini R², Cecchini AL¹.

7 ¹ Laboratory of Molecular Pathology, State University of Londrina, PR, BR.

8 ² Laboratory of Pathophysiology and Free radicals, State University of Londrina, PR, BR.

9 ³ Laboratory of Inflammatory Mediators, State University of West Parana, Unioeste,
10 Francisco Beltrão, PR, BR.

11 Corresponding author: Alessandra Lourenço Cecchini

12 E-mail: alcecchini@uel.br

13 Fax: +55 (43) 3371 42 67

14 Phone: +55 (43) 3371 4529

15 Laboratório de Patologia Molecular

16 Universidade Estadual de Londrina,

17 Rodovia Celso Garcia Cid, PR445, Km 380 Campus Universitário, Londrina, CEP 86051-990,

18 Paraná, Brasil.

19

20

21

1 **Abstract**

2 Chemoresistance is an emergent problem in the therapy of breast cancer. Metformin has been
3 investigated about its effects on breast cancer cells proliferation and sensitization of
4 chemoresistant cells. The exact mechanism regarding metformin interference during the
5 chemoresistance induction has not been described. In this study, we experimentally induced
6 resistance of MCF-7 and MDA-MB-231 cells to doxorubicin in the presence or not of
7 metformin and evaluated the cellular oxidative status, nitric oxide levels (NO), and nuclear p53,
8 nuclear factor kB (NF-kB), nuclear factor (erythroid-related-2)-like 2 (Nrf2), and cytoplasmic
9 transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) during the process of resistance induction. We
10 observed that the pretreatment with metformin prevented the resistance induction in both cell
11 lineages and sensitized MCF-7 cells to doxorubicin. However, when the experiment was
12 conducted using cells being concomitantly treated with metformin and doxorubicin, metformin
13 was not effective in preventing the cell to become resistant towards doxorubicin treatment. The
14 prevention in chemoresistance to doxorubicin occurred through the generation of oxidative
15 stress, reduction in NO levels, increase in nuclear p53 and cytoplasmic TGF- β 1, and reduction
16 in nuclear Nrf2, in both cell lines. These data suggest that metformin pretreatment could exert
17 a beneficial role in the prevention of the doxorubicin chemoresistance, highlighting its
18 therapeutic potential investigation in patients bearing chemoresistant breast tumors.

19 **Key words:** Metformin, chemoresistance, doxorubicin, oxidative stress.

20

21

22

1 **1 Introduction**

2 Breast cancer is a heterogeneous disease. Although the advances in early diagnosis and
3 targeted therapeutics, an important factor that limits the success of the treatment is the arising
4 resistance to chemotherapy. The mechanisms of chemoresistance are multiple and enable the
5 cancer cells to become resistant to several structurally and functionally unrelated drugs, a
6 concept known as multidrug resistance, MDR (Alpsoy, Yasa, Gunduz, 2014). The capacity of
7 a subject to not respond against anticancer agents can be influenced by many factors related to
8 inherent systemic pharmacology characteristics, as well as to single properties acquired by
9 cancer cells, like modifications in cellular pharmacokinetics, leading to drug
10 activation/inactivation, drug-target interactions, altered DNA damage repair mechanisms,
11 evasion of apoptosis and resistance to drug-induced oxidative stress (Hu et al., 2010, Fojo,
12 Coley, 2007).

13 The generation of oxidative stress is implied in the mechanism of action of several
14 chemotherapeutic drugs, as evidenced by the systemic detection of altered oxidative profiling
15 in cancer patients after chemotherapy (Panis et al., 2012). In this scenario, it is known that some
16 cancer cells acquire the MDR phenotype during this prooxidant treatment, and may develop
17 some additional mechanisms to protect themselves against this chemotherapy-driven oxidative
18 injury (Zhang et al., 2009; Cho et al., 2006)

19 In order to design rational and efficacious therapies, the molecular mechanisms used by
20 cells to develop resistance have been investigated. One of the most used drug to treat solid
21 tumors is doxorubicin (Dalmases et al., 2013). Although it has been relatively successful for
22 treating breast cancers, studies have described its involvement as a potent inducer of
23 chemoresistance (Ingles-Esteve et al., 2012).

1 In this context, novel drugs have been investigated aiming to overcome breast cancer
2 chemoresistance, such as metformin. This drug presented antiproliferative effects in many
3 breast cancer subtypes, *in vitro* (Dowling et al., 2012) and was able to resensitize MDR breast
4 cancer cells (Qu et al., 2014). However, the mechanisms underlying this fact remains unknown.
5 Furthermore, the metformin interference in the process of chemoresistance induction has not
6 already been described.

7 In breast cancer, prognosis and treatment response differ among disease subtypes, and
8 among them, triple negative breast cancer is associated with poor prognosis due to the absence
9 of specific treatment and to the resistance against usual therapeutic methods, in addition to the
10 aggressiveness of tumor cells (Ringnér; Staaf; Jonsson, 2013). Based on this, in this work, we
11 experimentally induced the doxorubicin-driven chemoresistant phenotype in two human breast
12 cancer cells, which correspond to two different subtypes of the disease: MCF-7 (estrogen and
13 progesterone receptor positive) and MDA-MB-231 cells (triple negative). To investigate the
14 participation of oxidative stress in the mechanism of chemoresistance induction in the two cell
15 lines, we evaluated the cellular oxidative status, NO levels, and intracellular pathways that
16 could be related to chemoresistance as the p53, NF- κ B, Nrf2 and the TGF- β 1. Furthermore, to
17 understand the role of metformin in the prevention of the doxorubicin-chemoresistant
18 phenotype in the two subtypes of breast cancer cells, we analysed such cellular responses in
19 conditions when cells were submitted to metformin pretreatment, before and during the
20 doxorubicin resistance induction, and further with the metformin administration simultaneously
21 with the chemotherapeutic.

22 **2 Materials and Methods**

23 2.1 Cell culture and treatments

1 MCF-7 cells (ATCC ® HTB-22™, ATCC, Manassas, VA. USA) and MDA-MB-231
2 cells (ATCC® HTB-26™; ATCC, Manassas, VA, USA) were grown in Dulbecco's modified
3 Eagle's medium (Gibco ® Life Technologies, Carlsbad, CA. USA) supplemented with 10%
4 fetal bovine serum (DMEM 10% FBS) and 1% penicillin/streptomycin mixture. Cells were
5 maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C (Sanyo CO₂ Incubator; Sanyo,
6 Japan). All experiments were performed in triplicate and repeated thrice.

7 2.1.1 Chemoresistance induction

8 To the induction of the doxorubicin-chemoresistance phenotype, MCF-7 and MDA-
9 MB-231 cells were grown in DMEM 10% FBS and exposed to increasing concentrations of
10 doxorubicin (10nM to 100 nM), as previously described by Fairchild et al., (1987), during
11 sequential passages. The experimental design is illustrated in the figure 1. Cells were considered
12 as chemoresistant when the exposition to the crescent concentration of doxorubicin did not
13 cause its death. In this study, cells become resistant to doxorubicin in the end of seven passages
14 (P7). Throughout the induction period, samples of each cell passage (P1 to P7) were collected
15 for the analysis of oxidative stress parameters, for the detection of NO levels and further grown
16 on glass coverslips for immunocytochemistry analysis. At the end of the process of doxorubicin
17 resistance induction, the cells were distributed in 24 well plates (1 x 10⁵ cells/well) and exposed
18 during 24 hours to doxorubicin (1.0, 2.5 and 5.0 µM), to test the cell responsiveness to drug.
19 This group was called doxorubicin resistant (DR) group.

20 2.1.2 Metformin treatments

21 Initially, it was done a characterization of metformin effects at 6 µM in MCF-7 and in
22 MDA-MB-231 cells, during seven and fourteen passages. As there were no differences between
23 the results obtained after seven and fourteen metformin administrations, the results of the group

1 exposed seven times to metformin were omitted from the results and only the results from the
2 group exposed fourteen times to metformin are showed. This group was called metformin
3 (MET) group (Figure 1). The concentration of metformin was chosen based on previous studies
4 of our research group (unpublished data), which demonstrated that metformin at 6 μ M did not
5 present cytotoxic effects to these breast cancer cell lines after 24 and 48 hours of exposure.

6 After the characterization of metformin effects in both cell lines, it was investigated if
7 metformin administration could interfere in the process of doxorubicin chemoresistance
8 induction. Two different metformin treatments were employed. First, it was investigated
9 metformin (6 μ M) effects when administered simultaneously to the doxorubicin resistance
10 induction, during seven passages, this group was called metformin treated doxorubicin resistant
11 (MDR) group (Figure 1). Later, the metformin effects (6 μ M) when administered during seven
12 passages before and along the seven passages of doxorubicin resistance induction were
13 investigated. This last group was called pre – metformin treated doxorubicin resistant (PMDR)
14 group and received metformin along fourteen passages (Figure 1).

15 For all the metformin – treated groups, samples were collected for the analysis of
16 oxidative stress parameters, for the detection of NO, as well cells coverslips for
17 immunocytochemistry analysis, in each passage (P1 to P7). For the MET group, only samples
18 after the seventh passage of metformin were collected and they were also referred as P1 to P7
19 (Figure 1). For the PMDR group, samples were collected after the beginning of the doxorubicin
20 administration and were called P1 to P7. At the end of the experiments, the cells from the MET,
21 MDR and PMDR groups were distributed in 24 well plates (1×10^5 cells/well) and exposed
22 during 24 hours to doxorubicin (1.0, 2.5 and 5.0 μ M), to test the cell responsiveness to the drug.

23

24 2.2 Oxidative stress parameters

1 Total thiol levels (Panis et al., 2013) were measured to determine the antioxidant
2 profiling of cells. Lipid peroxidation profile was estimated by chemiluminescence (Gonzalez-
3 Flecha, Llesuy and Boveris, 1991). The results were corrected by number of cells and expressed
4 as μM thiol / 10^6 cells and as area under the chemiluminescence curves (AUC) / 10^6 cells.

5

6 2.3 Detection of NO/peroxynitrite profiling by high-sensitivity chemiluminescence

7 A highly sensitive technique developed by Kikuchi et al., 1993, was modified and used
8 for the determination of NO levels. The assay was based on the reaction of NO with hydrogen
9 peroxide, which leads to the formation of peroxynitrite. Peroxynitrite in the presence of luminol
10 generates triplet oxygen that decays to singlet oxygen with photon emission. Photon emission
11 was recorded using a luminometer system and software. Cells were diluted in fresh sterile
12 Na_2CO_3 buffer (2 mM; pH: 8.5), which was degassed by N_2 bubbling for 20 min to eliminate
13 molecular oxygen and prevent the oxidation of NO to nitrite/nitrate. The starting reagent was
14 prepared by mixing equal volumes of luminol solution (4.39 μM dissolved in KOH 1M) diluted
15 with desferoxamine (36.58 μM) in the ratio 1:10 and H_2O_2 (2.44 μM); subsequently, three parts
16 of degassed Na_2CO_3 buffer (2 mM; pH: 8.5) was added to the reagent. To the reaction, 500 μL
17 of samples were mixed with an equal volume of buffer. Samples were mixed with 50 μL of the
18 starting reagent and the reaction was performed in a Glomax luminometer (Promega). The
19 results were corrected by number of cells and the peak height was used. Results were expressed
20 as NO peak / 10^6 cells.

21

22 2.4 MTT assay

23 To evaluate the cellular responsiveness to doxorubicin, the MTT assay was performed
24 as described by Mosmann (1983). The doxorubicin response of different groups was compared

1 with the MTT results for MCF-7 and MDA-MB-231 cells (controls) and the results were
2 expressed as percentage (%) of control viability.

3

4 2.5 Immunocytochemistry labeling for p53, NF-kB, Nrf2 and TGF- β 1

5 Immunocytochemistry analysis was performed on coverslip-adherent cells using the
6 labeled streptavidin biotin method using a LSAB KIT (DAKO Japan, Kyoto, Japan). The
7 sections were incubated with 0.1% Triton X-100 solution during 1 hour, washed 3 times in PBS
8 and treated for 40 min at room temperature with 10% BSA. In addition, coverslips were
9 incubated overnight at 4°C with the primary antibodies (anti-p53, anti-p65-NF-kB, anti-TGF-
10 β 1, diluted 1:400 and anti-Nrf2, diluted 1:300, Santa Cruz Biotechnology). After, secondary
11 antibody treatment was started (2 hours, room temperature), and horseradish peroxidase activity
12 was visualized by treatment with H₂O₂ and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 min. At the last
13 step, the sections were weakly counterstained with Harry's hematoxylin (Merck). For each case,
14 negative controls were performed by omitting the primary antibody. Intensity and localization
15 of immunoreactivities against primary antibody used were examined on all coverslips using a
16 photomicroscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). For the image
17 analysis study, photomicroscopic colour slides of representative areas (400 x) were digitally
18 acquired. The images were processed by Image J program. After the colour deconvolution, they
19 were thresholded and the total labelled area was calculated and corrected by the number of total
20 cells. For the p53, p65-NF-kB and Nrf2 analysis, the percentage of cells with nucleus labeled
21 were calculated.

22

23 2.6 Statistical analysis

1 Data were expressed as mean \pm standard error of the mean and analyzed using one-way
2 analysis of variance (ANOVA). Intergroup differences were analyzed by Bonferroni post-test.
3 For almost all the tests, it was compared the difference between cells at the several passages
4 with the cells at the first passage (passage 1). For the MTT assay, the doxorubicin
5 responsiveness of different groups was compared with the responsiveness of the correspondent
6 controls (MCF-7 and MDA-MB-231 cells). $p < 0.05$ was considered statistically significant. *
7 was used for $p < 0.05$ in MCF-7 cells and + was used for $p < 0.05$ in MDA-MB-231 cells. Data
8 analysis was conducted using GraphPad Prism (version 6; California, USA).

9

10 **3 Results**

11 3.1 Characterization of metformin effects

12 Metformin treatment significantly reduced total thiol levels (Figure 2A) and increased
13 the lipid peroxidation in MCF-7 and in MDA-MB-231 cells (Figure 2B). Treatment also
14 progressively reduced the levels of NO (Figure 2C), but did not alter the cellular sensitivity to
15 doxorubicin, since control cells and metformin – treated cells responded similarly to the
16 chemotherapeutic: doxorubicin only significantly reduced cell viability in MCF-7 cells at 2.5 and
17 5 μ M and in all concentrations used in MDA-MB-231 cells (Figure 2D). Metformin increased
18 the nuclear p53 and cytoplasmic TGF – β 1, (Figure 5A and 5D, respectively). Treatment
19 decreased the nuclear NF-kB (Figure 5B) and did not alter the nuclear Nrf2 (Figure 5C).

20

21 3.2 Oxidative profile and doxorubicin responsiveness of DR cells

22 The induction of doxorubicin resistance progressively increased the levels of total thiol
23 (Figure 3A). In relation to lipid peroxidation, the chemotherapeutic exposure led to a transient
24 increase in these levels (passages 2, 3 and 4), followed by a significant decrease (Figure 3B).

1 The NO levels increased from the fourth passage (Figure 3C) and the cells were resistant to
2 doxorubicin in all employed concentrations of the drug (Figure 3D). The nuclear p53 and the
3 cytoplasmic TGF – β 1 significantly reduced in DR cells (Figure 5E and 5H, respectively) and
4 nuclear NF-kB and Nrf2 increased in DR cells (Figure 5F and 5G, respectively).

5

6 3.3 Oxidative profile and doxorubicin responsiveness of MDR cells

7 The total thiol levels increased during the passages in MDR cells (Figure 4A) and lipid
8 peroxidation decreased (Figure 4B). The NO levels showed a transient reduction in the third
9 passage (only in MCF-7 cells), followed by an increase (Figure 4C), and cells remained resistant
10 to all doxorubicin concentrations employed (Figure 4D). The nuclear p53 and the cytoplasmic
11 TGF – β 1 did not altered in MDR cells (Figure 6A and 6D, respectively). TGF – β 1 presented
12 a transient elevation in MDA-MB-231 MDR cells (passages 2, 3 and 4) but it was reverted
13 during the other passages. Nuclear NF-kB and Nrf2 significantly increased (Figure 6B and 6C,
14 respectively).

15

16 3.4 Oxidative profile and doxorubicin responsiveness of PMDR cells

17 The total thiol levels did not modify during passages in MCF-7 PMDR cells, but
18 significantly reduced in MDA-MB-231 PMDR cells (Figure 4E). Lipid peroxidation
19 progressively increased (Figure 4F) and the NO levels decreased (Figure 4G). PMDR cells were
20 sensitive to all employed concentrations of doxorubicin (Figure 4H). The nuclear p53 and the
21 cytoplasmic TGF – β 1 significantly increased (Figure 6E and 6H, respectively). The nuclear
22 levels of NF-kB did not alter (Figure 6F) and the nuclear Nrf2 decreased (Figure 6G).

23

24 **4 Discussion and Conclusions**

1 Metformin was recently described to resensitize multidrug-resistant breast cancer cells
2 due to activating AMPK signal pathway (Qu et al., 2014). However, the mechanism by which
3 this reversion of phenotype occurs remains unclear. In this paper, we evaluated the metformin
4 effect during the process of doxorubicin resistance induction, by using two different
5 approaches, the pretreatment and the cotreatment. Our results strongly demonstrated that the
6 pretreatment of MCF-7 and MDA-MB-231 cells with metformin prevents cells from becoming
7 resistant to doxorubicin chemotherapy.

8 Here we showed that the experimental process of doxorubicin resistance induction, with
9 increasing cellular exposure to the drug, involved the regulation of some intracellular pathways
10 related to cell proliferation and survival, with significant alteration in the cellular oxidative
11 status. These findings suggest the involvement of oxidative stress during the acquisition of
12 doxorubicin-chemoresistance in MCF-7 and in MDA-MB-231 cells. According to the
13 immunocytochemistry analysis, from the fourth passage with doxorubicin, it was observed that
14 the nuclear p53 significantly reduced and NF-kB increased in MCF-7 DR cells. It was also
15 observed in MDA-MB-231 DR cells, but the reduction in p53 was significant only in the
16 seventh passage and the increase in NF-kB, from the sixth. p53 is a tumor suppressor protein
17 involved in the regulation of cellular proliferation and apoptosis through the control of several
18 molecular pathways (Ali et al., 2012). Mutations in this protein were associated with poor
19 clinical prognosis, resistance to chemotherapeutic treatments and to chemoresistance of
20 cultured tumor cells (Masciarelli et al., 2013). It has been demonstrated that the p53 can act as
21 an antioxidant protein. At low oxidative stress levels, p53 can activates other genes implicated
22 in the antioxidant response against reactive species generation (Macip et al., 2003).
23 Furthermore, it was previously described that p53 signaling pathway is necessary to re-sensitize
24 ovarian cancer cells to DNA-damaging chemotherapeutic agents (Woo et al., 2012, Abedini et

1 al., 2010). These findings suggest the existence of a crosstalk between the p53 pathway and the
2 generation of oxidative stress during the induction of the doxorubicin-chemoresistant
3 phenotype in breast cancer cells.

4 It is known that the induction of DNA damage by doxorubicin may result in the
5 activation of the p53 (Banin et al., 1998) and NF- κ B, which could impair drug cytotoxicity (Wu
6 et al., 2006). In this context, we also investigated the nuclear NF- κ B during the induction of the
7 chemoresistant phenotype. We detected increased levels of nuclear NF- κ B during the
8 exposition of cells to crescent doses of doxorubicin. It was previously demonstrated that
9 doxorubicin activates NF- κ B in breast cancer cells and the pharmacological inhibition of this
10 pathway increased the antitumoral effects of this drug (Tapia et al., 2007). Clinically, the
11 activation of NF- κ B was correlated with resistance to anthracycline-based chemotherapy and
12 worse outcome (Ingles-Esteve et al., 2012), suggesting that NF- κ B activation during
13 doxorubicin-based treatment is pivotal to the occurrence of poor prognosis events, such as
14 chemoresistance. NF- κ B is deeply correlated with the acquisition of chemoresistance
15 (Dalmases et al., 2013). Therefore, the concomitant reduced levels of nuclear p53 and the
16 increased nuclear NF- κ B in response to doxorubicin exposition observed in this work in the DR
17 group, corroborate with the the literature that associated the reduction of p53 and increased NF-
18 κ B activation, with a chemoresistance phenotype.

19 In addition to p53 and NF- κ B results, the DR group also presented increased nuclear
20 Nrf2, a critical transcription factor that regulates antioxidants molecules, (Chen et al., 2012). It
21 was previously described that the basal Nrf2 levels in different cell lines correlate with their
22 respective sensitivity to a common cytotoxic chemotherapy, specifically in breast cancer cells,
23 low levels of Nrf2 and of Nrf2-regulated detoxification proteins, constitute a frequent
24 phenotype in chemosensitive breast cancer cells (Hu et al., 2010). Similarly, the increased Nrf2

1 levels, were associated with both doxorubicin and paclitaxel resistance (Hu et al., 2010). The
2 model of doxorubicin resistance induction used in this work, significantly increased the nuclear
3 Nrf2 in DR cells and this result was consistent with the significant reduction in cellular
4 oxidative stress, observed by the increased total thiol levels and by the reduction on lipid
5 peroxidation across the passages with doxorubicin. Furthermore, the NO/peroxynitrite levels in
6 DR group significantly increased during doxorubicin administrations. NO, at physiologically
7 relevant concentrations, is able to induce an EGFR/Src-mediated activation of oncogenic signal
8 transduction pathways (such as c-Myc, Akt and β -catenin) and the loss of PP2A tumor
9 suppressor activity in estrogen receptor-negative (ER⁻) breast cancer cells. It was also
10 demonstrated that NO increases the cellular epithelial mesenchymal transition (EMT), and
11 chemoresistance to doxorubicin and paclitaxel in MCF-7 cells (Switzer et al., 2012). Our results
12 showed that the augmented NO levels could be associated with the development of the
13 chemoresistance, while Nrf2 increasing should respond by the attenuation in the prooxidant
14 status of cells acquired during doxorubicin exposition.

15 In addition to such factors, we also reported that the DR group presented a reduction in
16 cytoplasmic TGF- β 1 during the period of resistance induction. Although the participation of
17 TGF- β 1 in the mechanisms of chemoresistance in cancer is not completely established, there
18 are some reports pointing to a possible participation of TGF- β 1 as a factor that contributes to
19 chemoresistance in different cancer types (Yamada et al., 2013; Held-Feindt et al., 2012; Kim
20 et al., 2012), including breast cancers (Yu et al., 2010). Our data revealed that the
21 chemoresistance induction was accompanied by a reduction in cytoplasmic TGF- β 1, showing
22 that its participation in the doxorubicin resistance in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer
23 cells could be predominantly as a tumor suppressor. Previous studies of our group have
24 implicated the systemic TGF- β 1 levels in the prognosis of human breast cancer, since patients

1 ongoing doxorubicin chemotherapy presented depletion in circulating TGF- β 1 levels and it was
2 associated with a poor disease prognosis (Panis et al., 2013).

3 Once established the profiling of doxorubicin-resistance induction and its putative
4 mechanism of action, we performed some experiments to investigate if the chemoresistant
5 phenotype could be prevented by metformin treatment. To reach this goal, we first evaluated
6 the effects of the isolated administration of metformin on MCF-7 cells aiming to better
7 understand the drug mechanisms over the same evaluated parameters in chemoresistance
8 experiments. Our data showed that the treatment of MCF-7 and MDA-MB-231 cells with
9 metformin did not modify the cell sensitivity to doxorubicin and significantly increased the
10 activation of p53 and TGF- β 1, with further reduction of the NF- κ B pathway, without alter the
11 Nrf2. These results are consistent with the antiproliferative and proapoptotic effect described
12 for this drug (Dowling et al., 2012), since these pathways are important in the control of cellular
13 proliferation and survival, as discussed earlier. Additionally, metformin significantly increased
14 the cellular oxidative stress and reduced the NO levels. This profile could also contribute to the
15 cytotoxicity of the drug, since oxidative stress is able to induce cell death (Acharya et al., 2010)
16 and lower levels of NO is associated with a better phenotype characteristics in cancer cells
17 (Switzer et al., 2012).

18 In relation to metformin action in doxorubicin resistance induction, we observed that
19 the pretreatment with this drug (maintained during the resistance induction period) significantly
20 prevented the chemoresistance phenotype and also sensitized MCF-7 cells to doxorubicin, since
21 the concentration of 1.0 μ M of the chemotherapeutic significantly decreased the cell viability. On
22 the other hand, the simultaneous administration of metformin and doxorubicin did not
23 prevented the cells to becoming resistant. This difference in the metformin ability to act on the
24 induction of chemoresistance depending on the time of its introduction was directly related to

1 the regulation of the oxidative status and NO levels, as well as modulated the analyzed
2 intracellular pathways. In this context, MDR group did not significantly differ from the DR
3 group in relation to the cellular oxidative stress and the NO levels, but the PMDR group
4 presented increased cellular oxidative status, observed by the increase in lipid peroxidation and
5 by the recovery in the total thiol levels. Additionally, the PMDR group presented reduced levels
6 of NO. Moreover, we clearly observed that the pretreatment with metformin significantly
7 increased p53 and TGF- β 1 and further reduced Nrf2 and NF-kB. In the MDR group, however,
8 this effects were not observed, the activity of the NF-kB and the Nrf2 pathways remained
9 increased, similarly to the results observed in the DR group. However, in despite of these
10 results, an initial effect could be observed in the MDR group, with constant levels of p53 and
11 TGF- β 1, in contrast to the reduced levels observed in the DR group. These findings implicates
12 metformin as a putative candidate for future trials regarding the prevention or the reversion of
13 chemoresistance in patients submitted to doxorubicin-based treatment, such as the patients
14 bearing luminal or triple negative tumors.

15 In conclusion, the results of this study proposes an oxidative stress-based mechanism
16 for explaining, at least, in part the doxorubicin-driven chemoresistance. Furthermore, our data
17 suggests that metformin treatment could be beneficial in the prevention of the doxorubicin
18 chemoresistance, by modulating the cellular oxidative status and some known pathways related
19 to cell survival, proliferation and response to chemotherapeutic drugs. More detailed studies
20 investigating the metformin mechanisms of action in chemoresistance are necessary, to ensure
21 the security of the drug use as a possible agent in the clinical breast cancer treatment, especially
22 in situations of doxorubicin chemoresistance.

23

24 **Acknowledgments**

1 This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
2 Superior (CAPES) and by the Fundação Araucária. The authors are grateful to J.A. Vargas and
3 P.S.R. Dionízio-Filho, from the Department of General Pathology, State University of
4 Londrina, for their excellent technical assistance.

5

6 **Conflict of Interest:** The authors have no conflict of interest to declare.

7

8 **References**

9 Abedini MR, Muller EJ, Bergeron R, Gray DA, Tsang BK. Akt promotes chemoresistance in
10 human ovarian cancer cells by modulating cisplatin-induced, p53-dependent ubiquitination of
11 FLICE-like inhibitory protein. *Oncogene*, v. 29, p.11–25, 2010.

12 Acharya A, Das I, Chandhock D, Saha T. Redox regulation in cancer. *Oxidative Medicine and*
13 *Cellular Longevity*, v.3, n.1, p. 23-34, 2010.

14 Alpsyoy A, Yasa S, Gunduz U. Etoposide resistance in MCF-7 breast cancer cell line is marked
15 by multiple mechanisms. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2014. [Epub ahead of print].

16 Ali AY, Farrand L, Kim JY, Byun S, Suh J, Lee HJ, Tsang BK. Molecular determinants of
17 ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. *Ann NY Acad Sci*, v. 127,
18 n. 1, p. 58 – 67, 2012.

19 Banin S, Moyal L, Shieh S, Taya Y, Anderson CW, Chessa L, Smorodinsky NI, Prives C, Reiss
20 Y, Shiloh Y and Ziv Y. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage.
21 *Science*, v. 281, n.5383, p. 1674-1677, 1998.

22 Chen Q, Li W, Wan Y, Xia X, Wu Q, Chen Y, Lai Z, Yu C, Li W. Amplified in Breast Cancer
23 1 Enhances Human Cholangiocarcinoma Growth and Chemoresistance by Simultaneous
24 Activation of Akt and Nrf2 Pathways. *Hepatology*, v. 55, n. 6, p. 1820- 1829, 2012.

- 1 Cho HY, Reddy SP, Kleeberger SR. Nrf2 defends the lung from oxidative stress. *Antioxid Redox*
2 *Signal*. v. 8, p.76-87, 2006.
- 3 Dalmases A, González I, Menendez S, Arpí O, Corominas JM, Servitja S, Tusquets I, Chamizo
4 C, Rincón R, Espinoza L, Bigas A, Eroles P, Furriol J, Lluch A, Rovira A, Albanell J, Rojo F.
5 Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF-κB target
6 genes in human breast cancer. *Oncotarget*, v. 5, n. 1. [Epub ahead of print], 2013.
- 7 Dowling RJ, Niraula S, Stambolic V, Goodwin PJ. Metformin in cancer: translational
8 challenges. *J Mol Endocrinol*, v. 48, n. 3, p. 31-43, 2012.
- 9 Fairchild CR, Ivy AP, Kao-Shan C, Whang-Peng J, Rosen N, Israel MA, Melera PW, Cowan
10 KH, Goldsmith ME. Isolation of Amplified and Overexpressed DNA Sequences from
11 Adriamycin resistant Human Breast Cancer Cells. *Cancer Research*, v. 47, p. 5141 – 5148,
12 1987.
- 13 Fojo T, Cloney HM. The Role of Efflux Pumps in Drug-Resistant Metastatic Breast Cancer:
14 New Insights and Treatment Strategies. *Clinical Breast Cancer*, v. 7, n. 10, p. 749-756, 2007.
- 15 Gonzalez-Flecha B, Llesuy S, Boveris A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an
16 assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic Biol Med*, v. 10, n.
17 2, p. 93-100, 1991.
- 18 Held-Feindt J, Schmelz S, Hattermann K, Mentlein R, Mehdorn HM, Sebens S. The neural
19 adhesion molecule L1CAM confers chemoresistance in human glioblastomas. *Neurochem Int*,
20 v. 61, n. 7, p. 1183-1191, 2012.
- 21 Hu L, Miao W, Loignon M, Kandouz M, Batist G. Putative chemopreventive molecules can
22 increase Nrf2-regulated cell defense in some human cancer cell lines, resulting in resistance to
23 common cytotoxic therapies. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 66, n. 3, p. 467-74, 2010.

- 1 Ingles-Esteve J, Morales M, Dalmases A, Garcia-Carbonell R, Jene-Sanz A, Lopez-Bigas N,
2 Iglesias M, Ruiz-Herguido C, Rovira A, Rojo F, Albanell J, Gomis RR, Bigas A and Espinosa
3 L. Inhibition of specific NF-kappaB activity contributes to the tumor suppressor function of 14-
4 3-3sigma in breast cancer. *PLoS One*, v. 7, n. 5, e38347, 2012.
- 5 Kikuchi K, Nagano T, Hayakawa H, Hirata Y, Hirobe M. Real time measurement of nitric oxide
6 produced ex vivo by luminol-H2O2 chemiluminescence method. *J. Biol. Chem*, v. 268, p.
7 23106-23110, 1993.
- 8 Kim WD, Kim YW, Cho IJ, Lee CH, Kim SG. E-cadherin inhibits nuclear accumulation of
9 Nrf2: implications for chemoresistance of cancer cells. *J Cell Sci*, v. 125, p. 1284-1295, 2012.
- 10 Macip S, Igarashi M, Berggren P, Yu J, Lee SW, Aaronson SA. Influence of induced reactive
11 oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol Cell Biol*, v. 23, n. 23, p. 8576-85,
12 2003.
- 13 Masciarelli S, Fontemaggi G, Di Agostini S, Donzelli S, Carcarino E, Strano S, Blandino G.
14 Gain-of-function mutante p53 downregulates miR-223 contributing to chemoresistance of
15 culture tumor cells. *Oncogene*, 2013. [Epub ahead of print].
- 16 Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v. 67, p.753–791, 1998.
- 17 Panis, C., Herrera, A.C., Victorino, V. J., Aranome, A. M. F., Cecchini, R., 2013. Screening of
18 circulating TGF- β level and its clinicopathological significance in human breast cancer.
19 *Anticancer Research*, 33, 737 – 42, 2013.
- 20 Panis C, Herrera AC, Victorino VJ, Campos FC, Freitas LF, De Rossi T, Colado Simão AN,
21 Cecchini AL, Cecchini R. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer
22 patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat*. v. 133,
23 n. 1, p. 89-97, 2012.

- 1 Qu C, Zhang W, Zheng G, Zhang Z, Yin J, He Z. Metformin reverses multidrug resistance and
2 epithelial– mesenchymal transition (EMT) via activating AMP-activated protein kinase
3 (AMPK) in human breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, v. 386, p. 63 – 71, 2014.
- 4 Ringnér M, Staaf J, Jonsson G. Nonfamilial breast cancer subtypes. *Methods Mol Biol*, 973:
5 279-295, 2013;
- 6 Switzer CH, Glynn SA, Cheng RY, Ridnour LA, Green JE, Ambs S, Wink DA. S-Nitrosylation
7 of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer.
8 *Mol Cancer Res*, v. 10, n. 9, p. 1203–1215, 2012.
- 9 Tapia MA, Gonzalez-Navarrete I, Dalmases A, Bosch M, Rodriguez-Fanjul V, Rolfe M, Ross
10 JS, Mezquita J, Mezquita C, Bachs O, Gascon P, Rojo F, Perona R, Rovira A and Albanell J.
11 Inhibition of the canonical IKK/NF kappa B pathway sensitizes human cancer cells to
12 doxorubicin. *Cell Cycle*, v. 6, n. 18, p. 2284-2292, 2007.
- 13 Woo MG, Xue K, Liu J, McBride H, Tsang BK. Calpain-mediated processing of p53-associated
14 parkin-like cytoplasmic protein (PARC) affects chemosensitivity of human ovarian cancer cells
15 by promoting p53 subcellular trafficking. *J. Biol. Chem*, v. 287, p. 3963–3975, 2012.
- 16 Wu ZH, Shi Y, Tibbetts RS and Miyamoto S. Molecular linkage between the kinase ATM and
17 NF-kappaB signaling in response to genotoxic stimuli. *Science*, v. 311, n. 5764, p. 1141-1146,
18 2006.
- 19 Yamada D, Kobayashi S, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Ishii H, Nagano H,
20 Doki Y, Mori M. Role of crosstalk between interleukin-6 and transforming growth factor-beta
21 1 in epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in biliary tract cancer. *Eur J*
22 *Cancer*, v. 49, n. 7, p. 1725-1740, 2013.

1 Yu Y, Wang Y, Ren X, Tsuyada A, Li A, Liu LJ, Wang SE. Context-dependent bidirectional
2 regulation of the MutS homolog 2 by transforming growth factor β contributes to
3 chemoresistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res*, v. 8, n. 12, p. 1633-42, 2010.

4 Zhang M, Wang J, Zhang L, Zhou S. EGFR-Nrf2 pathway plays a role in cancer cell's
5 chemoresistance. *Bioscience Hypotheses*, v. 2, p. 261-263, 2009.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

Figures

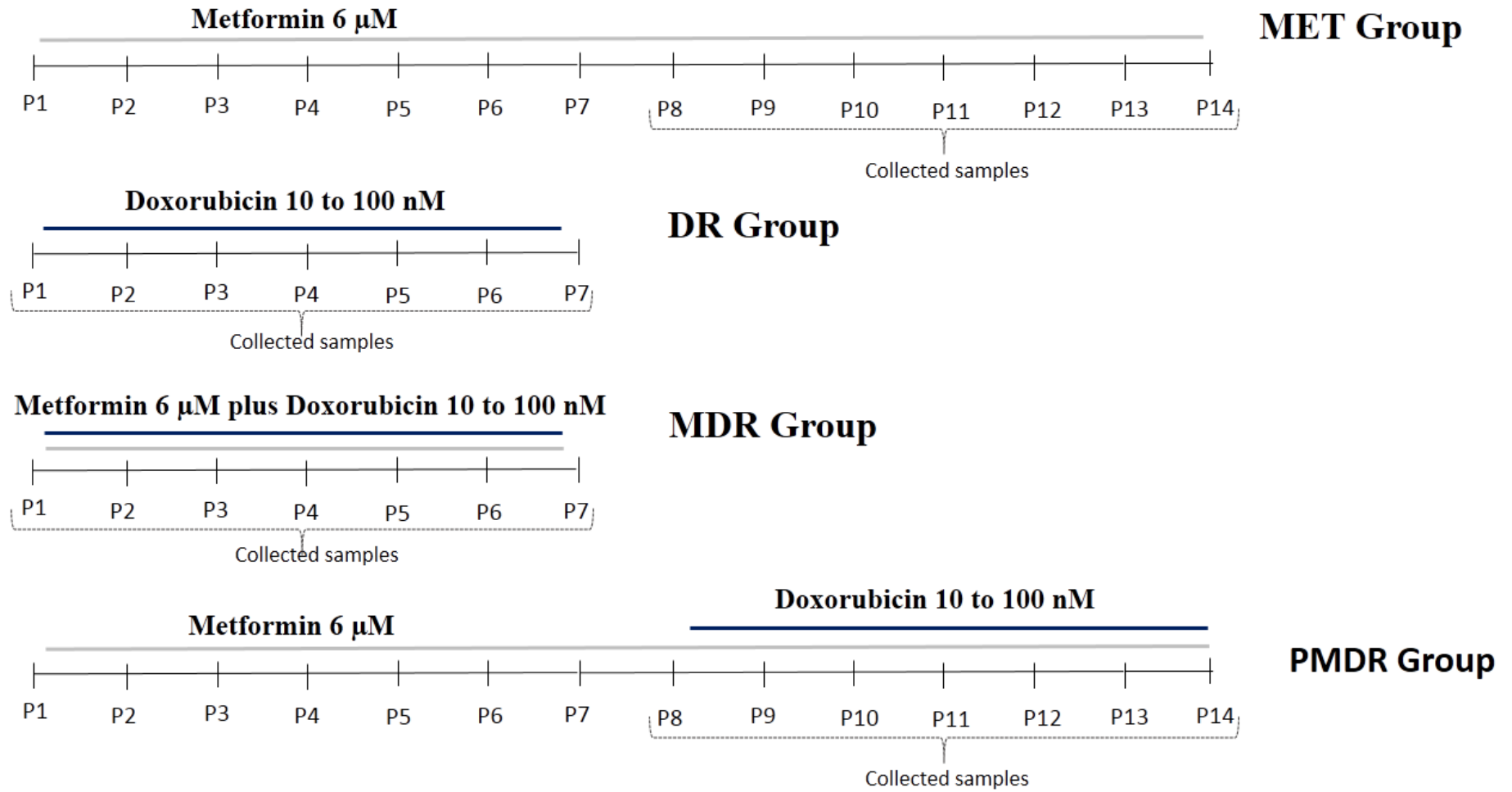


Figure 2. Experimental design.

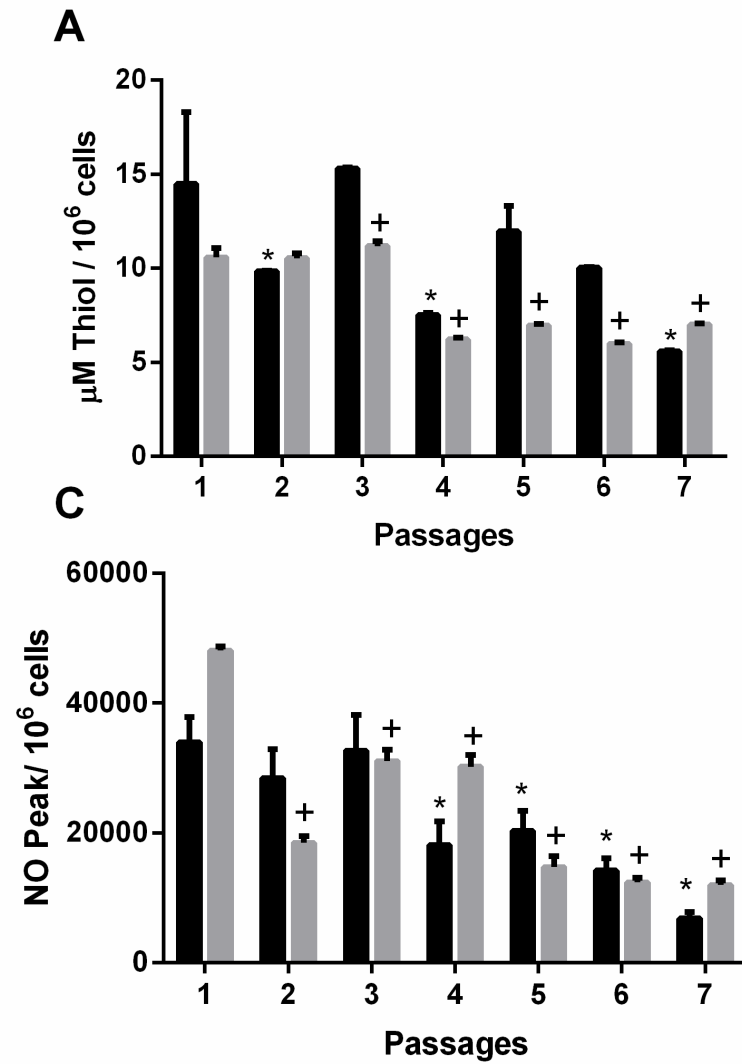


Figure 2. Oxidative profile and doxorubicin responsiveness of metformin - treated human breast cancer cells. A, B and C: Total thiol levels, area under the chemiluminescence curves and peak of the nitric oxide curves, respectively, during seven passages in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) treated with 6 μM of metformin. * and +: Statistically different ($p < 0.05$) from the first passage (passage 1) of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively. D: MTT assay of control MCF-7 (black columns) and control MDA-MB-231 cells (gray columns) and metformin – treated MCF-7 and MDA-MB-231 cells after 24 hours of exposure to three doxorubicin concentrations (1.0, 2.5 and 5.0 μM). * and +: Statistically different ($p < 0.05$) from the control MCF-7 and MDA-MB-231 group, respectively.

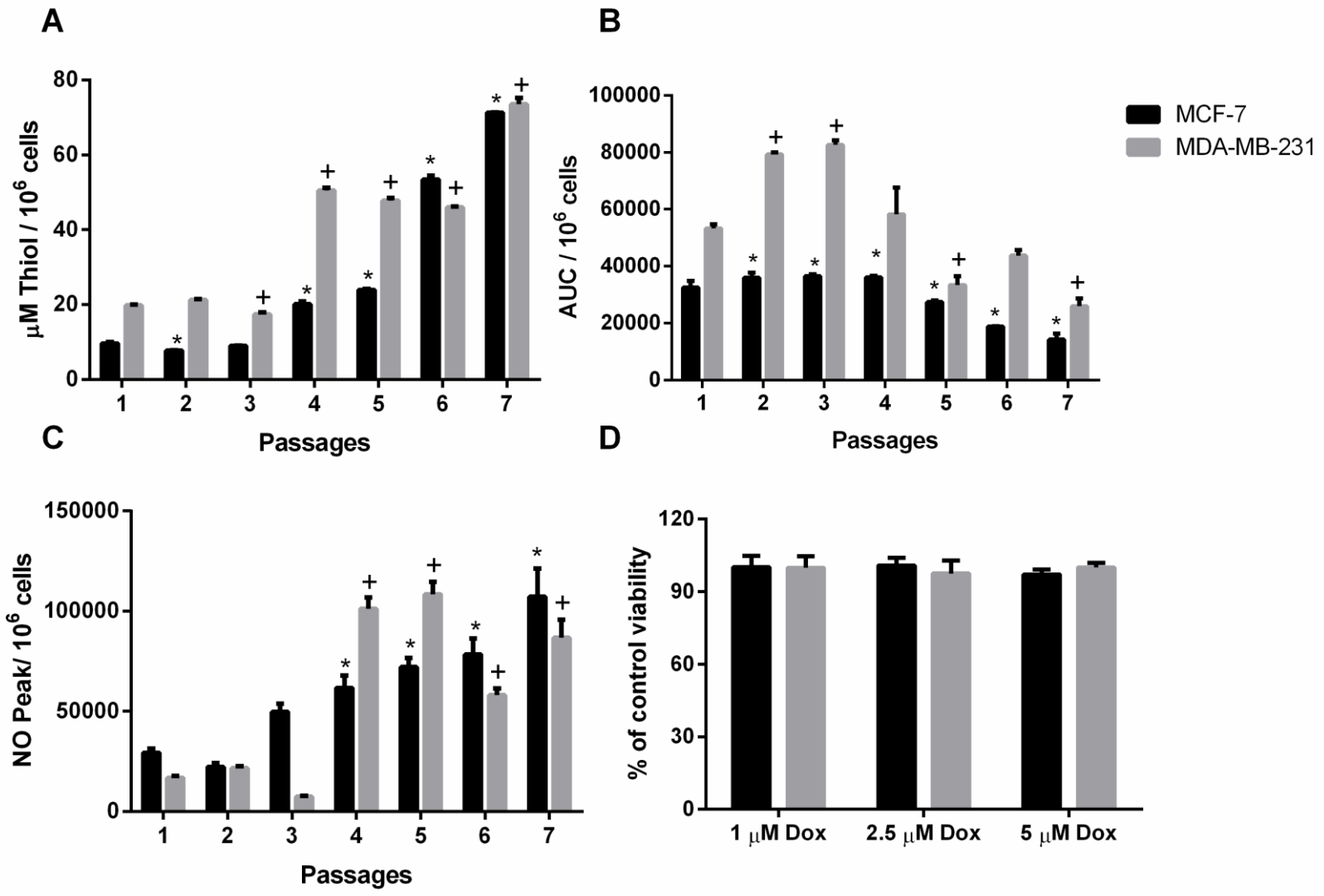


Figure 3. Oxidative profile and doxorubicin responsiveness of human breast cancer cells experimentally induced to doxorubicin resistance.

A, B and C: Total thiol levels, area under the chemiluminescence curves and peak of the nitric oxide curves, respectively, during seven passages in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) experimentally induced to doxorubicin resistance (doxorubicin dosage intervals during resistance induction ranging from 10nM to 100 nM). * and +: Statistically different ($p < 0.05$) from the first passage (passage 1) of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively. D: MTT assay of MCF-7 and MDA-MB-231 cells induced to doxorubicin resistance after 24 hours of exposure to three doxorubicin concentrations (1.0, 2.5 and 5.0 μM).

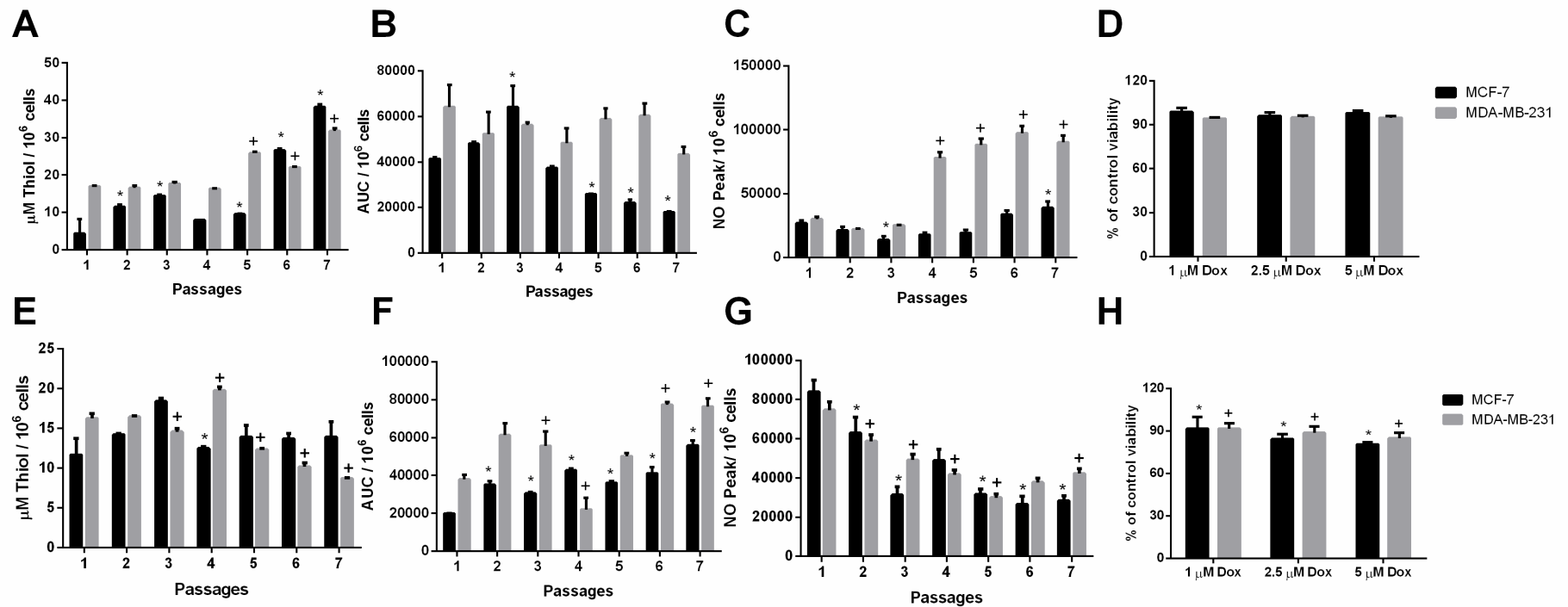


Figure 4. Oxidative profile and doxorubicin responsiveness of human breast cancer cells experimentally induced to doxorubicin resistance treated with metformin simultaneously or before and during the resistance induction. A, B and C: Total thiol levels, area under the chemiluminescence curves and peak of the nitric oxide curves, respectively, during seven passages in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) treated with metformin (6 μ M) simultaneously to the induction of doxorubicin resistance (doxorubicin dosage intervals during resistance induction ranging from 10nM to 100 nM). E, F and G: Total thiol levels, area under the chemiluminescence curves and peak of the nitric oxide curves, respectively, during seven passages in MCF-7 and in MDA-MB-231 cells treated with metformin (6 μ M) before (7 passages before) and during the induction of doxorubicin resistance. * and +: Statistically different ($p < 0.05$) from the first passage (passage 1) of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively. D and H: MTT assay of MCF-7 and MDA-MB-231 cells treated with metformin (6 μ M) simultaneously or before and during the induction of doxorubicin resistance, respectively, after 24 hours doxorubicin exposure (1.0, 2.5 and 5.0 μ M). * and +: Statistically different ($p < 0.05$) from the control MCF-7 and MDA-MB-231 group, respectively.

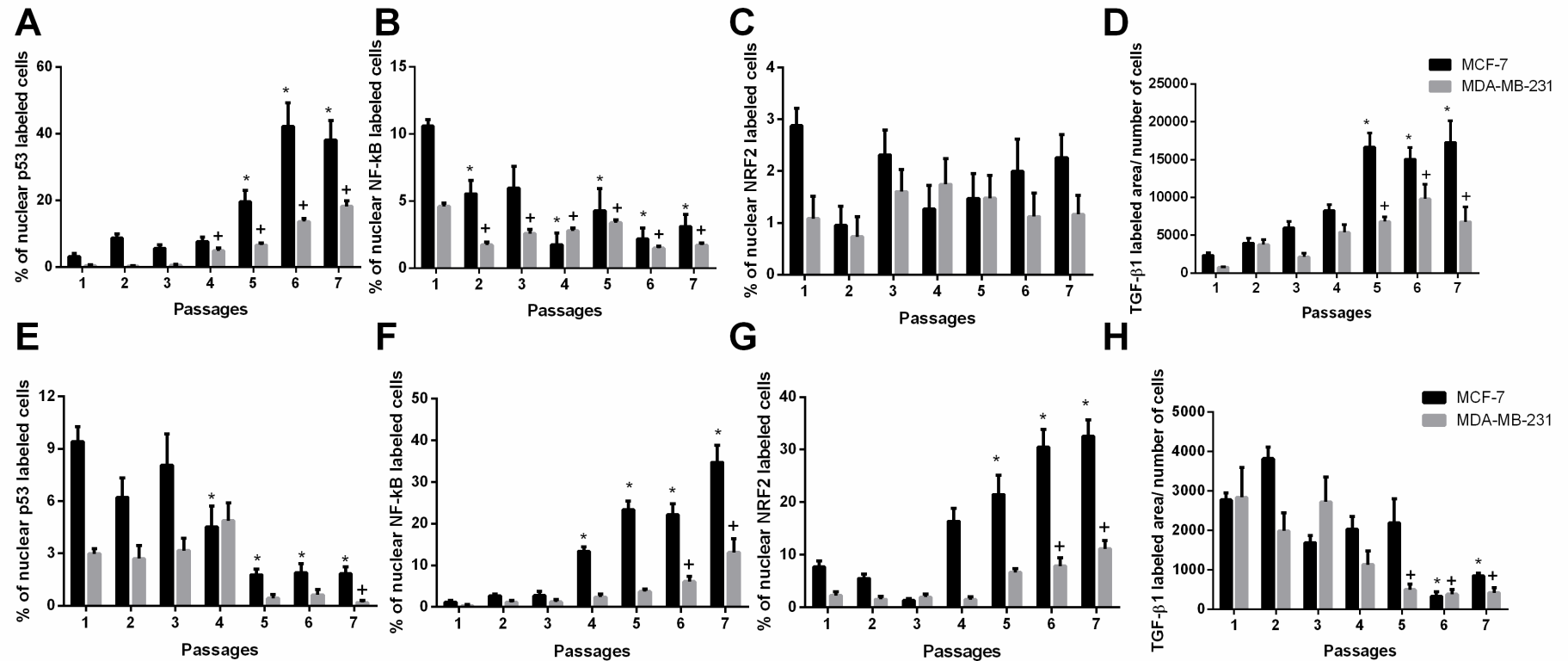


Figure 5. Immunocytochemistry analysis of human breast cancer cells treated with metformin and experimentally induced to doxorubicin resistance. A, B, C and D: Quantitative results for nuclear p53, p65-NF-kB, Nrf2 and cytoplasmic TGF-β1, respectively, during seven passages in metformin – treated (6 μM) MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns). E, F, G and H: Quantitative results for nuclear p53, p65-NF-kB, Nrf2 and cytoplasmic TGF-β1, respectively, during seven passages in MCF-7 and MDA-MB-231 cells experimentally induced to doxorubicin resistance (doxorubicin dosage intervals during resistance induction ranging from 10nM to 100 nM). * and +: Statistically different ($p < 0.05$) from the first passage (passage 1) of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively.

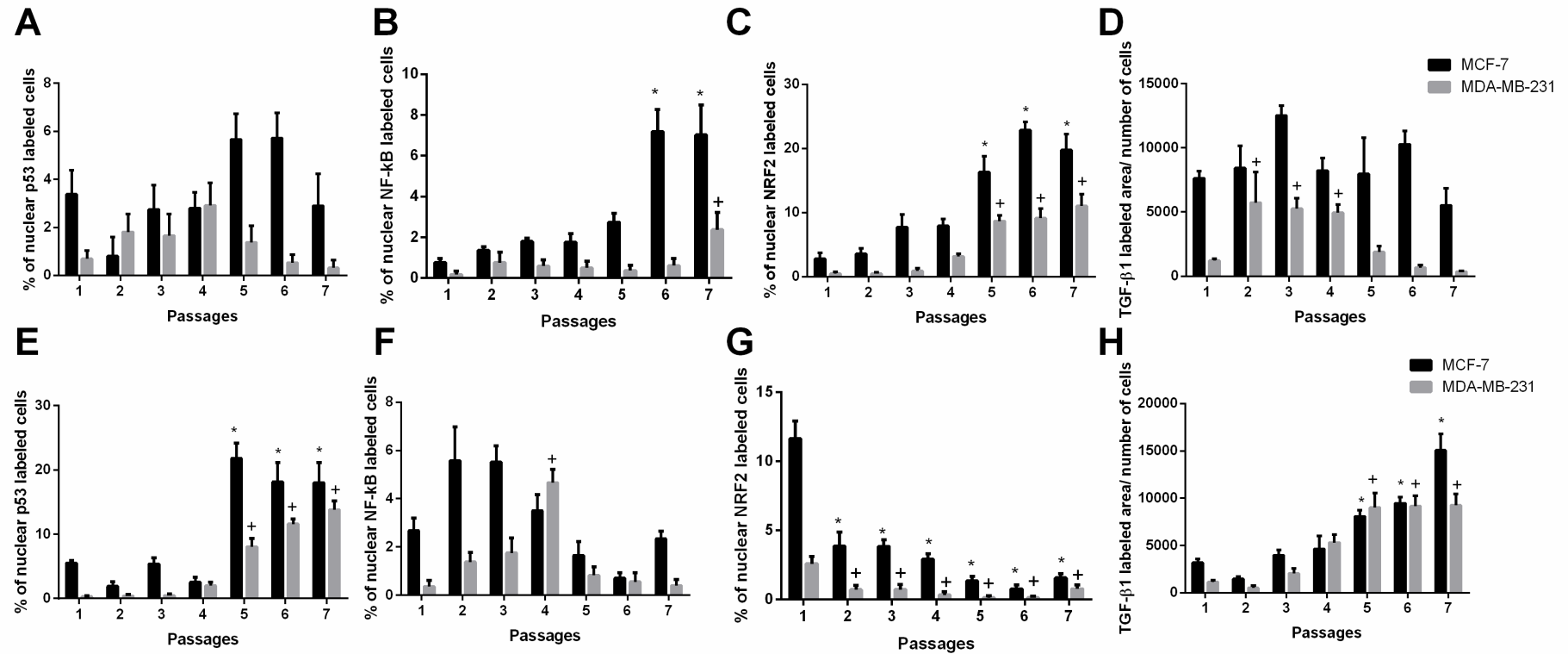


Figure 6. Immunocytochemistry analysis of human breast cancer cells experimentally induced to doxorubicin resistance treated with metformin at different times. A, B, C and D: Quantitative results for nuclear p53, p65-NF-kB, Nrf2 and cytoplasmic TGF-β1, respectively, during seven passages in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) induced to resistance simultaneously treated with metformin (6 μM). E, F, G and H: Quantitative results for nuclear p53, p65-NF-kB, Nrf2 and cytoplasmic TGF-β1, respectively, during seven passages in MCF-7 (black columns) and MDA-MB-231 cells (gray columns) induced to resistance treated with metformin (6 μM) before and during the induction. * and +: Statistically different ($p < 0.05$) from the first passage (passage 1) of MCF-7 and MDA-MB-231 cells, respectively.