EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO TUMORAL NA
OBESIDADE: MECANISMOS ENVOLVIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE O DESENVOLVIMENTO TUMORAL NA
OBESIDADE: MECANISMOS ENVOLVIDOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof. Dra. Zuleica Bruno Fortes

Co-orientadora: Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Fonseca, Eveline Aparecida Isquierdo.

Efeito da metformina sobre o desenvolvimento tumoral na
obesidade mecanismos envolvidos / Eveline Aparecida Isquierdo
Fonseca. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração:
Farmacologia. Linha de pesquisa: Obesidade e câncer.

Versão do título para o inglês: Effect of metformin in the tumor
development in obese mechanisms involved.

1. Neoplasias 2. Obesidade 3. Metformina 4. Estresse oxidativo 5.
Apoptose mecanismos envolvidos 6. Necrose I. Fortes, Profa. Dra.
Zuleica Bruno II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB033/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca.

Título da Tese: Efeito da metformina sobre o desenvolvimento tumoral na obesidade mecanismos envolvidos.

Orientador(a): Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 75 nas fls. 89 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Zuleica Bruno Fortes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Obesidade, suas complicações e a resposta vascular: efeito de fármacos** do qual participam o(s) alunos **Núbia de Souza Lobato, Graziela Neves Hagihara, Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca, Simone Marcieli Sartoretto, Beatriz Ponzio Felice e os pesquisadores Maria Helena Catelli de Carvalho, Maria do Carmo Pinho Franco, Eliana Hiromi Akamine**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **27.07.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 27 de julho de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

À minha amada família,

Dedico este trabalho à minha querida e amada mãe, Aparecida Zocolaro Isquierdo Fonseca, por todo amor, apoio, carinho, dedicação, ensinamentos, confiança e auxílio durante toda a minha vida.

Ao meu Pai, Áureo Silva da Fonseca, pelo amor e apoio dedicados a mim.

Ao meu Amor, Diogo Albino de Queiroz,

Ao meu querido esposo, por toda a paciência, dedicação, carinho, amor, amizade e companheirismo em todos os momentos que estamos juntos, dando-me apoio, força e coragem para sempre seguir em frente.

À minha orientadora,

Dra. Zuleica Bruno Fortes, os meus mais profundos agradecimentos pelo apoio, confiança, ensinamentos e orientação exemplar, que contribuíram de modo decisivo para minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Primeiramente a Deus... Senhor de todas as coisas e sem o qual nada seria possível...Amigo de todas as horas...Senhor que me dá a vida, que me fortalece, anima e ama incondicionalmente....

À minha mãe Aparecida Zocolaro Isquierdo Fonseca que sempre me apoiou, me deu força, me respeitou, foi paciente e me amou infinitamente...

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e me ajudaram em tudo o que fosse necessário em especial meus tios, Terezinha Iracema Cáccia Isquierdo e Antônio Isquierdo, que me acolheram e me amaram durante todos os anos da faculdade...

Ao meu esposo Diogo Albino de Queiroz que sempre esteve ao meu lado, me apoiando, dando força, amor, carinho e ensinando tantas coisas....

À minha orientadora, professora e amiga, que acompanhou o desenvolvimento deste trabalho, com muita dedicação, responsabilidade e carinho... prof. Dra. Zuleica Bruno Fortes.... Obrigada por confiar em mim e ficar comigo até o final desse trabalho.

À minha co-orientadora Sandra Coccuzzo Sampaio, pela amizade e por todo o apoio, dedicação e ensinamentos que tem me dado ao longo desses anos. Obrigada por me acolher no Butantan e permitir que vários experimentos fossem realizados...

Ao prof. Dr. Szulim Ber Zyngier por desde o início ter me ajudado e apoiado na minha chegada ao ICB....

Aos meus supervisores, Aneli de Melo Barbosa, Robert Dekker e Neelam Khaper, que me acolheram com tanto carinho em seus laboratórios na Lakehead University e por toda a dedicação e ensinamentos....

Aos professores pela dedicação e entusiasmo em nos transmitir seus conhecimentos...

Às professoras do grupo de Hipertensão e Diabetes, Dra. Maria Helena C. Carvalho, Dra. Eliana H. Akamine, Dra. Graziela Ceravolo, Dra. Rita de Cássia A. T. Passaglia, Dra. Dorothy Nigro, pelo apoio, ensinamentos e estrutura dos laboratórios...

Às secretárias do departamento de Farmacologia, Mônica, Camila, Selma e Julieta pelo apoio, auxílio e amizade...

Aos funcionários do laboratório de hipertensão e diabetes: Maria Aparecida de Oliveira, Antônio Garcia, Rosângela dos Santos Eichler, Ana Rita Araújo, Marta Rodriguês, Sônia Leite, Manoel Rocha, Maria Alice Araújo e Sandra, pela atenção, auxílio e amizade. Pelos momentos de descontração e ajuda nos experimentos...

Aos meus grandes amigos do Laboratório: Simone Sartoretto (amiga e cumadi), Gisele F. Bomfim, Cinthya Echem, Clara Martins, Tiago Januário, Vanessa Oliveira, Beatriz F. Ponzio, Verônica Rennó, Renee, Luciana Giaquinto, Núbia Lobato, Fernando Filgueira, Eliana Akamine, Graziela Neves Hagihara, Graziela Ceravolo, André Colaço, Andréia Zago, Priscila Xavier, Fernanda, Caroline Midori, Paula Honda, Fernanda Giachini, Vitor, Fernando Carneiro, Zidonia, pelo carinho, amizade e parceria durante todo esse período...

Aos meus amigos do Instituto Butantan: Edilene Costa, Renata Oliveira, Ellen Emi, Luciana, Tati, Odair, Neusa, Vanessa Gutierrez e Sandra Coccuzzo, pela amizade, pelos auxílios na cultura de células e por desde o início ter me auxiliado e doado as células do tumor de Walker-256, sem as quais nada teria sido realizado...

Agradeço também aos companheiros do Departamento de Fisiologia: Luciana Rossoni, Helane, Gisele, Camila, Karilane, Ana Paula, Anderson, Juliana Costa, Juninho, pela amizade, ensinamentos, festinhas...

Às meninas do laboratório de sinalização redox: Aline, Ana Alice e Lívia pela ajuda e amizade...

Aos amigos que eu conheci em Thunder Bay, Ontario, Canadá: Hande, Irina, Balaji, Bruno, Stephanie, Boran, Jéssica, Ashley...

Às minhas grande amigas da faculdade: Vanessa Sugahara, Evelyn Kamogawa, Claudia Tsuruda, Caroline Nishikawa, Suzana Matsubara, Ana Elisa Arai, Lina Sanada, Isis, Lídia, Luciana...

Aos meus grandes amigos: Gisele Souza Amorim, Thiago Amorim, Joyce Zapaterini e André Rossi por todo o apoio e amizade...

Aos meus grandes amigos da COCA "Comunidade da Catedral" por todo apoio, orações e amizade...

Às minhas amigas Ana Paula, Helane e Rosélia que durante esses anos de pós não só dividiram comigo o apartamento como também me ajudaram, me apoiaram, me deram força, amizade e companheirismo...

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro durante todo esse período do doutorado. À CNPq pelos 6 meses de bolsa e à FAPESP pelos 30 meses de bolsa de doutorado, sendo 6 meses de doutorado-sanduíche no Canadá.

A todos que tanto colaboraram ao longo deste caminho e contribuíram de alguma maneira para que eu pudesse realizar este sonho... MUITO OBRIGADA!!!

RESUMO

FONSECA, E. A. I. **Efeito da metformina sobre o desenvolvimento tumoral na obesidade:** mecanismos envolvidos. 2013. 116 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Estudos epidemiológicos tem relacionado a obesidade com uma grande variedade de cânceres, como o câncer de mama metastático. Resistência à insulina e hiperinsulinemia tem sido propostos como os mecanismos pelos quais a obesidade induz ou promove a tumorigênese. Metformina, uma droga anti-diabética comumente prescrita para o tratamento do diabetes tipo 2, tem recentemente recebido atenção como um potencial agente terapêutico para reduzir o risco de câncer. Metformina, atuando de forma dependente ou independente da melhora da sensibilidade à insulina, poderia diminuir a proliferação celular e diminuir ou impedir o desenvolvimento do tumor. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar os mecanismos envolvidos no maior desenvolvimento de câncer em ratos obeso-MSG e analisar os mecanismos de ação pelo qual a metformina reduz o tumor. Obesidade foi induzida em ratos Wistar machos neonatos pela administração subcutânea de glutamato monossódico (MSG, 400 mg/kg de peso corpóreo) (obeso) ou solução fisiológica (controle) nos dias 2, 3, 4, 5 e 6 após o nascimento. Após 16 semanas, 1×10^7 células provenientes do tumor de Walker-256, um carcinossarcoma mamário, foram injetadas no flanco superior direito desses animais e foi iniciado o tratamento com metformina (300 mg/kg, por gavagem, por 15 dias). Os ratos foram então divididos em 4 grupos: Controle tumor (CT), Controle tumor tratado com metformina (CTM), Obeso-MSG tumor (OT) e Obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM). O efeito da metformina sobre o desenvolvimento tumoral foi avaliado na 18ª semana de vida. O desenvolvimento do tumor foi significativamente maior nos ratos OT quando comparado aos ratos CT e a sobrevida dos ratos OT foi significativamente menor quando comparada à dos ratos CT. Os mecanismos envolvidos no maior desenvolvimento tumoral nos ratos obesos-MSG são resistência à insulina, ativação da via de sinalização insulina-IR-ERK1/2 e ação anti-apoptótica via Bcl-2. A metformina foi eficaz em reduzir o desenvolvimento tumoral nos ratos OT e prolongar a sobrevida desses ratos. Metformina aumentou a expressão de RNAm dos reguladores do ciclo celular pRb e p27 e aumentou as atividades da AMPK e do FOXO3a, bem como reduziu a expressão de p-ERK1/2 nos grupos CTM e OTM. A fim de explorar ainda mais os mecanismos de ação da metformina sobre as células tumorais, células da linhagem do câncer de mama, a MCF-7, foram tratadas com metformina por 24, 48 e 72 horas. Metformina induziu efeito antiproliferativo sobre as células MCF-7, de forma dependente da concentração e do tempo de tratamento. Esse efeito foi relacionado ao bloqueio do ciclo celular na fase G0-G1, ao estresse oxidativo, ao aumento na apoptose e necrose celulares. Metformina também aumentou a expressão de RNAm de FOXO3a, p27, Bax, e reduziu a expressão de RNAm de ciclina D1 e Bcl-2. Ainda a combinação de metformina+H₂O₂ aumentou ainda mais o efeito antiproliferativo quando comparado com esses tratamentos individuais. Pode-se concluir que a obesidade contribui de maneira significativa para o desenvolvimento tumoral, aumentando significativamente o tamanho do tumor e reduzindo a sobrevida dos ratos. A metformina é eficaz em controlar o desenvolvimento tumoral e aumentar a sobrevida

dos ratos, efeitos esses relacionados com a AMPK e o FOXO3a. Apoio financeiro: FAPESP e CNPq (Brazil), NSERC-RCD e NOSM (Canadá).

Palavras-chave: Câncer. Obesidade. Metformina. AMPK. FOXO3a.

ABSTRACT

FONSECA, E.A.I. **Effect of metformin in the tumor development in obese: mechanisms involved.** 2013. 116 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Epidemiological studies have associated obesity with a wide variety of cancers such as metastatic breast cancer. Insulin resistance and hyperinsulinemia have been proposed as the mechanisms by which obesity induces or promotes tumorigenesis. Metformin, an anti-diabetic drug commonly prescribed to treat type 2 diabetes, has recently received attention as a potentially useful therapeutic agent for reducing cancer risk. It is reported to not only have a direct antitumoral effect, but also to act indirectly to improve insulin sensitivity, decreases hyperinsulinemia, and consequently attenuate tumor proliferation. Thus, the objective of the present study was to analyze the mechanisms associated with the higher development of tumor in obesity and analyze the mechanisms by which metformin reduces tumor size. Obesity was induced in newborn male Wistar rats by subcutaneous injection of 400 mg/kg body weight monosodium glutamate (MSG) (obese) or saline (control) at 2, 3, 4, 5 and 6 days of age. After 16 weeks, 1×10^7 Walker-256 tumor cells, a rat breast carcinosarcoma cell lines, were subcutaneously injected in the right flank of the rats and concomitantly were treated with metformin (300 mg/kg body weight, *via gavage*, for 15 days). Following this treatment, the rats were divided into 4 groups: control tumor (CT), control tumor metformin (CTM), obese tumor (OT) and obese tumor metformin (OTM). The effect of metformin on tumor development was assessed at the 18th week. Tumor development was higher in OT rats compared with CT rats which correlated with reduced life span in OT compared with CT rats. The mechanisms associated with higher development of tumor in obesity are insulin resistance, activation of insulin-IR-ERK1/2 pathway and anti-apoptotic action, via Bcl-2. Metformin reduced the tumor development in OT rats and prolonged the life span of the rats. Metformin increased the mRNA expression of cell cycle regulators pRb and p27. Furthermore, metformin increased AMPK and FOXO3a activities, and decreased p-ERK1/2 expression in CTM and OTM groups. In order to further explore the molecular mechanism of the antiproliferative role of metformin, breast cancer MCF-7 cells were treated with metformin for 24, 48 and 72 hours. Results indicated that the antiproliferative effect of metformin was both time- and dose-dependent. This effect was associated with an increase in oxidative stress, apoptosis, necrosis and cell cycle arrest in G₀-G₁ phase as measured by flow cytometry. Metformin also increased mRNA expression of FOXO3a, p27, Bax and decreased the mRNA expression of cyclin D1 and Bcl-2 as well as decreased the Bcl-2 protein expression. Furthermore, metformin increased AMPK and FOXO3a activities. Moreover, the combination of metformin+H₂O₂ exhibited an even stronger antiproliferative effect as compared to the individual treatments. In conclusion, we have demonstrated that obesity has an important role in tumor development, increasing the tumor size and reducing the life span of the rats. We have also demonstrated that metformin was effective in controlling tumor development and prolonging the survival; effects associated with AMPK and FOXO3a. Financial support: FAPESP and CNPq (Brazil), NSERC-RCD and NOSM (Canada).

Keywords: Cancer. Obesity. Metformin. AMPK. FOXO3a.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Etapas da carcinogênese – iniciação, promoção, progressão e metástase.	25
Figura 2 - Relação entre obesidade, resistência à insulina e seus efeitos sobre o desenvolvimento tumoral.	30
Figura 3 - Obesidade, hormônios sexuais e câncer endometrial.	32
Figura 4 - Fórmula estrutural da metformina (N,N-dimetilbiguanida).	35
Figura 5 - Mecanismo de ação da metformina nas células.	37
Figura 6 - Peso relativo (g/100g peso corporal) do tumor de Walker-256 nos grupos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM).	55
Figura 7 - Curva de sobrevivência (A) e Tempo de Sobrevivência (B) dos animais dos grupos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM).	56
Figura 8 - Expressão de RNAm de ciclina D1 (gene CCND1) (A), pRb (gene PRB1) (B), p53 (gene TP53) (C) e p27 (gene CDKN1B) (D) no tecido tumoral dos ratos.	57
Figura 9 - Expressão protéica dos receptores de insulina (IR e p-IR) no tecido tumoral dos ratos.	58
Figura 10 - Expressão protéica da ERK 1/2 e fosfo-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204) no tecido tumoral dos ratos.	59
Figura 11 - Expressão protéica da p38 e fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) no tecido tumoral dos ratos.	60
Figura 12 - Expressão protéica da AMPK α e fosfo-AMPK α (Thr 172) no tecido tumoral dos ratos.	61
Figura 13 - Expressão protéica da p70S6K e fosfo-p70S6K (Thr 389) no tecido tumoral dos ratos.	62
Figura 14 - Expressão protéica da FOXO3a e fosfo-FOXO3a (Ser253) no tecido tumoral dos ratos.	63
Figura 15 - Expressão protéica de Bax e Bcl-2 no tecido tumoral dos ratos.	65
Figura 16 - Expressão protéica da caspase-3 clivada no tecido tumoral dos ratos.	66
Figura 17 - Metformina apresentou efeito antiproliferativo nas células do câncer de mama (MCF-7).	68

Figura 18 - Metformina aumentou a atividade das caspases-3 e -7 após 72 horas de tratamento.	70
Figura 19 - Metformina aumentou a necrose celular de forma tempo-dependente. .	71
Figura 20 - Expressão protéica da AMPK α e fosfo-AMPK α (Thr 172) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.....	73
Figura 21 - Expressão protéica da p70S6K e fosfo-p70S6K (Thr 389) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.....	74
Figura 22 - Expressão de FOXO3a, fosfo-FOXO3a (Ser 413) e fosfo-FOXO3a (Ser 253) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.	75
Figura 23 - Expressão de RNAm de ciclina D1 (gene CCND1) e p27 (gene CDKN1B) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.	77
Figura 24 - Metformina aumentou a razão BAX/BCL2 em células MCF-7.....	78
Figura 25 - Metformina diminuiu a expressão de Bcl-2 e aumentou a razão Bax/Bcl-2 nas células MCF-7.	80
Figura 26 - Efeito antiproliferativo da metformina foi associado com estresse oxidativo.	82
Figura 27 - Análise da produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) pelas células MCF-7.	84
Figura 28 - Efeito antiproliferativo da metformina foi associado com estresse oxidativo.	86
Figura 29 - Efeito antiproliferativo da metformina foi associado com estresse oxidativo.	89
Figura 30 – Vias de sinalização envolvidas com o efeito da metformina em células do câncer de mama.....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da organização mundial da saúde (OMS) para a obesidade segundo o valor da razão cintura-quadril e da circunferência da cintura.	27
Tabela 2 - Classificação da organização mundial da saúde (OMS) segundo o índice de massa corporal (IMC) para sobrepeso e obesidade.....	27
Tabela 3 - Parâmetros biológicos dos animais.	54
Tabela 4 - Metformina promoveu parada do ciclo celular e apoptose de maneira tempo-dependente.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil CoA-Carboxilase
AGL	Ácidos graxos livres
Akt	Proteína quinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada pelo monofosfato de adenosina
AMPKK	Proteína quinase quinase ativada pelo monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i>
CaMKK	Proteína quinase dependente de Ca^{+2} /Calmodulina
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CM-H ₂ DCFDA	diacetato de 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína, acetil éster
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CO ₂	Dióxido de carbono
CST	Controle sem tumor
CT	Controle tumor
CTM	Controle tumor metformina
2DG	2-deoxi-D-glucose
DMEN	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
4EBP1	<i>Eukaryote Initiation Factor 4E Binding Protein 1</i>
EDL	Extensor digital longo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
epm	Erro padrão da média
ERKs	Quinases reguladas por sinalização extracelular
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FOXO	<i>Forkhead Transcription Factor</i>
FOXO1	<i>Forkhead Transcription Factor 1</i>
FOXO3a	<i>Forkhead Transcription Factor 3a</i>

FOXO4	<i>Forkhead Transcription Factor 4</i>
FOXO6	<i>Forkhead Transcription Factor 6</i>
GLUT4	Transportador de glicose 4
GH	Hormônio de crescimento
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril CoA
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IARC	<i>International Agency for Reasearch on Cancer</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN-γ	Interferon-gama
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i>
IGF-1R	Receptor do IGF-1
IGFBP	<i>Insulin-like growth factor binding protein</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina - 6
IMC	Índice de massa corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídeo
IR	Receptor de insulina
IRS	Substrato para o receptor de insulina
JNKs	Quinases do terminal c-jun
LKB1	Gene supressor tumoral
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MC	Melanocortina
MCF-7	Linhagem de células do câncer de mama humano
MCF10A	Células epiteliais de mama humana não transformadas
MSG	Glutamato monossódico
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
mTOR	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NaF	Fluoreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NPY	Neuropeptídeo Y
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sódio
OCT	<i>Organic Cation Transporter</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

OST	Obeso sem tumor
OT	Obeso tumor
OTM	Obeso tumor metformina
PAI-1	Inibidor do ativador de plasminogênio – 1
PARP	Poli-(ADP-Ribose)- Polimerase
PBS	Tampão fosfato salina
PCOS	Síndrome do ovário policístico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PI3K	Fosfatidil inositol -3 quinase
PMA	Acetato de forbol miristato
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
SAA	Proteína sérica amilóide
SFB	Soro fetal bovino
SHBG	Globulina ligadora de hormônios sexuais
S6K	Proteína ribossomal S6 quinase
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente
TGF- β	Fator transformador de crescimento-beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
WHR	Razão cintura-quadril

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Câncer	22
1.2 Obesidade e resistência à insulina	25
1.3 Obesidade e câncer.....	29
1.4 Obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG)	33
1.5 Metformina, AMPK e câncer	35
1.6 Modelos experimentais de tumor.....	39
1.6.1 Tumor de Walker-256.....	39
1.6.2 Células do câncer de mama MCF-7	40
2 OBJETIVOS.....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 Experimentos in vivo	42
3.1.1 Animais	42
3.1.2 Indução da obesidade, inoculação do tumor de Walker-256 e tratamento com metformina	42
3.1.3 Caracterização da obesidade.....	43
3.1.4 Implante do tumor de Walker-256 e sua avaliação	43
3.1.5 Curva de sobrevivência	44
3.2 Experimentos in vitro.....	44
3.2.1 Linhagem celular e condições de cultura	44
3.2.2 Análise da proliferação celular in vitro – Técnica do MTT.....	45
3.2.3 Análise da viabilidade celular – método de exclusão pelo azul de tripan.....	46
3.2.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	46
3.2.5 Análise da apoptose – CaspaTag™ caspase-3/7 in situ assay	47
3.2.6 Análise de necrose.....	49
3.2.7 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) – técnica do CM-H₂DCFDA	49
3.2.8 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) – Análise da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).....	50
3.3 Quantificação da expressão do RNAm por RT-PCR em tempo real	51
3.4 Análise da expressão protéica pela técnica de Western blotting	52
3.5 Análise estatística	53

4 RESULTADOS.....	54
4.1 Experimentos in vivo	54
<i>4.1.1 Caracterização da obesidade.....</i>	<i>54</i>
<i>4.1.2 Desenvolvimento do tumor de Walker-256</i>	<i>55</i>
<i>4.1.3 Curva de sobrevida</i>	<i>56</i>
<i>4.1.4 Análise da expressão de RNAm por RT-PCR em tempo real das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (ciclina D1, pRb, p53 e p27) no tecido tumoral.....</i>	<i>57</i>
<i>4.1.5 Análise da expressão protéica dos receptores de insulina no tecido tumoral.....</i>	<i>58</i>
<i>4.1.6 Análise da expressão protéica das MAPKs no tecido tumoral</i>	<i>59</i>
<i>4.1.7 Análise da expressão protéica da AMPK e da p70S6K no tecido tumoral</i>	<i>61</i>
<i>4.1.8 Análise da expressão do FOXO3a no tecido tumoral</i>	<i>63</i>
<i>4.1.9 Análise da expressão das proteínas envolvidas na apoptose (Bax, Bcl-2 e caspase-3) no tecido tumoral.....</i>	<i>64</i>
4.2 Experimentos in vitro.....	67
<i>4.2.1 Análise da proliferação de células MCF-7.....</i>	<i>67</i>
<i>4.2.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo</i>	<i>69</i>
<i>4.2.3 Análise da apoptose.....</i>	<i>70</i>
<i>4.2.4 Análise da necrose.....</i>	<i>71</i>
<i>4.2.5 Análise da expressão das proteínas AMPK, p70S6K e FOXO3a nas células em cultura</i>	<i>72</i>
<i>4.2.6 Análise da expressão de RNAm das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (ciclina D1 e p27) e apoptose (Bax e Bcl-2) nas células em cultura</i>	<i>77</i>
<i>4.2.7 Análise da expressão das proteínas envolvidas na apoptose (Bax e Bcl-2) nas células MCF-7</i>	<i>79</i>
<i>4.2.8 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio nas células MCF-7</i>	<i>81</i>
<i>4.2.9 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas células MCF-7.....</i>	<i>83</i>
<i>4.2.10 Análise da proliferação de células MCF-7 na presença de enzimas antioxidantes</i>	<i>85</i>
<i>4.2.11 Análise da porcentagem de células MCF-7 mortas na presença de enzimas antioxidantes</i>	<i>88</i>
5 DISCUSSÃO	91

6 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma das doenças que mais matam em todo o mundo. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, órgão do Ministério da Saúde, as neoplasias malignas são, atualmente, a 2ª causa de morte por doenças no Brasil (INCA, 2012). Ainda, as estimativas para o ano de 2012 são de 518.510 casos novos de câncer, dentre esses 53.000 são casos de câncer de mama, o câncer de maior incidência entre as mulheres (INCA, 2012).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento descontrolado (maligno) de células que podem invadir outros tecidos e órgãos, causando metástases (INCA, 2012).

O câncer é gerado a partir de uma célula normal que sofreu um acúmulo progressivo de mutações no seu material genético. É uma doença multifatorial, que envolve predisposição genética e influências externas, como fatores ambientais, e ação de agentes carcinogênicos – químicos, físicos e biológicos. Outros dois fatores de risco que estão sendo bem estudados são a obesidade e a resistência à insulina (CALLE, 2003; CURT et al., 2002; FORTE et al., 2012; HURSTING; HURSTING, 2012; KUMAR et al., 2008; OSORIO-COSTA et al., 2009).

Durante o processo de formação tumoral, uma célula normal passa por várias etapas, como a iniciação, a promoção, a progressão e a manifestação do tumor.

A iniciação é o primeiro estágio da carcinogênese que corresponde à transformação celular induzida pelos cancerígenos ou carcinógenos causando modificações genéticas nas células e alterando suas respostas ao microambiente. Ocorre acúmulo progressivo de alterações, mutações, que contribuem para o desenvolvimento tumoral. Essas alterações tornam a célula propensa a desenvolver tumor, porém a iniciação somente não é suficiente para a formação do mesmo (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2006).

A promoção é a segunda etapa da carcinogênese, e consiste na proliferação ou expansão das células “iniciadas” por meio da ação de agentes denominados promotores (SHILS et al., 2003). A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um

longo e continuado contato com o agente promotor. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Ainda, esses agentes, por si só, não causam câncer (COUSSENS; WERB, 2002; KEMPEN; VISSER; COUSSENS, 2006; KUMAR et al., 2008; WEISS, 2002).

Com a permanência dos promotores, ocorre o terceiro estágio da carcinogênese, a progressão, onde ocorrem as alterações fenotípicas, ou seja, as células geneticamente mutadas passam a multiplicar-se desordenadamente, adquirindo autonomia, transformando-se em células agressivas e invasivas (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011; KUMAR et al., 2008; ONUCHI et al., 2012).

A manifestação dos sinais do tumor é o último estágio da carcinogênese podendo levar anos até décadas para surgirem os primeiros sintomas da doença (SHILS et al., 2003). Os sintomas dependem da localização do tumor e da atividade funcional do órgão acometido, variando desde sangramentos, úlceras, emagrecimento, caquexia, anorexia dentre outros (BARACAT; FERNANDES JR; SILVA, 2000). Ainda, outro quadro característico do desenvolvimento tumoral é a presença da síndrome da anorexia-caquexia uma complicação freqüente no paciente com câncer em estágio avançado. Ela é caracterizada por um intenso consumo dos tecidos muscular e adiposo, com conseqüente perda de peso, além de anemia, astenia, balanço nitrogenado negativo, devido a alterações fisiológicas, metabólicas e imunológicas (BATISTA JR et al., 2012; FEARON; ARENDS; BARACOS, 2013; FEARON; MOSES, 2002; JOHNS; GREIG; FEARON, 2012; TISDALE, 2001). Muitas vezes leva o paciente a óbito.

O câncer em si apresenta várias características, sendo algumas fundamentais para a determinação do fenótipo tumoral como: auto-suficiência aos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento, resistência à apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e capacidade de invadir tecidos normais e causar metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000, 2011). Assim, para uma célula normal se transformar numa célula maligna e dar origem a um câncer com todas ou algumas dessas características, vários fatores precisam atuar sinergicamente. Como citado anteriormente, vários fatores de risco estão

associados com o desenvolvimento tumoral, dentre eles a luz ultravioleta, radiações ionizantes, vírus, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o cigarro e o álcool. Ainda, como citado anteriormente, outros dois fatores de risco que estão sendo bem estudados, e são objetivos do nosso estudo, são a obesidade e a resistência à insulina (CALLE, 2003; CURI et al., 2002; FORTE et al., 2012; OSORIO-COSTA et al., 2009).

A obesidade é uma doença cada vez mais comum, cuja prevalência já atinge proporções epidêmicas. Está crescendo em níveis alarmantes em todo o mundo e representa um grande problema de saúde pública, uma vez que está associada com o desenvolvimento de outras doenças, tais como o diabetes, doenças cardiovasculares e alguns cânceres (ABESO, 2010; KOPELMAN, 2000; MANCINI, 2010).

No Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2008-2009, realizada numa parceria entre o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Ministério da Saúde (MS), analisando dados de 188 mil brasileiros de todas as idades, mostrou que a prevalência de obesidade e de excesso de peso tem aumentado rapidamente nos últimos anos em todas as faixas etárias. Neste levantamento, 50% dos homens e 48% das mulheres apresentaram excesso de peso, sendo que 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres já haviam alcançado o estágio de obesidade (ABESO, 2010).

Segundo o relatório “Estatísticas Mundiais de Saúde 2012”, da OMS, a obesidade é a causa de 2,8 milhões de óbitos por ano em todo o mundo e ainda há muito com que se preocupar, pois atualmente, 12% da população mundial é considerada obesa, e este número tende a crescer.

Figura 1 - Etapas da carcinogênese – iniciação, promoção, progressão e metástase.

1.2 Obesidade e resistência à insulina

A obesidade é uma doença de alta prevalência e representa um dos principais problemas de saúde associados com morbidade e mortalidade (KOPELMAN, 2000; MANCINI, 2010). A hipertensão, dislipidemia, doença cardiovascular aterosclerótica, diabetes mellitus, apnéia do sono, problemas psico-sociais e diversos tipos de câncer são complicações freqüentes no indivíduo obeso (DINIZ et al., 2008; KOPELMAN, 2000; LI et al., 2005; POWERS; REHRIG; JONES, 2007; TIROSH et al., 2011; ZIMMET; ALBERTI; SHAW, 2001).

A obesidade é uma condição fisiopatológica crônica de origem multifatorial, sendo caracterizada por excesso da massa de tecido adiposo em relação à massa magra, que pode ocorrer de modo regional ou generalizado (VEJA, 2002).

Na obesidade, observa-se um desequilíbrio energético, onde o ganho energético é maior que o gasto energético. Estilo de vida baseado em consumo excessivo de alimentos ricos em energia, baixa atividade física e influências biológicas e genéticas do indivíduo contribuem para o acúmulo de tecido adiposo

(CALLE, 2004; CNOP; FOUFELLE; VELLOSO, 2012; HILL, 2006; MORAES et al., 2009).

O tecido adiposo é o principal reservatório energético do organismo. É dividido em tecido adiposo marrom (especializado na produção de calor – termogênese - onde participa ativamente do controle da temperatura corporal) e tecido adiposo branco (conhecido como um órgão endócrino além da sua capacidade de armazenar energia na forma de triacilglicerol) (FONSECA-ALANIS et al., 2006). Ainda, recentemente, tem sido descrito a existência de um terceiro tipo de tecido adiposo, o tecido adiposo bege (BERANGER et al., 2012; SHARP et al., 2012; WU; COHEN; SPIEGELMAN, 2013). Estudos mostram que adipócitos presentes no tecido adiposo branco podem ser convertidos em adipócitos multiloculares que expressam a proteína UCP1, uma proteína mitocondrial que desempenha um efeito fundamental na produção de calor por desacoplamento da atividade da cadeia respiratória de síntese de ATP. Esses adipócitos multiloculares foram nomeados de adipócitos bege e geralmente são desenvolvidos durante a fase pós-natal em resposta ao frio crônico ou a ação de agonistas do PPAR γ (BERANGER et al., 2012; SHARP et al., 2012).

Existem dois principais tipos de tecido adiposo branco: subcutâneo e visceral. O subcutâneo está localizado entre a pele e o músculo e a gordura visceral está localizada dentro das cavidades do corpo, primariamente na cavidade abdominal. Os adipócitos viscerais são metabolicamente mais ativos que o subcutâneo, possuem alta atividade lipolítica provocando liberação de grande quantidade de ácidos graxos livres e são os principais responsáveis pelos problemas associados com a obesidade.

Duas medidas da adiposidade central, a razão cintura-quadril (WHR) e a medida da circunferência da cintura, têm sido comumente usadas em estudos epidemiológicos para classificar um indivíduo com obesidade (Tabela 1). O valor do índice de massa corporal (IMC) também é muito utilizado e aceito mundialmente para classificar sobrepeso ou obesidade (CALLE, 2004; GENKINGER et al., 2011; PATEL et al., 2008; WANG et al., 2008). A classificação do IMC adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é mostrada na tabela 2. Essa classificação é baseada em estudos epidemiológicos e observacionais. Deve-se ressaltar que mesmo em indivíduos com IMC normal aumentos discretos na adiposidade visceral

podem resultar em maior risco relativo para desenvolvimento de várias doenças associadas à obesidade.

Tabela 1 - Classificação da organização mundial da saúde (OMS) para a obesidade segundo o valor da razão cintura-quadril e da circunferência da cintura.

Razão Cintura-Quadril	
Homens	>0.90
Mulheres	>0.85
Circunferência da Cintura	
Homens	>102cm
Mulheres	>88cm

Tabela 2 - Classificação da organização mundial da saúde (OMS) segundo o índice de massa corporal (IMC) para sobrepeso e obesidade.

IMC (kg/m²)	OMS	Descrição Popular
<18,5	Abaixo do peso	Fino
18,5-24,9	Peso Normal	Peso “saudável”, “normal” ou “aceitável”
25,0-29,9	Sobrepeso	Sobrepeso
30,0-34,9	Obeso grau 1	Obeso
35,0-39,9	Obeso grau 2	Obeso
≥ 40,0	Obeso grau 3	Obesidade Mórbida

Como citado anteriormente, o tecido adiposo constitui um órgão endócrino e metabólico que pode alterar a fisiologia de outros tecidos (RAJALA, 2003). Ele libera diversas proteínas conhecidas como adipocinas, que exercem diferentes funções no controle fisiológico do organismo. Há liberação de peptídeos como leptina, adiponectina e resistina, citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-6 e fator transformador de crescimento β (TGF- β), além de outras proteínas como o inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), proteína sérica amilóide A (SAA) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BODEN, 1997; FILIPPIN-MONTEIRO et al.,

2012; MONTEIRO; AZEVEDO, 2010; SCHENK; SABERI; OLEFSKY, 2008; SCHERER, 2006; TILG, 2006).

Aumento da liberação de ácidos graxos livres, resistina, IL-6 e TNF- α pelo tecido adiposo e redução da liberação de adiponectina dão origem à resistência à insulina presente na obesidade (CALLE, 2004) (Figura 2).

A resistência à insulina relacionada à obesidade é uma desordem complexa. Vias endócrinas, inflamatórias e neurais estão alteradas e podem modular a sinalização celular em diversos tecidos (CNOP; FOUFELLE; VELLOSO, 2012; GREENFIELD; CAMPBELL, 2004; KONNER; BRUNING, 2011; QATANANI; LAZAR, 2007).

A resistência à insulina é definida como uma resposta metabólica diminuída dos tecidos (músculo, fígado e tecido adiposo) à insulina e freqüentemente é acompanhada de hiperinsulinemia compensatória (REAVEN, 1988; SALTIEL; KAHN, 2001; WAJCHENBERG, 2000).

Nesta condição, a captação de glicose estimulada pela insulina encontra-se diminuída no músculo esquelético, no fígado e no tecido adiposo (FORMIGUEIRA; CANTON, 2004; GREENFIELD; CAMPBELL, 2004). Em consequência da menor captação de glicose pelos tecidos, o pâncreas passa a produzir e liberar mais insulina para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando-se desta forma os níveis de insulina circulante. Assim, hiperinsulinemia compensatória é um sinal evidente de perda da homeostase glicêmica na resistência à insulina (SALTIEL; KAHN, 2001).

A insulina é o hormônio anabólico mais potente que se conhece, agindo sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, tem efeitos na síntese de DNA e RNA, sobre o transporte de íons e aminoácidos, sobre a proliferação e ciclo celulares, diferenciação celular e apoptose, bem como sobre a síntese de óxido nítrico (CALLE et al., 2004; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; JEE; KIM; LEE, 2005; MUNIYAPPA et al., 2007; SALTIEL; KAHN, 2001; WILCOX, 2005).

Após a ligação com seu receptor específico presente na membrana plasmática, a insulina ativa diversas vias de sinalização envolvidas com o metabolismo e crescimento celular. O receptor da insulina é uma proteína tetramérica com atividade tirosina quinase, composta por duas subunidades α e duas subunidades β . A ligação da insulina à subunidade α permite que esta adquira atividade quinase levando à alteração conformacional do receptor e autofosforilação

da subunidade β , tornando o receptor ativo. Após ser ativado, o receptor fosforila membros da família dos substratos dos receptores de insulina (IRS-1 a 4) em resíduos de tirosina, criando sítios de reconhecimento para moléculas contendo homologia com a Src 2 (SH2). Entre essas destacam-se a subunidade regulatória p85 da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), Grb2, Crkl e fosfatase fosfotirosina (SHP2). Após a ligação dessas proteínas aos IRS há ativação de outras proteínas, como as proteínas da via dependente da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e proteínas da via da *mammalian target of rapamycin* (mTOR). Essas vias estão geralmente ligadas ao metabolismo, crescimento, proliferação e diferenciação celulares (OSÓRIO-COSTA et al., 2009; POLLAK, 2008; SALTIEL; KAHN, 2001).

As intervenções para o controle da resistência à insulina e desordens metabólicas relacionadas incluem inicialmente mudanças no estilo de vida, com redução da ingestão calórica e atividades físicas, a fim de diminuir os níveis de glicose, melhorar o perfil lipídico e induzir a perda de peso (FONSECA, 2003). Outra intervenção importante é dada através dos antidiabéticos orais que contribuem melhorando a sensibilidade à insulina e as consequências dessa síndrome.

1.3 Obesidade e câncer

Estudos epidemiológicos mostram que a obesidade aumenta o risco de desenvolver alguns tipos de câncer, como o mamário na pós-menopausa, câncer de cólon retal, de esôfago, fígado, rins, pâncreas, endométrio, ovário, próstata, tireóide e certos cânceres hematopoiéticos (BALLARD-BARBASH et al., 2010; BEASON; COLDITZ, 2012; FORTE et al., 2012; GIOVANNUCCI; MICHAUD, 2007; HURSTING et al., 2012; LEW, 1979; NOCK, 2012; OSÓRIO-COSTA et al., 2009; TERAS; PATEL, 2012).

Há várias hipóteses que podem explicar o mecanismo de carcinogênese na obesidade, entre elas a inflamação, o estresse oxidativo e a resistência à insulina. A hiperinsulinemia, consequência da resistência à insulina, está relacionada com vários tipos de câncer, como o de cólon retal, pancreático, endometrial e de mama (HURSTING et al., 2012; IARC, 2002; KAKS; LUKANOVA; KURZER, 2002; KAKS, 1996; MCKEOWN-EYSEN, 1994). A insulina pode contribuir para o desenvolvimento tumoral por dois mecanismos: 1) atuando diretamente sobre seus receptores presentes nas células (pré)neoplásicas (POLLAK, 2008) (Figura 2) e 2)

indiretamente por mudanças no metabolismo de hormônios endógenos (GIOVANNUCCI, 1995).

A insulina promove a produção e a atividade do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) (CALLE, 2004). Este pode estimular a proliferação celular em estados de hipernutrição como a obesidade (GIOVANNUCCI; MICHAUD, 2007; MACAULAY, 1992). Em estudo experimental *in vivo*, o crescimento tumoral foi reduzido quando o receptor de IGF-1 foi removido ou quando a concentração de IGF-1 foi diminuída (CHAPMAN, 1998). Isso mostra que o IGF-1 livre possa estar envolvido com o crescimento tumoral. Apenas 20 % do IGF-1 é encontrado livre, 80 % do IGF-1 encontra-se combinado com uma proteína ligadora do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP), que pode interferir com o crescimento do tumor, uma vez que se liga ao IGF-I e impede sua ação mitogênica. Assim, vários estudos têm relatado que em indivíduos com altos níveis de IGF-1 e baixos níveis de IGFBPs o risco de desenvolver câncer de cólon, mama, próstata e pulmão é maior (CALLE, 2004; FREIER et al., 1999; MISHRA et al., 1998).

Figura 2 - Relação entre obesidade, resistência à insulina e seus efeitos sobre o desenvolvimento tumoral.

Fonte: Adaptado de Calle, 2004.

O IGF-I também aumenta a síntese de VEGF que aumenta a permeabilidade vascular e angiogênese tumorais (HOEBEN, 2004; IBRAHIM, 2004), contribuindo assim para a progressão e metástase (Figura 2).

Hiperinsulinemia também pode afetar a produção de hormônios sexuais como andrógenos e estrógenos que podem interferir com o crescimento tumoral (JEE et al., 2005). Os hormônios sexuais esteróides são mitogênicos, podem estimular a proliferação celular, inibir a apoptose e aumentar potencialmente o risco de ocorrer mutações (FORTE et al., 2012; HURSTING et al., 2012; KAAKS; LUKANOVA; KURZER, 2002; LONERGAN; TINDALL, 2011). O papel da hiperinsulinemia no aumento da produção de hormônios sexuais e sua relação com o desenvolvimento de câncer fica demonstrado na síndrome do ovário policístico. Nessa síndrome, observamos acentuada resistência à insulina e aumento na produção de hormônios androgênicos pelas células do tecido ovariano e pela glândula adrenal (DUNAIF, 1997). Esses dois fatores estão possivelmente relacionados ao aumento do câncer endometrial (KAAKS; LUKANOVA; KURZER, 2002).

A adiposidade também pode influenciar a síntese e atividade dos hormônios sexuais esteróides - estrógeno, progesterona e andrógenos (CALLE, 2004; FORTE et al., 2012; POLLAK et al., 2004). O tecido adiposo expressa várias enzimas metabolizadoras de hormônios sexuais que promovem a formação de estrógeno a partir de precursores androgênicos, que são secretados pelas gônadas e glândulas adrenais. Nos homens e nas mulheres na pós-menopausa, o tecido adiposo é o principal local de síntese de estrógeno, e o IMC está diretamente relacionado com os níveis de estrógeno e estradiol circulante (FORTE et al., 2012; KEY et al., 2003; KEY et al., 2001; TCHERNOF, DESPRES, 2000) (Figura 3).

Na obesidade há aumento dos níveis circulantes de insulina e da atividade de IGF-I, isto resulta em redução da síntese hepática e da concentração sanguínea de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), aumentando dessa forma a quantidade de hormônios sexuais livres circulantes (Figura 3).

Figura 3 - Obesidade, hormônios sexuais e câncer endometrial.

Fonte: Adaptado de Calle, 2004.

Como citado anteriormente, a inflamação crônica moderada presente na obesidade também pode facilitar o desenvolvimento tumoral. As adipocinas secretadas pelo tecido adiposo como leptina, TNF- α e IL-6 podem promover inflamação, proliferação celular e angiogênese (FORTE et al., 2012; HURSTING et al., 2012). Na obesidade, há aumento dos níveis de leptina. Muitos estudos sugerem que ela pode estimular a proliferação celular e promover angiogênese *in vitro* e *in vivo* e aumentar a expressão das metaloproteinases da matriz-2 e 9 (BOULLOUMIE et al., 1998; BRANDON et al., 2009; GAROFALO; SURMACZ, 2006; HODA et al., 2007; HOUSA et al., 2006; SAXENA et al., 2007; SHARMA et al., 2006; SOMASUNDAR, 2004), contribuindo para a progressão tumoral. No entanto, alguns

estudos com ratos “fatless A-Zip/F1”, mostraram resultados contrários, uma vez que mesmo com níveis indetectáveis de adipocinas, houve formação tumoral acelerada. Isso sugere que as adipocinas não são as únicas moléculas envolvidas no desenvolvimento tumoral e ainda há muito a ser estudado (ABLAMUNITIS et al., 2006; HURSTING et al., 2007; MOITRA et al., 1998; NUNEZ et al., 2006).

Outro mecanismo pelo qual a hiperinsulinemia pode contribuir para o desenvolvimento tumoral é bloqueando a ação dos fatores de transcrição FOXO. Em mamíferos, os fatores FOXO apresentam diversas funções: promovem supressão do tumor, podem aumentar a expectativa de vida, regulam o metabolismo energético e o desenvolvimento de vários tecidos (BLUHER; KAHN; KAHN, 2003; HOLZENBERGER et al., 2003; HU et al., 2004; ROPELLE et al., 2009), promovem parada do ciclo celular, reparo da lesão do DNA, detoxificação das espécies reativas de oxigênio, apoptose e autofagia, por regular programas de expressão gênica específicos (BRUNET et al., 1999; DIJKERS et al., 2000; KOPS et al., 2002). Portanto, o papel desses fatores no controle do metabolismo, crescimento e proliferação celulares é de grande relevância.

Os fatores de transcrição FOXO são regulados por diversos estímulos externos como insulina, IGF-I, neurotrofinas, nutrientes, citocinas e estresse oxidativo. Estes estímulos controlam os níveis da proteína FOXO, sua localização subcelular, ligação ao DNA e sua atividade transcricional (CALNAN; BRUNET, 2008). São regulados negativamente pela via de sinalização da PI3K/Akt. A proteína Akt, uma vez ativada pela ação da insulina ou de outros fatores de crescimento, fosforila os fatores FOXO em três sítios específicos. Isso leva ao seqüestro desses fatores no citoplasma, aumento de sua degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma e diminuição de sua atividade transcricional, uma vez que sua atividade ocorre no núcleo.

1.4 Obesidade induzida pelo glutamato monossódico (MSG)

Devido às limitações éticas e financeiras para estudar a obesidade em humanos e devido à maior facilidade de estudos com animais proporcionando grande quantidade de pesquisas e resultados, muitos modelos de obesidade experimental têm sido utilizados com o objetivo de estabelecer as causas, conseqüências e tratamento dessa doença.

Há vários modelos animais de obesidade como aqueles em que se induzem alterações genéticas, lesões neuronais, mudanças alimentares ou indução química por administração de glutamato monossódico (MSG) a animais neonatos. Os animais recém-nascidos são mais sensíveis à ação neurotóxica do MSG, uma vez que a barreira hematoencefálica não está ainda totalmente formada (KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1978).

O glutamato monossódico é um aminoácido neurotóxico quando administrado em doses suprafisiológicas apresentando efeito agudo e irreversível. Ele provoca lesões no sistema nervoso central (SNC), especificamente nos neurônios dopaminérgicos da área pré-óptica e do núcleo arqueado do hipotálamo e nos neurônios colinérgicos do núcleo arqueado do hipotálamo (HOLZWARTH-MCBRIDE et al., 1976; OLNEY, 1969).

Assim, as lesões hipotalâmicas podem produzir a denominada obesidade hipotalâmica ou obesidade neuroendócrina, através de diversas alterações metabólicas como hipercorticosterolemia, hiperinsulinemia/resistência à insulina, hiperleptinemia e prejuízo da termogênese com menor atividade do tecido adiposo marrom, além de desordens funcionais no sistema nervoso autônomo (KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1978; PEREIRA et al., 2003). Sabe-se também que, quando adultos, os animais apresentam, além de obesidade (aumento da gordura corporal sem hiperfagia), redução do peso corporal, significativa diminuição nos níveis do hormônio do crescimento (GH), hipogonadismo, esterilidade, disfunção sexual, déficit comportamental em ratos e alterações no controle cardiovascular (DAWSON; ANNAU, 1983; HIRATA et al., 1997; KIZER; NEMEROFF; YOUNGBLOOD, 1978; OLNEY, 1969).

Nenhum modelo experimental é completamente adequado para estudar a obesidade humana com exatidão. Cada método apresenta uma variedade de características que os assemelham à obesidade humana, mas nenhum método apresenta total semelhança.

No modelo de obesidade induzida pelo glutamato monossódico observa-se estado de resistência à insulina (HIRATA et al., 1997), dislipidemia e aumento da gordura visceral, semelhante às características encontradas na obesidade humana. Sendo assim, pode ser considerado um modelo adequado para o estudo da obesidade.

1.5 Metformina, AMPK e câncer

A metformina (Figura 4) é um agente antidiabético da classe das biguanidas e uma das drogas mais comumente utilizadas no tratamento de pacientes com diabetes tipo 2.

Ela é anti-hiperglicêmica, mas não hipoglicemiante. Não provoca a liberação de insulina pelo pâncreas e, em geral, não causa hipoglicemia mesmo em grandes doses.

Figura 4 - Fórmula estrutural da metformina (N,N-dimetilbiguanida).

A metformina age por diversos mecanismos extra-hepáticos, aumentando a sensibilidade do organismo à ação da insulina endógena e controlando a resistência à insulina por mecanismos dependentes e independentes de insulina. Apesar de não ter seu mecanismo de ação ainda totalmente elucidado, sabe-se que a principal ação da metformina em pacientes com diabetes é inibir a produção de glicose hepática, primariamente por reduzir a gliconeogênese hepática, em parte através da potencialização da ação da insulina e mediante a ativação da proteína quinase ativada pelo monofosfato de adenosina (AMPK) (SEUFERT et al., 2004; SHAW et al., 2005; ZHOU et al., 2001). Este efeito resulta na diminuição das concentrações de glicose no sangue, com conseqüente redução da hiperinsulinemia (SEUFERT et al., 2004).

Estudos mostram que a captação de metformina é dependente de um transportador de cátion orgânico (organic cation transporter, OCT) (REITMAN; SCHADT, 2007; SALANI et al., 2012; SHU et al., 2007) e que a caveolina-1 é importante na ação da metformina nas células de câncer de pulmão não-pequenas células (SALANI et al., 2012).

Ainda, sabe-se que a captação de metformina pelas células hepáticas ocorre pelo transportador OCT1, e pelas células renais pelos transportadores OCT2, um transportador expresso em abundância nessas células (DRESSER et al., 2002; WANG et al., 2002; ZHANG et al., 1997).

Shu et al. 2007 observaram que esses transportadores OCT1 são importantes não só para a captação da metformina pelas células hepáticas, mas também para o seu efeito farmacológico em reduzir os níveis de glicose circulante (Figura 5). Ainda, demonstraram que os polimorfismos genéticos do OCT 1 podem modular tanto a resposta celular quanto clínica da metformina. No entanto, sabe-se que outros transportadores podem controlar a captação da metformina em outros tecidos, como o tecido muscular esquelético e novos estudos são necessários para melhor avaliar os mecanismos de ação da metformina no organismo.

Estudos populacionais mostram que metformina também pode ter efeito anti-neoplásico ou quimiopreventivo pela ativação da AMPK na célula tumoral ou diminuição dos níveis circulantes de insulina (ALGIRE et al., 2008; EVANS, 2004; ROPELLE et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2001; ZAKIKHANI et al., 2006).

A AMPK é uma enzima que controla a carga energética celular, mantendo a homeostase energética da célula, regulando muitas moléculas e vias de sinalizações no músculo esquelético, coração, tecido adiposo, fígado, células β pancreáticas e cérebro e controla a captação, estoque e utilização de glicose e lipídios (HARDIE, 2003). Ela é ativada quando os níveis de ATP são diminuídos e os níveis de AMP são elevados, como no exercício físico, na contração muscular, na hipóxia, no estresse oxidativo, no choque osmótico, no choque térmico, no envenenamento metabólico, na isquemia, na diminuição do pH, na inibição da glicólise e desacoplamento da fosforilação oxidativa (HARDIE, 2003).

Figura 5 - Mecanismo de ação da metformina nas células.

Fonte: Shu et al., 2012.

AMPK é uma proteína heterotrimérica composta por uma subunidade catalítica α e duas subunidades regulatórias β e γ . Em mamíferos, o AMP ativa a AMPK por estimular a fosforilação do resíduo de treonina 172, localizado na subunidade α , por ação de quinase regulatória, a AMPK quinase (AMPKK). Dentre as AMPKK há a LKB1 uma proteína supressora tumoral e a proteína quinase quinase dependente de Ca^{+2} /calmodulina (CaMKK). Ativada, a AMPK inativa as enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA redutase (HMG-CoA redutase), acetil CoA carboxilase (ACC) e mTOR, exercendo efeitos sobre o metabolismo da glicose e dos lipídios, sobre a expressão gênica e sobre a síntese protéica (HADAD et al., 2008; KAHN et al., 2005; SANTOMAURO JÚN et al., 2008).

AMPK também pode ser ativada por drogas antidiabéticas orais, como as tiazolidinedionas e a metformina (HADAD et al., 2008; ZHOU et al., 2001). Metformina parece ativar a AMPK pela LKB1 e esta ativação envolve regulação de vias relevantes para o controle da proliferação celular. Estudos experimentais mostram que a metformina, ativando a AMPK, diminui a proliferação de células

epiteliais por reduzir a ativação da mTOR (ALGIRE et al., 2008; BERSTEIN et al., 2010; ZAKIKHANI et al., 2008; ZAKIKHANI et al., 2006).

mTOR é uma proteína serina/treonina quinase pertencente à família das quinases relacionadas com a PI3K. Ela está integrada a dois complexos multiprotéicos: mTORC1 e mTORC2, e é regulada por fatores de crescimento e nutrientes. Estes fatores aumentam a função da mTORC1, aumentando a fosforilação da proteína ribossomal S6 quinase (S6K) e *eukaryote initiation factor 4E binding protein 1 (4EBP1)*, reguladores chave da tradução protéica.

mTOR está super-ativada em muitas células de câncer, como resultado de alterações genéticas ou ativação aberrante dos componentes da via PI3K/Akt. Isso contribui para a perda de controle da proliferação, crescimento, diferenciação e sobrevivência das células. Portanto, metformina por inibição da mTOR, via AMPK, pode exercer um efeito anti-neoplásico importante nas células epiteliais. Essa pode ser estratégia terapêutica considerável, principalmente em indivíduos obesos com resistência à insulina e hiperinsulinemia.

Trabalho realizado por Algire et al. (2008) mostrou que a metformina diminui o crescimento tumoral em camundongos submetidos à dieta rica em energia, pela melhora da sensibilidade à insulina, diminuição dos níveis séricos desse hormônio e ativação da AMPK. Zakikhani et al. (2006) também mostraram que a metformina inibe o crescimento celular por via dependente da AMPK em células do câncer de mama. A ativação dessa via leva à inibição da via da mTOR e conseqüente redução da proliferação e crescimento celulares.

O estudo epidemiológico realizado por Evans et al. (2005), com pacientes diabéticos tipo 2, mostrou que o risco de câncer era menor no grupo tratado com metformina quando comparado com outros grupos de pacientes tratados com outras drogas antidiabéticas. Segundo esses autores, o efeito benéfico da metformina seria devido ao LKB1, cuja atividade supressora de tumor é bem estabelecida (HAWLEY et al., 2003; LIZCANO et al., 2004).

Foi descrito que a AMPK pode ativar fatores de transcrição FOXO (FOXO1, FOXO3a, FOXO4 e FOXO6) em algumas condições, como na restrição alimentar. Trabalho realizado por Greer et al. (2009) mostrou que em condições de restrição alimentar, a ativação da AMPK leva à ativação de FOXO e aumenta o tempo de vida e a resistência ao estresse em *Caenorhabditis elegans*. Outro trabalho realizado por Chiacchiera et al. (2009) mostrou que o bloqueio da p38 α inibe o crescimento de

células de câncer de cólon retal por ativar a AMPK e conseqüentemente ativar o fator de transcrição FOXO3a. No entanto, a ativação dos fatores de transcrição FOXO pela ação da metformina sobre a AMPK em células tumorais ainda não foi explorada.

1.6 Modelos experimentais de tumor

1.6.1 Tumor de Walker-256

A indução de câncer em animais é uma abordagem importante para se investigar a dinâmica tumoral, as alterações causadas no organismo portador de tumor e possíveis estratégias de tratamento. Um dos modelos animais utilizados em ratos é o Tumor de Walker-256, caracterizado como carcinossarcoma mamário, identificado pela primeira vez em 1928, por George Walker, na mama de uma rata prenhe (BLACK; NESHEIM; KINSELLA, 1994; EARLE, 1935). Agostino e Clifton em 1967 descreveram a passagem do tumor da forma sólida para a ascítica. Assim, as células tumorais na forma ascítica poderiam, novamente, ser injetadas intraperitonealmente em outros animais que sempre desenvolviam o tumor ascítico, mantendo dessa forma a viabilidade das células. Estas mesmas células poderiam ainda ser injetadas em diferentes órgãos e tecidos, sempre com o desenvolvimento de tumor sólido (CALDAROLA et al., 1968). Portanto, o tumor é capaz de se desenvolver tanto na forma sólida como na forma ascítica e possui capacidade de disseminação, tanto por via linfática como hematogênica, dependendo da via de inoculação.

Desde sua descoberta em 1928, essa linhagem tumoral tem sido amplamente utilizada em estudos de antineoplásicos e de caquexia induzida pelo tumor, por ser específica para ratos e facilmente transplantada. A inoculação do tumor de Walker-256 em ratos é eficiente, apresenta alta porcentagem de pega e reprodutibilidade, o que é muito importante para os estudos experimentais envolvendo processos neoplásicos (COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2010; EARLE, 1935; FAIAD, 2012; FAIAD et al., 2008; FERNANDES et al., 1995; FOLADOR et al., 2009; FONSECA et al., 2011; FONSECA et al., 2009; GUAITANI et al., 1982; PAVLAKI et al., 2009).

1.6.2 Células do câncer de mama MCF-7

A linhagem de células do câncer de mama humano, MCF-7, é originária de um adenocarcinoma mamário, derivado do local metastático, derrame pleural, de uma mulher de 69 anos caucasiana (ATCC; SOULE et al., 1973). É uma linhagem de câncer de mama que tem sido muito utilizada nos estudos de antineoplásicos (AMARAL et al., 2011; BERSTEIN et al., 2010; ZHUANG; MISKIMINS, 2011).

Essas células expressam o oncogene WNT7B (HUGUET et al., 1994) e mantém diversas características do epitélio mamário diferenciado, incluindo a capacidade de processar o 17β -estradiol via receptores de estrógeno citoplasmáticos, sendo assim consideradas células de câncer de mama responsivas ao estrógeno (BROOKS; LOCKE; SOULE, 1973; LIPPMAN; BOLAN, 1975; SHAFIE; BROOKS, 1977).

As células MCF-7 também são responsivas a diversos outros hormônios como a dihidrotestosterona, o cortisol, a progesterona e a insulina (HORWITZ et al., 1975; OSBORNE; LIPPMAN, 1976) e seu crescimento é inibido pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) (SUGARMAN et al., 1985).

As células MCF-7 são células aderentes mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo $4,5 \text{ g L}^{-1}$ de glicose e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

2 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi investigar os mecanismos envolvidos no maior desenvolvimento de câncer em ratos obesos-MSG e analisar os mecanismos pelos quais a metformina reduz o tumor. Para isso, foram analisados:

- o desenvolvimento tumoral em ratos obesos-MSG tratados com metformina.
- a proliferação de células do câncer de mama (MCF-7) *in vitro* tratadas com metformina.
- análise do ciclo celular, apoptose, necrose e detecção de EROs por citometria de fluxo.
- a expressão de RNAm de proteínas envolvidas com o controle do ciclo celular através da técnica de RT-PCR em tempo real.
- as vias de sinalização envolvidas no efeito da metformina, dentre elas as vias de sinalização da AMPK/mTOR/ FOXO3a.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimentos in vivo

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar, provenientes do Biotério do grupo de Hipertensão. O protocolo para uso de animais em experimentação está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do ICB (nº Protocolo – 007/04/CEEa).

3.1.2 *Indução da obesidade, inoculação do tumor de Walker-256 e tratamento com metformina*

Para indução da obesidade, ratos Wistar neonatos receberam glutamato monossódico (MSG, 4 g/kg) nos dias 2, 3, 4, 5 e 6 após o nascimento (RODRIGUEZ-SIERRA et al., 1980). Ratos do grupo controle receberam igual volume de solução de cloreto de sódio 0,9 %.

Os ratos foram mantidos em caixas de polipropileno, acondicionadas em ambiente com temperatura controlada de 22 ± 2 °C e ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso à água e alimento. Os ratos foram divididos em quatro grupos experimentais: I) Controle com tumor (CT); II) Controle com tumor tratado com metformina (CTM); III) Obeso-MSG com tumor (OT) e IV) Obeso-MSG com tumor tratado com metformina (OTM).

Todos os ratos controles (CT) e obesos-MSG (OT) receberam a inoculação de 1×10^7 células provenientes do tumor de Walker-256, subcutâneamente, no flanco superior direito, quando atingiram a idade de 16 semanas. No mesmo dia da inoculação do tumor iniciou-se o tratamento de parte dos ratos CT e parte dos ratos OT com dose única diária de metformina (300 mg/kg de peso corpóreo), diluída em água, por gavagem, durante 15 dias. Parte dos grupos CT e OT receberam água.

Os ratos dos diferentes grupos experimentais (CT, CTM, OT e OTM) foram estudados na 18ª semana de vida.

3.1.3 Caracterização da obesidade

O modelo de obesidade foi bem caracterizado por nós no desenvolvimento do projeto de Mestrado (FONSECA et al., 2011), portanto, nesse projeto, que é continuação do mesmo, apenas o cálculo do índice de Lee, peso relativo das gorduras periepídimal e retroperitoneal e da massa magra (músculos sóleo, gastrocnêmio e EDL) foram avaliados em todos os ratos.

O índice de Lee foi avaliado na 18ª semana, para isso os ratos foram pesados e o comprimento naso-anal foi determinado.

$$\text{Índice de Lee} = (\text{peso corporal}^{1/3} \text{ (g)}/\text{comprimento naso-anal em (cm)} \times 100)$$

Amostras de tecido adiposo (gordura periepídimal e retroperitoneal) e tecido muscular (sóleo, gastrocnêmio e extensor digital longo (EDL)) foram coletadas. Os tecidos foram lavados com solução fisiológica e pesados para a determinação dos pesos absoluto (g) e relativo (g/100 g peso corporal).

Amostras de tecido tumoral foram retiradas e armazenadas a -80 °C para avaliação da expressão do RNAm e de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e na apoptose por RT-PCR em tempo real e Western blotting, respectivamente.

3.1.4 Implante do tumor de Walker-256 e sua avaliação

As células do tumor de Walker-256 foram mantidas por passagens semanais de 2×10^6 células viáveis de um animal para a cavidade abdominal de um outro animal (ratos Wistar adultos). Antes de iniciar a manutenção, os ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂, em seguida foi realizada uma laparotomia e todo o líquido peritoneal foi retirado e passado para um tubo falcon de 50 ml com 5 ml de EDTA (EARLE, 1935; GUAITANI et al., 1982). A viabilidade celular foi determinada em câmara de Neubauer, pelo método de exclusão pelo azul de Tripán. Foi feita a contagem no quadrante central da mesma câmara e em seguida 2×10^6 células foram inoculadas na cavidade abdominal de ratos Wistar adultos.

Para a realização do experimento, os ratos do grupo controle e obeso-MSG foram previamente anestesiados com uma mistura de cetamina (113 mg/kg de peso, ip.) e xilasina (7,4 mg/kg de peso, ip.) na dose de 0,15 ml/ 100 g de peso corporal, por via intraperitoneal, e receberam uma suspensão de 1×10^7 células utilizando-se seringa de 1 ml e agulha 30 G, no espaço subcutâneo do flanco direito traseiro do rato e foram identificados como CT, CTM, OT e OTM como citado anteriormente.

O peso relativo do tumor foi avaliado 15 dias após a inoculação do tumor e os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (epm) em g/100g de peso corporal.

3.1.5 Curva de sobrevida

Ratos de cada grupo experimental (CT, CTM, OT e OTM) foram inoculados com o tumor de Walker-256 e o número de mortes anotados diariamente até a morte de todos os ratos. Foram então calculadas as porcentagens de morte e as curvas de sobrevida foram construídas pelo método de Kaplan & Meyer e avaliadas utilizando o teste de χ^2 da Mantel-Haenszel (MATTHEWS; FAREWELL, 1985). Também expressamos o resultado como média $\pm$ erro padrão da média (epm) do tempo de sobrevida dos ratos de cada grupo.

3.2 Experimentos in vitro

3.2.1 Linhagem celular e condições de cultura

As células da linhagem do câncer de mama (MCF-7) foram gentilmente doadas pela professora Dra Vanessa Moraes Freitas do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento do ICB-USP. As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma-Aldrich, Canadá) contendo 4,5 g L⁻¹ de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos/antifúngicos (penicilina G, 100 unidades mL⁻¹, estreptomicina sulfato 100 µg mL⁻¹, amfotericina B, 0,25 µg mL⁻¹). As culturas celulares foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm², em uma atmosfera umidificada a 37 °C e 5 % CO₂. As células foram repicadas a cada 3 dias, utilizando solução de tripsina-EDTA 0,05 % (Invitrogen), por 2 minutos, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura fresco.

3.2.2 Análise da proliferação celular *in vitro* – Técnica do MTT

A atividade metabólica das células vivas indicando sua proliferação e viabilidade celular até o período final de incubação foi avaliada pelo ensaio de proliferação celular, técnica do MTT (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005), descrito a seguir. Neste método, a mitocôndria presente em células vivas/viáveis transforma o MTT (solução amarela) em formasan (cor azul). Quanto maior a quantidade de formasan formado maior é a quantidade de células viáveis.

Células MCF-7 (150 μL ; $2,5 \times 10^4$ células por poço) cultivadas em placas de 96 poços e incubadas em meio de cultura DMEM contendo 10 % de SFB foram incubadas por 24 horas a 37 °C e 5 % CO_2 para aderir à placa. Após esse período, o meio foi removido e as células foram incubadas com meio de cultura DMEM (grupo controle) ou meio de cultura DMEM na presença de metformina (2,5, 5, 10 e 20 mmol L^{-1}) (grupo metformina) por 24, 48 e 72 horas a 37 °C e 5 % CO_2 . Em seguida, parte das células do grupo controle e parte das células do grupo metformina foram tratadas com 1 mmol L^{-1} de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 4 horas.

Após o período de incubação, as células foram tratadas com a solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina, 15 μL , 5 mg mL^{-1} em PBS, Sigma-Aldrich, Canadá) e a placa foi incubada por um período adicional de 4 horas. Após esse período, o meio de incubação foi aspirado e 50 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço. A placa foi colocada em agitação por 10 minutos, protegida da luz. Após este tempo, a redução do MTT foi determinada espectrofotometricamente pela medida da absorbância (A) nos comprimentos de onda de 490 e 650 nm, e a diferença (ΔA) calculada pela fórmula:

$$\Delta A = A_{490} - A_{650}.$$

O valor de ΔA foi transformado em número de células vivas extraído de uma curva padrão de concentração de células vivas pelo valor da absorbância.

Os grupos tratados foram comparados com o grupo controle e os resultados foram expressos como o número de células vivas presentes no meio após cada período de incubação.

3.2.3 Análise da viabilidade celular – método de exclusão pelo azul de tripan

Células MCF-7 ($2,0 \times 10^5$ células por poço) foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas a 37 °C, 5% CO₂ durante a noite. Após este período, o meio foi removido e um volume igual (1 mL) de meio de cultura DMEM (grupo controle), meio de cultura DMEM na presença de metformina (10 mmol L^{-1}) (grupo metformina) foi adicionado em cada poço e as células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após a incubação, o meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS para remover o soro. Uma alíquota foi retirada para a determinação do número de células, utilizando-se azul de tripan, em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada, nestas condições, pela técnica de exclusão do corante azul de tripan que cora especificamente as células mortas. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células mortas em relação ao número total de células contadas após o período de incubação.

3.2.4 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

As células MCF-7 ($5,0 \times 10^5$ células por poço) foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas a 37 °C, 5% CO₂, durante a noite, para aderir. Após este período, o meio foi removido, volume igual (3 mL) de meio de cultura DMEM (grupo controle) ou meio de cultura DMEM na presença de metformina (10 mmol L^{-1}) foi adicionado em cada poço e as células foram incubadas por 24, 48 e 72 horas, a 37 °C e 5% CO₂.

Em seguida, as células foram coletadas, lavadas em PBS e fixadas em 4 mL de etanol 70% (gelado, -20 °C), por um período de 12 horas a 4 °C. Após esse período, as células foram centrifugadas a $380 \times g$ por 5 minutos à temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi removido cuidadosamente, as células foram ressuspensas em 4 mL de PBS e centrifugadas novamente a $380 \times g$ por 5 minutos a TA. O sobrenadante foi removido e o pellet foi ressuspenso em 400 µL de PBS. A solução de células foi transferida para um tubo do citômetro de fluxo, 10 µL de

RNase A (10 mg mL^{-1} ; concentração final - 0.25 mg mL^{-1}) foram adicionados e a mistura foi incubada por 1 hora a 37°C . Em seguida, $64 \text{ }\mu\text{L}$ de iodeto de propídio (IP) ($250 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; concentração final - $34.5 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionados e as células foram incubadas por um período adicional de 15 minutos a 37°C , protegidas da luz. A distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo pela análise do conteúdo de DNA nas células (FACScan (Becton Dickinson Heidelberg, Germany)).

Para a análise do conteúdo de DNA nas células, a medida de fluorescência vermelha (emitida pela coloração com o iodeto de propídio, IP) foi feita no canal FL2-A. Um histograma de log de FL2-A (eixo-x) versus número de células (eixo-y) foi gerado. No histograma aparecem dois picos. O primeiro pico representa as células nas fases G0/G1, células com o conteúdo de DNA igual a $2n$, DNA não duplicado. O espaço entre os dois picos representa as células na fase S, fase de síntese de DNA, células com a média do conteúdo de DNA igual a $3n$, e o segundo pico representa as células nas fases G2/M, células com o conteúdo de DNA igual a $4n$, pois o DNA já está totalmente duplicado. O espaço entre o eixo-y até o primeiro pico representa as células na fase sub-G1 (células apoptóticas).

Quatro cursores na posição horizontal foram colocados de forma a abranger/quantificar cada uma dessas fases. O resultado foi expresso como a porcentagem de células MCF-7 em cada fase do ciclo celular em relação ao número total de células contadas (10.000 células).

3.2.5 Análise da apoptose – CaspaTag™ caspase-3/7 *in situ* assay

O “CaspaTag *In Situ* Apoptosis Detection Kit” (Chemicon, Temecula, USA) detecta a presença de caspases ativas em células vivas em processo de apoptose. Inibidores da atividade das caspases, marcados com fluorescência, se ligam irreversivelmente às caspases ativas, permitindo que células apoptóticas sejam identificadas pela sua fluorescência. Assim, as células que apresentam caspases 3 e 7 ativas são marcadas com o peptídeo inibidor da caspase-3, fluorometil cetona marcado com a carboxifluoresceína e emitem fluorescência verde. Essa fluorescência é detectada e quantificada pela citometria de fluxo (kit “CaspaTag Caspase-3/7 Assay Kit”, Chemicon, Temecula, USA).

Células MCF-7 (7.0×10^5 células por poço) foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas a 37 °C, 5 % CO₂, para permitir a adesão das células à parede da placa. Após este tempo, o meio foi removido e solução nova de meio de cultura DMEM (grupo controle) ou de meio de cultura DMEM na presença de metformina (10 mmol L^{-1}) (grupo metformina) foi adicionado em cada poço e as células foram incubadas por 48 e 72 horas, a 37 °C, 5% CO₂. Após este período, parte das células do grupo controle e parte das células do grupo metformina foram tratadas com 1 mmol L^{-1} de H₂O₂ por 4 horas.

Em seguida, as células foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL e centrifugadas a $380 \times g$ por 5 minutos a TA. O sobrenadante foi removido cuidadosamente e foram adicionados 300 µL de PBS. Estes 300 µL de suspensão de células ($\sim 10^6$ células) foram transferidos para tubos estéreis, 10 µL de reagente FLICA 30X, recentemente preparado, foi adicionado e incubado por 1 hora a 37 °C, 5 % CO₂, protegidos da luz. As células foram homogeneizadas gentilmente duas vezes durante este período, para ressuspender as células decantadas.

Após este período de incubação, 2 mL de tampão de lavagem (1X) foi adicionado em cada tubo e misturado gentilmente. As células foram centrifugadas a $380 \times g$ por 5 minutos a TA. Este processo foi repetido novamente. O sobrenadante foi removido, o pellet de células foi ressuspenso em 400 µL de tampão de lavagem (1X) e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo - FACScan (Becton Dickinson Heidelberg, Germany).

Para a análise foi utilizado um laser de argônio de 15 mW a 488 nm (filtro FITC) e a fluorescência foi medida no canal FL1. Um histograma de log de FL1 (eixo-x) versus número de células (eixo-y) foi gerado. No histograma, aparecem duas populações de células representadas por dois picos. As células negativas para as caspases ativas frequentemente ocorrem dentro do primeiro pico e a população de células positivas para as caspases ativas aparecerem dentro do segundo pico, mostrando uma maior intensidade de fluorescência. Um cursor na posição vertical foi colocado entre os dois picos e a porcentagem de células presentes à direita desse cursor, que abrange o segundo pico, representa a porcentagem de células positivas para as caspases 3 e 7 ativas em relação ao número total de células contadas (10.000 células contadas).

3.2.6 Análise de necrose

Células MCF-7 ($6,0 \times 10^5$ células por poço) foram cultivadas em placas de 6 poços e incubadas para permitir a adesão na parede da placa, durante 24 horas. Após este tempo, o meio foi removido, meio de cultura DMEM (controle) ou meio de cultura DMEM na presença de metformina (10 mmol L^{-1}) foi adicionado em cada poço e as células foram incubadas por 48 e 72 horas, a 37°C , 5 % CO_2 . Em seguida, as células foram removidas da placa e centrifugadas a $380 \times g$ por 5 minutos a TA. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e as células foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (1X). Por fim, o pellet celular foi ressuspenso em $400 \mu\text{L}$ de tampão (1X), as células foram transferidas para um tubo do citômetro de fluxo e $2 \mu\text{L}$ de solução de IP ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi adicionado. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo - FACScan (Becton Dickinson Heidelberg, Germany).

Para a análise, a medida de fluorescência vermelha (emitida pelo iodeto de propídio, IP) foi feita no canal FL2. Um histograma de log de FL2 (eixo-x) versus número de células (eixo-y) foi gerado. No histograma, aparecem duas populações de células representadas por dois picos. As células negativas para a marcação com o iodeto de propídio ocorrem dentro do primeiro pico, por outro lado a população de células positivas para a marcação com o iodeto de propídio aparecem como um pico separado mostrando uma maior intensidade de fluorescência. Um cursor na posição vertical foi colocado entre os dois picos e a porcentagem de células presentes à direita desse cursor, que abrange o segundo pico, representa a porcentagem de células positivas para o IP em relação ao número total de células contadas ($10.000 \text{ células contadas} / 10.000 \text{ eventos}$).

3.2.7 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) – técnica do CM-H₂DCFDA

CM-H₂DCFDA (diacetato de 5-(6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína, acetil éster) é uma molécula permeável à célula e é usada para medir a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelular.

DCFDA é uma molécula não fluorescente que quando captada pelas células é desacetilada por esterases celulares e torna-se fluorescente. Subseqüentemente,

DCFDA é rapidamente oxidado a um derivado altamente fluorescente (DCF) que permite a avaliação da produção de oxidantes intracelulares (THANNICKAL; FANBURG, 2000). CM-H₂DCFDA é um derivado do DCFDA, mas com um grupo clorometil tiol reativo, que aumenta a capacidade do composto ligar-se aos componentes intracelulares, prolongando assim a retenção do corante.

Células MCF-7 ($1,0 \times 10^6$ células por garrafa) foram cultivadas em garrafas de 25 cm² e incubadas para permitir a adesão na parede do frasco, durante 24 horas a 37 °C e 5% CO₂. Após esse período o meio foi removido e as células foram tratadas apenas com o meio de cultura DMEM (grupo controle) ou tratadas com solução de metformina (10 mmol L⁻¹) (grupo metformina) por 48 e 72 horas a 37 °C e 5% CO₂. Em seguida, parte das células do grupo controle e parte das células do grupo metformina foram tratadas com 1 mmol L⁻¹ de H₂O₂ por 4 horas. Então, o meio foi removido e as células foram incubadas com 1 mL da solução de CM-H₂DCFDA por 30 minutos. Após este período de incubação, a solução corante foi removida, as células foram retiradas do frasco e centrifugadas a 500 x *g* por 5 minutos a 4 °C. Por fim, as células foram lavadas duas vezes com PBS, colocadas no gelo e cobertas para protegê-las da luz. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo - FACScan (Becton Dickinson Heidelberg, Germany).

Para a análise foi utilizado um laser de argônio de 15 mW a 488 nm (filtro FITC) e a fluorescência emitida pela coloração com o CM-H₂DCFDA foi medida no canal FL1. Foi feito um gráfico de SSC-H (eixo-y) vs FSC-H (eixo-x). Esse gráfico foi duplicado e onde estava escrito SSC-H foi denominado FL1. No primeiro gráfico foi feita uma janela onde as células de interesse estavam. No segundo gráfico como janela foi selecionado G1=R1. Foi feita a análise de 10.000 eventos e o resultado foi expresso como a média da intensidade de fluorescência.

3.2.8 Quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) – Análise da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para determinação de peróxido de hidrogênio foi utilizada a técnica descrita por Pick & Keisari (1980), adaptada para micro ensaio por Pick & Mizel (1981). A técnica baseia-se na oxidação do fenol vermelho pelo peróxido de hidrogênio, reação dependente da enzima peroxidase.

Células MCF-7 (150 μL ; 2×10^5 células por poço) foram cultivadas em placas de 96 poços e incubadas em meio contendo 10% de SFB. Após incubação por 24 horas, o meio foi removido e as células foram tratadas apenas com o meio de cultura DMEM (grupo controle) ou meio de cultura DMEM na presença de metformina (10 mmol L^{-1}) (grupo metformina) por 24, 48 e 72 horas a 37°C e 5% CO_2 . Após este período, as células foram tratadas com $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de catalase por 30 min.

Em seguida, o meio foi removido, a placa foi lavada e as células foram incubadas com 100 μL /poço de solução de fenol vermelho. Algumas células também foram incubadas na presença de 10 μL de solução de acetato de forbol miristato (PMA – 40 ng) (ativador indireto da NADPH oxidase). A placa foi incubada a 37°C , em atmosfera úmida, por 1 hora. Após esse período, a reação foi interrompida pela adição de 20 μL da solução de hidróxido de sódio (NaOH, 1 N) e a absorbância do sobrenadante foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 620 nm, contra branco constituído por solução de fenol vermelho. O valor da absorbância foi transformado em nmoles de H_2O_2 extraído de uma curva padrão de concentração de H_2O_2 pelo valor da absorbância. Os resultados foram apresentados em nmoles de $\text{H}_2\text{O}_2/8 \times 10^5$ células/hora.

3.3 Quantificação da expressão do RNAm por RT-PCR em tempo real

A expressão de RNAm das proteínas FOXO3a (gene FOXO3), ciclina D1 (gene CCND1), pRB (gene PRB1), p27 (gene CDKN1B), p53 (gene TP53), Bax (gene BAX) e Bcl-2 (gene BCL2) foram avaliadas pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR em tempo real) no tecido tumoral e nas células MCF-7 cultivadas em meio de cultura DMEM. Para tal, as amostras foram removidas rapidamente e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até o processamento.

O RNA total (tRNA) foi obtido utilizando o método de TrizolÒ (Invitrogen-EUA). Após a obtenção do RNA, a integridade das amostras foi verificada pela presença das bandas 18S e 28S. As amostras foram então submetidas à digestão do DNA remanescente. Após esse procedimento, 2 μg do RNA total de cada amostra foram utilizados para obtenção da fita de cDNA pelo método da transcriptase reversa (reação de RT). A reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) foi

realizada em um volume final de 12,5 μ L contendo oligonucleotídeos específicos, que foram construídos a partir de informações retiradas do GENE BANK. A especificidade da reação com SYBR[®] Green foi confirmada pela análise da curva de dissociação.

As reações de PCR foram realizadas e analisadas usando o sistema Corbett Research (Corbett Life Sciences, Australia). A expressão gênica foi quantificada utilizando o cálculo do DCt ("cycle threshold") (PFAFFL, 2001). O cDNA sintetizado a partir do RNAm da β -actina (controle interno, no tecido tumoral) e do GAPDH (controle interno, nas células MCF-7) foi utilizado para normalização das amostras. O resultado foi expresso em unidades arbitrárias referentes à variação da taxa de indução em relação ao grupo controle, normalizadas pela β -actina (gene ACTB) ou GAPDH (gene GAPDH).

3.4 Análise da expressão protéica pela técnica de Western blotting

As amostras de tecido tumoral dos animais mantidas a -80 °C foram trituradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão contendo Triton-X-100 (1%), Tris (100 mM, pH 7,4), pirofosfato de sódio (100 mM), fluoreto de sódio (100 mM), EDTA (10 mM), ortovanadato de sódio (10 mM), PMSF (2 mM) e aprotinina (0,01 mg/mL).

As células MCF-7 foram homogeneizadas em 200 μ L de tampão de lise (NaCl 150 mmol L⁻¹, NP40 1 %, tris-HCl 50 mmol L⁻¹, PMSF 1 mg mL⁻¹, aprotinina 1 mg mL⁻¹, pepstatin 0.1 mg mL⁻¹, leupeptin 1 mg mL⁻¹, Na₃VO₄ 10 mmol L⁻¹ e NaF 10 mmol L⁻¹).

Os extratos teciduais e os homogeneizados das células em cultura foram centrifugados a 12000 *g* a 4 °C por 30 minutos para a remoção dos debris celulares. Após a centrifugação, o conteúdo protéico total foi quantificado pelo método de Bradford (BioRad). O sobrenadante foi tratado com tampão de Laemmli contendo DTT (100 mM), aquecido a 100 °C por 5 minutos e 100 μ g de proteína total foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 10%).

A transferência das proteínas separadas no gel foi feita eletricamente para uma membrana de PVDF (BioRad), por 1 hora e 30 minutos a 100 V. Após transferência, a membrana de PVDF foi incubada com uma solução bloqueadora com 5 % de albumina bovina sérica (BSA- bovin serum albumin) por 1 hora e 30

minutos em temperatura ambiente para reduzir a ligação inespecífica dos anticorpos às proteínas na membrana. Em seguida, as membranas foram lavadas com TTBS (pH = 7.4), três vezes de 10 minutos e, então, incubadas com o anticorpo primário a 4 °C durante a noite.

Após este período, as membranas foram lavadas exaustivamente com TTBS (pH = 7.4) e as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário, conjugado com peroxidase por 1,5 horas em TA. Em seguida as membranas foram lavadas 3 vezes de 15 minutos com TTBS (pH = 7.4) e, logo após, incubadas com a solução de quimioluminescência, por 5 minutos, como descrito no protocolo do kit (Amersham).

Todos os anticorpos primários foram adquiridos da Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, USA), exceto os anticorpos para Bax e Bcl-2 que foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). A diluição dos anticorpos encontra-se a seguir: anti-IR (1:100), anti-p-IR (1:100), anti-ERK1/2 (1:1000), anti-p-ERK1/2 (1:1000), anti-p38 (1:1000), anti-p-p38 (1:1000), anti-FOXO3a (1:1000), anti-p-FOXO3a (Ser253) (1:200), anti-AMPK α (1:1000), anti-p-AMPK α (Thr172) (1:500), anti-p70S6K (1:1000), anti-p-p70S6K (Thr389) (1:500), anti-Bax (1:100), anti-Bcl-2 (1:100), anti-caspase-3 (1:1000) e anti- β -actina (1:10000). Os anticorpos secundários utilizados foram os seguintes: anti-rabbit IgG (1:5000; Cell Signaling Technologies) foi usado para todos os anticorpos primário exceto para Bcl-2 que foi usado anti-mouse IgG (1:2000) e para p-IR que foi usado anti-goat (1:2000).

3.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o teste “t” de Student no caso de comparação de duas médias ou análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Bartlett para a homogeneidade das variâncias e teste de múltiplas comparações Tukey-Kramer para o caso de comparação de mais de duas médias. O nível de significância mínima aceitável foi $p < 0,05$. O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras e os resultados dos experimentos *in vitro* expressam a média de pelo menos 3 experimentos independentes.

4 RESULTADOS

4.1 Experimentos in vivo

4.1.1 Caracterização da obesidade

O tratamento de ratos neonatos com MSG induziu obesidade, caracterizada pelo aumento do índice de Lee e do peso relativo das gorduras periepídimal e retroperitoneal, e diminuição significativa da massa magra após 18 semanas de idade (Tabela 3).

A metformina não alterou o índice de Lee e a massa magra, mas diminuiu significativamente o peso relativo das gorduras periepídimal e retroperitoneal nos ratos do grupo OTM quando comparado com o grupo OT (Tabela 3).

Tabela 3 - Parâmetros biológicos dos animais.

	CT	CTM	OT	OTM
Peso Corporal Inicial (g)	392,5 ± 7,1	404,7 ± 7,2	313,5 ± 5,6 ***	314,5 ± 6,9 ***
Peso Corporal Final (g)	408,1 ± 10,4	420,1 ± 7,8	330,0 ± 5,6 ***	320,8 ± 7,1 ***
Índice de Lee (x100)	29,97 ± 0,2	30,15 ± 0,2	31,22 ± 0,2 *	31,53 ± 0,5 **
Gordura Periepídimal (g/100g peso)	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2 ***	1,5 ± 0,1 #
Gordura Retroperitoneal (g/100g peso)	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	2,5 ± 0,2 ***	1,8 ± 0,2 #
Músculo Sóleo (g/100g peso)	0,042 ± 0,001	0,039 ± 0,002	0,029 ± 0,001 **	0,029 ± 0,003 ***
Músculo EDL (g/100g peso)	0,039 ± 0,002	0,035 ± 0,002	0,026 ± 0,002 ***	0,027 ± 0,003 ***
Músculo Gastrocnêmio (g/100g peso)	0,530 ± 0,016	0,486 ± 0,023	0,412 ± 0,018 **	0,395 ± 0,027 **

Controle tumor (CT), controle tumor metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor metformina (OTM) (n=10 para cada grupo experimental). *** p<0.0001 vs CT, ** p<0.001 vs CT e # p< 0.05 vs OT.

4.1.2 Desenvolvimento do tumor de Walker-256

O peso relativo do tumor foi significativamente maior no grupo OT quando comparado ao CT e a metformina foi eficaz em impedir o aumento no grupo obeso-MSG, tornando o tamanho do tumor semelhante a aquele do grupo controle (Figura 6).

Figura 6 - Peso relativo (g/100g peso corporal) do tumor de Walker-256 nos grupos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM).

A obesidade foi induzida com glutamato monossódico (MSG) em ratos neonatos e a inoculação do tumor e início do tratamento com metformina foram realizados quando os ratos apresentavam 16 semanas de vida. Os valores foram calculados após 15 dias da inoculação do tumor. O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras. *** $p < 0,0001$ vs CT e # $p < 0,0001$ vs OT.

4.1.3 Curva de sobrevida

O tempo de sobrevida dos ratos obesos-MSG com tumor (OT) foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle com tumor (CT). O tratamento com metformina aumentou significativamente o tempo de sobrevida nos ratos OT (Figura 7).

Figura 7 - Curva de sobrevida (A) e Tempo de Sobrevida (B) dos animais dos grupos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM).

A obesidade foi induzida com glutamato monossódico (MSG) em ratos neonatos e a inoculação do tumor e início do tratamento com metformina foram realizados quando os ratos apresentavam 16 semanas de vida. A curva de sobrevida foi avaliada do primeiro dia do experimento (data em que o tumor de Walker-256 foi inoculado) até a data em que o último rato morreu. A curva de sobrevida (A) representa a porcentagem de animais vivos em relação ao tempo. O tempo de sobrevida (B) representa a média do tempo de vida dos animais após a inoculação do tumor de Walker-256. O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se entre parênteses (A) e dentro das barras (B). * $p < 0.05$ vs CT e # $p < 0.05$ vs OT.

4.1.4 Análise da expressão de RNAm por RT-PCR em tempo real das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (ciclina D1, pRb, p53 e p27) no tecido tumoral

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso-MSG e os respectivos grupos tratados na expressão de RNAm de ciclina D1 (gene CCND1) e p53 (gene TP53) (Figuras 8 A e C, resp.). Quanto à expressão de RNAm de pRb (gene PRB1), no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (CTM e OTM) a expressão foi maior do que aqueles dos respectivos controles CT e OT (Figura 8 B). Quanto à expressão de RNAm de p27 (gene CDKN1B) apenas no grupo OTM a expressão foi maior do que seu respectivo controle OT (Figura 8 D).

Figura 8 - Expressão de RNAm de ciclina D1 (gene CCND1) (A), pRb (gene PRB1) (B), p53 (gene TP53) (C) e p27 (gene CDKN1B) (D) no tecido tumoral dos ratos.

Controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM). A obesidade foi induzida com glutamato monossódico (MSG) em ratos neonatos e a inoculação do tumor e início do tratamento com metformina foram realizados quando os ratos apresentavam 16 semanas de vida. Amostras de tecido tumoral foram coletadas 15 dias após a inoculação do tumor e a expressão de RNAm foi avaliada por RT-PCR. O número de ratos utilizados em cada grupo encontra-se dentro das barras. * $p < 0,05$ vs CT, ** $p < 0,001$ vs OT e # $p < 0,001$ vs OT.

4.1.5 Análise da expressão protéica dos receptores de insulina no tecido tumoral

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso-MSG e os respectivos grupos tratados na expressão de IR β total. No entanto, a expressão de fosfo-IR β (Tyr 1162/1163) foi significativamente maior no tecido tumoral do grupo OT quando comparado ao grupo CT e a metformina foi eficaz em reduzir a fosforilação do IR no grupo obeso-MSG (Figura 9).

Figura 9 - Expressão protéica dos receptores de insulina (IR e p-IR) no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para o receptor de insulina IR, nas formas total e fosforilada (p), no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a razão das duas formas total e fosforilada dos receptores de insulina (IR). Os dados são representados como média $\pm$ epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras. * $p < 0.05$ vs CT e # $p < 0.05$ vs OT.

4.1.6 Análise da expressão protéica das MAPKs no tecido tumoral

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso-MSG e os respectivos grupos tratados na expressão de ERK1/2 total. No entanto, a expressão de fosfo-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204) no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (CTM e OTM) foi significativamente menor do que aqueles dos respectivos controles (CT e OT) (Figura 10).

Figura 10 - Expressão protéica da ERK 1/2 e fosfo-ERK 1/2 (Thr 202/Tyr 204) no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para a proteína ERK1/2, nas formas total e fosforilada (p), no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a razão das duas formas total e fosforilada da proteína ERK 1/2. Os dados são representados como média $\pm$ epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras. * $p < 0,05$ vs OT e ** $p < 0.001$ vs CT.

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso-MSG e os respectivos grupos tratados na expressão de p38 MAPK total e fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) no tecido tumoral dos ratos (Figura 11).

Figura 11 - Expressão protéica da p38 e fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para a proteína p38 MAPK, nas formas total e fosforilada (p), no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a razão das duas formas total e fosforilada da proteína p38 MAPK. Os dados são representados como média $\pm$ epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras.

4.1.7 Análise da expressão protéica da AMPK e da p70S6K no tecido tumoral

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso-MSG e os respectivos grupos tratados na expressão de AMPK total. No entanto, a expressão de fosfo-AMPK (Thr 172) no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (CTM e OTM) foi significativamente maior do que aqueles dos respectivos controles (CT e OT) (Figura 12).

Figura 12 - Expressão protéica da AMPK α e fosfo-AMPK α (Thr 172) no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), nas formas total e fosforilada (p), no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a razão das duas formas total e fosforilada da proteína AMPK. Os dados são representados como média $\pm$ epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras. * $p < 0,05$ vs CT e OT.

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso-MSG e os respectivos grupos tratados na expressão de p70S6K total. No entanto, a expressão de fosfo-p70S6K (Thr 389) no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (CTM e OTM) foi significativamente menor do que aqueles dos respectivos controles (CT e OT) (Figura 13).

Figura 13 - Expressão protéica da p70S6K e fosfo-p70S6K (Thr 389) no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para a proteína p70S6K, nas formas total e fosforilada (p), no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a razão das duas formas total e fosforilada da proteína p70S6K. Os dados são representados como média $\pm$ epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras. * $p < 0,05$ vs CT e OT.

4.1.8 Análise da expressão do FOXO3a no tecido tumoral

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso-MSG e os respectivos grupos tratados na expressão de FOXO3a total. No entanto, a expressão de fosfo-FOXO3a (Ser253) no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (CTM e OTM) foi significativamente menor do que aqueles dos respectivos controles (CT e OT) (Figura 14).

Figura 14 - Expressão protéica da FOXO3a e fosfo-FOXO3a (Ser253) no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para a proteína FOXO3a, nas formas total e fosforilada (p), no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a razão das duas formas total e fosforilada da proteína FOXO3a. Os dados são representados como média $\pm$ epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras. * $p < 0,05$ vs CT e OT.

4.1.9 Análise da expressão das proteínas envolvidas na apoptose (Bax, Bcl-2 e caspase-3) no tecido tumoral

A expressão de Bax e a razão Bax/Bcl-2 foram significativamente maiores no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (CTM e OTM) quando comparado a aqueles dos respectivos controles (CT e OT) (Figura 15 A e C). A expressão de Bcl-2 foi significativamente maior no grupo OT quando comparado ao grupo CT e foi significativamente menor no grupo OTM quando comparado ao grupo OT (Figura 15 B). A expressão de caspase-3 clivada (17 e 19 kDa) no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (CTM e OTM) foi significativamente maior do que aqueles dos respectivos controles (CT e OT) (Figura 16).

Figura 15 - Expressão protéica de Bax e Bcl-2 no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para as proteínas Bax e Bcl-2 no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a análise densitométrica da expressão das proteínas Bax e Bcl-2. Valores normalizados pela β -actina (A e B, respectivamente). O gráfico C representa a razão das duas proteínas. Os dados são representados como média $\pm$ epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras. * p<0,05 vs CT e OT, ** p<0.001 vs OT.

Figura 16 - Expressão protéica da caspase-3 clivada no tecido tumoral dos ratos.

Imagens representativas do Western blotting para as formas clivadas da proteína caspase-3 (17 e 19 kDa) no tecido tumoral dos ratos controle tumor (CT), controle tumor tratado com metformina (CTM), obeso-MSG tumor (OT) e obeso-MSG tumor tratado com metformina (OTM) com 18 semanas de idade. O gráfico mostra a análise densitométrica da expressão da caspase-3 clivada. Valores normalizados pela β-actina. Os dados são representados como média ± epm. O número de amostras utilizadas em cada grupo encontra-se dentro das barras. ** $p < 0.001$ vs CT e * $p < 0,05$ vs OT.

4.2 Experimentos in vitro

4.2.1 Análise da proliferação de células MCF-7

O número de células MCF-7 foi significativamente menor após o tratamento com metformina e esse efeito ocorreu de maneira dependente da concentração e do tempo de tratamento (Figura 17 A). Portanto, esses dados demonstram que o tratamento com metformina apresenta efeito antiproliferativo sobre as células do câncer de mama (MCF-7). Ainda, foi observada a presença de vacúolos nas células tratadas com metformina por 72 horas (Figura 17 B).

Figura 17 - Metformina apresentou efeito antiproliferativo nas células do câncer de mama (MCF-7).

A, Células MCF-7 foram tratadas com metformina (2,5, 5, 10 e 20 mmol L⁻¹) por 24, 48 e 72 horas. A proliferação celular foi analisada pela técnica do MTT. Dados foram expressos como o número de células viáveis comparado com o controle (n=16 amostras por grupo). B, Células MCF-7 foram tratadas (Metf) ou não (Controle) com metformina (10 mmol L⁻¹) por 24, 48 e 72 horas e visualizadas por microscopia invertida de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100) (Objetiva de 20 X). ** p<0.001 vs Controle, *** p<0.0001 vs Controle.

4.2.2 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

O tratamento com metformina promoveu a parada do ciclo celular na fase G₀-G₁ e aumentou a apoptose de maneira dependente do tempo. Após 72 horas de tratamento, 70% das células estavam na fase G₀-G₁ e apenas 1% das células estavam na fase S. Após 48 horas, o número de células apoptóticas (fase sub G₁) foi 2-vezes maior no grupo tratado com metformina comparado ao grupo controle e após 72 horas foi 4 vezes maior (Tabela 4).

Tabela 4 - Metformina promoveu parada do ciclo celular e apoptose de maneira tempo-dependente.

<i>Grupos</i>	<i>Tempo (h)</i>	<i>Fases</i>			
		Sub G1	G0-G1	S	G2-M
Controle	24	3.5 ± 0.2	42.8 ± 0.9	6.9 ± 0.2	46.9 ± 0.9
	48	2.9 ± 0.1	50.7 ± 0.4	11.6 ± 0.1	34.7 ± 0.4
	72	4.1 ± 0.6	63.7 ± 0.8	9.8 ± 0.1	22.7 ± 1.4
Metformina	24	4.6 ± 0.2 *	46.0 ± 0.3 *	9.4 ± 0.2 ***	39.9 ± 0.6 *
	48	7.0 ± 0.5 ***	67.3 ± 0.1 ***	3.2 ± 0.1 ***	22.4 ± 0.5 ***
	72	14.7 ± 0.3 ***	69.8 ± 0.2 ***	1.0 ± 0.04 ***	14.8 ± 0.5 **

Células MCF-7 foram tratadas com metformina (10 mmol L⁻¹) por 24, 48 e 72 horas. A análise do ciclo celular foi analisada através da coloração com iodeto de propídio no citômetro de fluxo (FACScan - Becton Dickinson Heidelberg, Germany) e os resultados foram expressos como a porcentagem de células MCF-7 em cada fase do ciclo celular em relação ao número total de células contadas. * p<0.05 vs Controle; ** p<0.001 vs Controle; *** p<0.0001 vs Controle.

4.2.3 Análise da apoptose

A apoptose, avaliada pela porcentagem de células positivas para as caspases 3 e 7 ativas, foi significativamente maior após 72 horas do tratamento com metformina comparada com as células não tratadas (controle) (Figura 18).

Figura 18 - Metformina aumentou a atividade das caspases-3 e -7 após 72 horas de tratamento.

As células foram tratadas com metformina por 48 e 72 horas e a quantidade de células MCF-7 positivas para as caspases-3 e -7 ativas foi determinado através do kit "CaspasTag Caspase-3/7 Assay" e analisada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células positivas para as caspases 3 e 7 ativas em relação ao número total de células contadas. *** $p < 0.0001$ vs Controle.

4.2.4 Análise da necrose

O tratamento com metformina (10 mmol L^{-1}) por 48 e 72 horas aumentou significativamente a necrose determinada por citometria de fluxo após coloração com iodeto de propídio (Figura 19).

Figura 19 - Metformina aumentou a necrose celular de forma tempo-dependente.

Células MCF-7 foram tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 48 e 72 horas e a quantidade de células positivas para iodeto de propídio (células em necrose) foi analisada por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células positivas para o iodeto de propídio em relação ao número total de células contadas. ** $p < 0.001$ vs Controle, *** $p < 0.0001$ vs Controle.

4.2.5 Análise da expressão das proteínas AMPK, p70S6K e FOXO3a nas células em cultura

Não houve diferença significativa na expressão de AMPK total entre os grupos controle e tratados com metformina após 24, 48 e 72 horas (Figuras 20 A, C e E, resp.). No entanto, a expressão de fosfo-AMPK (Thr 172) nas células MCF-7 foi significativamente maior após tratamento com metformina por 48 e 72 horas quando comparada com o grupo controle (Figuras 20 D e F, resp.).

Não houve diferença significativa na expressão de p70S6K total entre os grupos controle e tratados com metformina após 24, 48 e 72 horas (Figuras 21 A, C e E, resp.). No entanto, a expressão de fosfo-p70S6K (Thr 389) nas células MCF-7 foi significativamente menor após tratamento com metformina por 24, 48 e 72 horas quando comparada ao grupo controle (Figuras 21 B, D e F, resp.).

A expressão do RNAm de FOXO3a foi significativamente maior nas células tratadas com metformina quando comparada com as células não tratadas (Figuras 22 A). A expressão protéica do fator de transcrição FOXO3a foi significativamente maior nas células tratadas com metformina por 48 horas, porém foi significativamente menor após 72 horas de tratamento quando comparada com as células não tratadas (Figuras 22 B). A expressão de fosfo-FOXO3a (Ser 413) foi significativamente maior nas células tratadas com metformina por 24 e 72 horas quando comparada com o grupo controle, demonstrando um aumento da atividade do FOXO3a mediado pela ação da metformina via AMPK (Figura 22 B). Ainda, a expressão de fosfo-FOXO3a (Ser 253) foi significativamente menor nas células tratadas com metformina por 48 horas quando comparada com o grupo controle, demonstrando um aumento da atividade do FOXO3a (Figura 22 B).

Figura 20 - Expressão protéica da AMPK α e fosfo-AMPK α (Thr 172) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.

Imagens representativas do Western blotting para a proteína AMPK α , nas formas total e fosforilada (p) nas células MCF-7 tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 24, 48 e 72 h. Os gráficos A, C e E mostram a análise densitométrica da expressão da proteína AMPK com os valores normalizados pela β -actina. Os gráficos B, D e F mostram a razão das duas formas total e fosforilada da proteína AMPK. Os dados são representados como média $\pm$ epm. * $p < 0,05$ vs CT e OT. * $p < 0,05$ vs Controle; ** $p < 0,001$ vs Controle.

Figura 21 - Expressão protéica da p70S6K e fosfo-p70S6K (Thr 389) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.

Imagens representativas do Western blotting para a proteína p70S6K, nas formas total e fosforilada (p) nas células MCF-7 tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 24, 48 e 72 h. Os gráficos A, C e E mostram a análise densitométrica da expressão da proteína p70S6K com os valores normalizados pela β-actina. Os gráficos B, D e F mostram a razão das duas formas total e fosforilada da proteína p70S6K. Os dados são representados como média $\pm$ epm. * $p < 0.05$ vs Controle; *** $p < 0,0001$ vs Controle.

Figura 22 - Expressão de FOXO3a, fosfo-FOXO3a (Ser 413) e fosfo-FOXO3a (Ser 253) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.

A, As células foram tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 48 e 72 horas, e a análise da expressão do mRNA de FOXO3a foi realizada por RT-PCR. B, Células MCF-7 foram tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 24, 48 e 72 horas e a expressão protéica de FOXO3a, fosfo-FOXO3a (Ser 413) e fosfo-FOXO3a (Ser 253) foi determinada por Western blotting, respectivamente. * $p < 0.05$ vs Controle, ** $p < 0,001$ vs Controle e *** $p < 0,0001$ vs Controle.

4.2.6 Análise da expressão de RNAm das proteínas envolvidas no controle do ciclo celular (ciclina D1 e p27) e apoptose (Bax e Bcl-2) nas células em cultura

Metformina diminuiu significativamente a expressão do RNAm de ciclina D1 (gene CCND1) e aumentou a expressão de RNAm de p27 (gene CDKN1B) após 48 e 72 horas de tratamento (Figuras 23 A e B, respectivamente). Ainda, a metformina aumentou a expressão de RNAm de Bax (gene BAX) e diminuiu a de Bcl-2 (gene BCL-2), e aumentou significativamente a razão Bax/Bcl-2, confirmando o envolvimento desta via na apoptose das células (Figura 24).

Figura 23 - Expressão de RNAm de ciclina D1 (gene CCND1) e p27 (gene CDKN1B) nas células MCF-7 tratadas ou não com metformina.

A e B, As células foram tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 48 e 72 horas, e a análise da expressão do RNAm de ciclina D1 (gene CCND1) e p27 (gene CDKN1B), respectivamente, foi realizada por RT-PCR. * $p < 0.05$ vs Controle.

Figura 24 - Metformina aumentou a razão BAX/BCL2 em células MCF-7.

As células foram tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 48 e 72 horas, e a análise da expressão do RNAm de Bax (gene BAX, A e D) e Bcl-2 (gene BCL2, B e E) foi realizada por RT-PCR. Também foi determinada a razão BAX/BCL2 (C e F). * $p < 0.05$ vs Controle; ** $p < 0.001$ vs Controle; *** $p < 0.0001$ vs Controle.

4.2.7 Análise da expressão das proteínas envolvidas na apoptose (Bax e Bcl-2) nas células MCF-7

A metformina aumentou a expressão de Bax após 48 horas de tratamento (Figura 25 D) e diminuiu significativamente a expressão de Bcl-2 após 24, 48 e 72 horas de tratamento (Figuras 25 B, E e H). Ainda, a metformina aumentou significativamente a razão Bax/Bcl-2 após 24, 48 e 72 horas, confirmando o envolvimento desta via na apoptose das células (Figuras 25 C, F e I).

Figura 25 - Metformina diminuiu a expressão de Bcl-2 e aumentou a razão Bax/Bcl-2 nas células MCF-7.

Imagens representativas do Western blotting para as proteínas Bax e Bcl-2 nas células MCF-7 tratadas com metformina (10 mmol L⁻¹) por 24, 48 e 72 h. O gráfico mostra a análise densitométrica da expressão das proteínas Bax e Bcl-2. Valores normalizados pela β -actina. Os gráficos C, F e I representam a razão das duas proteínas, Bax e Bcl-2, após 24, 48 e 72 h de tratamento, respectivamente. Os dados são representados como média $\pm$ epm. * $p < 0.05$ vs Controle; ** $p < 0.001$ vs Controle.

4.2.8 Análise da geração de espécies reativas de oxigênio nas células MCF-7

A incubação com 10 mmol L⁻¹ de metformina por 48 horas não alterou a geração de EROs em relação ao controle (sem metformina). No entanto, o tratamento com metformina por 72 horas aumentou a detecção de EROs em 4 vezes em relação ao controle (Figura 26 A). Ainda, o tratamento das células com 1 mmol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 4 horas aumentou significativamente a detecção de EROs comparado ao controle. A associação de metformina com H₂O₂ aumentou ainda mais a detecção de EROs comparado com o tratamento com H₂O₂ apenas (Figura 26 B).

O tratamento das células MCF-7 com 1 mmol L⁻¹ de H₂O₂ reduziu a viabilidade celular comparada ao controle e a associação de metformina com H₂O₂ potencializou este efeito (Figura 26 C). A quantidade de células apoptóticas (células positivas para caspase-3 e -7 ativas) também foi significativamente maior após associação de metformina com o peróxido de hidrogênio. A quantidade de células positivas foi 3 vezes maior comparado ao controle (Figura 26 D).

Figura 26 - Efeito antiproliferativo da metformina foi associado com estresse oxidativo.

A, Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) analisada pelo método de CM-H₂DCFDA e quantificada por citometria de fluxo. B, C e D Células MCF-7 foram tratadas com metformina por 48 horas e tratadas com metformina + H₂O₂ por um período adicional de 4 horas. Após este tempo, a detecção de EROs (B), células viáveis (C) e a porcentagem de células positivas para as caspases 3 e 7 ativas (D) foram analisados. * $p < 0.05$ vs Controle; *** $p < 0.0001$ vs Controle e # $p < 0.001$ vs H₂O₂.

4.2.9 Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células MCF-7

Não houve diferença significativa na produção de H_2O_2 basal pelas células MCF-7 dos diferentes grupos estudados após 24, 48 e 72 horas de tratamento (Figuras 27 A, C e E).

Após o estímulo com PMA, um ativador indireto da NADPH oxidase, a produção de H_2O_2 foi significativamente maior nas células tratadas com metformina (10 mmol L^{-1}) por 24 horas (Figura 27 B). O tratamento com metformina + catalase reduziu significativamente a produção de H_2O_2 quando comparado ao grupo tratado apenas com metformina após 24 e 48 horas (Figuras 27 B e D). Ainda, não houve diferença significativa na produção de H_2O_2 entre os grupos controle e controle + catalase após 24, 48 e 72 horas de tratamento (Figuras 27 B, D e F).

Figura 27 - Análise da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas células MCF-7.

Detecção da liberação de H_2O_2 basal (A, C e E) e estimulado com PMA (B, D e F) após tratamento das células com metformina por 24, 48 e 72 horas. *** $p < 0.0001$ vs Controle; # $p < 0.005$ vs Metformina.

4.2.10 Análise da proliferação de células MCF-7 na presença de enzimas antioxidantes

Após 24 horas de tratamento não houve diferença entre os grupos no número de células vivas (Figura 28 A). No entanto, o tratamento das células MCF-7 com metformina (10 mmol L^{-1}) por 48 e 72 horas reduziu significativamente o número de células vivas quando comparado ao grupo controle (Figuras 28 B e C). Ainda, o tratamento das células com metformina (10 mmol L^{-1}) associada à enzima antioxidante, SOD ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), por 48 e 72 horas aumentou o número de células vivas quando comparado ao grupo metformina, no entanto o número de células vivas ainda foi menor quando comparado ao grupo controle (Figuras 28 B e C). Isso demonstra que o efeito antiproliferativo da metformina está associado com estresse oxidativo e geração de ânions superóxido.

O tratamento das células com metformina (10 mmol L^{-1}) + catalase ($28 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 48 horas também aumentou o número de células vivas quando comparado ao grupo metformina, no entanto o número de células vivas ainda foi menor quando comparado ao grupo controle (Figuras 28 B).

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e controle+enzimas antioxidantes (apocinina, SOD ou catalase) após 24, 48 e 72 horas de tratamento (Figuras 28 A, B e C).

Figura 28 - Efeito antiproliferativo da metformina foi associado com estresse oxidativo.

Células MCF-7 foram tratadas com o meio de cultura DMEM (controle), meio de cultura DMEM + enzimas antioxidantes (apocinina, SOD ou catalase), metformina (10 mmol L⁻¹) ou metformina + enzimas antioxidantes (apocinina, SOD ou catalase) por 24, 48 e 72 horas (A, B e C, respectivamente). A proliferação celular foi analisada pela técnica do MTT. Dados foram expressos como o número de células vivas presentes no meio após cada período de incubação. O número de células foi calculado a partir de uma curva padrão de concentração de células vivas pelo valor da absorbância. (n=6 por grupo). *** p<0.0001 vs Controle; ** p<0.001 vs Controle; * p<0.05 vs Controle e # p<0.05 vs Metformina.

4.2.11 Análise da porcentagem de células MCF-7 mortas na presença de enzimas antioxidantes

Após 24 horas de tratamento não houve diferença entre os grupos na porcentagem de células mortas (Figura 29 A). No entanto, o tratamento das células MCF-7 com metformina (10 mmol L^{-1}) por 48 e 72 horas aumentou significativamente a porcentagem de células mortas quando comparado ao grupo controle (Figuras 29 B e C). Ainda, o tratamento das células com metformina (10 mmol L^{-1}) associada à enzima antioxidante, SOD ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$), por 48 e 72 horas reduziu a porcentagem de células mortas quando comparado ao grupo metformina (Figuras 29 B e C). Isso demonstra que o efeito antiproliferativo da metformina está associado com a geração de ânions superóxido.

O tratamento das células com metformina (10 mmol L^{-1}) + catalase ($28 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 48 horas também reduziu a porcentagem de células mortas quando comparado ao grupo metformina (Figuras 29 B).

Não houve diferença significativa entre os grupos controle e controle+enzimas antioxidantes (apocinina, SOD ou catalase) após 24 e 48 horas de tratamento (Figuras 29 A e B).

Figura 29 - Efeito antiproliferativo da metformina foi associado com estresse oxidativo.

Células MCF-7 foram tratadas com o meio de cultura DMEM (controle), meio de cultura DMEM + enzimas antioxidantes (apocinina, SOD ou catalase), metformina (10 mmol L^{-1}) ou metformina + enzimas antioxidantes (apocinina, SOD ou catalase) por 24, 48 e 72 horas (A, B e C, resp.). A morte celular foi analisada pelo método de exclusão com azul de tripan. Dados foram expressos como a % de células mortas em relação ao número total de células contadas. (n=3 por grupo). *** $p < 0.0001$ vs Controle; ** $p < 0.001$ vs Controle; * $p < 0.05$ vs Controle; ### $p < 0.0001$ vs Metformina; ## $p < 0.001$ vs Metformina e # $p < 0.05$ vs Metformina.

5 DISCUSSÃO

Os resultados por nós obtidos confirmam dados anteriores que a obesidade tem papel importante no desenvolvimento tumoral, aumentando significativamente o tamanho do tumor e reduzindo a taxa de sobrevida dos ratos obesos-MSG com tumor. Resistência à insulina, ativação da via de sinalização, insulina-IR-ERK1/2 no tecido tumoral, e ação anti-apoptótica, via Bcl-2, são alguns dos mecanismos envolvidos no maior desenvolvimento tumoral em ratos obesos-MSG. Demonstramos também que a metformina, independentemente da melhora da sensibilidade à insulina, foi eficaz em impedir o aumento do tumor de Walker-256 nos ratos obesos-MSG tornando o tamanho do tumor semelhante ao do grupo controle não tratado. Ainda, observamos que o tratamento com metformina foi eficaz em aumentar a taxa de sobrevida dos ratos OT. A metformina aumentou a expressão de RNAm de pRb e p27 e aumentou a atividade da AMPK e do FOXO3a no tecido tumoral. Além disso, ela diminuiu a proliferação das células do câncer de mama (MCF-7) de maneira dependente da concentração e do tempo de tratamento. Ela promoveu o bloqueio do ciclo celular na fase G_0 - G_1 , e aumentou a apoptose e necrose celulares, efeitos mediados pelo estresse oxidativo e pela atividade da AMPK e do FOXO3a.

Vários estudos demonstram que a obesidade pode aumentar o risco de desenvolvimento de diversos tipos de câncer e que a resistência à insulina, a hiperinsulinemia e as alterações metabólicas freqüentemente presentes nessa condição podem ser os fatores responsáveis por esse maior desenvolvimento tumoral (CALLE, 2003; GIOVANNUCCI, 1995, 2007; LEW; GARFINKEL, 1979).

A obesidade é uma doença endócrino-metabólica crônica, caracterizada por aumento de tecido adiposo em relação à massa magra. Freqüentemente observa-se resistência à insulina, hiperinsulinemia e alteração do perfil lipídico. Geralmente esta condição coincide com aumento de peso, no entanto pode ocorrer aumento da quantidade e porcentagem de gordura sem aumento do peso corporal (KOPELMAN, 2000; TILG; MOSCHEN, 2006).

O modelo de obesidade experimental utilizado no nosso trabalho foi o modelo de lesão hipotalâmica descrito por Olney em 1969 que observou quadro de obesidade em camundongos tratados com MSG. A obesidade induzida por MSG causa redução do crescimento em ratos e diminuição do peso corporal. Estas

alterações são atribuídas às lesões que este aminoácido provoca no núcleo arqueado do hipotálamo diminuindo os níveis do hormônio de crescimento (GH) (MACHO et al., 2000; MAITER et al., 1991; NEMEROFF et al., 1977). Acúmulo de gordura visceral, alteração do perfil lipídico, intolerância à glicose, resistência à insulina e hiperinsulinemia também foram observados em ratos tratados com MSG (BAKKE et al., 1978; BUNYAN; MURRELL; SHAH, 1976; HIRATA et al., 1997; LOBATO et al., 2010; REDDING et al., 1971; REMKE; WILSDORF; MULLER, 1988).

Em trabalho por nós publicado anteriormente mostramos que a injeção de MSG em ratos provoca redução significativa do peso corporal, a partir da 6ª semana de vida, menor comprimento naso-anal, maior índice de Lee, acúmulo de tecido adiposo representado por aumento da quantidade de gorduras periepididimal e retroperitoneal e redução da massa magra (FONSECA et al., 2011). Ainda, observamos que os ratos obesos-MSG com tumor apresentam alterações no metabolismo de lipídeos, refletidas pelo aumento nos níveis circulantes de triglicérides e VLDL-colesterol, à semelhança do que ocorre em ratos MSG sem tumor. Assim, essas alterações caracterizam a obesidade nos ratos MSG com tumor à semelhança do que ocorre em ratos MSG sem tumor (dados do nosso laboratório), permitindo que os mesmos sejam considerados adequados para o presente trabalho.

Não houve diferença significativa no consumo de ração entre os ratos dos grupos controle com tumor e obesos-MSG com tumor, mostrando que esse quadro de obesidade apresentado pelos ratos do grupo OT não é dependente do aumento da ingestão alimentar e sim consequência de alterações metabólicas provavelmente decorrentes das alterações neuronais citadas anteriormente (FONSECA et al., 2011).

Os ratos obesos-MSG com tumor também apresentam intolerância à glicose, resistência à insulina e normoglicemia, semelhantemente aos resultados obtidos por Hirata et al. em 1997 e aos de nosso laboratório em estudos anteriores em ratos obesos-MSG sem tumor (LOBATO et al., 2010).

Embora os ratos obesos-MSG com tumor apresentem resistência à insulina e normoglicemia, não houve diferença significativa na concentração de insulina sérica entre eles e os ratos do grupo controle com tumor, ao contrário do que foi observado em ratos obesos-MSG sem tumor que apresentaram hiperinsulinemia quando

comparados aos controles sem tumor, como é bem descrito na literatura (DE MELLO et al., 2001; HIRATA et al., 1997; MACHO et al., 2000).

A diminuição dos níveis séricos de insulina observada em ratos controle e obesos-MSG com tumor pode ser devida a alterações pancreáticas ou por ação de fatores como prostaglandina E2, TNF- α ou catecolaminas freqüentemente presentes em alta concentração na circulação sanguínea de animais com tumor (FERNANDES et al., 1990). A normoglicemia também pode ser consequência da presença do tumor no organismo que não só consome alta quantidade de glicose como estimula a produção de glicose pelo fígado, mantendo assim os níveis glicêmicos normais (YOUNES; NOGUCHI, 2000).

O câncer é uma das doenças que mais matam em todo o mundo sendo a segunda causa de morte por doenças no Brasil, logo após as doenças cardiovasculares (INCA, 2012). O estudo dessa doença é de grande importância para o desenvolvimento de novas alternativas preventivas e terapêuticas, contribuindo assim para o maior controle de sua incidência e mortalidade, bem como para o maior controle do desenvolvimento de metástases.

O câncer é uma doença multifatorial, que envolve predisposição genética e influências externas, como fatores ambientais, ação de agentes carcinogênicos – químicos, físicos e biológicos. Outros dois fatores de risco que estão sendo bem estudados são a obesidade e a resistência à insulina (CALLE, 2003; CURT et al., 2002; FORTE et al., 2012; HURSTING; HURSTING, 2012; KUMAR et al., 2008; OSORIO-COSTA et al., 2009).

Trabalho por nós desenvolvido anteriormente mostrou que a obesidade tem papel importante no desenvolvimento tumoral, aumentando significativamente o tamanho do tumor, e que a metformina, independentemente da melhora da sensibilidade à insulina, é eficaz no controle do desenvolvimento tumoral. Isso mostra que ela tem ação efetiva e direta sobre a célula do tumor. Ainda, sua ação no controle de alterações metabólicas como: correção das alterações lipídicas, redução do acúmulo de gorduras periepídimal e retroperitoneal, e diminuição da peroxidação lipídica sérica também pode contribuir para o menor desenvolvimento do tumor (FONSECA et al., 2011).

No presente trabalho, os dados obtidos confirmam que a obesidade tem papel significativo no desenvolvimento do tumor de Walker-256, aumentando o tamanho do tumor e reduzindo a taxa de sobrevivência dos ratos obesos-MSG com tumor.

Demonstramos também que a metformina foi eficaz em impedir o aumento do tumor de Walker-256 nos ratos obesos e em aumentar a taxa de sobrevivência desses ratos.

De forma semelhante a diversos cânceres humanos, o tumor de Walker-256 é um carcinossarcoma mamário que apresenta um crescimento tumoral rápido, agressivo, metastático e alta incidência da síndrome de anorexia-caquexia (BERTEVELLO; EARLE, 1935; FERNANDES et al., 1995; FOLADOR et al., 2009; GARRATINI et al., 1980; GUAITANI et al., 1982; PAVLAKI et al., 2009; ROPELLE et al., 2007; SEELAENDER, 2001). Assim, o efeito da metformina reduzindo o desenvolvimento do tumor de Walker-256 e aumentando a sobrevivência dos ratos permite sugerir que esse fármaco pode ser útil no controle tumoral, inclusive em cânceres de crescimento agressivo e alto poder metastático, como o câncer de mama.

Estudos mostram que a metformina pode ter efeito antiproliferativo ou quimiopreventivo tanto diretamente, pela ativação da AMPK na célula tumoral, como indiretamente, pela melhora da sensibilidade à insulina e consequentemente redução dos níveis circulantes de insulina (ALGIRE et al., 2008; BOWKER et al., 2006; EVANS, 2004; POLLAK, 2007; ROPELLE et al., 2009; SCHNEIDER et al., 2001; ZAKIKHANI et al., 2006).

A insulina é o hormônio anabólico mais potente que se conhece, agindo sobre o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídeos, tem efeitos na síntese de DNA e RNA, sobre o transporte de íons e aminoácidos, sobre a proliferação e ciclo celulares, diferenciação celular e apoptose, bem como sobre a síntese de óxido nítrico (CALLE et al., 2004; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002; JEE et al., 2005; MUNIYAPPA et al., 2007; SALTIEL; KAHN, 2001; WILCOX, 2005). Após ligação com seu receptor específico presente na membrana plasmática, a insulina ativa diversas vias de sinalização envolvidas com o metabolismo e crescimento celular, como as proteínas da via dependente da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e proteínas da via da *mammalian target of rapamycin* (mTOR).

As MAPKs compreendem um sistema de sinalização intracelular que é representado principalmente por três grupos de proteínas: quinases reguladas por sinalização extracelular (ERKs), quinases do terminal c-jun (JNKs), e p38 MAPKs (METHA; GRIENDLING, 2007) que estão ligadas ao metabolismo, crescimento, proliferação e diferenciação celulares (OSÓRIO-COSTA et al., 2009; POLLAK, 2008; SALTIEL; KAHN, 2001).

Assim, embora não tenha sido observado alteração nos níveis sérico de insulina entre os grupos CT, CTM, OT e OTM (FONSECA et al., 2011), a expressão da forma fosforilada do receptor de insulina foi maior no grupo OT quando comparado ao grupo CT, mostrando uma maior ativação desse receptor no tecido tumoral dos ratos OT, o que pode ter contribuído para o maior desenvolvimento do tumor nesse grupo. A redução da ativação da via insulina-IR-ERK 1/2 pode ter contribuído para a redução do crescimento do tumor de Walker-256 pela metformina pois ocorreu diminuição da expressão da forma fosforilada do receptor e inibição da via das MAPKs/ERK 1/2.

A metformina pode, atuando diretamente sobre as células tumorais (células do câncer de cólon, de mama e de pulmão), ativando a AMPK via LKB1, diminuir a proliferação por reduzir a ativação das proteínas mTOR e p70S6K. Isso leva à diminuição da síntese protéica, diminuição do crescimento e proliferação celulares (ALGIRE et al., 2008; BERSTEIN et al., 2010; ZAKIKHANI et al., 2008; ZAKIKHANI et al., 2006). De fato, demonstramos que o tratamento com metformina aumentou a fosforilação da AMPK e diminuiu a expressão de p-p70S6K (Th172) no tecido tumoral, o que pode explicar, em parte pelo menos, a diminuição do crescimento e proliferação celulares observado por nós.

Estudos têm mostrado que a AMPK pode ativar os fatores de transcrição, FOXO, e assim pode promover supressão tumoral (CHIAACCHIERA et al., 2009; CHIAACCHIERA; SIMONE, 2009; GREER; BANKO; BRUNET, 2009). Como citado na introdução, os fatores de transcrição (FOXO) tem papel importante na longevidade e supressão tumoral por regular a expressão de genes envolvidos na resistência ao estresse, no metabolismo, na parada do ciclo celular e na apoptose. Estímulos ambientais, como a insulina, os nutrientes e o estresse oxidativo, controlam a atividade desses fatores seja alterando os níveis protéicos, a localização subcelular, as propriedades de ligação ao DNA e a atividade transcricional dos mesmos (CALNAN; BRUNET, 2008).

Sabe-se que a super expressão de FOXO em vermes e aves pode aumentar o tempo de vida destes (GIANNAKOU et al., 2004; HWANGBO et al., 2004). Por outro lado, a perda de FOXO está relacionada a aumento de câncer nos mamíferos. Além disso, a localização citoplasmática de FOXO3a parece estar correlacionada com uma baixa sobrevida dos pacientes com câncer de mama (BORKHARDT et al., 1997; HU et al., 2004; PAIK et al., 2007).

No presente trabalho nós observamos que a metformina leva à maior atividade de FOXO3a nas células do tumor de Walker-256, pois houve redução na expressão de p-FOXO3a (Ser 253) no tecido tumoral o que representa maior quantidade de FOXO no núcleo, onde ele exerce a sua atividade transcricional. A fosforilação de FOXO3a pela Akt no resíduo de serina 253 reduz a sua atividade transcricional, pois provoca acúmulo no citoplasma e subsequente degradação como demonstrado por diversos autores (CALNAN; BRUNET, 2008; CHIACCHIERA; SIMONE, 2009; ZHANG et al., 2011).

A importância da atividade antitumoral de FOXO3a é também demonstrada por estudos conduzidos em leucemia, câncer de próstata e glioblastoma (JAGANI; SINGH; KHOSRAVI-FAR, 2008; SEOANE et al., 2004; TROTMAN et al., 2006;). Nas células de câncer colorretal, observou-se que FOXO3a é necessário para a indução da morte das células após tratamento com cisplatina e inibidores da p38 α (CHIACCHIERA et al., 2009; FERNÁNDEZ DE MATTOS et al., 2008). Sabe-se que uma vez ativado FOXO3a é capaz de se ligar a regiões promotoras dos genes e induzir a transcrição de genes envolvidos com a parada do ciclo celular (CDKN1A, CDKN1B, CCNG2, RBL2, BCL6) e apoptose (GADD45A, BCL2L11, FASLG, BBC3, PTEN, BNIP3, BNIP3L), contribuindo assim para a supressão tumoral (CHIACCHIERA et al., 2009; CHIACCHIERA; SIMONE, 2009; HO et al., 2008). Portanto, podemos sugerir que o menor desenvolvimento do tumor de Walker-256 induzido pela metformina pode ser devido à indução da apoptose.

Apoptose é um tipo de morte celular desencadeada por uma variedade de condições fisiológicas e patológicas, e é altamente regulada por proteínas que promovem ou bloqueiam a morte celular em diferentes estágios. As proteínas da família Bcl-2 são importantes reguladores da apoptose. Em mamíferos, Bcl-2 tem ao menos 20 parentes, incluindo 4 proteínas anti-apoptóticas: Bcl-xL, Bcl-w, A1 e Mcl1, e dois grupos de proteínas que promovem a morte celular: Bax e BH3. Bax pode formar homodímeros que consequentemente promovem a apoptose, ou ela pode formar heterodímeros com Bcl-2 ou Bcl-xL inibindo dessa forma a apoptose (MARIA et al., 2012; OLTVAI; MILLIMAN; KORSMEYER, 1993; REED 1997; ZAMZAMI, 2001).

Demonstrou-se que a razão Bax/Bcl-2 determina a suscetibilidade das células à indução da apoptose (RAISOVA, 2001). Bax associa-se com Bcl-2 *in vivo* e a baixa expressão de Bcl-2 favorece a formação de homodímeros de Bax que

consequentemente aumenta a taxa de apoptose e aumenta a sensibilidade das células ao estímulo apoptótico. Ainda, Bax atua aumentando a permeabilidade da membrana mitocondrial resultando na maior liberação de citocromo c, fator indutor de apoptose (AIF) e outras moléculas pró-apoptóticas, que vão promover a ativação de caspases executoras como as caspases 3, 6 e 7 levando à apoptose (CUVILLIER et al., 2001; KROEMER, 2000; MARIA et al., 2012). Assim, o aumento na expressão de Bax, a diminuição dos níveis de Bcl-2 e o aumento na razão Bax/Bcl-2, bem como o aumento na expressão de caspase-3 clivada, confirmam a ação da metformina induzindo a apoptose, efeito este mediado pelo FOXO3a. Por outro lado, a expressão de Bcl-2 foi significativamente maior no grupo OT quando comparada ao grupo CT, o que contribui para o maior desenvolvimento do tumor observado nesse grupo.

O mecanismo de ação da metformina já foi bem estudado no fígado, tecido adiposo e nos músculos esquelético e cardíaco (KAHN et al., 2005; SEUFERT et al., 2004). Entretanto, o mecanismo de ação e as consequências biológicas desse fármaco sobre as células tumorais ainda é pouco conhecido. Assim, para melhor explorar o mecanismo de ação da metformina em tumores, sem a interferência de fatores como insulina, adiposidade aumentada, hipertensão, avaliamos o efeito direto da metformina sobre uma outra linhagem de células do câncer de mama, a MCF-7. Essa estratégia permitiu demonstrar que a metformina inibe a proliferação das células MCF-7 promovendo o bloqueio do ciclo celular na fase G_0 - G_1 , e induzindo a apoptose e necrose das células. Esses efeitos foram associados com o estresse oxidativo, e ativação da AMPK e do FOXO3a, à semelhança do demonstrado *in vivo*.

A proliferação celular dos mamíferos é regida pela maquinaria do ciclo-celular onde ciclinas e inibidores de ciclinas controlam com grande eficiência a progressão do ciclo ao longo das fases do ciclo celular (fases G_1 , S, G_2 e M). No ciclo celular há dois pontos de checagem que contribuem para o controle da proliferação da célula, um desses pontos está entre as fases G_1 e S e o outro entre as fases G_2 e M. Nestes pontos, várias proteínas atuam estimulando ou impedindo a progressão do ciclo, buscando manter a integridade genômica da célula.

O complexo ciclina D1/CDK4/6 atua contribuindo para a progressão do ciclo celular aumentando a expressão de proteínas importantes para a proliferação da célula. Nesta mesma fase, proteínas supressoras tumorais, tais como as proteínas

pRb, p53 e p27 atuam impedindo o acúmulo de mutações no genoma da célula e controlando a progressão da célula ao longo das fases do ciclo celular. Assim, como a metformina aumentou a expressão do RNAm e protéica da proteína supressora tumoral p27 e diminuiu significativamente a expressão de RNAm de ciclina D1 nas células MCF-7, podemos concluir que esses seriam os pontos em que ela agiria controlando o ciclo celular.

Semelhantemente, Sahra et al. (2008) mostraram que a metformina inibe a proliferação de células do câncer de próstata (DU 145, PC-3 e LNCaP), diminuindo a viabilidade celular, por bloquear o ciclo celular na fase G_0 - G_1 e diminuir os níveis de ciclina D1. Entretanto, nestas células a metformina não induziu apoptose, como observado por nós mostrando que o efeito da metformina pode variar nos diversos tipos celulares.

Por outro lado, estudos têm mostrado que a metformina pode aumentar a apoptose em células do câncer de mama, cólon e endométrio, por outros mecanismos (BERSTEIN et al., 2010; BUZZAI et al., 2007; CANTRELL et al., 2009). Buzzai e colaboradores (2007) mostraram que a apoptose estimulada pela metformina em células do câncer de cólon deve-se à perda da autofagia e diminuição da glicólise mediadas pelo p53. Zhuang e Miskimins (2011) e Berstein et al. (2010) mostraram que a metformina sozinha ou em combinação com o tamoxifeno aumentou a apoptose em células do câncer de mama (MCF-7 e LTED) via caspase e poli (ADP-ribose) polimerase (PARP).

No presente estudo nós observamos que a metformina induz a apoptose das células MCF-7 pela via intrínseca de indução de apoptose mediante a ação das proteínas bax e caspases. Assim, pode-se concluir que a metformina apresenta efeito direto sobre as células tumorais mediante o bloqueio do ciclo celular e a indução da apoptose, efeitos esses nem sempre observados em todos os tipos celulares.

Dados da literatura mostram que a metformina pode afetar especificamente a proliferação das células tumorais quando comparada às células normais (SAHRA et al., 2008; ZHUANG; MISKIMINS, 2011). Embora a metformina apresente efeito antiproliferativo significativo sobre as células tumorais, ela não apresenta efeito citotóxico sobre as células normais (MCF-10A) mesmo após um longo período de incubação (ZHUANG; MISKIMINS, 2011). Esses autores demonstraram que as células epiteliais de mama humanas não transformadas, MCF10A, foram resistentes

ao efeito citotóxico da metformina. Nestas células, o tratamento com metformina (8 mmol L⁻¹ por 4 dias) não aumentou a porcentagem de células mortas quando comparada com as células tumorais.

Zhuang e Miskimins (2011) observaram que a morte de células dependente de PARP está relacionada com acúmulo de grandes e claras vesículas representando o alargamento das mitocôndrias. Observamos alterações similares nas células MCF-7 após 72 horas de tratamento com metformina (Fig. 17B). Estas modificações podem ser devidas ao efeito da metformina inibindo o complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, como mostrado por Sahra et al., 2010. Isso pode levar à perda do potencial de membrana mitocondrial e inibição da produção de ATP que pode conseqüentemente ativar a AMPK (KAHN et al., 2005; OWEN; DORAN; HALESTRAP, 2000). De fato, confirmando a ativação da AMPK pela metformina observado *in vivo*, o tratamento com esse fármaco aumentou a expressão de p-AMPK (Thr 172) nas células MCF-7.

No presente trabalho também observamos que a metformina leva à maior atividade de FOXO3a em células MCF-7, pois aumento na expressão de RNAm e protéica de FOXO3a foi observado. Além disso, semelhantemente ao observado no tecido tumoral dos ratos tratados com metformina (estudo *in vivo*), a expressão de p-FOXO3a (Ser 253) foi significativamente menor, o que representa uma maior quantidade de FOXO no núcleo, onde ele exerce a sua atividade transcricional (CALNAN; BRUNET, 2008; CHIACCHIERA; SIMONE, 2009; ZHANG et al., 2011).

A fosforilação de FOXO3a pela AMPK no resíduo de serina 413 aumenta a sua atividade transcricional, aumentando a síntese de diversas proteínas como a SOD e a catalase (CALNAN; BRUNET, 2008; CHIACCHIERA; SIMONE, 2009). Assim, o aumento na expressão de p-FOXO3a (Ser 413) nas células tratadas com metformina, o que representa uma maior quantidade de FOXO no núcleo, onde ele exerce a sua atividade transcricional, é mais um dado mostrando o aumento da atividade do FOXO3a após tratamento com a metformina.

Sabe-se que o gene da ciclina D1 (CCND1) é super expresso em vários tipos de cânceres humano (ALAO, 2007; SAHRA et al., 2008). Demonstrou-se ainda que o aumento na expressão de ciclina D1 em células LNCaP aumenta o crescimento destas células e a tumorigenicidade (CHEN et al., 1998). Portanto, diminuir a expressão de ciclina D1 pode ser alvo molecular importante para o controle da proliferação tumoral. A metformina aumentou a expressão de p27 (RNAm e protéica)

e diminuiu a expressão de RNAm de ciclina D1 (CCND1). Isto permite sugerir que ciclina D1 e p27, dois importantes reguladores do ciclo celular, estão relacionados com o efeito antiproliferativo induzido pela metformina em células do câncer de mama via FOXO3a. Ainda, o fato do RNAm de p27 estar aumentado apenas no grupo OTM (*in vivo*) mostra a importância dessa molécula no bloqueio do crescimento celular induzido pela metformina.

Além disso, as alterações mitocondriais, a diminuição dos níveis de Bcl-2, aumento na razão Bax/Bcl-2 e o aumento nas atividades das caspases-3 e -7, nas células MCF-7, observadas por nós neste trabalho, confirmam a ação da metformina induzindo a apoptose pela via intrínseca de indução de apoptose, efeito este mediado pelo FOXO3a.

Sabe-se que células tumorais, mesmo na presença de oxigênio, preferem utilizar o processo muito menos eficiente de produção de energia, a fermentação da glicose (glicólise), efeito conhecido como efeito de Warburg (GRUNING; RALSER, 2011; WARBURG, 1956). Anastasiou et al. (2011) mostrou que devido a esta mudança metabólica, pode haver diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células do câncer e como consequência ocorrer menor dano oxidativo. Assim, alternativas para combater o estresse oxidativo parece ser estratégia importante para impedir a progressão do câncer.

Uma vez que a mitocôndria é fonte considerável de EROs e mudanças mitocondriais foram observadas após o tratamento com metformina, a hipótese era que o efeito da metformina estava relacionado ao estresse oxidativo. De fato observamos que a maior detecção de EROs foi diretamente proporcional à apoptose e necrose celulares, podendo ser relacionada ao efeito deletério da metformina em células MCF-7. Ainda, nós observamos que o co-tratamento com H₂O₂, um agente pró-oxidante, potencializou o efeito antiproliferativo aumentando significativamente a apoptose, confirmando assim a hipótese da participação, pelo menos em parte, do estresse oxidativo no efeito da metformina.

Sabe-se que além da AMPK, as espécies reativas de oxigênio (O₂⁻, H₂O₂, OH⁻), principalmente o peróxido de hidrogênio, podem levar à ativação dos fatores de transcrição FOXO e consequentemente podem induzir a apoptose, promover resistência ao estresse ou induzir a senescência celular (STORZ, 2011).

Na condição de estresse oxidativo, a JNK interage com FOXO levando à sua translocação para o núcleo e à consequente ativação do mesmo. Essa via de

sinalização, EROs-JNK-FOXO, pode induzir a apoptose das células tumorais reduzindo a expressão de Bcl-2 e aumentando a de Bax (STORZ, 2007). Assim, a maior produção de H_2O_2 (EROs), a redução da viabilidade celular e a indução da morte das células MCF-7 após tratamento com metformina, juntamente com a ativação de FOXO3a e aumento na razão Bax/Bcl-2, sugerem que esta via está ativada nas células MCF-7 tratadas com metformina.

Além disso, o fato do co-tratamento das células com metformina+enzimas antioxidantes (SOD ou catalase) reverter em parte o efeito da metformina sobre as células MCF-7, aumentando o número de células vivas e reduzindo a porcentagem de células mortas, reforça a hipótese da participação do estresse oxidativo neste efeito.

Outras funções da via de sinalização, EROs-JNK-FOXO, estão relacionadas com a indução de genes que regulam o reparo do DNA e o bloqueio do ciclo celular. Karger et al., 2009 mostraram que, no câncer da tireóide, a ativação de FOXO pelo H_2O_2 via JNK induz a expressão dos genes supressores tumorais, p27 e GADD45, contribuindo para a supressão tumoral. No presente trabalho, observamos aumento na expressão do RNAm de p27 após tratamento com metformina o que reforça a hipótese da ativação desta via nas células MCF-7.

Resumidamente, demonstramos no presente trabalho que os mecanismos envolvidos no maior desenvolvimento tumoral em ratos obesos-MSG são resistência à insulina, ativação da via de sinalização insulina-IR-ERK1/2 e ação anti-apoptótica via Bcl-2. Demonstramos também que a metformina é eficaz em impedir o aumento do tumor de Walker-256 provocado pela obesidade e aumentar a taxa de sobrevivência dos ratos obesos-MSG. A ativação da AMPK e do FOXO3a, a redução da ativação da via de sinalização insulina/IR/ERK1/2, bem como o aumento na apoptose podem, pelo menos em parte, explicar o efeito da metformina como antitumoral. Além disso, concluímos que a metformina tem ação efetiva e direta sobre a célula tumoral, inibindo a proliferação das células do câncer de mama (MCF-7), como consequência da parada do ciclo celular na fase G_0 - G_1 , apoptose e necrose celulares. Esses efeitos foram mediados pelo estresse oxidativo e pela ativação da AMPK e do FOXO3a (Figura 35). Não podemos excluir, entretanto, sua ação no controle de alterações metabólicas como: correção das alterações lipídicas, redução do acúmulo de gorduras periepididimal e retroperitoneal e diminuição da peroxidação lipídica

sérica, demonstrada anteriormente, como fatores que contribuem para o menor crescimento do tumor.

Assim, os resultados obtidos nos levam a sugerir que a metformina é potencial fármaco para o tratamento do câncer, inclusive para cânceres de crescimento agressivo e alto poder metastático, como o câncer de mama.

Figura 30 – Vias de sinalização envolvidas com o efeito da metformina em células do câncer de mama.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste estudo permitem-nos concluir que:

- a obesidade reduz a sobrevida de ratos com o tumor de Walker-256;
- resistência à insulina, ativação da via de sinalização insulina-IR-ERK1/2 e ação anti-apoptótica, via Bcl-2, são os mecanismos envolvidos no maior desenvolvimento do tumor de Walker-256 em ratos obesos-MSG;
- a metformina é eficaz em reduzir o desenvolvimento tumoral na obesidade e em aumentar a taxa de sobrevida dos ratos obesos-MSG com tumor;
- a metformina tem ação eficiente e direta sobre a célula tumoral, inibindo a proliferação celular, como consequência da parada do ciclo celular na fase G_0 - G_1 , apoptose e necrose;
- os mecanismos pelos quais a metformina reduz o tumor estão relacionados à redução da ativação da via de sinalização insulina/IR/ERK1/2, ativação da AMPK e do FOXO3a, e geração de espécies reativas de oxigênio.

REFERÊNCIAS*

ABLAMUNITS, V.; COHEN, Y.; BRAZEE, I. B.; GAETZ, H. P.; VINSON, C.; KLEBANOV, S. Susceptibility to induced and spontaneous carcinogenesis is increased in fatless A-ZIP/F-1 but not in obese ob/ob mice. **Cancer Res.**, v. 66, p. 8897–8902, 2006.

AGOSTINO, D.; CLIFFTON, E. E. The growth of the carcinosarcoma of Walker 256 in the ascitic form. **Experientia**, v. 24, p. 166-167, 1968.

ALAO, J. P. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. **Mol. Cancer**, v. 6, p. 24, 2007.

ALGIRE, C.; ZAKIKHANI, M.; BLOUIN, M.; SHUAI, J. H.; POLLAK, M. Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. **Endocr-Relat. Cancer**, v. 15, p. 833-839, 2008.

ALGIRE, C.; AMREIN, L.; ZAKIKHANI, M.; PANASCI, L.; POLLAK, M. Metformin blocks the stimulative effect of a high-energy diet on colon carcinoma growth in vivo and is associated with reduced expression of fatty acid synthase. **Endocr-Relat. Cancer**, v. 17, p. 351–360, 2010.

AMARAL, J. B.; REZENDE-TEIXEIRA, P.; FREITAS, V. M.; MACHADO-SANTELLI, G. M. MCF-7 cells as a three-dimensional model for the study of human breast cancer. **Tissue Eng.**, v. 17, p. 1097-1107, 2011.

ANASTASIOU, D.; POULOGIANNIS, G.; ASARA, J. M.; BOXER, M. B.; JIANG, J. K.; SHEN, M.; BELLINGER, G.; SASAKI, A. T.; LOCASALE, J. W.; AULD, D. S.; THOMAS, C. J.; VANDER HEIDEN, M. G.; CANTLEY, L. C. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. **Science**, v. 334, n. 6060, p. 1278-1283, 2011.

BAKKE, J. L.; LAWRENCE, N.; BENNETT, J.; ROBINSON, S.; BOWERS, C. Y. Late endocrine effects of administering monosodium glutamate to neonatal rats. **Neuroendocrinology**, v. 26, p. 220-228, 1978.

BALLARD-BARBASH, R.; BERRIGAN, D.; POTISCHMAN, N.; DOWLING, E. Obesity and cancer epidemiology. In: BERGER, N. A. (Ed.). **Energy balance and cancer**. New York: Springer, 2010. p. 1-44.

BARACAT, F. F.; FERNANDES JR, H. J.; SILVA, M. J. **Câncerologia atual: um enfoque multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. 548 p.

BATISTA JR, M. L.; PERES, S. B.; MCDONALD, M. E.; ALCANTARA, P. S. M.; OLIVAN, M.; OTOCH, J. P.; FARMER, S. R.; SEELAENDER, M. Adipose tissue

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors. **Cytokine**, v. 57, p. 9-16, 2012.

BEASON, T.; COLDITZ, G. Obesity and multiple myeloma. In: MITTELMAN, S.D.; BERGER, N. A. (Ed.) **Energy balance and hematologic malignancies**. New York: Springer, 2012. p. 71-95.

BERANGER, G. E.; KARBIENER, M.; BARQUISSAU, V.; PISANI, D. F.; SCHEIDELER, M.; LANGIN, D.; AMRI, E. Z. In vitro brown and "brite"/"beige" adipogenesis: Human cellular models and molecular aspects. **Biochim. Biophys. Acta**, v. pii, p. S1388-1981, 2012. In press.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. , M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnol. Ann. Rev.**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BERSTEIN, L. M.; YUE, W.; WANG, J. P.; SANTEN, R. J. Isolated and combined action of tamoxifen and metformin in wild-type, tamoxifen-resistant, and estrogen-deprived MCF-7 cells. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 128, n. 1, p. 109-117, 2011.

BERTEVELLO, P. S.; SEELAENDER, M. C. Heterogeneous response of adipose tissue to cancer cachexia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, n. 9, p. 1161-1167, 2001.

BLACK, J. M.; NESHEIM, M. C.; KINSELLA, J. E. Dietary level of maize oil affects growth and lipid composition of Walker 256 carcinosarcoma. **Brit. J. Nutr.**, v.1, p. 283-294, 1994.

BLUHER, M.; KAHN, B. B.; KAHN, C. R. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. **Science**, v. 299, p. 572-574, 2003.

BODEN, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 1, p. 3-10, 1997.

BORKHARDT, A.; REPP, R.; HAAS, O. A.; LEIS, T.; HARBOTT, J.; KREUDER, J.; HAMMERMANN, J.; HENN, T.; LAMPERT, F. Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). **Oncogene**, v. 14, p. 195-202, 1997.

BOULOUMIE, A.; DREXLER, H. C.; LAFONTAN, M.; BUSSE, R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. **Circulation**, v. 83, p. 1059-1066, 1998.

BRANDON, E. L.; GU, J. W.; CANTWELL, L.; HE, Z.; WALLACE, G.; HALL, J. E. Obesity promotes melanoma tumor growth: Role of leptin. **Cancer Biol. Ther.**, v. 8, p. 1871-1879, 2009.

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 188-236.

BROOKS, S. C.; LOCKE, E. R.; SOULE, H. D. Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. **J. Biol. Chem.**, v. 248, n. 17, p. 6251-6253, 1973.

BRUNET, A.; BONNI, A.; ZIGMOND, M. J.; LIN, M. Z.; JUO, P.; HU, L. S.; ANDERSON, M. J.; ARDEN, K. C.; BLENIS, J.; GREENBERG, M.E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, p. 857–868, 1999.

BUNYAN, J.; MURRELL, E. A.; SHAH, P. P. The induction of obesity in rodents by means of monosodium glutamate. **Br. J. Nutr.**, v. 35, p. 25-39, 1976.

BUZZAI, M.; JONES, R. G.; AMARAVADI, R. K.; LUM, J. J.; DEBERARDINIS, R. J.; ZHAO, F.; VIOLLET, B.; THOMPSON, C. B. Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. **Cancer Res.**, v. 67, p. 6745–6752, 2007.

CALDAROLA, L.; DEI POLI, G.; DEI POLI, M.; BIGLIANI, S. Notes on the transplantability and dissemination of experimental Walker's sarcomas. **Oncology**, v.10, p. 246-249, 1968.

CALLE, E. E.; RODRIGUEZ, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U. S. adults. **N. Engl. J. Med**, v. 348, p. 1625–1638, 2003.

CALLE, E. E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, p. 579-591, 2004.

CALLE, E. E.; THUN, M. J. Obesity and cancer. **Oncogene**, v. 23, p. 6365-6378, 2004.

CALNAN, D. R.; BRUNET, A. The FoxO code. **Oncogene**, v. 27, p. 2276–2288, 2008.

CANTRELL, L. A.; ZHOU, C.; MENDIVIL, A.; MALLOY, K. M.; GEHRIG, P. A.; BAE-JUMP, V. L. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation—implications for a novel treatment strategy. **Gynecol. Oncol.**, v. 116, n. 1, p. 92-98, 2010.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 46, p. 419-425, 2002.

CHAPMAN, I. M.; HARTMAN, M. L.; PIEPER, K. S.; SKILES, E. H.; PEZZOLI, S. S.; HINTZ, R. L. Recovery of growth hormone release from suppression by exogenous insulin-like growth factor-1 (IGF-1): evidence for a suppressive action of free rather than bound IGF-1. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, p. 2836-2842, 1998.

CHEN, Y.; MARTINEZ, L. A.; LACAVA, M.; COGHLAN, L.; CONTI, C. J. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. **Oncogene**, v. 16, p. 1913–1920, 1998.

CHIAACCHIERA, F.; MATRONE, A.; FERRARI, E.; INGRAVALLO, G.; LO SASSO, G.; MURZILLI, S.; PETRUZZELLI, M.; SALVATORE, L.; MOSCHETTA, A.; SIMONE, C. p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription. **Cell Death Differ.**, v. 16, p. 1203-1214, 2009.

CHIAACCHIERA, F.; SIMONE, C. Inhibition of p38alpha unveils an AMPK-FoxO3A axis linking autophagy to cancer-specific metabolism. **Autophagy**, v. 5, p. 1030-1033, 2009.

CNOP, M.; FOUFELLE, F.; VELLOSO, L. A. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. **Trends Mol. Med.**, v. 18, p. 59-68, 2012.

COSTA, E. S.; FRANCISCO, A. M. S. C.; FAIAD, O. J.; CURY, Y.; SAMPAIO, S. C. Effect of Crotoxin, the main toxin of the rattlesnake c.d. terrificus venom, on secretory activity of peritoneal macrophages during tumor progression. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**. Apresentado no Abstracts for 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 107 (Suppl. 1): 2729, Official journal of WordPharma 2010.

COSTA, E. S.; FAIAD, O. J.; CURI, R.; CURY, Y.; SAMPAIO, S. C. Effect of Crotoxin on secretory activity of peritoneal macrophages co-cultivated with tumor cells. Involvement of formyl peptide receptors. **Inflammation Research**. Apresentado no Abstracts for 10th World Congresso on Inflammation, DOI 10.1007/s00011-011-0341-6,, Vol 60, (Suppl 1): P-601. Official Journal of The International Association of Inflammation Societies and The European Histamine Research Society, 2011.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, p. 860-867, 2002.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. 580 p.

CUVILLIER, O.; NAVA, V. E.; MURTHY, S. K.; EDSALL, L. C.; LEVADE, T.; MILSTIEN, S.; SPIEGEL, S. Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. **Cell Death Differ.**, v. 8, p. 162-171, 2001.

DAWSON, R.; ANNAU, Z. A behavioral assessment of arcuate nucleus damage after a single injection of monosodium glutamate. **Neurobehav. Toxicol. Teratol.**, v. 5, p. 399-406, 1983.

DE MELLO, M. A.; DE SOUZA, C. T.; BRAGA, L. R.; DOS SANTOS, J. W.; RIBEIRO, I. A.; GOBATTO, C. A. Glucose tolerance and insulin action in monosodium glutamate (MSG) obese exercise-trained rats. **Physiol. Chem. Phys. Med.**, v. 33, n. 1, p. 63-67, 2001.

DIJKERS, P. F.; MEDEMADAGGER, R. H.; LAMMERS, J. J.; KOENDERMAN, L.; COFFER, P. J. Expression of the pro-apoptotic bcl-2 family member bim is regulated by the forkhead transcription factor FKHR-L1. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 1201-1204, 2000.

DINIZ, Y. S.; BURNEIKO, R. M.; SEIVA, F. R. F.; ALMEIDA, F. Q. A.; GALHARDI, C. M.; NOVELLI FILHO, J. L. V.; MANI, F.; NOVELLI, E. L. Diet compounds, glycemic index and obesity-related cardiac effects. **Int. J. Cardiol.**, v. 124, p. 92-99, 2008.

DRESSER, M. J.; XIAO, G.; LEABMAN, M. K.; GRAY, A. T.; GIACOMINI, K. M. Interactions of n-tetraalkylammonium compounds and biguanides with a human renal organic cation transporter (hOCT2). **Pharm. Res.**, v. 19, p. 1244-1247, 2002.

DUNAIF, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocr. Rev.**, v. 18, p. 774-800, 1997.

EARLE, W. R. A study of the Walker rat mammary carcinoma 256: in vivo and in vitro. **Am. J. Cancer**, v. 24, p. 566-612, 1935.

EVANS, J. M. M.; DONNELLY, L. A.; EMSLLE-SMITH, A. M.; ALESSI, D. R.; MORRIS, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **Brit. Med. J.**, v. 330, p. 1304-1305, 2007.

FAIAD, O. J.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C. Lipoxin A₄ contributes to inhibitory effect of Crotoxin on growth of Walker 256 tumor. In: ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, 10., 2008. **Anais...** 2008. p. 65: 8.04.

FEARON, K. C.; ARENDS, J.; BARACOS, V. Understanding the mechanisms and treatment options in cancer cachexia, **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 10, n. 2, p. 90-99, 2013.

FEARON, K. C.; MOSES, E. A. G. Cancer cachexia. **Int. J. Cardiol.**, v. 85, n. 1, p. 73-81, 2002.

FERNANDES, L. C. **Alterações metabólicas causadas pelo tumor de Walker 256 no músculo esquelético, linfócitos e macrófagos de ratos: possíveis mecanismos envolvidos na reversão da caquexia pela administração de insulina.** 1995. 97 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

FERNANDES, L. C.; NOGUEIRA C. R.; MACHADO, U. F.; CARPINELLI, A. R.; CURI, R. Insulin secretion in Walker 256 tumor cachexia. **Am. J. Physiol.**, v. 258, p. E1033-E1036, 1990.

FERNÁNDEZ DE MATTOS, S.; VILLALONGA, P.; CLARDY, J.; LAM, E. W. FOXO3a mediates the cytotoxic effects of cisplatin in colon cancer cells. **Mol. Cancer Ther.**, v. 7, p. 3237-3246, 2008.

FILIPPIN-MONTEIRO, F. B.; DE OLIVEIRA, E. M.; SANDRI, S.; KNEBEL, F. H.; ALBUQUERQUE, R. C.; CAMPA, A. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1

adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. **Int. J. Obes.**, v. 36, n. 8, p. 1032-1039, 2012.

FOLADOR, A.; DE LIMA-SALGADO, T. M.; HIRABARA, S. M.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; MARTINS, E. F.; DE OLIVEIRA, H. H.; PIZATTO, N.; KANUNFRE, C. C.; PERES, C. M.; FERNANDES, L. C.; CURI, R. Effect of fish oil supplementation for two generations on changes of lymphocyte function induced by walker 256 cancer cachexia in rats. **Nutr. Cancer**, v. 61, n. 5, p. 670-679, 2009.

FONSECA, E. A. I.; OLIVEIRA, M. A.; LOBATO, N. S.; AKAMINE, E. H.; COLQUHOUN, A.; CARVALHO, M. H. C.; ZYNGIER, S. B.; FORTES, Z. B. Meformin reduces the stimulatory effect of obesity on in vivo Walker-256 tumor development and increases the area of tumor necrosis. **Life Sci.**, v. 88, p. 846-852, 2011.

FONSECA, E. A. I.; MACIOSZEK, M.; SAITO, A.; COTRIM, K.; MAZZUCO, T. L. Estudo das alterações morfológicas da glândula adrenal na caquexia neoplásica. **Semina. Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, p. 163-174, 2009.

FONSECA-ALANIS, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 216-229, 2006.

FORMIGUEIRA, X.; CANTÓN, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v. 18, p. 1125–1146, 2004.

FORTE, V.; PANDEY, A.; ABDELMESSIH, R.; FORTE, G.; WHALEY-CONNELL, A.; SOWERS, J. R.; MCFARLANE, S. I. Obesity, Diabetes, the Cardiorenal Syndrome, and Risk for Cancer. **Cardiorenal Med.**, v. 2, n. 2, p. 143-162, 2012.

FREIER, S.; WEISS, O.; ERAN, M.; FLYVBJERG, A.; DAHAN, R.; NEPHESH, I.; SAFRA, T.; SHILONI, E.; RAZ, I. Expression of the insulin-like growth factors and their receptors in adenocarcinoma of the colon. **Gut.**, v. 44, p. 704–708, 1999.

GAROFALO, C.; SURMACZ, E. Leptin and cancer. **J. Cell. Physiol.**, v. 207, p. 12-22, 2006.

GARRATINI, S.; BIZZI, A.; DONELLI, M. G.; GUAITANI, A.; SEMANIN, R.; SPREAFICO, F. Anorexia and cancer in animals and man. **Cancer Treat. Rev.**, v. 7, p. 115-140, 1980.

GENKINGER, J. M.; SPIEGELMAN, D.; ANDERSON, K. E.; BERNSTEIN, L.; VAN DEN BRANDT, P. A.; CALLE, E. E.; ENGLISH, D. R.; FOLSOM, A. R.; FREUDENHEIM, J. L.; FUCHS, C. S.; GILES, G. G.; GIOVANNUCCI, E.; HORN-ROSS, P. L.; LARSSON, S. C.; LEITZMANN, M.; MÄNNISTÖ, S.; MARSHALL, J. R.; MILLER, A. B.; PATEL, A. V.; ROHAN, T. E.; STOLZENBERG-SOLOMON, R. Z.; VERHAGE, B. A.; VIRTAMO, J.; WILLCOX, B. J.; WOLK, A.; ZIEGLER, R. G.; SMITH-WARNER, S. A. A pooled analysis of 14 cohort studies of anthropometric factors and pancreatic cancer risk. **Int. J. Cancer.**, v. 129, n. 7, p. 1708-1717, 2011.

GIANNAKOU, M. E.; GOSS, M.; JUNGER, M. A.; HAFEN, E.; LEEVERS, S. J.; PARTRIDGE, L. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. **Science**, v. 305, p. 361, 2004.

GIOVANNUCCI, E.; ASCHERIO, A.; RIMM, E. B.; COLDITZ, G. A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Physical activity, obesity and risk for colon cancer and adenoma in men. **Ann. Intern. Med.**, v. 122, p. 327-334, 1995.

GIOVANNUCCI, E. Insulin and colon cancer. **Cancer Cause Control**, v. 6, p. 164-179, 1995.

GIOVANNUCCI, E.; MICHAUD, D. The role of obesity and related metabolic disturbances in cancers of the colon, prostate, and pancreas. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2208-2225, 2007.

GREER, E. L.; BANKO, M. R.; BRUNET, A. AMP-activated Protein Kinase and FoxO Transcription Factors in Dietary Restriction-induced Longevity. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1170, p. 688-692, 2009.

GREENFIELD, J.; CAMPBELL, L. Insulin resistance and obesity. **Clin. Dermatology**, v. 22, n. 4, p. 289-295, 2004.

GRUNING, N.; RALSER, M. Cancer Sacrifice for survival. **Nature**, v. 480, p. 190-191, 2011.

GUAITANI, A.; RECHIA, M.; CARLI, M.; ROCCHETTI, M.; BARTO, S.; GARANTI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-induced anorexia and cachexia. **Oncology**, v. 39, p. 173-178, 1982.

HADAD, S. M.; FLEMING, S.; THOMPSON, A. M. Targeting AMPK: a new therapeutic opportunity in breast cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 67, p. 1-7, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

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

HAWLEY, S. A.; BOUDEAU, J.; REID, J. L.; MUSTARD, K. J.; UDD, L.; MAKELA, T. P.; ALESSI, D. R.; HARDIE, D. G. Complexes between the LKB1 tumor suppressor. STRAD alpha/beta and MO 25 alpha/beta upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. **J. Biol.**, v. 2, n. 4, p. 28, 2003.

HILL, J. O. Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. **Endocr. Rev.**, v. 27, n. 7, p. 750-761, 2006.

HIRATA, A. E.; ANDRADE, I. S.; VASKEVICIUS, P.; DOLNIKOFF, M. S. Monosodium glutamate (MSG)-obese rats develop glucose intolerance and insulin resistance to peripheral glucose uptake. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 671–674, 1997.

HO, K. K.; MYATT, S. S.; LAM, E. W. Many forks in the path: cycling with FoxO. **Oncogene**, v. 27, p. 2300-2311, 2008.

HODA, M. R.; KEELY, S. J.; BERTELSEN, L. S.; JUNGER, W. G.; DHARMASENA, D.; BARRETT, K. E. Leptin acts as a mitogenic and antiapoptotic factor for colonic cancer cells. **Br. J. Surg.**, v. 94, p. 346-354, 2007.

HOEBEN, A.; LANDUYT, B.; HIGHLEY, M. S.; WILDIERS, H.; VAN OOSTEROM, A. T.; DE BRUIJN, E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. **Pharmacol. Rev.**, v. 56, p. 549-580, 2004.

HOLZENBERGER, M.; DUPONT, J.; DUCOS, B.; LENEUE, P.; GELOEN, A.; EVEN, P. C.; CERVERA, P.; LE BOUC, Y. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. **Nature**, v. 421, p. 182–187, 2003.

HOLZWARTH-MCBRIDE, M. A.; SLADEK, K. M.; KNIGGE, J. R. Monosodium glutamate induced lesions of the arcuate nucleus. II. Fluorescence histochemistry of catecholamines. **Anat. Rec.**, v. 186, p. 197-206, 1976.

HORWITZ, K. B.; COSTLOW, M. E.; MCGUIRE, W. L. MCF-7: a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. **Steroids**, v. 26; p. 785-795, 1975.

HOUSA, D.; HOUSOVÁ, J.; VERNEROVÁ, Z.; HALUZÍK, M. Adipocytokines and cancer. **Physiol. Res.**, v. 55, p. 233-244, 2006.

HU, M. C.; LEE, D. F.; XIA, W.; GOLFMAN, L. S.; OU-YANG, F.; YANG, J. Y.; ZOU, Y.; BAO, S.; HANADA, N.; SASO, H.; KOBAYASHI, R.; HUNG, M. C. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. **Cell**, v. 117, p. 225–237, 2004.

HUGUET, E. L.; McMAHON, J. A.; McMAHON, A. P.; BICKNELL, R.; HARRIS, A. L. Differential expression of human Wnt genes 2, 3, 4, and 7B in human breast cell lines and normal and disease states of human breast tissue. **Cancer Res.**, v. 54, p. 2615-2621, 1994.

HURSTING, S. D.; HURSTING, M. J. Growth signals, inflammation, and vascular perturbations: mechanistic links between obesity, metabolic syndrome, and cancer. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 32, p. 1766-1770, 2012.

HURSTING, S. D.; NUNEZ, N. P.; VARTICOVSKI, L.; VINSON, C. The obesity-cancer link: lessons learned from a fatless mouse. **Cancer Res.**, v. 67, n. 6, p. 2391-2393, 2007.

HWANGBO, D. S.; GERSHAM, B.; TU, M. P.; PALMER, M.; TATAR, M. Drosophila dFOXO controls lifespan and regulates insulin signaling in brain and fat body. **Nature**, v. 429, p. 562–566, 2004.

IBRAHIM, Y. H.; YEE, D. Insulin-like growth factor-I and cancer risk. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 14, p. 261-269, 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>>. Acesso em: 20 out. 2012.

INTERNATIONAL AGENCY FOR REASEARCH ON CANCER (IARC). **Handbooks of cancer prevention. weight control and physical activity**. Lyon, 2002. 327 p. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 20 jun. 2012.

JAGANI, Z.; SINGH, A.; KHOSRAVI-FAR, R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1785, p. 63-84, 2008.

JEE, S. H.; KIM, H. I.; LEE, J. Obesity, insulin resistance and câncer risk. **Yonsei Med. J.**, v. 46, n. 4, p. 449-455, 2005.

JOHNS, N.; GREIG, C.; FEARON, K. C. Is tissue cross-talk important in cancer cachexia? **Crit. Rev. Oncol.**, v. 17, n. 3, p. 263-276, 2012.

KAACKS, R. Nutrition, hormones, and breast cancre: is insulin the missing link? **Cancer Cause. Control**, v. 7, p. 605-625, 1996.

KAACKS, R.; LUKANOVA, A. Effects of weight control and physical activity in cancer prevention: role of endogenous hormone metabolism. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 963, p. 268-281, 2002.

KAACKS, R.; LUKANOVA, A.; KURZER, M. S. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk: a synthetic review. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 11, p. 1531-1543, 2002.

KAHN, B. B.; ALQUIER, T.; CARLING, D.; HARDIE, D. G. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. **Cell Metab.**, v. 1, p. 15-25, 2005.

KEMPEN, L. C. L.; VISSERC, K. E.; COUSSENS, L. M. Inflammation, proteases and cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 42, p. 728-734, 2006.

KEY, T. J.; ALLEN, N. E.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Energy balance and cancer: the role of sex hormones. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 60, p. 81–89, 2001.

KEY, T. J.; APPLEBY, P. N.; REEVES, G. K.; RODDAM, A.; DORGAN, J. F.; LONGCOPE, C.; STANCZYK, F. Z.; STEPHENSON, H. E; FALK, R.T.; MILLER, R.; SCHATZKIN, A.; ALLEN, D.S.; FENTIMAN, I.S.; KEY, T.J.; WANG, D.Y.; DOWSETT, M.; THOMAS, H. V.; HANKINSON, S. E.; TONIOLO, P.; AKHMEDKHANOV, A.; KOENIG, K.; SHORE, R. E.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A.;

BERRINO, F.; MUTI, P.; MICHELI, A.; KROGH, V.; SIERI, S.; PALA, V.; VENTURELLI, E.; SECRETO, G.; BARRETT-CONNOR, E.; LAUGHLIN, G. A.; KABUTO, M.; AKIBA, S.; STEVENS, R. G.; NERIISHI, K.; LAND, C. E.; CAULEY, J. A.; KULLER, L. H.; CUMMINGS, S. R.; HELZLSOUER, K. J.; ALBERG, A. J.; BUSH, T. L.; COMSTOCK, G. W.; GORDON, G. B.; MILLER, S. R.; LONGCOPE, C. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 95, p. 1218-1226, 2003.

KIZER, J. S.; NEMEROFF, C. B.; YOUNGBLOOD, W. W. Neurotoxic amino acids and structurally related analogs. **Pharmacol. Rev.**, v. 24, p.301-318, 1978.

KÖNNER, A. C.; BRÜNING, J. C. Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism. **Trends Endocrin. Met.**, v. 22, p. 16-23, 2011.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-643, 2000.

KOPS, G. J.; DANSEN, T. B.; POLDERMAN, P. E.; SAARLOOS, I.; WIRTZ, K. W.; COFFER, P. J.; HUANG, T. T.; BOS, J. L.; MEDEMA, R. H.; BURGERING, B. M. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. **Nature**, v. 419, p. 316–321, 2002.

KROEMER, G. Mitochondrial control of cell death. **Nat. Med.**, v. 6, p. 513-519, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins patologia básica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LEW, E. A.; GARFINKEL, L. Variations in mortality by weight among 750,000 men and women. **J. Chronic. Dis.**, v. 32, p. 563-576, 1979.

LI, Z.; BOWERMAN, S.; HEBER, D. Health ramifications of the obesity epidemic. **Surg. Clin. North America**, v. 85, n. 4, p. 681-701, 2005.

LIPPMAN, M. E.; BOLAN, G. Estrogen-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. **Nature**, v. 256, p. 592-593, 1975.

LIZCANO, J. M.; GORANSSON, O.; TOCH, R.; DEAK, M.; MORRICE, N. A.; BOUDEAU, J.; HAWLEY, S. A.; UDD, L.; MÄKELÄ, T. P.; HARDIE, D. G.; ALESSI, D. R. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. **EMBO. J.**, v. 23, p. 833-843, 2004.

LOBATO, N. S.; FILGUEIRA, F. P.; AKAMINE, E. H.; DAVEL, A. P. C.; ROSSONI, L. V.; TOSTES, R. C.; CARVALHO, M. H. C.; FORTES, Z. B. Obesity Induced by Neonatal Treatment with Monosodium Glutamate Impairs Microvascular Reactivity in Adult Rats: Role of NO and Prostanoids. **Nutr. Metab. Cardiovas.**, v. 21, n. 10, p. 808-816, 2011.

LONERGAN, P. E.; TINDALL, D. J. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. **J. Carcinog.**, v. 10, p. 20, 2011.

MACAULAY, V. M. Insulin-like growth factors and cancer. **Br. J. Cancer**, v. 65, n. 3, p. 311-320, 1992.

MACHO, L.; FICKOVÁ, D.; JEZOVÁ, S.; ZÓRAD, S. Late effects of postnatal administration of monosodium glutamate on insulin action in adult rats. **Physiol. Res.**, v. 49, p. 79-85, 2000.

MAITER, D.; UNDERWOOD, L. E.; MARTIN, J. B.; KOENIG, J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. **Endocrinology**, v. 128, n. 2, p. 1100-1106, 1991.

MANCINI, M. C. Obesidade e doenças associadas. In: MANCINI, M. C.; GELONEZE, B.; SALLES, J. E. N.; LIMA, J. G.; CARRA, M. K. **Tratado de obesidade**. Itapevi: AC Farmacêutica, 2010. p. 253--264.

MARIA, D. A.; SOUZA, J. G.; MORAIS, K. L. P.; BERRA, C. M.; ZAMPOLLI, H. C.; DEMASI, M.; SIMONS, S. M.; SAITO, R. F.; CHAMMAS, R.; CHUDZINSK-TAVASSI, A. M. A novel proteasome inhibitor acting in mitochondrial dysfunction, ER stress and ROS production. **Invest. New Drugs**, 2012. In press.

MATTHEWS, D. E.; FAREWELL, V. Kaplan-Meier or “actual” survival curves. In: _____ **Using and understanding medical statistics**. Basel: Karger, 1988. p. 67-87.

MCKEOWN-EYSEN, G. Epidemiology of colorectal cancer revisited: are serum triglycerides and/or plasma glucose associated with risk? **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 3, p. 687–695, 1994.

MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 292, n. 1, p. C82-97, 2007.

MISHRA, L.; BASS, B.; OOI, B. S.; SIDAWY, A.; KORMAN, L. Role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor, IGF-1, IGF binding protein-2 in human colorectal cancers. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 8, p. 473–479, 1998.

MOITRA, J.; MASON, M. M.; OLIVE, M.; KRYLOV, D.; GAVRILOVA, O.; MARCUS-SAMUELS, B.; FEIGENBAUM, L.; LEE, E.; AOYAMA, T.; ECKHAUS, M.; REITMAN, M.L.; VINSON, C. Life without white fat: a transgenic mouse. **Genes Dev.**, v. 12, p. 3168–3181, 1998.

MONTEIRO, J. C. Obesidade: diagnóstico, métodos e fundamentos. In: HALPERN, A. (Ed.). **Obesidade**. São Paulo: Lemos, 1998. p. 36-40.

MONTEIRO, R.; AZEVEDO, I. Chronic Inflammation in Obesity and the Metabolic Syndrome. **Mediat. Inflamm.**, v. pii, 289645, 2010.

MORAES, J. C.; COOPE, A.; MORARI, J.; CINTRA, D. E.; ROMAN, E. A.; PAULI, J. R.; ROMANATTO, T.; CARVALHEIRA, J. B.; OLIVEIRA, A. L. R.; SAAD, M. J.;

VELLOSO, L. A. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. **Plos One**, v. 4, e5045, 2009.

MORIOKA, T.; BABA, T.; BLACK, K. L.; STREIT, W. J. Inflammatory cell infiltrates vary in experimental primary and metastatic brain tumors. **Neurosurgery**, v. 30, p. 891-896, 1992.

MUNIYAPPA, R.; MONTAGNANI, M.; KOH, K. K.; QUON, M. J. Cardiovascular Actions of Insulin. **Endocrinol. Rev.**, v. 28, n. 5, p. 463-491, 2007.

NEMEROFF, C. B.; GRANT, L. D.; BISSETTE, G.; ERVIN, G. N.; HARRELL, L. E.; PRANGE, A. J. Growth, endocrinological and behavioral deficits after monosodium L-glutamate in the neonatal rat: possible involvement of arcuate dopamine neuron damage. **Psychoneuroendocrino.**, v. 2, n. 2, p. 179-196, 1977.

NOCK, N. L. Obesity and gastrointestinal cancers: epidemiology. In: MARKOWITZ, S. D.; BERGER, N. A. (Ed.). **Energy balance and gastrointestinal cancer**. Cleveland: Springer, 2012. p. 1-22.

NUNEZ, N. P.; OH, W. J.; ROZENBERG, J.; PERELLA, C.; ANVER, M.; BARRET, J. C.; PERKINS, S. N.; BERRIGAN, D.; MOITRA, J.; VARTICOVSKI, L.; HURSTING, S. D.; VINSON, C. Accelerated tumor formation in a fatless mouse with type 2 diabetes and inflammation. **Cancer Res.**, v. 66, p. 5469-5476, 2006.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, p. 719-721, 1969.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, p. 609-619, 1993.

ONUCHI, A. C.; MACHADO, C. M.; SAITO, R. F.; RIOS, F. J.; JANCAR, S.; CHAMMAS, R. Expression of PAFR as part of a prosurvival response to chemotherapy: a novel target for combination therapy in melanoma. **Mediators Inflamm.**, 2012. In press.

OSBORNE, C. K.; LIPPMAN, M. E. Insulin-Responsive Human Breast Cancer in Long-term Tissue Culture. **Proc. Am. Assoc. Cancer Res.**, v. 17, p. 209, 1976.

OSÓRIO-COSTA, F.; ROCHA, G. Z.; DIAS, M. M.; CARVALHEIRA, J. B. C. Epidemiological and molecular mechanisms aspects linking obesity and cancer. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 53, p. 213-226, 2009.

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

PAIK, J. H.; KOLLIPARA, R.; CHU, G.; JI, H.; XIAO, Y.; DING, Z.; MIAO, L.; TOTHOVA, Z.; HORNER, J. W.; CARRASCO, D. R.; JIANG, S.; GILLILAND, D. G.; CHIN, L.; WONG, W. H.; CASTRILLON, D. H.; DEPINHO, R. A. FoxOs are lineage-

restricted redundant tumor suppressors and regulate endothelial cell homeostasis. **Cell**, v. 128, p. 309-323, 2007.

PAVLAKI, M.; GIANNOPOULOU, E.; NIARAKIS, A.; RAVAZOULA, P.; ALETRAS, A. J. Walker 256 cancer cells secrete tissue inhibitor of metalloproteinase-free metalloproteinase-9. **Mol. Cell Biochem.**, v. 328, p.189–199, 2009.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCH JR, A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, p. 111-127, 2003.

PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **J. Immunol. Methods.**, v. 38, p. 161-170, 1980.

POLLAK, M. Insulin and insulin-like growth factor signaling in neoplasia. **Nat. Cancer Rev.**, v. 8, p. 915-928, 2008.

POWERS, K.; REHRIG, S.; JONES, D. Financial impact of obesity and bariatric surgery. **Med. Clin. North America.**, v. 91, n. 3, p. 321-338, 2007.

QATANANI, M.; LAZAR, M. A. Mechanisms of obesity-associated insulin resistance: many choices on the menu. **Genes Dev.**, v. 21, n. 12, p. 1443-1455, 2007.

RAISOVA, M.; HOSSINI, A. M.; EBERLE, J.; RIEBELING, C.; WIEDER, T.; STURM, I.; DANIEL, P. T.; ORFANOS, C. E.; GEILEN, C. C. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 117, p. 333-340, 2001.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: the adipocyte — at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology**, v. 144, p. 3765–3773, 2003.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, v. 37, p. 1595–1607, 1988.

REDDING, T. W.; SCHALLY, A. V.; ARIMURA, A.; WAKABAYASHI, I. Effect of monosodium glutamate on some endocrine functions. **Neuroendocrinology**, v. 8, p. 245-255, 1971.

REED, J. C. Double identity for protein of Bcl-2 family. **Nature**, v. 387, p. 773-778, 1997.

REITMAN, M. L.; SCHADT, E. E. Pharmacogenetics of metformin response: a step in the path toward personalized medicine. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1226-1229 , 2007.

REMKE, H.; WILSDORF, A.; MULLER, F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. **Exp. Pathol.**, v. 33, p. 223-232, 1988.

RODRIGUEZ-SIERRA, J. F.; SRIDARAN, R.; BLAKE, C. A. Monosodium glutamate disruption of behavioral and endocrine function in the female rat. **Neuroendocrinology**, v. 31, n. 3, p. 228-235, 1980.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; ZECCHIN, K. G.; UENO, M.; SOUZA, C. T.; MORARI, J.; FARIA, M. C.; VELLOSO, L.; SAAD, M. J. A.; CARVALHEIRA, J. B. C. A central role for neuronal adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase in cancer-induced anorexia. **Endocrinology**, v. 148, p. 5220-5229, 2007.

SAHRA, I. B.; LAURENT, K.; GIULIANO, S.; LARBRET, F.; PONZIO, G.; GOUNON, P.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; GIORGETTI-PERALDI, S.; CORMONT, M.; BERTOLOTTO, C.; DECKERT, M.; AUBERGER, P.; TANTI, J. F.; BOST, F. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 6, p. 2465-2475, 2010.

SAHRA, I. B.; LAURENT, K.; LOUBAT, A.; GIORGETTI-PERALDI, S.; COLOSETTI, P.; AUBERGER, P.; TANTI, J. F.; LE MARCHAND-BRUSTEL, Y.; BOST, F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect *in vitro* and *in vivo* through a decrease of cyclin D1 level. **Oncogene**, v. 27, p. 3576-3586, 2008.

SALANI, B.; MAFFIOLI, S.; HAMOUDANE, M.; PARODI, A.; RAVERA, S.; PASSALACQUA, M.; ALAMA, A.; NHIRI, M.; CORDERA, R.; MAGGI, D. Caveolin-1 is essential for metformin inhibitory effect on IGF1 action in non-small-cell lung cancer cells. **FASEB J.**, v. 26, n. 2, p. 788-798, 2012.

SALTIEL, A. R.; KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. **Nature**, v. 414, p. 799-806, 2001.

SANTOMAURO JÚN., A. C.; UGOLINI, M. R.; SANTOMAURO, A. T.; SOUTO, R. P. Metformina e AMPK: um antigo fármaco e uma nova enzima no contexto da síndrome metabólica. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 52, p. 120-125, 2008.

SAXENA, N. K.; VERTINO, P. M.; ANANIA, F. A.; SHARMA, D. Leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to cyclin d1 promoter via activation of stat3. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 13316-13325, 2007.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, v. 55, n. 6, p. 1537-1545, 2006.

SCHNEIDER, M. B.; MATSUZAKI, H.; HAORAH, J.; ULRICH, A.; STANDOP, J.; DING, X.; ADRIAN, T. E.; POUR, P. M. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. **Gastroenterology**, v. 120, p. 1263-1270, 2001.

SEELANDER, M. C.; AMBRICO, C.; RODRIGUES, M. C. P. S.; BOECKH-HAEBISCH, E.; CURI, R. Hormonal alterations in Walker 256 tumor-bearing rats: possible role of calcium for the maintenance of cachexia. **Cancer Res. Ther. Control**, v.5, p. 29-33, 1996.

SEOANE, J.; LE, H. V.; SHEN, L.; ANDERSON, S. A.; MASSAGUÉ, J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. **Cell**, v. 117, p. 211-223, 2004.

SEUFERT, J.; LUBBEN, G.; DIETRICH, K.; BATES, P. C. A comparison of the effects of thiazolidinediones and metformin on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus. **Clin. Ther.**, v. 26, n. 6, p. 805-818, 2004.

SHAFIE, S.; BROOKS, S. C. Effect of Prolactin on Growth and the Estrogen Receptor Level of Human Breast Cancer Cells (MCF-7). **Cancer Res.**, v. 37, p. 792-799, 1977.

SHARMA, D.; SAXENA, N. K.; VERTINO, P. M.; ANANIA, F. A. Leptin promotes the proliferation response and invasiveness in human endometrial cancer cells by activating multiple signaltransduction pathways. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 13, p. 629-640, 2006.

SHARP, L. Z.; SHINODA, K.; OHNO, H.; SCHEEL, D. W.; TOMODA, E.; RUIZ, L.; HU, H.; WANG, L.; PAVLOVA, Z.; GILSANZ, V.; KAJIMURA, S. Human BAT possesses molecular signatures that resemble beige/brite cells. **Plos One**, v. 7, n. 11, p. e49452, 2012.

SHAW, R. J.; LAMIA, K. A.; VASQUEZ, D.; KOO, S. H.; BARDEESY, N.; DEPINHO, R. A.; MONTMINY, M.; CANTLEY, L. C. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. **Science**, v. 310, p. 1642–1646, 2005.

SCHENK, S.; SABERI, M.; OLEFSKY, J. M. Insulin sensitivity: modulation by nutrients and inflammation. **J. Clin. Invest.**, v. 118, p. 2992-3002, 2008.

SHILS, M.; OLSON, J.; SHIKE, M.; ROSS, A. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. 9. ed. São Paulo: Manole, 2003. 3132 p.

SHU, Y.; SHEARDOWN, S. A.; BROWN, C.; OWEN, R. P.; ZHANG, S.; CASTRO, R. A.; IANCULESCU, A. G.; YUE, L.; LO, J. C.; BURCHARD, E. G.; BRETT, C. M.; GIACOMINI, K. M. Effect of genetic variation in the organic cation transporter 1 (OCT1) on metformin action. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1422–1431, 2007.

SILVA, M. P. N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 52, p. 59-77, 2006.

SIMONY, J.; ROSSI, J. F.; SHISHEHIAN, B.; URSULE, E.; RADAL, M.; PUJOL, H. Characterization of proliferative cells in malignant melanomas and their inflammatory infiltrates. **Cancer Detect Prev.**, v. 15, p. 183-187, 1991.

SOMASUNDAR, P.; MCFADDEN, D. W.; HILEMAN, S. M.; VONA-DAVIS, L. Leptin is a growth factor in câncer. **J. Surg. Res.**, v. 116, p. 337-349, 2004.

SOULE, H. D.; VAZQUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 51, p. 1409-1416, 1973.

SUGARMAN, B. J.; AGGARWAL, B. B.; HASS, P. E.; FIGARI, I. S.; PALLADINO, M. A. Jr.; SHEPARD, H. M. Recombinant human tumor necrosis factor-alpha: effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. **Science**, v. 230, p. 943-945, 1985.

TCHERNOF, A.; DESPRES, J. P. Sex steroid hormones, sex hormone-binding globulin, and obesity in men and women. **Horm. Metab. Res.**, v. 32, p. 526-536, 2000.

TERAS, L. R.; PATEL, A. V. The Epidemiology of obesity and hematologic malignancies. In: MITTELMAN, S. D.; BERGER, N. A. (Ed.). **Energy balance and hematologic malignancies**. New York: Springer, 2012. p. 1-30.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 6, p. 772-783, 2006.

TIROSH, A.; SHAI, I.; AFEK, A.; DUBNOV-RAZ, G.; AYALON, N.; GORDON, B.; DERAZZNE, E.; TZUR, D.; SHAMIS, A.; VINKER, S.; RUDICH, A. Adolescent BMI Trajectory and Risk of Diabetes versus Coronary Disease. **N. Eng. J. Med.**, v. 364, n. 14, p. 1315-1325, 2011.

TISDALE, M. J. DSC, câncer anorexia and caquexia. **Nutrition**, v. 17, p. 438-442, 2001.

TROTMAN, L. C.; ALIMONTI, A.; SCAGLIONI, P. P.; KOUTCHER, J. A.; CORDON-CARDO, C.; PANDOLFI, P. P. Identification of a tumour suppressor network opposing nuclear Akt function. **Nature**, v. 441, p. 523-527, 2006.

VEJA, G. L. Cardiovascular outcomes for obesity and metabolic syndrome. **Obes. Res**, v. 10, n. 1, p. S27-S32, 2002.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr. Rev**, v. 21, p. 697-738, 2000.

WANG, Y.; JACOBS, E. J.; PATEL, A. V.; RODRÍGUEZ, C.; MCCULLOUGH, M. L.; THUN, M. J.; CALLE, E. E. A prospective study of waist circumference and body mass index in relation to colorectal cancer incidence. **Cancer Cause. Control**, v. 19, n. 7, p. 783-792, 2008.

WANG, D. S.; JONKER, J. W.; KATO, Y.; KUSUHARA, H.; SCHINKEL, A. H.; SUGIYAMA, Y. Involvement of organic cation transporter 1 in hepatic and intestinal distribution of metformin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 302, p. 510-515, 2002.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, p. 309-314, 1956.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v. 420, p. 845, 2002.

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 26, p. 19-27, 2005.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? **Genes Dev.**, v. 27, n. 3, p. 234-250, 2013.

YOUNES, R. N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo**, v. 55, p. 181-193, 2000.

ZAKIKHANI, M.; DOWLING, R. J. O.; SONENBERG, N.; POLLAK, M. N. The effects of adiponectin and metformin on prostate and colon neoplasia involve activation of AMP-activated protein kinase. **Cancer Prev. Res.**, v. 1, n. 5, p. 369-375, 2008.

ZAKIKHANI, M.; DOWLING, R.; FANTUS, G.; SONENBERG, N.; POLLAK, M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 66, n. 21, p. 10269-10273, 2006.

ZAMZAMI, N.; KROEMER, G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 2, p. 67-71, 2001.

ZHANG, X.; TANG, N.; HADDEN, T. J.; RISHI, A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1813, n. 11, p. 1978-1986, 2011.

ZHANG, L.; DRESSER, M. J.; GRAY, A. T.; YOST, S. C.; TERASHITA, S.; GIACOMINI, K. M. Cloning and functionalexpression of a human liver organic cation transporter. **Mol. Pharmacol.**, v. 51, p. 913-921, 1997.

ZHOU, G.; MYERS, R.; LI, Y.; CHEN, Y.; SHEN, X.; FENYK-MELODY, J.; WU, M.; VENTRE, J.; DOEBBER, T.; FUJII, N.; MUSI, N.; HIRSHMAN, M. F.; GOODYEAR, L. J.; MOLLER, D. E. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. **J. Clin. Invest.**, v. 108, p. 1167-1174, 2001.

ZHUANG, Y.; MISKIMINS, W. K. Metformin induces both caspase-dependent and poly(ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. **Mol. Cancer Res.**, v. 9, p. 603-615, 2011.

ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G.; SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, p. 782-787, 2001.