



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

NATÁLIA MEDEIROS DIAS LOPES

**ANÁLISE DOS PADRÕES DE MORTE CELULAR INDUZIDA
PELA METFORMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA
HUMANO MCF-7**

NATÁLIA MEDEIROS DIAS LOPES

**ANÁLISE DOS PADRÕES DE MORTE CELULAR INDUZIDA
PELA METFORMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA
HUMANO MCF-7**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Lopes, Natália Medeiros Dias.

Análise dos padrões de morte celular induzida pela metformina em células de câncer de mama humano MCF-7 / Natália Medeiros Dias Lopes. - Londrina, 2017.
49 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Câncer de mama - Tese. 2. Metformina - Tese. 3. Morte celular - Tese. 4. Estresse oxidativo - Tese. I. Armani, Alessandra Lourenço Cecchini. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

NATÁLIA MEDEIROS DIAS LOPES

**ANÁLISE DOS PADRÕES DE MORTE CELULAR INDUZIDA PELA
METFORMINA EM CÉLULAS DE CÂNCER DE MAMA HUMANO
MCF-7**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini
Armani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Rubens Cecchini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Poliana Camila Marinello
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 6 de abril de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as bênçãos derramadas sobre minha vida, por todas as oportunidades que me foram dadas e por ter iluminado meu caminho durante toda essa caminhada.

Agradeço à minha mãe, à quem eu devo tudo que sou, por todo ensinamento, por me apoiar em todos os momentos, por ser o grande exemplo da minha vida, o mais sincero e verdadeiro amor, sem ela eu nada seria.

Ao meu pai (*in memoriam*), que apesar da ausência física está comigo em todos os momentos, no meu coração, e tenho certeza que sempre olhando e zelando por mim.

A professora Dr^a. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, pela oportunidade que me foi dada, por toda dedicação e apoio ao longo deste projeto.

Ao professor Dr^o. Rubens Cecchini, por todo conhecimento compartilhado e oportunidade de trabalhar em seu laboratório.

Agradeço à Poliana Camila Marinello, por tudo que me ensinou, sempre com muita paciência, por todo apoio, orientação e amizade, por ser um exemplo pra mim, a quem eu serei eternamente grata.

A todos meus amigos de longa data, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e ajudando a enfrentar os momentos mais difíceis. Agradeço também às grandes amigadas que fiz no laboratório, por todo auxílio e dedicação, por dividirem comigo as angústias e alegrias, foi muito bom conhece-los.

Aos técnicos do laboratório, Jesus Antônio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, por todo apoio e dedicação, para que meu trabalho fosse realizado sempre da melhor maneira possível.

A CAPES pela bolsa; à pós-graduação; aos financiamentos da Fundação Araucária às pesquisas do laboratório que tornou possível fazer este trabalho, bem como ao esforço de várias pessoas que trabalharam no Curso de Verão que retornou neste projeto em forma de reagentes e materiais usados neste trabalho.

Agradeço a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e para meu crescimento profissional e pessoal, a quem expresso meus sinceros agradecimentos.

“Eu posso ir muito além de onde estou, vou nas asas do Senhor, o Teu amor é o que me conduz! Posso voar e subir sem me cansar, ir pra frente sem me fatigar, vou com asas, como águia, pois confio no Senhor!”

LOPES, Natália Medeiros Dias. **Análise dos padrões de morte celular induzida pela metformina em células de câncer de mama humano MCF-7**. 2017. 49f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia com a maior incidência e mortalidade entre as mulheres no mundo todo. Apesar de novas formas de tratamento para este tipo de câncer, o desenvolvimento de resistência ao tratamento ainda é uma grande preocupação. A metformina, um fármaco de utilização oral para o tratamento de diabetes tipo 2, vem apresentando resultados interessantes ao ser utilizado como uma possível alternativa para o tratamento de vários tipos de câncer, inclusive o câncer de mama, onde estudos mostram que a metformina induz a morte das células tumorais pela geração de estresse oxidativo. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi analisar por quais vias a metformina estaria induzindo a morte das células de câncer de mama humano MCF-7, utilizando os inibidores específicos para cada via de morte, como o Z-vad, um inibidor de pan-caspases, que age no sítio catalítico das caspases bloqueando a apoptose; o inibidor de necroptose, a Necrostatina-1 que age bloqueando a RIPK1, impedindo a morte por necroptose, e a Deferoxamina, um quelante de ferro que inibe a morte por ferroptose. Para isso, as células foram tratadas com duas concentrações de metformina (1mM e 5mM) concomitantemente com os inibidores de morte, Z-vad (10 μ M), Necrostatina-1 (50 μ M) e Deferoxamina (100 μ M). Após 24 horas de tratamento, foram analisados a viabilidade e proliferação celular, análise de morte celular por citometria de fluxo através da coloração com Anexina V e Iodeto de propídio, e quanto aos parâmetros de estresse oxidativo foram analisados tiol total, GSH, GSSG e malondialdeído. Os resultados mostraram que após o tratamento com as duas concentrações de metformina houve uma redução da viabilidade e proliferação das células, porém quanto ao tratamento concomitante da metformina com os inibidores, estes índices foram restaurados. Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo, a metformina reduziu os níveis de antioxidantes (Tiol, GSH e GSSG), porém no tratamento concomitante com os inibidores de morte os antioxidantes foram preservados. Em relação ao marcador de lipoperoxidação, malondialdeído, as duas concentrações de metformina foram capazes de aumentar a sua concentração. Estes resultados nos sugerem que a metformina não induz apenas um tipo de morte celular, uma vez que os três inibidores de morte utilizados foram capazes de reverter os efeitos tóxicos do fármaco. Quanto à geração de estresse oxidativo, o tratamento com os inibidores de morte parecem proteger as células da morte induzida pela metformina, condizendo com os resultados já descritos de que a morte induzida pela metformina estaria associada com a geração de estresse oxidativo.

Palavras-chave: Câncer de mama. Metformina. Morte celular. Estresse oxidativo.

LOPES, Natália Medeiros Dias. **Analysis of cell death patterns induced by metformin in human MCF-7 breast cancer cells**. 2017. 49p. Dissertation (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Breast cancer is the neoplasia with the highest incidence and mortality among women worldwide. Despite new forms of treatment for this type of cancer, the development of resistance to treatment is still a major concern. Metformin, a drug of oral use for the treatment of type 2 diabetes, has been showing interesting results when used as a possible alternative for the treatment of several types of cancer, including breast cancer, where studies show that metformin induces death of the tumor cells by the generation of oxidative stress. Thus, the aim of this study was to analyze by which pathways metformin would be inducing death of human MCF-7 breast cancer cells, using specific inhibitors for each pathway of death, such as Z-vad, a pan-caspases, which acts at the catalytic site of caspases blocking apoptosis; The necrosis inhibitor, Necrostatin-1 which acts by blocking RIPK1, preventing death by necroptosis, and Deferoxamine, an iron chelator that inhibits death by ferroptosis. For this, the cells were treated with two concentrations of metformin (1mM and 5mM) concomitantly with the death inhibitors, Z-vad (10 μ M), Necrostatin-1 (50 μ M) and Deferoxamine (100 μ M). After 24 hours of treatment, cell viability and proliferation were analyzed, cell death analysis by flow cytometry through the staining with Annexin V and propidium iodide, and in relation to the oxidative stress parameters, total thiol, GSH, GSSG and malondialdehyde. The results showed that after the treatment with the two metformin concentrations there was a reduction in the viability and proliferation of the cells, however, regarding the concomitant treatment of metformin with the inhibitors, these indices were restored. Regarding the parameters of oxidative stress, metformin reduced levels of antioxidants (total thiol, GSH and GSSG), but in the concomitant treatment with the death inhibitors the antioxidants were preserved. Regarding the lipoperoxidation marker, malondialdehyde, the two concentrations of metformin were able to increase their concentration. These results suggest that metformin does not induce only one type of cell death, since the three death inhibitors used were able to reverse the toxic effects of the drug. As for the generation of oxidative stress, treatment with death inhibitors seems to protect the cells from metformin-induced death, consistent with the previously reported results that metformin-induced death would be associated with the generation of oxidative stress.

Keywords: Breast cancer. Metformin. Cell death. Oxidative stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPK	Quinase de adenosina monofosfato
Apaf-1	Fator-1 de ativação de apoptose
BRCA1	Gene do câncer de mama 1
BRCA 2	Gene do câncer de mama 2
CYLD	Supressor tumoral cilindromatosis desubiquitinase
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FTL	Ferritina de cadeia leve
FTH1	Ferritina de cadeia pesada
GPx4	Glutathione peroxidase 4
GSH	Glutathione reduzida
HER-2	Fator de crescimento epidermal 2
HSP	Proteínas do choque térmico
clAP1	Inibidor celular da apoptose 1
IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MLKL	Proteína quinase de linhagem mista
mTOR	Alvo mamífero da rapamicina.
Nec-1	Necrostatina-1
RIPK1	Proteína quinase 1
RIPK3	Proteína quinase 3
RSL3	Composto seletivo letal 3 de Ras
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 do fator de necrose tumoral
TRAF2	Fator 2 associado ao TNF
TRADD	Domínio de morte associado ao TNF

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	CÂNCER DE MAMA	9
1.2	TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA.....	10
1.3	METFORMINA	11
1.3.1	Metformina no Câncer de Mama	11
1.4	VIAS DE MORTE CELULAR.....	12
1.4.1	Apoptose	13
1.4.2	Necrose e Necroptose	15
1.4.3	Ferroptose	17
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	21
4	CONCLUSÃO	22
	REFERÊNCIAS	23
	APÊNDICES	27
	APÊNDICE A – Artigo	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de câncer que apresenta a maior incidência e mortalidade na população feminina em todo o mundo. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), mais de 57 mil novos casos foram estimados no Brasil em 2016 (INCA, 2016). Este tipo de câncer é resultado de uma proliferação e transformação maligna de células epiteliais que revestem os ductos ou os lóbulos mamários (WANG et al., 2016), sendo ainda classificados em carcinomas *in situ* e invasivo (NWABO KAMDJE et al., 2014).

Dos casos diagnosticados, aproximadamente 5-10% são considerados hereditários, e destes, cerca de 30% estão relacionados a mutações no gene do câncer de mama 1 e 2 (BRCA1/2) (ECONOMOPOULOU et al., 2015).

É um tipo de câncer considerado multifatorial, pois envolve desde fatores biológicos-endócrinos à fatores relacionados à vida reprodutiva, comportamento e estilo de vida (INCA, 2016), sendo que dentre os fatores de risco associados ao aumento da susceptibilidade de desenvolvimento do câncer de mama, a idade, histórico familiar, exposição à radiação e hábitos alimentares, são consideradas os mais importantes (MCPHERSON et al., 2000).

O câncer de mama é considerado uma doença heterogênea, dividida em diferentes subtipos, como o subtipo luminal, superexpressão de receptor para o fator de crescimento epidermal 2 (HER-2) e triplo-negativo, classificados de acordo com o perfil de expressão gênica das células tumorais (RINGNÉR; STAAF; JONSSON, 2013). A expressão de receptores hormonais, como estrógeno e progesterona, e a superexpressão de HER-2 são considerados importantes fatores preditivos entre pacientes com câncer de mama, e são utilizados no estabelecimento do prognóstico da doença e na definição do tratamento (CINTRA et al., 2011). A compreensão das características apresentadas pelos diferentes subtipos levam à identificar propriedades clínicas importantes, como potencial invasivo e metastático (SORLIE et al., 2001), sendo que pacientes com tumores triplo-negativos tendem a desenvolver metástases pulmonares, enquanto pacientes com receptores endócrino-positivo são mais propensos ao desenvolvimento de metástases ósseas (JOLLY et al., 2012).

Nos últimos anos houve uma redução importante nos índices de mortalidade por câncer de mama, correlacionada com o diagnóstico precoce e melhores opções de tratamento disponíveis, porém a doença ainda apresenta altas taxas de mortalidade (LARSEN et al., 2014). Ao redor do mundo, há uma grande variação na incidência deste tipo de câncer, sendo que o maior número de casos são observados em países desenvolvidos, e a mortalidade é maior nos países em desenvolvimento, devido principalmente à falta de disponibilidade de serviços de detecção precoce e novas opções de tratamento (JEMAL et al., 2011).

1.2 TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Os tumores de mama humano apresentam características biológicas e moleculares diferentes, além de diferirem quanto à capacidade de resposta aos tratamentos (PEROU et al., 2000). O tipo do tratamento e o prognóstico do câncer de mama dependem de alguns fatores, tais como metástases, tamanho do tumor, comprometimento dos linfonodos, grau histológico, estrogênio, bem como as taxas de proliferação celular (ABDULLAH et al., 2015).

Entre os diferentes tipos de tratamento do câncer de mama, os mais utilizados são: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, a fim de destruir as células tumorais e inibir a sua proliferação (NWABO KAMDJE et al., 2014).

O tratamento quimioterápico baseia-se em três abordagens terapêuticas: a quimioterapia clássica, terapia hormonal e terapia-alvo, sendo que diversas classes de quimioterápicos estão disponíveis para o tratamento do câncer de mama, dentre eles estão as antraciclinas e taxanos, utilizados como quimioterapia padrão em diversos países (LEIDY et al., 2014). Quanto à terapia alvo, este termo começou a ser utilizado para descrever novas drogas que foram desenvolvidas com base no conhecimento da patologia molecular da doença, visando os marcadores moleculares específicos (WICKI e ROCHLITZ, 2012). Dentro das terapias alvo, o Trastuzumab foi o primeiro anticorpo monoclonal desenvolvido como terapia contra HER-2, que se liga ao domínio do receptor HER-2, inibindo a proliferação das células tumorais (HOWE; BROWN, 2011).

Para pacientes que possuem o subtipo luminal, com expressão de receptores hormonais, a terapia antiestrogênica é a mais usada, através de medicamentos que interagem diretamente com o receptor de estrogênio, como o tamoxifeno, ou por

inibição da produção sistêmica do hormônio, como o anastrozol (CINTRA et al., 2011).

Porém, apesar destas diferentes alternativas terapêuticas, o tratamento do câncer de mama ainda é um desafio, pois os graves efeitos colaterais e o desenvolvimento de resistência às drogas limita o sucesso do tratamento, portanto, novas alternativas terapêuticas são necessárias para melhorar a sobrevida dos pacientes.

1.3 METFORMINA

A metformina é um fármaco de uso oral, pertencente à família das biguanidas, utilizada como anti-hiperglicemiante no tratamento do diabetes tipo 2, cujos principais efeitos relacionam-se com a redução da gliconeogênese hepática e aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos adiposo e muscular (NATHAN et al., 2009), reduzindo a hiperinsulinemia associada à resistência à insulina, e diminuindo também os níveis de glicose circulante (GONZALEZ-ÂNGULO; MERIC-BERNSTAM, 2010).

Ao nível de sinalização celular, o principal mecanismo de ação proposto da metformina consiste na ativação da AMPK (quinase de adenosina monofosfato), que participa de vias relacionadas ao crescimento e proliferação celular (GONZALEZ-ÂNGULO; MERIC-BERNSTAM, 2010).

De acordo com Golozar *et al.* (2016), estudos pré-clínicos evidenciaram que a ação antineoplásica da metformina relaciona-se com a indução da parada do ciclo celular de uma forma dependente e independente de AMPK, reduzindo a captação de glicose, inibindo a via de sinalização da insulina através da ativação da AMPK, e reduzindo os níveis do IGF-1 (fator de crescimento semelhante a insulina 1), diminuindo assim o fornecimento de glicose aos tumores (GOLOZAR et al., 2016).

1.3.1 Metformina no Câncer de Mama

Estudos científicos tem demonstrado que o uso da metformina diminui a incidência e a taxa de mortalidade por câncer em pacientes diabéticos (LEONE et al., 2014; QUINN et al., 2013). Ao comparar pacientes diabéticos com câncer que recebiam metformina durante a quimioterapia neoadjuvante, com os pacientes que

recebiam apenas o tratamento quimioterápico, houve uma elevação no nível de resposta ao tratamento comparado aos pacientes diabéticos que não recebiam metformina (GONZALEZ-ÂNGULO; MERIC-BERNSTAM, 2010).

Estudos pré-clínicos demonstraram que a metformina pode inibir o crescimento de tumores *in vivo*, bem como a proliferação e sobrevivência de células cancerosas em estudos de câncer de mama *in vitro*, sendo então investigada como um potencial agente terapêutico para o tratamento deste tipo de câncer (GONZALEZ-ÂNGULO; MERIC-BERNSTAM, 2010).

A metformina pode apresentar um efeito antitumoral direto, através da ativação da AMPK, que inibe a via do alvo mamífero da rapamicina (mTOR), inibindo crescimento e proliferação celular, assim como também pode atuar indiretamente, melhorando a sensibilidade à insulina, diminuindo a hiperinsulinemia e consequentemente diminuindo a proliferação tumoral, pois, com o decaimento dos níveis de insulina há uma redução na ativação de vias como do PI3K/Akt/mTOR e uma diminuição no crescimento do tumor (QUEIROZ et al., 2014).

Segundo Ferro *et al.* (2013) uma outra importante utilização da metformina seria na terapia adjuvante, como um radiosensibilizador, podendo levar à uma melhora significativa no prognóstico de pacientes que recebem radioterapia externa como parte do tratamento de câncer de mama (FERRO et al., 2013).

Segundo Malki e Youssef (2011), em um estudo utilizando células de câncer de mama humano MCF-7, a metformina foi capaz de induzir apoptose nas células tumorais através da interrupção do ciclo celular na fase G1 (MALKI; YOUSSEF, 2011). Além disso, já foi relatado que os efeitos antiproliferativos e citotóxicos da droga sobre a mesma linhagem relacionam-se com a indução de estresse oxidativo celular (QUEIROZ et al., 2014 e MARINELLO et al., 2016).

No entanto, apesar da metformina ser alvo de estudos no câncer de mama, ainda não foi completamente esclarecido os mecanismo pelo qual este fármaco atua na doença.

1.4 VIAS DE MORTE CELULAR

O processo de morte celular é importante ao longo da vida de um organismo multicelular e é fundamental para o desenvolvimento da plasticidade e manutenção da homeostasia do organismo (ARYA; WHITE, 2015). Pode ocorrer devido à uma

lesão celular irreversível ou como consequência de eventos de sinalização específicos, sendo que há três tipos principais de morte celular, que são definidas de acordo com as características apresentadas pelas células durante este processo (GREEN; LLAMBI, 2015).

A classificação do tipo de morte celular é realizado seguindo alguns critérios, como o aspecto morfológico do processo que irá culminar na morte, que pode ser apoptótico, necrótico ou autofágico (GALLUZZI et al., 2007).

O processo de morte celular apresenta importantes funções, como remoção de tecidos que já não são mais necessários e de células que apresentam alterações, evitando assim a sua propagação (ARYA; WHITE, 2015).

Em condições de homeostase, cada evento de duplicação celular deve ser compensado pela eliminação de outra célula, sendo que as condições patológicas são frequentemente ligadas à morte celular desregulada, que ocorre de maneira excessiva ou deficiente, como a perda de neurônios e cardiomiócitos, que ocorre de forma aguda em acidentes vasculares encefálicos e infartos ou progressivamente em doenças degenerativas. Por outro lado, a oncogênese é caracterizada pela supressão parcial dos programas de morte celular, o que por sua vez provoca resistência à quimioterapia e radioterapia, dificultando o tratamento do paciente (GALLUZZI et al., 2007).

1.4.1 Apoptose

O processo de morte celular programada é muito importante para a regulação da homeostase em organismos multicelulares, sendo a apoptose o principal exemplo deste tipo de morte. Na apoptose ocorre a formação de bolhas na membrana da célula, encolhimento celular, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (ZAMARAV et al., 2015). Formam-se os chamados corpos apoptóticos, que são pequenos corpos redondos envoltos por membrana e que contem organelas citoplasmáticas e fragmentos do núcleo, que são rapidamente removidos pelas células fagocitárias, sem levar ao desenvolvimento de reação inflamatória (GALLUZZI et al., 2007).

A maioria das alterações morfológicas e bioquímicas que ocorre durante a apoptose são causadas principalmente por uma família de cisteína-proteases, as caspases. As caspases são divididas em dois grupos, as caspases iniciadoras

(caspase-8, 9 e 10), e as executoras (caspase-3, 6 e 7) (KONDRATSKYI et al., 2015). O bloqueio ou diminuição da função das caspases pode resultar em redução da apoptose que conseqüentemente pode desencadear o processo de carcinogênese e o desenvolvimento de outras doenças (GOLDAR et al., 2015).

A morte celular por apoptose pode ser desencadeada por duas principais vias: a via mitocondrial ou intrínseca, e a via por receptor de morte ou extrínseca (GREEN; LLAMBI, 2015).

A via intrínseca pode ser iniciada por estímulos como danos no DNA, estresse oxidativo, acúmulo de proteínas mal dobradas, entre outros. Estes estímulos induzem alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial e liberação de moléculas pró-apoptóticas no citosol, como o citocromo c, que se liga a Apaf-1 (fator-1 de ativação de apoptose) formando um hexâmero, chamado de apoptossoma. Este complexo se liga à caspase-9, que é a desencadeante da via mitocondrial, que irá desencadear o processo de apoptose (KONDRATSKYI et al., 2015).

A via extrínseca é desencadeada por sinais pró-apoptóticos extracelulares que ativam receptores de superfície específicos, chamados receptores de morte (membros da família de receptores de fator de necrose tumoral - TNF). A ligação com os receptores de morte inicia a formação de um complexo denominado complexo de sinalização indutor de morte, que ativa a caspase-8, que é a iniciadora desta via. Apesar dos mecanismos de iniciação serem diferentes, as duas vias estão inter-relacionadas. Após a clivagem das caspases desencadeantes, um programa enzimático de morte é iniciado por ativação sequencial das caspases executoras, que atuam em muitos componentes celulares, como na desmontagem do citoesqueleto por clivagem de proteínas, degradam os componentes da matriz extracelular e promovem a fragmentação do núcleo (KONDRATSKYI et al., 2015).

A ativação da apoptose pode acontecer para que defeitos no desenvolvimento celular causado por mutações sejam bloqueados, impedindo assim a disseminação de células mutadas (ARYA; WHITE, 2015). A sinalização apoptótica apropriada é muito importante para manter o equilíbrio entre a morte e a sobrevivência da célula e na manutenção da integridade do material genético, no entanto no desenvolvimento do câncer, há uma evasão dos mecanismos de apoptose, levando a propagação de células que deveriam ser destinadas à morte (PLATI; BUCUR; KHOSRAVI-FAR,

2011). Portanto, o desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento do câncer que possam modular as vias apoptóticas são de grande importância.

Desvendar a significativa função da morte celular tanto ao processo fisiológico quanto ao patológico é de grande interesse entre os cientistas, cujos esforços de pesquisa buscam uma maior compreensão da morte celular ao nível molecular e também analisar a relação com uma gama de doenças e estratégias terapêuticas. Para estudar as vias de morte celular são utilizados inibidores relacionados à via de interesse. Para bloqueio da apoptose utiliza-se o Z-VAD, um pan inibidor de caspase, que é permeável às células e se liga irreversivelmente ao sítio catalítico das caspases, impedindo a sua ativação, sendo portanto considerado um eficiente bloqueador desta via de morte (DONG et al., 2015). Com a descoberta de inibidores de caspases, que bloqueiam a via canônica da apoptose, foi possível observar que este evento não levava ao aumento da sobrevivência da célula, mas que conduzia à morte celular por outras vias (DEGTEREV, A; LINKERMANN, 2016).

A apoptose é a forma mais bem caracterizada e evolucionária da morte celular programada. Assim, tornou-se de grande interesse a descoberta e melhor caracterização de programas de morte celular diferentes, sendo que a morte celular não apoptótica pode servir tanto para apoiar a apoptose quando eventualmente ocorrer falha ou pode acontecer de forma independente (TAIT; ICHIM; GREEN, 2015).

1.4.2 Necrose e Necroptose

A necrose celular ou morte celular necrótica abrange uma grande variedade de processos de morte celular com um denominador comum: a perda da integridade da membrana plasmática seguida de liberação do conteúdo citoplasmático (YUAN; KROEMER, 2010). Além disso é caracterizada morfológicamente por inchaço das células, disfunção mitocondrial e altos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Apresentando também alterações nucleares características, como cariólise (lise da cromatina), picnose (retração nuclear) e cariorrexe (fragmentação nuclear) (DONG et al., 2015).

A morte por necrose pode ocorrer em consequência a lesões reversíveis onde o estímulo nocivo não é interrompido, portanto a lesão passa a ser considerada irreversível, promovendo alterações no DNA da célula, e também devido a danos

extensos como alta temperatura, tensão mecânica, entre outros, sendo então considerada como um tipo de morte passiva, onde não necessita da ativação de vias de sinalização específicas (TAIT; ICHIM; GREEN, 2015).

Uma significativa importância fisiopatológica está associada à morte com padrão necrótico, pois devido à perda da integridade de membrana e liberação do conteúdo celular, ocorre ativação de uma resposta inflamatória (CHO, 2014). Esta resposta pode ser benéfica na defesa contra patógenos, porém pode ser prejudicial em outras situações, como traumas isquêmicos (ALMAGRO; VUCIC, 2015).

Durante muito tempo a necrose foi considerada como uma morte celular descontrolada, porém um novo tipo de morte celular, considerada como um tipo de necrose programada, vem sendo estudada, e chamada de necroptose (DONG et al., 2015).

A necroptose se assemelha muito à necrose clássica, exibindo tumefação de organelas, lesões precoces na membrana plasmática que culminam em eventual ruptura, porém apresenta fragmentação do DNA, que é observada na apoptose. Como também ocorre na necrose, a perda da integridade da membrana leva ao extravasamento do conteúdo citoplasmático e liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), como interleucina-1, ácido úrico, proteínas do choque térmico (HSP), entre outras, que levam à ativação de uma resposta inflamatória (KACZMAREK; VANDENABEELE; KRYSKO, 2013).

A necroptose pode ser desencadeada pela interação com os receptores de morte, membros da família do TNF, que são os principais mediadores da morte celular. A associação do TNF- α com o receptor TNFR1 (receptor 1 do fator de necrose tumoral) na membrana da célula, leva à formação do complexo I, que é constituído por TRADD (domínio de morte associado ao TNF), TRAF2 (fator 2 associado ao TNF), RIPK1 (proteína quinase 1) e cIAP1 (inibidor celular da apoptose 1). Quando o RIPK1 se mantém ubiquitinado, a célula está destinada à sobrevivência. Se ocorrer a desubiquitinização da RIPK1 pela CYLD ou a inibição da cIAPs, ocorre a formação do complexo II. Este complexo pode ser sistematicamente dividido em IIa e IIb, sendo que no IIa ocorre a ativação das caspases-8, desencadeando o processo de apoptose. Porém, se a caspase-8 for inibida ocorrerá a formação do complexo IIb, também chamado que necrossomo, com consequente fosforilação de RIPK1 e RIPK3 (proteína quinase 3) e oligomerização de MLKL (proteína quinase de linhagem mista), que se desloca para a membrana plasmática,

promovendo a formação de um poro, que leva à modificação do influxo de sódio/cálcio, alterando a pressão osmótica da célula (ZHOU; YUAN, 2014).

Além da indução da necroptose pelo TNF α , outros gatilhos podem desencadear este processo de morte, como os receptores Toll-like, FasL, e também os vírus, porém a necroptose induzida por TNF α é o mecanismo atualmente melhor compreendido (WEGNER; SALEH; DEGTEREV, 2017).

A fosforilação de RIPK1 e RIPK3 é essencial para a formação do necrossomo, que funciona como uma plataforma de sinalização no contexto da ativação da necroptose por TNF α , sendo essenciais para levar à morte da célula por necroptose. Portanto a inibição da atividade destas quinases leva ao bloqueio do desencadeamento da necroptose (DEGTEREV, A; LINKERMANN, 2016).

Inibidores seletivos da necroptose, chamadas de necrostatinas, foram descobertas através da inibição da necroptose induzida pelo TNF- α na linha celular monocítica humana U937. O alvo específico da necrostatina é o RIPK1, atuando no bloqueio da sua atividade catalítica, e promovendo a estabilidade da conformação inativa do domínio quinase no RIPK1, impedindo que se torne ativo, consequentemente inibindo a necroptose (DEGTEREV, A; LINKERMANN, 2016).

Em um estudo realizado por Degterev *et al.* (2005) a necrostatina-1 (Nec-1) foi evidenciada como um dos inibidores da necroptose, e que agia de forma eficiente no bloqueio desta via, apresentando também um papel relevante na regulação da necrose patológica (DEGTEREV *et al.*, 2005). Além da Nec-1, Degterev *et al.* (2008) mostra que outras necrostatinas, como a Nec-3, Nec-4 e Nec-5, que são estruturalmente diferentes, porém apresentam a função comum de inibir a atividade de RIPK1 (DEGTEREV *et al.*, 2008).

1.4.3 Ferroptose

Além das vias de morte já mencionadas, outra via de morte celular foi recentemente descoberta, chamada de ferroptose, que é uma forma de morte celular oxidativa e dependente de ferro, que resulta do acúmulo de peróxido de lipídeos na membrana. Apresenta características diferentes da apoptose e da necrose, como encolhimento do volume celular e aumento da densidade da membrana mitocondrial (YU *et al.*, 2016).

A ferroptose é desencadeada pela inativação das defesas antioxidantes dependentes da glutatona celular (GSH), levando ao acúmulo de ERO. Este tipo de morte celular vem sendo implicado na morte de tecidos renais e cardíacos submetidos a injúria de isquemia-reperfusão, bem como de tecidos cerebrais expostos à altos níveis de glutamato (CAO; DIXON, 2016).

Os indutores da ferroptose podem ser divididos em duas classes, classe 1, que inclui como principal composto a Erastina, que é uma pequena molécula seletivamente letal para as células que apresentam gene RAS mutado, e que promovem a inibição do sistema X_c^- , que é responsável pelo transporte de glutamato e cistina, reduzindo assim o conteúdo de glutatona intracelular com consequente desequilíbrio de oxidação/redução nas células. E os indutores da classe 2, que inclui principalmente o composto seletivo letal 3 de Ras (RSL3), que inibe diretamente a glutatona peroxidase 4 (GPx4), levando ao acúmulo de peróxidos lipídicos (YU et al., 2016).

O excesso de ferro contribui para a ferroptose através da produção de ERO pela reação de Fenton. O ferro circulante está sob a forma férrica (Fe^{3+}) ligado à transferrina, que é transportado para o endossoma onde é reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}). O excesso de ferro é armazenado sob a forma de ferritina, incluindo a de cadeia leve (FTL) e a de cadeia pesada (FTH1). As células sensíveis à ferroptose aumentam a expressão de FTH1 e FTL, sugerindo que o aumento da captação e o armazenamento reduzido de ferro podem contribuir para a sobrecarga de ferro durante a ferroptose, sendo que esta diminuição da sobrecarga por quelantes de ferro (por exemplo, deferoxamina) inibe a ferroptose mediada por erastina. Portanto, o acúmulo de produtos da peroxidação lipídica e de ERO derivados do metabolismo do ferro, podem ser inibidas por quelantes de ferro ou por inibidores de peroxidação lipídica, como a ferrostatina. (XIE et al. 2016).

O estudo das diferentes vias de morte celular apresenta grande utilidade no estudo de diversas doenças, principalmente quando se trata de câncer, que é uma doença de grande relevância no mundo todo. Azevedo e colaboradores (2015) evidenciaram que o tratamento de células de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 com um extrato de veneno de cobra sugere que a morte das células tumorais ocorria por um mecanismo integrado que envolve componentes apoptóticos e autofágicos que trabalham em conjunto para induzir a morte celular, e

que estes dados poderiam ser exploradas para desenvolver novas abordagens terapêuticas (AZEVEDO et al., 2015).

Mfouo-Tynga e colaboradores (2014) realizaram um estudo que buscava investigar os eventos de morte celular em células de câncer de mama humano MCF-7 após uma terapia fotodinâmica, no qual foi possível observar que a terapia desencadeava a morte das células preferencialmente por apoptose e que genes envolvidos nesta via de morte se apresentavam mais ativos (MFOUO-TYNGA et al., 2014). Pode-se concluir portanto, que a possibilidade de descobrir o mecanismo preciso de morte celular desencadeado por um tratamento específico tem uma grande importância no contexto clínico da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os padrões de morte celular induzidos pela metformina em células de câncer de mama humano MCF-7.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os efeitos da metformina sobre a proliferação e atividade metabólica celular após inibição da apoptose, ferroptose e necroptose.

Investigar a porcentagem de apoptose e necrose das células expostas à metformina após inibição da apoptose, ferroptose e necroptose.

Quantificar o estresse oxidativo celular de células expostas à metformina após inibição da apoptose, ferroptose e necroptose.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

O presente trabalho originou um artigo científico que será incluído nessa dissertação como apêndice. Ele foi realizado na Universidade Estadual de Londrina, nos laboratórios de Patologia Molecular e no laboratório de Fisiopatologia e Radicais Livres.

O trabalho será submetido para publicação e intitula-se “Análise dos padrões de morte celular induzida pela metformina em células de câncer de mama humano MCF-7”.

4 CONCLUSÃO

Através dos resultados apresentados neste trabalho podemos concluir que a metformina não induz a morte da célula apenas por uma via, mas que várias vias de morte podem ser ativadas após o tratamento com a droga, o que foi possível ser observado após o tratamento concomitante entre a metformina e os inibidores de morte, que reverteram os efeitos citotóxicos da droga sobre as células.

Quanto aos parâmetros de estresse oxidativo, após o tratamento concomitante com os inibidores de morte, os níveis de antioxidantes se apresentam preservados, o que condiz com resultados já descritos que a morte da célula induzida pela metformina seria mediada pela geração de estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, A.H; MOHAMMED, A.S; RASEDEE, A; MIRGHANI, M.E.S. Oxidative Stress-Mediated Apoptosis Induced by Ethanolic Mango Seed Extract in Cultured Estrogen Receptor Positive Breast Cancer MCF-7 Cells. **Int. J. Mol. Sci.** v. 16, p. 3528-3536, 2015.
- ALMAGRO, M.C; VUCIC, D. Necroptosis: Pathway diversity and characteristics. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** v.9, p. 56–62, 2015.
- ARYA, R; WHITE, K. Cell death in development: signaling pathways and core mechanisms. **Semin Cell Dev Biol.** v. 39, p. 12–19, 2015.
- AZEVEDO, F.P; LOPES, D.S; GIMENES, S.N; ACHÊ, D.C; VECHI, L; ALVES, P.T; GUIMARÃES, D.O; RODRIGUES, R.S; GOULART, L.R; RODRIGUES, V.M. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules,** 2015.
- CAO, J.Y., DIXON, S.J. Mechanisms of ferroptosis. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 73, p. 2195–2209, 2016.
- CHO, Y.S. Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (Review). **International Journal of Molecular Medicine.** v. 33, p. 1401-1406, 2014.
- CINTRA, J.R.D. et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast câncer. **Rev Assoc Med Bras.** v.2, p.178-187, 2011.
- DEGTEREV, A; HITOMI, J; GERMSCHIED, M; CH'EN, I.L; KORKINA, O; TENG, X; ABBOTT, A; CUNY, G.D; YUAN, C; WAGNER, G; HEDRICK, S; GERBER, S.A; LUGOVSKOY, A; YUAN, J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. **Nature Chemical Biology.** v 4, 2008.
- DEGTEREV, A; HUANG, Z; BOYCE, M; LI, Y; JAGTAP, P; MIZUSHIMA, N; CUNY, G.D; MITCHISON, T.J; MOSKOWITZ, M.A; YUAN, J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. **Nature Chemical Biology.** v. 1, 2005.
- DEGTEREV, A; LINKERMANN,A. Generation of small molecules to interfere with regulated necrosis. **Cell. Mol. Life Sci.** 2016.
- DONG, T; LIAO, D; LIU, X; LEI, X. Using Small Molecules to Dissect Non-apoptotic Programmed Cell Death: Necroptosis, Ferroptosis, and Pyroptosis. **Chem Bio Chem.** v. 16, p. 2557 – 2561, 2015.
- ECONOMOPOULOU, P; DIMITRIADIS, G; PSYRRI, A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treatment Reviews.** v. 41, p.1-8, 2015.

FERRO, A., GOYAL, S., KIM, S., WU, H., TAUNK, N. K., SCHIFF, D., PIRLAMARLA, A., HAFFTY, B. G. Evaluation of Diabetic Patients with Breast Cancer Treated with Metformin during Adjuvant Radiotherapy. **Int J Breast Cancer**. v. 2013, p. 659723-659731, 2013.

GALLUZZI, L; MAIURI, M.C; VITALE, I; ZISCHKA, H; CASTEDO, M; ZITVOGEL, L; KROEMER, G. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ**. v. 14, p. 1237–1243, 2007.

GOLDAR, S; KHANIANI, M.S; DERAKHSHAN, S.M; BARADARAN, B. Molecular Mechanisms of Apoptosis and Roles in Cancer Development and Treatment. **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 16, p. 2129-2144, 2015.

GOLOZAR, A; LIU, S; LIN, J.A; PEAIRS, K; YE, H.C. Does Metformin Reduce Cancer Risks? Methodologic Considerations. **Curr Diab Rep**. v.4, p.16, 2016.

GONZALEZ-ANGULO, A. M.; MERIC-BERNSTAM, F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer. **Clin Cancer Res**. v.16, p.1695-1700, 2010.

GREEN, D.R; LLAMBI, F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, 2015.

HOWE, L. R., BROWN, P. H. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. **Cancer Prevention Research**. v. 4, n. 8, p. 1149-1157, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2016. **Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. **CA Cancer Journal for Clinical**. v.61, pg.69-90, 2011.

JOLLY, T., WILLIAMS, G.R., JONES, E., MUSS, H. B. Treatment of metastatic breast cancer in women aged 65 years and older. **Womens Health (Lond Engl)**. v. 8, n. 4, p. 455-71, 2012.

KACZMAREK, A., VANDENABEELE, P., KRYSKO, D.V. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. **Immunity**. v. 38, 2013.

KONDRATSKYI, A; KONDRATSKA, K; SKRYMA, R; PREVARSKAYA, N. Ion channels in the regulation of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta** v. 1848, p. 2532–2546, 2015.

LARSEN, M.J; THOMASSEN, M; GERDES, A.M; KRUSE, T.A. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. **Breast cancer : basic and clinical research**. v.15, p.145-55, 2014.

LEIDY, J; KHAN, A; PATH, F.R.C; KANDIL, D. Basal-like breast cancer: update on clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. **Archives of pathology & laboratory medicine**. v.138, n.1, p.37-43, 2014.

LEONE, A., GENNARO, E. D., BRUZZESE, F., AVALLONE, A., BUDILLON, A. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. **Cancer Treat Res.** v. 159, p. 355-376, 2014.

MALKI, A.; YOUSSEF, A. Antidiabetic drug metformin induces apoptosis in human MCF breast cancer via targeting ERK signaling. **Oncol Res**, v. 19, n. 6, p. 275-85, 2011.

MARINELLO, P.C; SILVA, T.N.X; PANIS, C; NEVES, A.F; MACHADO, K.L; BORGES, F.H; GUARNIER, F.A; BERNARDES, S.S; MORGADO-DÍAZ, J.A; LUIZ, R.C; CECCHINI, R; CECCHINI, A.L. 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. **Tumor Biol.** v. 37, p. 5337-5346, 2016.

MCPHERSON K, STEEL CM, DIXON JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ.** v.321, n.7261, p.624-8, 2000.

MFOUO-TYNGA, I; HOURELD, N.N; ABRAHAMSE, H. Induced Cell Death Pathway Post Photodynamic Therapy Using a Metallophthalocyanine Photosensitizer in Breast Cancer Cells. **Photomedicine and Laser Surgery.** v. 32, 2014.

NATHAN, D. M; BUSE, J.B; DAVISON, M.B; FERRANNINI, E; HOLMAN, R.R; SHERWIN, R; ZINMAN, B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetes Care.** v. 32, p. 193–203, 2009.

NWABO KAMDJE, A.H; ETET, P.F.S; VECCHIO, L; TAGNE, R.S; AMVENE, J.M; MULLER, J.M; KRAMPERA, M; LUKONG, K.E. New targeted therapies for breast cancer: A focus on tumor microenvironmental signals and chemoresistant breast cancers. **World Journal of Clinical Cases.** v.2, n.12, p.769-86, 2014.

PLATI, J; BUCUR, O; KHOSRAVI-FAR,R. Apoptotic cell signaling in cancer progression and therapy. **Integr Biol.** v.3, p. 279-96, 2011.

PEROU, C.M; SORLIE, T; EISEN, M.B; RIJIN, M; JEFFREY, S.S; REES, C.A; POLLACK, J.R; ROSS, D.T; JOHNSEN, H; AKSLEN, L.A; FLUGE,O; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** v.406, n.6797, p.747-52, 2000.

QUEIROZ, E.A.I.F. PUUKILA, S; EICHLER, R; SAMPAIO, S.C; FORSYTH, H.L; LEES, S.J; BARBOSA, A.M; DEKKER, R.F.H; FORTES, Z.B; KHAPER, N. Metformin Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest Mediated by Oxidative Stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 Breast Cancer Cells. **PLOS ONE.** v. 9, 2014.

QUINN, B. J., KITAGAWA, H., MEMMOTT, R. M., GILLS, J. J., DENNIS, P. A. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. **Trends Endocrinol Metab.** v. 24, n. 9, p. 469-80. 2013.

RINGNÉR, M., STAAF, J., JONSSON, G. Nonfamilial breast cancer subtypes. **Methods Mol Biol.** v. 973, p. 279-295, 2013.

SØRLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H, HASTIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, THORSEN T, QUIST H, MATESE JC, BROWN PO, BOTSTEIN D, LØNNING PE, BØRRESEN-DALE AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v.98, n.19, p.10869-74, 2001.

TAIT, S.W.G; ICHIM, G; GREEN, D.R. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. **J Cell Sci.** v. 10, p. 2135–2144, 2015.

WANG, F; LI, Y.C; LIU, L.P; ZHANG, H.M; TONG, S. Circulating Tumor Cells and Tumor Stem Cells Detection in the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Breast Cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** v.00, p. 1–7, 2016.

WEGNER, K.W.,SALEH, D., DEGTEREV, A. Complex Pathologic Roles of RIPK1 and RIPK3: Moving Beyond Necroptosis. **Trends in Pharmacological Sciences,** 2017.

WICKI, A.; ROCHLITZ, C. Targeted therapies in breast cancer. **Swiss Medical Weekly.** v. 142, p. 13550, 2012.

XIE, Y; HOU, W; YU, Y; HUANG, J; SUN, X; KANG, R; TANG, D . Ferroptosis: process and function. **Cell Death and Differentiation.** v. 23, p. 369–379, 2016.

YU, H; GUO, P; XIE, X; WANG, Y; CHEN, G. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. **J. Cell. Mol. Med.** p. 1-10, 2016.

YUAN J, KROEMER G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. **Genes Dev.** v. 24, p. 2592–2602, 2010.

ZAMARAEV, A; KOPEINA, G.S; ZHIVOTOVSKY, B; LAVRIK, I.N. Cell death controlling complexes and their potential therapeutic role. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 72, p. 505–517, 2015.

ZHOU, W. YUAN, J. Necroptosis in health and diseases. **Seminars in Cell & Developmental Biology.** v.35, p. 14–23, 2014.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Artigo

Analysis of cell death patterns induced by metformin in human MCF-7 breast cancer cells

Natália Medeiros Dias Lopes ^a, Poliana Camila Marinello ^a, Larissa Juliani Sanches ^a, Walison Augusto da Silva Brito ^a, Maria Isabel Lovo Martins ^c, Phileno Pinge Filho ^c, Rodrigo Cabral Luiz ^a, Rubens Cecchini ^b, Alessandra Lourenço Cecchini ^a.

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

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

^c Laboratory of Experimental Immunopathology, State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil.

Corresponding author: Alessandra Lourenço Cecchini Armani

E-mail: alcecchini@uel.br

Fax: +55 (43) 3371 42 67

Phone: +55 (43) 3371 4529

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

Abstract

Metformin, a drug used to treat type 2 diabetes, has been studied for its therapeutic potential among various types of cancer, including breast cancer. It has been reported that metformin would trigger cell death through the generation of oxidative stress, but the pathway of death that is being activated is not well understood. We analyzed the importance of apoptosis, necroptosis and ferroptosis in the toxicity of metformin in MCF-7 cells, evaluating proliferation, viability and oxidative stress after the use of specific inhibitors of pathways of death, such as Z-vad a pan-caspase inhibitor that blocks death by apoptosis, Necrostatin-1 which inhibits RIPK1 activity and blocks necroptosis, and the iron chelator Deferoxamine that prevents cell death by ferroptosis. The participation of oxidative stress was analyzed through the parameters of total thiol, GSH, GSSG and malondialdehyde.

Our results show that metformin does not induce tumor cell death by only one route, since after the concomitant treatment between metformin and the inhibitors of apoptosis, necroptosis and ferroptose used, we observed that they were able to reverse the effect of the drug on the cells. Regarding the participation of oxidative stress, when using the inhibitors of cell death antioxidant levels were restored, which is consistent with previous studies indicating the participation of oxidative stress in metformin-induced cell death.

Keywords: metformin, cell death, breast cancer, oxidative stress.

Introduction

Breast cancer is the neoplasia with the highest incidence and mortality among women in the world. Due to the high rates of development of resistance to chemotherapy, the discovery of new alternatives for the treatment of the disease is a necessity (TORRE et al., 2015; LARSEN et al., 2014).

Metformin, a drug used to treat type 2 diabetes, has been shown to be a possible alternative for the treatment of cancer patients (NATHAN et al., 2009; FERRO et al., 2013). In breast cancer, the use of this drug was associated with an improvement in the clinical and pathological profile of patients, and greater sensitivity to radiotherapy, when compared to patients who did not receive metformin (FERRO et al., 2013).

Regarding Marinello et al. (2016) the mechanisms of metformin action, *in vitro* studies demonstrated that used two human breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231) to investigate the mechanism of action of the drug, and were able to observe that metformin exerted a pro-apoptotic effect and induced death of the tumor cell through the participation of oxidative stress (MARINELLO et al., 2016).

The process of cell death is fundamental for the maintenance of the homeostasis of a multicellular organism (ARYA, WHITE, 2015). Considered the main form of programmed death, apoptosis is triggered by the sequential activation of cysteine proteases, known as caspases, which culminate in the activation of its canonical pathway. Therefore, the use of a caspase inhibitor, such as Z-vad, blocks cell death by apoptosis (HAHNE et al., 2013; DEGTEREV et al., 2005).

In the absence of caspase activation, a type of regulated necrosis prevails. Necroptosis has recently been discovered and is an alternative non-apoptotic death pathway, triggered by signaling through the death domain receptors (DEGTEREV et

al., 2005). In this type of death, the interaction between the complex formed after the activation of the death receptors with the receptor-interacting protein kinase 1 (RIPK1), leads to the phosphorylation of RIPK3 and necrosome formation, which phosphorylates the mixed-lineage kinase domain-like protein (MLKL) and triggers necroptosis in several cell types (ZHANG et al., 2016). To demonstrate the existence of this pathway, and to distinguish it from other pathways of death, an inhibitor has been identified and has been called Necrostatin-1 (Nec-1). This inhibitor blocks RIPK1 and blocks necroptosis (DEGTEREV et al., 2005).

Another type of cell death, recently discovered, is ferroptosis, which is a form of oxidative and iron dependent cell death, which results from accumulation of lipid peroxide in the membrane. Because it is an iron-dependent pathway, when using a chelator, such as Deferoxamine (DFO), this pathway is inhibited. (YU et al., 2016).

Many drugs used in the treatment of cancer act to induce apoptosis of the cells, however neoplastic cells, that are resistant to this type of death, are more resistant to the treatment, for this reason the study of the different types of cell death is of great importance. Therefore, this work aims to analyze the importance of apoptosis, necroptosis and ferroptosis in the toxicity of metformin in MCF-7 cells, evaluating proliferation, viability and oxidative stress after the use of specific inhibitors of these pathways of death.

Methods and Materials

Cell culture and treatment

MCF-7 cells (ATCC® HTB-22™, ATCC, Manassas, VA, USA) were seeded in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium/nutrient mixture (DMEM) (Gibco® Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (DMEM 10% FBS), and 1% penicillin-streptomycin mixture. Cells were maintained in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C (Sanyo CO₂ Incubator; Sanyo, Japan). The assays were performed by seeding 10⁵ cells in 24-well plates or 10⁶ cells in culture flasks and culturing them in fresh culture medium for 24 h. Cells were then exposed to metformin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) at two concentrations (1 and 5 mM) for 24 h. These concentrations were chosen based on results of our group that demonstrated that these concentrations induced cell death (Marinello et al., 2016). The cells were pretreated with Z-VAD (10µM) or Nec-1 (50µM) for one

hour before being exposed to metformin, as previously described by Mooney et al., 2002 and Araujo et al., 2014, respectively. Treatment with DFO (100 μ M) was done concomitantly with metformin as previously described by Ma et al., 2015. All the experiments were performed in triplicate and repeated thrice, and all analyses were performed after 24 h of metformin treatment.

Cell viability

Cellular metabolic activity was measured by (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT) assay as described by Mosmann, 1983. To perform the MTT assay, the cells were seeded in 24-well plates, as previously explained. After treatment, 0.4mM MTT solution was added and incubated at 37°C for 2h. The formazan crystals formed were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO). Results were measured using a microplate reader (Multiskan GO; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) at 540 nm.

Cell proliferation assays

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

Annexin V-FITC/propidium iodide staining

The cells were washed and trypsinized after treatment. Cellular suspension was centrifuged 600 xg (4°C, 3 min) and cells were stained using the Annexin V-FITC/PI kit (BD, USA), as described previously by Cai et al., 2015 by flow cytometry. Double-negative cells were considered intact, annexin⁺/PI⁻ cells are presumably in early apoptosis and the annexin⁻/PI⁺ were considered necrotic. Results were expressed in percentage of apoptotic and necrotic cells.

Oxidative stress parameters

To determine the treatment effects on cellular oxidative stress, we evaluated total thiol, malondialdehyde and reduced and oxidized glutathione.

Determination of total thiol levels

Total thiol levels were measured as previously described by Panis et al., 2013. Thiol groups were calculated using a calibration curve prepared with reduced glutathione (GSH) (Sigma Aldrich) and the results were expressed in μM thiol/ g of total protein. Total protein content was determined based on the method of Lowry, modified by Miller (Lowry et al., 1951, Miller, 1959).

Determination of intracellular malondialdehyde levels

The malondialdehyde was measured as previously described by Victorino et al., 2013, with some modifications, described by Marinello et al., 2016. It was used a high performance liquid chromatograph (Shimadzu HPLC-20AT) equipped with a pump and LC20AT UV absorbance detector SPD20A diode-array employing a reverse phase C18 column, without the use of pre-column. The cells suspension were incubated with perchloric acid and then with 0.5M thiobarbituric acid (TBA) at 100°C for 30 minutes. The reaction was cooled in an ice bath and centrifuged at $5000 \times g$ at 4°C . The readings are taken at 535nm during 11 minutes and the results were expressed in nM MDA / protein (g).

Determination of glutathione levels

Reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively) were determined in cell suspension as previously described by Locatelli et al., (2009), using $60 \mu\text{M}$ 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) in a 1 M TRIS buffer. Results were expressed in μM GSH or GSSG/ g of total protein.

Statistical analysis

Data were analysed for normality. For parametric data it was used one-way analysis of variance (ANOVA), followed by *Tukey's* post test. Data analysis was conducted using GraphPad Prism (version 5; San Diego, CA, USA) and significance was assigned for $p < 0.05$.

Results

Cellular metabolic activity and proliferation

In the MTT assay, the two metformin concentrations, when used alone, significantly decreased the metabolic activity of the cell compared to the control, in

the three situations in which the inhibitors were used (Fig. 1A, B and C). When treatment with Z-vad alone and when metformin was associated with Z-vad, metabolic activity was reestablished to control levels, at both metformin concentrations (Fig. 1A), as well as in the treatment with Nec-1 (Fig. 1B). Regarding treatment with DFO, the concentration of 1mM metformin associated with DFO intensified the reduction of the metabolic activity of the cell, as well as when DFO was used alone (Fig. 1C).

The proliferation assay demonstrated that the two concentrations of metformin were able to decrease cell proliferation in the three conditions (Fig. 1, D, E and F). When Z-vad and Nec-1 was used alone, they don't alter cell proliferation, but when metformin was used concomitantly with Z-vad and Nec-1, the proliferation was significantly increased (Fig. 1D and 1E, respectively). However, when DFO was used alone its decrease cell proliferation, but when associated with metformin, only the concentration of 5 mM of metformin was able to reestablish proliferation (Fig. 1F).

Cell death patterns

The analysis of cell death pathways by flow cytometry demonstrated that treatment with the two concentrations of metformin significantly increased the percentage of apoptotic cells when compared to the control, in the three conditions of treatment with cell death inhibitors (Fig. 2, A, B and C). The association with Z-vad and metformin only reverted apoptosis induction in the highest concentration of metformin (Fig 2A). When Nec-1 and DFO were used, it was observed reduction in apoptosis with the two concentrations of metformin (Fig. 2B and 2C, respectively).

In relation to necrotic cells, only the treatment with 5mM of metformin significantly increased necrosis in the three situations (Fig. 2, D, E and F). The Z-vad treatment alone was able to increase necrosis and the concomitant treatment with Z-vad and metformin (1mM) increased the percentage of necrotic cells, when compared with metformin treatment alone. However, the association with Z-vad and metformin (5mM) reduced the percentage of necrotic cells (Fig 2D). Nec-1 treatment did not alter the necrosis induced by metformin but DFO reduced the necrosis (Fig. 2F). Nec-1 and DFO treatments did not interfere in necrosis when used without metformin.

Oxidative stress parameters

Quantification of total thiol demonstrated that metformin reduced thiol levels in MCF-7 cells at both concentrations (Fig. 3, A, B and C). The Z-vad treatment alone also reduced thiol levels, but the association with metformin restored thiol to control levels (Fig. 3A). Nec-1 treatment also reduced thiol levels and the association with metformin only reestablished thiol in the concentration of 1mM of metformin (Fig. 3B). DFO increased thiol when used alone and restored thiol to control levels when associated with metformin at both concentration (Fig. 3C).

The analysis of lipid peroxidation by MDA, showed that both concentrations of metformin were able to significantly raise MDA levels (Fig. 3, D, E and F). Z-vad also increased MDA levels when used alone and when associated with metformin 1mM (Fig. 3D). Nec-1 and DFO alone also increased MDA levels (Fig. 3E and F, respectively), but the association between Nec-1 and metformin 5mM significantly restored MDA to control levels (Fig 3E). DFO association with metformin 1mM increased MDA when compared to metformin treatment alone (Fig. 3F).

With regard to GSH levels, both concentrations of metformin significantly decreased their concentration (Fig. 4, A, B and C). Z-vad did not interfere with GSH when used alone, but was able to increase this levels when associated with metformin (Fig 4A). The same was observed for Nec-1 and for DFO (Fig. 4B and 4C, respectively), however Nec-1 increased GSH levels when used alone (Fig. 4B).

In relation to GSSG, the two concentrations of metformin were able to reduce their amount (Fig. 4, D, E and F). Z-vad treatment also reduced GSSG when used alone, but return its concentrations to control levels when associated with metformin 5mM (Fig 4D). Nec-1 and DFO increased GSSG when used alone and when used with metformin (Fig. 4, E and F, respectively).

Discussion and Conclusion

The antitumor activity of metformin and its possible use as an adjuvant therapy has been reported for several types of cancer (LEONE et al., 2014; QUINN et al., 2013). However, the mechanism by which metformin leads to tumor cell death is still unclear. To better analyze this mechanism we used a human MCF-7 breast cancer cell line.

In the MTT assay, where we analyzed cellular metabolic viability, we observed that metformin was able to reduce cell viability at the two concentrations in which it

was used, and according to Marinello et al. (2016) (MARINELLO et al., 2016). We used inhibitors of cell death pathways to analyze the possible pathways that would be related to the action of metformin. When we used the pan-caspase inhibitor, Z-vad, it was possible to observe that both metabolic activity and cell proliferation were restored to control levels, suggesting that Z-vad blockade of apoptosis inhibits the effect of metformin on cell viability.

In order to investigate the importance of necroptosis, ferroptosis and apoptosis in toxicity of metformin to cells we associated the drug with the three inhibitors and analyzed the percentage of necrosis and apoptosis by flow cytometry. However it is not possible to differentiate morphologically if the cell death was by necrosis, necroptosis or ferroptosis, since these pathways present a necrotic pattern of cell death. When analyzing the percentage of death due to apoptosis and necrosis, it was observed that Z-vad decreased the apoptosis triggered by metformin, which indicates that apoptosis induced by metformin is dependent of caspases. Regarding necrosis, we observed its increase. It has been reported that there are forms of cell death that are independent of caspases, and that caspase inhibitors can accelerate other forms of cell death (NICOTERA; MELINO, 2004), such as necroptosis, for exemple, that is detected by staining with PI (DEGTEREV et al., 2005). This also explains increased necrosis when the cell was treated with Z-vad only.

In addition to observing by which way the cell would be dying, we also decided to observe how this death is being triggered, thus analyzing some parameters of oxidative stress, since it was previously described that the oxidative stress is related to the cytotoxicity induced by metformin. It has been described that the generation of intracellular oxidative stress is responsible for the consumption of glutathione (oxidized and reduced, GSSG and GSH, respectively), and induction of apoptosis (GHIBELLI et al., 1998), in this work it was also observed since the cytotoxicity of metformin was accompanied by oxidative stress, with reduction of GSH, thiol and increase of MDA. Inhibition of apoptosis by the association between Z-vad and metformin was accompanied by the reestablishment of cellular antioxidants (thiol and GSH), however, MDA levels remained high. These results demonstrate that inhibition of caspases was effective in preventing the consumption of cellular antioxidants by metformin, but did not reverse lipoperoxidation. Interestingly, Z-vad alone also increased MDA, suggesting that, by mechanisms not yet described, the inhibition of cellular caspases is responsible for increasing lipoperoxidation.

The use of Nec-1, the necroptosis inhibitor, (DEGTEREV; LINKERMANN, 2016) associated with metformin in the MTT assay, promoted the restoration of metabolic activity and cell proliferation, indicating that the reduction of cell viability caused by metformin is also dependent on RIPK1, a similar result was found by Babcook et al. (2014), where metformin in combination with simvastatin promoted cell cycle arrest in prostate cancer cells resistant to castration, and this effect is dependent on RIPK1 and RIPK3 (BABCOOK et al., 2014). The participation of RIPK1 in the cytotoxicity of metformin in breast cancer has not been studied yet.

When analyzing apoptosis after treatment with Nec-1 in combination with metformin, it can be observed that there was a decrease in the percentage of apoptotic cells through annexin V staining. This could be justified by the fact that the initial process of apoptosis and necroptosis are similar, and the externalization of phosphatidylserine to necroptosis could be blocked by Nec-1 (MENG et al., 2016). In addition, RIPK1 is also able to control apoptosis (NEWTON, K., 2015). With regard to metformin-induced necrosis, the use of Nec-1 did not promote change in its rates.

Some tumors may have elevated levels of antioxidants, such as glutathione, which is the most abundant antioxidant within the cell, and makes neoplastic cells more resistant to chemotherapy (TRAVERSO et al., 2013). Due to this fact, therapeutic strategies aimed to decrease antioxidant defenses, thus increasing the sensitivity of tumor cells to chemotherapy treatment has been increasingly studied (GALADARI et al., 2017). Our results show that the two concentrations of metformin decreased the intracellular concentration of GSH, suggesting metformin as a potential therapeutic agent capable of reducing antioxidant defense levels, which could reduce the resistance to chemotherapeutic treatment.

Under oxidative equilibrium conditions, two molecules of GSH can be converted into a GSSG molecule, which can be reduced to its reduced form by the action of glutathione reductase (FLOHÉ, 2013). However, on certain oxidative stress conditions an imbalance of this reaction occurs, with increase of GSSG and reduction of GSH (KHAZIM et al., 2014). However, in our results we observed a reduction of GSH and GSSG, which can be explained by the fact that the treatment with the two concentrations of metformin reduced the levels of intracellular total thiol.

Concomitant treatment of metformin and Nec-1 promoted the increase in GSH levels, which is consistent with the results found by Xu et al., (2007), who observed that Nec-1 was able to prevent the consumption of antioxidants in neuronal cells

treated with glutamate, suggesting that Nec-1 would increase intracellular levels of GSH (XU et al., 2007). However, the authors observed that although Nec-1 reverses the antioxidant consumption generated by the treatment, it has not been able to reduce cellular damage caused by the administration of hydrogen peroxide to the cells. Similarly, we found that although Nec-1 prevented GSH consumption, MDA levels remained high, indicating that Nec-1 partially reversed the generation of oxidative stress by metformin.

Ferroptosis is an oxidative and iron-dependent form of death (CAO; DIXON, 2016). Besides being important in this type of death, iron is essential for cell proliferation, being part of several biochemical reactions of vital importance for the cells (MACKOVA et al., 2012), this explains why we did not find recovery of cellular metabolic activity when we associated DFO and metformin, as well as explain the reduction of cell viability and proliferation found in the cells that received DFO only. On the other hand, the administration of DFO was responsible for reducing apoptosis and necrosis induced by metformin, indicating the importance of iron in the cytotoxicity of metformin.

With respect to oxidative stress parameters, DFO promotes an increase in the levels of thiol and GSH, which is consistent with data from Potuckova et al. (2014), which shows the antioxidant capacity of iron chelators, including DFO in MCF-7 cells (POTUCKOVA ET AL. 2014). The lysosomal membrane is more vulnerable to ROS-mediated damage, due to the lack of an intrinsic antioxidant defense. When ROS increases, hydrogen peroxide reacts with iron and occurs the formation of hydroxyl radicals, which are highly reactive molecules, promoting membrane destabilization and lipid peroxidation (TERMAN et al., 2006). With this in mind, when using an iron chelator, these changes could then be suppressed, but in a study by Venkatesan et al., (2016), DFO was not able to promote this inhibition in MCF-7 cells. Which agrees with our analysis that despite treatment with DFO, MDA levels did not decrease after the induction of oxidative stress by metformin (VENKATESAN et al., 2016).

From the analysis of the results we can conclude that metformin does not induce a single type of death in MCF-7 cells (Fig. 5), since the three inhibitors of cell death used were able to revert the toxic effects of the drug. This probably occurs because the drug strongly interferes with the cellular metabolism, being able to activate different mechanisms of death. In addition, the preservation of cellular antioxidants was found in all evaluated situations and for this reason appears to have

been important in the protection of metformin-induced cell death, corroborating with previous studies indicating the generation of oxidative stress as an important mechanism of metformin cytotoxicity. Together, this study reveals new mechanisms for metformin-mediated-cell-death and clearly add one more path to metformin anticancer activity.

References

ARAUJO, CB; RUSSO, LC; CASTRO, LM; FORTI, FL; MONTE, ER; RIOLI, V; GOZZO, FC; COLQUHOUN, A; FERRO, ES. A Novel Intracellular Peptide Derived from G1/S Cyclin D2 Induces Cell Death. *The journal of biological chemistry*. v. 289, p. 16711–16726, 2014.

ARYA, R; WHITE, K. Cell death in development: signaling pathways and core mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*. v. 39, p. 12–19, 2015.

BABCOOK, MA; SRAMKOSKI, RM; FUJIOKA, H; DANESHGARI, F; ALMASAN, A; SHUKLA, S; NANAVATY, RR; GUPTA, S. Combination simvastatin and metformin induces G1-phase cell cycle arrest and Ripk1- and Ripk3-dependent necrosis in C4-2B osseous metastatic castration-resistant prostate cancer cells. *Cell Death and Disease*. v.5, 2014.

CAI, XY, XIA Y, YANG SH, LIU XZ, SHAO ZW, LIU YL, YANG W, XIONG LM. Ropivacaine- and bupivacaine-induced death of rabbit annulus fibrosus cells in vitro: involvement of the mitochondrial apoptotic pathway. *Osteoarthritis Cartilage*. v. 10, p.1763-1775, 2015.

CAO, J.Y., DIXON, S.J. Mechanisms of ferroptosis. *Cell. Mol. Life Sci*. v. 73, p. 2195–2209, 2016.

CHO, Y.S. Perspectives on the therapeutic modulation of an alternative cell death, programmed necrosis (Review). *International Journal of Molecular Medicine*. v. 33, p. 1401-1406, 2014.

DEGTEREV, A; HUANG, Z; BOYCE, M; LI, Y; JAGTAP, P; MIZUSHIMA, N; CUNY, G.D; MITCHISON, T.J; MOSKOWITZ, M.A; YUAN, J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*. v. 1, 2005.

DEGTEREV, A; LINKERMANN,A. Generation of small molecules to interfere with regulated necrosis. *Cell. Mol. Life Sci*. 2016.

FERRO, A., GOYAL, S., KIM, S., WU, H., TAUNK, N. K., SCHIFF, D., PIRLAMARLA, A., HAFFTY, B. G. Evaluation of Diabetic Patients with Breast Cancer Treated with Metformin during Adjuvant Radiotherapy. *Int J Breast Cancer*. v. 2013, p. 659723-659731, 2013.

FLOHÉ, L. The fairytale of the GSSG/GSH redox potential. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830. p. 3139–3142, 2013.

GALADARI, S; RAHMAN, A; PALLICHANKANDY, S; THAYYULLATHIL, F. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? *Free Radical Biology and Medicine*. v.104, p. 144–164, 2017.

GHIBELLI, L; FANELLI, C; ROTILIO, G; LAFAVIA, E; COPPOLA, S; COLUSSI, C; CIVITAREALE, P; CIRIOLO, MR. Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J*. v.12, p.479–486, 1998.

HAHNE, JC; SCHMIDT, H; MEYER, SR; ENGEL, JB; DIETL, J; HONIG, A. Anti-tumour activity of phosphoinositide-3-kinase antagonist AEZS 126 in models of triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. v. 139, p. 905–914, 2013.

KHAZIM, K; GIUSTARINI, D; ROSSI, R; VERKAIK, D; CORNELL, J.E; CUNNINGHAM, S.E.D; MOHAMMAD, M; TROCHTA, K; LORENZO, C; FOLLI, F; BANSAL, S; FANTI, P. Glutathione Redox Potential is Low and Glutathionylated and Cysteinylated Hemoglobin Levels are Elevated in Maintenance Hemodialysis Patients. v. 162, p. 16–25, 2014.

LARSEN MJ, THOMASSEN M, GERDES AM, KRUSE TA. Hereditary breast cancer: clinical, pathological and molecular characteristics. *Breast cancer: basic and clinical research*. v.15, p.145-55, 2014.

LEONE, A., GENNARO, E. D., BRUZZESE, F., AVALLONE, A., BUDILLON, A. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Cancer Treat Res*. v. 159, p. 355-376, 2014.

LOWRY, OH; ROSENBROUGH, NJ; FARR, AL; RANDALL, RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*. v. 193, p. 265-75, 1951.

LOCATELLI, C; LEAL, PC; YUNES, RA; NUNES, RJ; CRECZYNSKI-PASA, TB. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between free radical generation, glutathione depletion and cell death. *Chemico-Biological Interactions*. v. 181, p.175-84, 2009.

MA, S; HENSON, ES; CHEN, Y; GIBSON, SB. Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells. *Cell Death and Disease*. v. 7, 2015.

MARINELLO, P.C; SILVA, T.N.X; PANIS, C; NEVES, A.F; MACHADO, K.L; BORGES, F.H; GUARNIER, F.A; BERNARDES, S.S; MORGADO-DÍAZ, J.A; LUIZ, R.C; CECCHINI, R; CECCHINI, A.L. 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. *Tumor Biol*. v. 37, p. 5337-5346, 2016.

MACKOVA, E; HRUSKOVA, K; BENDOVA, P; VAVROVA, A; JANSOVA, H. HASKOVA, P; KOVARIKOVA, P; VAVROVA, K; SIMUNEK, T. Methyl and ethyl ketone analogs of salicylaldehyde isonicotinoyl hydrazone: Novel iron chelators with selective antiproliferative action. *Chemico-Biological Interactions*. v. 197, p. 69-79, 2012.

MENG, MB; WANG, HH; CUI, YL; WU, ZQ; SHI, YY; ZAORSKY, NG; DENG, L; YUAN, ZY; LU, Y; WANG, P. Necroptosis in tumorigenesis, activation of anti-tumor immunity, and cancer therapy. *Oncotarget*. v.7, p. 57391-57413, 2016.

MILLER GL. Protein determination for larger numbers of samples. *Anal Chem*. v. 31, p. 964, 1959.

MOONEY, LM; AL-SAKKAF, KA; BROWN, BL; DOBSON, PRM. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer Cells. *British Journal of Cancer*. v. 87, p. 909 – 917, 2002.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 65, 55-63, 1983.

NATHAN, D. M; BUSE, J.B; DAVISON, M.B; FERRANNINI, E; HOLMAN, R.R; SHERWIN, R; ZINMAN, B. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care*. v. 32, p. 193–203, 2009.

NEWTON, K. RIPK1 and RIPK3: critical regulators of inflammation and cell death. *Trends Cell Biol*. v. 25, p. 347-53, 2015.

NICOTERA, P; MELINO, G. Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*. v. 23, p. 2757–276, 2004.

PANIS C, HERRERA AC, VICTORINO VJ, ARANOME AM, CECCHINI R. 2013. Screening of circulating TGF- β levels and its clinicopathological significance in human breast cancer. *Anticancer Res*. 33, 737-742.

POTUCKOVA, E; JANSOVA, H; MACHACEK, M; VAVROVA, A; HASKOVA, P; TICHOTOVA, L; RICHARDSON, V; KALINOWSKI, DS; RICHARDSON, DR; SIMUNEK, T. Quantitative Analysis of the Anti-Proliferative Activity of Combinations

of Selected Iron-Chelating Agents and Clinically Used Anti-Neoplastic Drugs. PLOS ONE. v. 9, 2014.

QUINN, B. J., KITAGAWA, H., MEMMOTT, R. M., GILLS, J. J., DENNIS, P. A. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. Trends Endocrinol Metab. v. 24, n. 9, p. 469-80. 2013.

TERMAN, A; KURZ, T; GUSTAFSSON, B; BRUNK, UT. Lysosomal labilization. Life, v. 58, p. 531 – 539, 2006.

TICE, RR; AGURELLI, E; ANDERSON, D; BURLINSON, B; HARTMANN, A; KOBAYASHI, H; MIYAMAE, Y; ROJAS, E; RYU, JC; SASAKI, YF. Single Cell Gel/Comet assay: Guideline for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, Environ. Mol. Mutagen. 2000; 35: 206-21.

TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, FERLAY J, LORTET-TIEULENT J, JEMAL A. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer Journal for Clinical. v.65, n.2, p.87-108, 2015.

TRAVERSO, N; RICCIARELLI, R; NITTI, M; MARENCO, B; FURFARO, A.L; PRONZATO, M.A; MARINARI, U.M; DOMENICOTTI. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. v.2013, p. 1-10, 2013.

VENKATESAN, T; CHOI, YW; MUN, SP; KIM, YK. Quantitative Analysis of the Anti-Proliferative Activity of Combinations of Selected Iron-Chelating Agents and Clinically Used Anti-Neoplastic Drugs. Cell Biol Toxicol. 2016.

VICTORINO VJ, PANIS C, CAMPOS FC, CAYRES RC, COLADO-SIMÃO AN, OLIVEIRA SR, HERRERA ACSA, CECCHINI AL, CECCHINI R., 2013. Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women. AGE 35, 1411-1421.

XU, Xingshun; CHUA, CC; KONG, JIMING; KOSTRZEWA, RM; KUMARAGURU, U; HAMDY, RC; CHUA, BHL. necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in ht-22 cells. *Journal of Neurochemistry*, v. 103, p. 204-2014, 2007.

YU, H; GUO, P; XIE, X; WANG, Y; CHEN, G. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumourous diseases. *J. Cell. Mol. Med.* p. 1-10, 2016.

ZHANG, Z; LI, HM; ZHOU, C; LI, Q; ZHANG, Z; SUN, Y; WANG, L; ZHANG, X; ZHU, B; HONG, YS; WU, CZ; LIU, H. Non-benzoquinone geldanamycin analogs trigger various forms of death in human breast cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* v. 35, p. 149, 2016.

Figures

Fig. 1

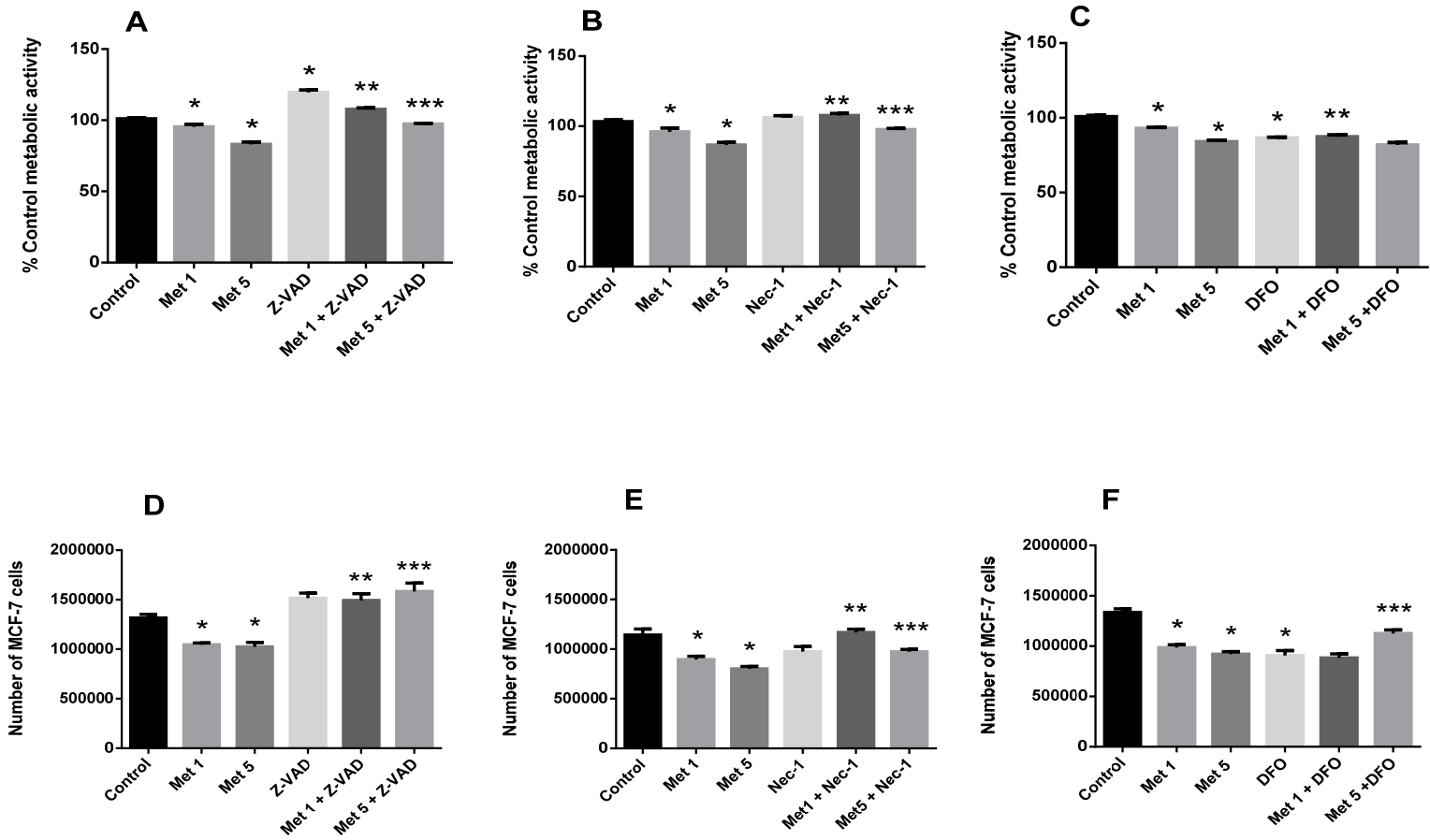


Figure 1. Effects of metformin and cell death inhibitors on cellular metabolic activity and proliferation. A, B and C: MTT assay for concomitant treatment with metformin (1 and 5 mM, 24h) and Z-vad (10 μ M), Necrostatin 1 (Nec-1, 50 μ M) and Deferoxamine (DFO, 100 μ M), respectively. C, D and F: Cell proliferation assay for concomitant treatment metformin (1 and 5 mM, 24h) and Z-Vad, Nec-1 and DFO, respectively. * $p < 0.05$; statistically different from the control group. **: different from metformin 1mM. ***: different from metformin 5mM.

Fig. 2

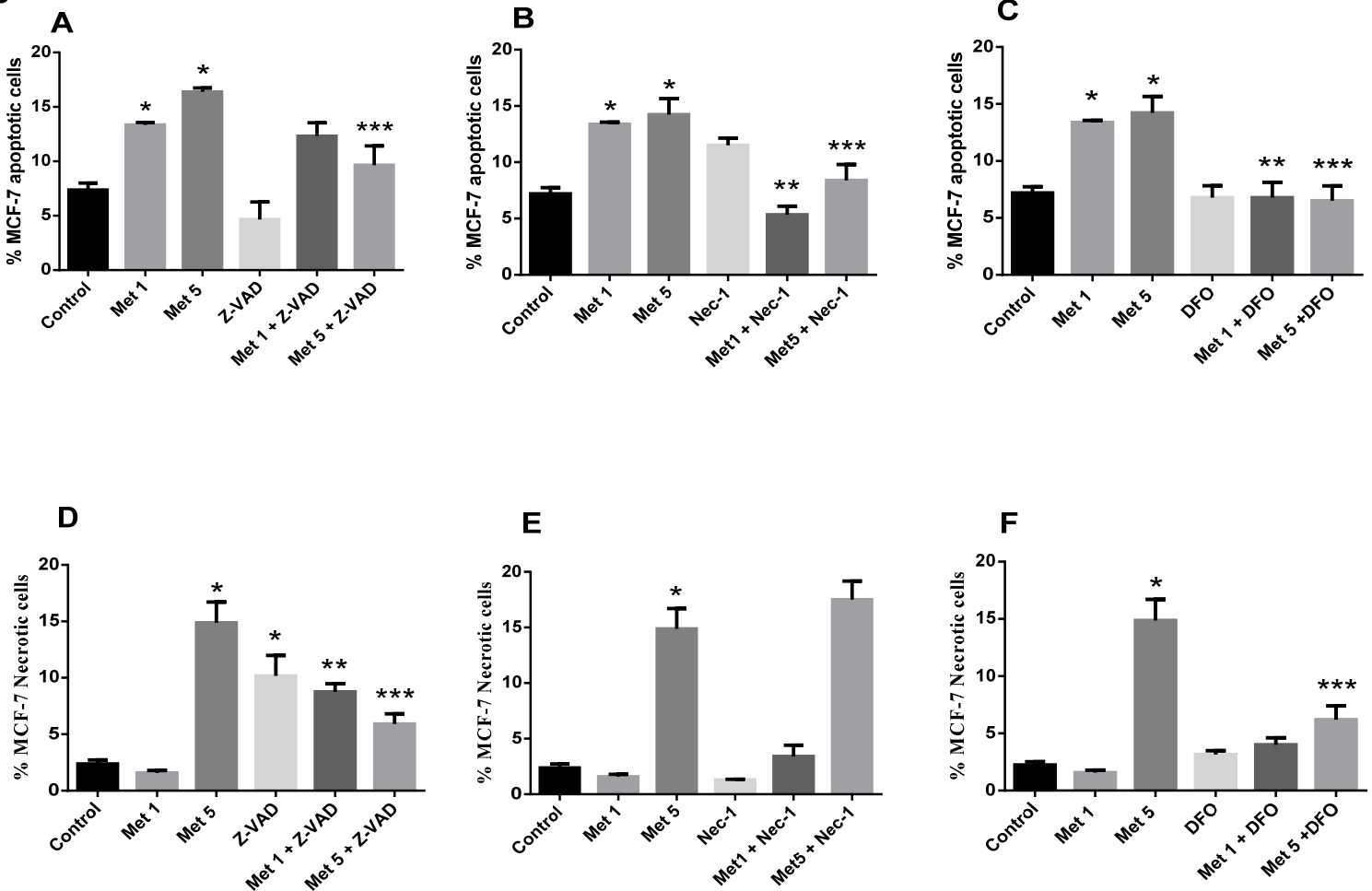


Figure 2. Cell death patterns induced by metformin and cell death inhibitors in MCF-7 cells. Analysis of cell death by annexin V-FITC/Propidium iodide staining by flow cytometry after treatment with metformin and inhibitors of cell death for 24 hours. A, B and C: percentage of apoptotic cells after concomitant treatment with metformin (1 and 5 mM) and Z-vad (10 μ M), Necrostatin 1 (Nec-1, 50 μ M) and Deferoxamine (DFO, 100 μ M), respectively. C, D and F: percentage of necrotic cells after concomitant treatment with metformin (1 and 5 mM) and Z-Vad, Nec-1 and DFO, respectively. *p < 0.05; statistically different from the control group. **: different from metformin 1mM. ***: different from metformin 5mM.

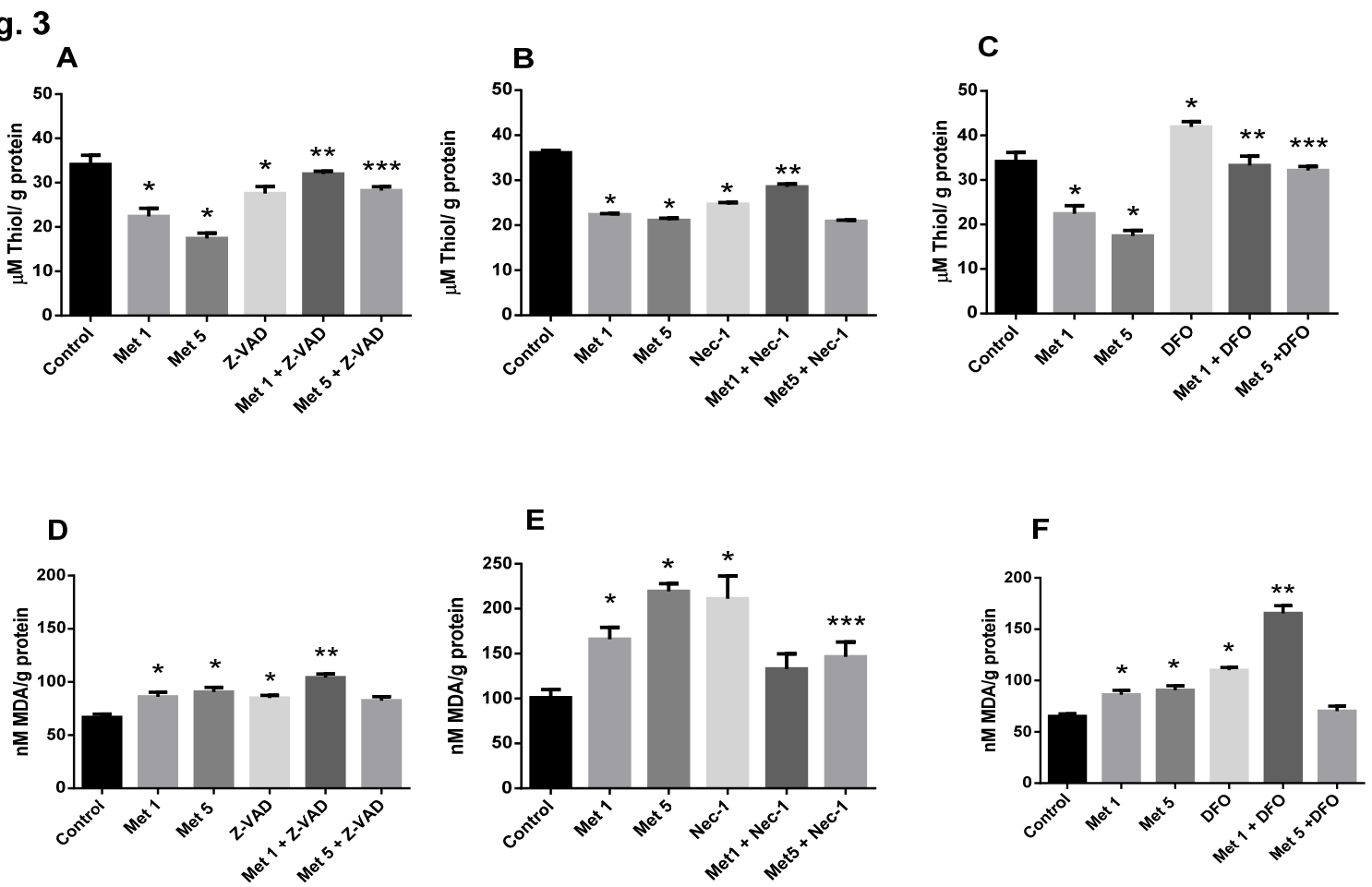


Figure 3. Evaluation of oxidative stress induced by metformin and cell death inhibitors in MCF-7 cells. A, B and C: Total Thiol levels after concomitant treatment with metformin (1 and 5 mM) and Z-vad (10 μM), Necrostatin 1 (Nec-1, 50 μM) and Deferoxamine (DFO, 100 μM), respectively. C, D and F: Malondialdehyde levels after concomitant treatment with metformin (1 and 5 mM) and Z-Vad, Nec-1 and DFO, respectively. *p < 0.05; statistically different from the control group. **: different from metformin 1mM. ***: different from metformin 5mM.

Fig. 4

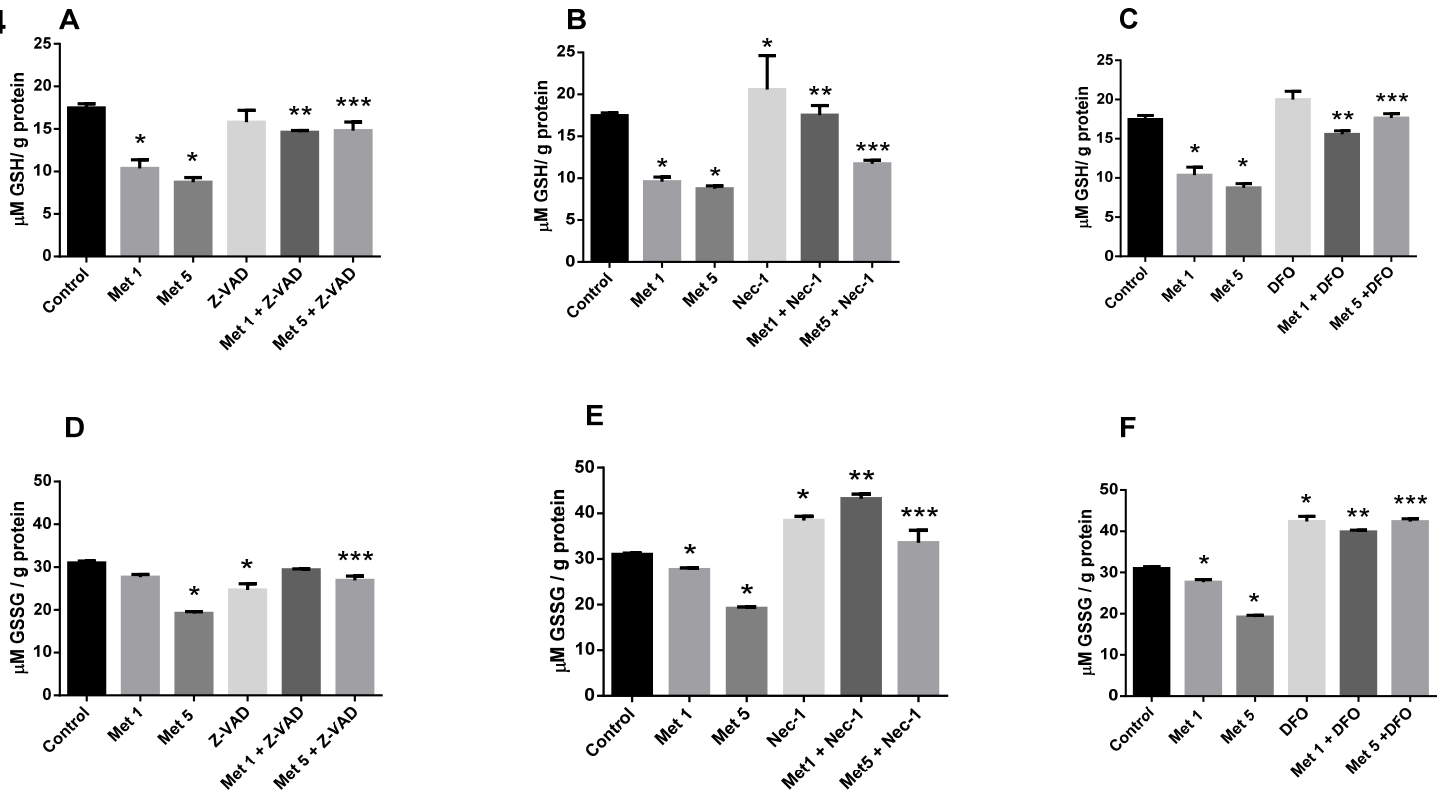


Figure 4. Quantification of reduced and oxidized glutathione levels after metformin and cell death inhibitors treatment. A, B and C: Reduced glutathione levels after concomitant treatment with metformin (1 and 5 mM) and Z-vad (10 μM), Necrostatin 1 (Nec-1, 50 μM) and Deferoxamine (DFO, 100 μM), respectively. D, E and F: Oxidized glutathione levels after concomitant treatment with metformin (1 and 5 mM) and Z-Vad, Nec-1 and DFO, respectively. * $p < 0.05$; statistically different from the control group. *: different from metformin 1mM. ***: different from metformin 5mM.

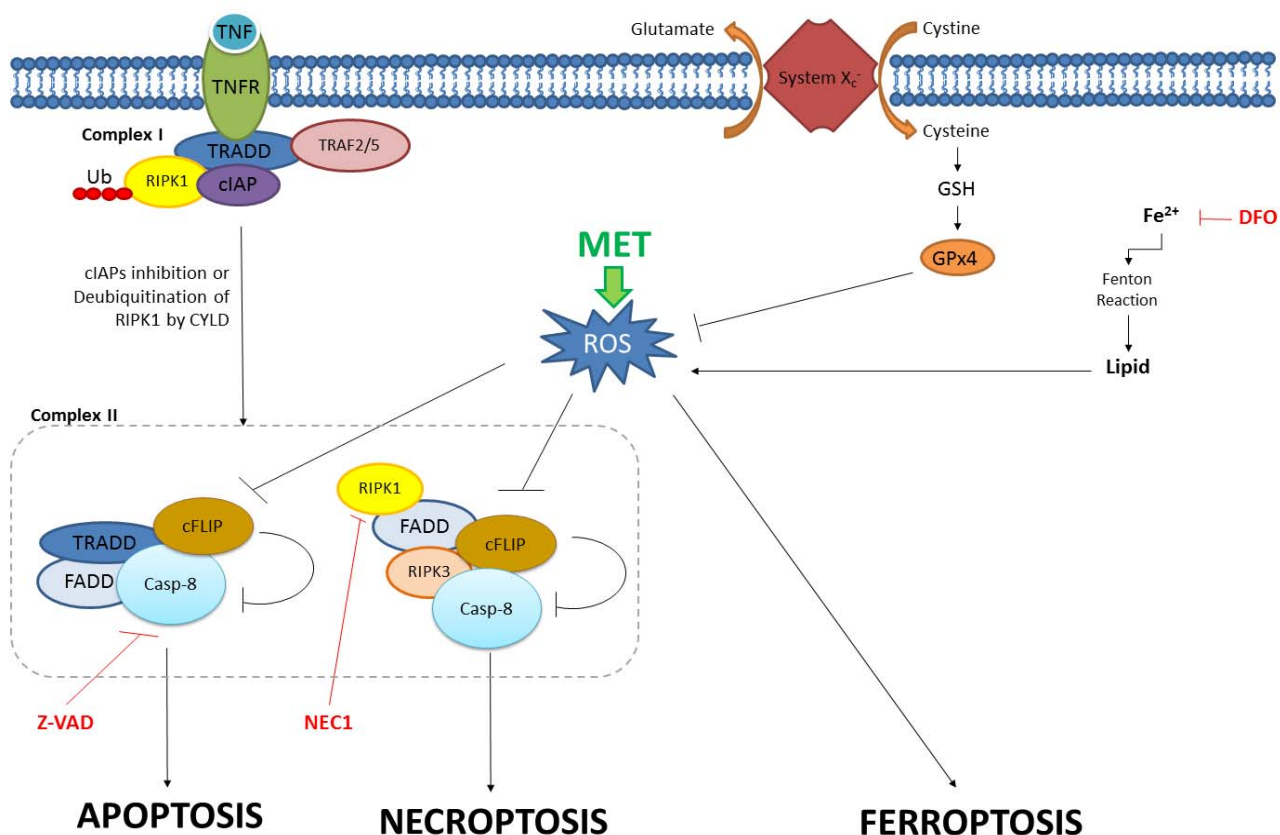


Figure 5. Generation of oxidative stress by metformin and the induction of cell death. The cytotoxicity of metformin is related to the generation of OE triggering the death of the cell. Binding of TNF to TNFR triggers the formation of Complex I, consisting of TRADD, RIPK1, cIAP, TRAF 2/5. If cIAP is inhibited or occurs RIPK1 deubiquitination by CYLD the formation of Complex II occurs, which is related to the activation of apoptosis or necroptosis. Casp-8 is triggering apoptosis and is regulated by cFLIP. Generation of ROS by metformin prevents the action of cFLIP, which leads to activation of Casp-8 and apoptosis. When using the pan-caspase inhibitor, Z-vad, inhibiting Casp-8, another death pathway is activated, Necroptosis, through the phosphorylation of RIPK1. This pathway can be blocked by using a RIPK1 inhibitor, such as Nec-1. In addition, another death path that can be activated through the generation of OE by metformin is ferroptosis. The cytotoxicity of metformin decreases GSH, generating intracellular OE, which with the participation of iron and formation of

lipid peroxides triggers death via ferroptosis. This pathway can be blocked by using an iron chelator, such as DFO.

MET: metformin; OE: oxidative stress; TNF: tumor necrosis factor; TNFR: tumor necrosis factor receptor; TRADD: TNF-associated death domain; RIPK1: receptor-interacting protein kinase 1; cIAP: cellular inhibitor of apoptosis; TRAF 2/5: factor 2/5 associated with TNF; CYLD: cilindromatosis; Casp-8: caspase-8; cFLIP: cellular FLICE inhibitory protein; ROS: reactive oxygen species; Nec-1: necrostatin-1; GSH: reduced glutathione; DFO: deferoxamine.