



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Marina Gobbe Moschetta

**Bloqueio simultâneo da angiogênese pelas vias de
sinalização PI3K e MAPK/AKT/mTOR após
tratamento com metformina e LY294002 no câncer de
mama**

São José do Rio Preto
2016

Marina Gobbe Moschetta

**Bloqueio simultâneo da angiogênese pelas vias de
sinalização PI3K e MAPK/AKT/mTOR após
tratamento com metformina e LY294002 no câncer de
mama**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientadora: Profa. Dra. Debora Ap. Pires de Campos Zuccari

**São José do Rio Preto
2016**

Marina Gobbe Moschetta

**Bloqueio simultâneo da angiogênese pelas vias de
sinalização PI3K e MAPK/AKT/mTOR após
tratamento com metformina e LY294002 no câncer de
mama**

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Debora Ap. P. C. Zuccari

2º Examinador: Profa. Dra. Patricia Simone Leite Vilamaior

3º Examinador: Profa. Dra. Ana Paula Girol

4º Examinador: Profa. Dra. Adriana Barbosa Gonçalves

5º Examinador: Profa. Dra. Dorotéia Rossi Silva Souza

Suplentes: Profa. Dra. Lilian Castiglioni

Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas

São José do Rio Preto, 04 de novembro de 2016.

Sumário

Sumário

Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iv
Lista de figuras.....	viii
Lista de Quadros e quadros.....	xi
Lista de abreviaturas e símbolos.....	xiii
Resumo.....	xvii
Abstract.....	xx
I. INTRODUÇÃO.....	2
1. Aspectos Gerais.....	2
2. Hipóxia.....	2
3. Angiogênese.....	3
4. Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF).....	5
5. Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia.....	6
6. O papel da metformina e do inibidor LY294002 no câncer.....	8
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
Considerações éticas.....	12
1. Cultivo celular.....	12
1.1. Contagem e plaqueamento das células.....	12
1.2. Ensaio de viabilidade celular.....	13
1.3. Grupos de tratamento.....	14
1.4. Citometria de fluxo.....	14
1.5. Imunocitoquímica.....	15
1.5.1. Quantificação imunocitoquímica.....	16
1.6. Técnica de PCR quantitativo (qPCR): Análise da expressão gênica.....	16
1.6.1. Extração de RNA total.....	16
1.6.2. Obtenção do cDNA.....	17
1.6.3. Análise da expressão gênica.....	17
1.6.4. Análise da expressão dos genes.....	19
2. Implantação tumoral.....	19
2.1. Grupos de tratamento.....	19
2.2. Peso corporal e glicose sanguínea.....	20
2.3. Tamanho tumoral.....	20
2.4. Ensaio de citotoxicidade.....	20
2.5. Eutanásia.....	21

2.6. Inclusão em parafina.....	21
2.7. Imunohistoquímica.....	22
2.8. Técnica de PCR quantitativa.....	22
2.8.1. Extração de RNA Total.....	22
3. Análise Estatística.....	23
III. RESULTADOS.....	25
1.1. Análise da viabilidade celular pelo ensaio MTT.....	25
1.2. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	30
1.3. Análise da expressão proteica do VEGF e HIF-1 α por imunocitoquímica.....	31
1.4. PCR em Tempo Real.....	35
1.4.1. Quantificação do RNA.....	35
1.4.2. Seleção dos genes endógenos.....	36
1.4.3. Análise da expressão gênica do <i>VEGFA</i> e <i>HIF-1A</i>	38
2. Modelo animal.....	40
2.1. Análise do peso corporal.....	40
2.2. Verificação dos níveis de glicose.....	41
2.3. Verificação do volume tumoral.....	41
2.4. Análise da citotoxicidade das drogas.....	42
2.5. Análise da MVD pela expressão proteica do CD31.....	43
2.6. Análise da expressão proteica e gênica do VEGF e HIF-1 α	43
IV. DISCUSSÃO.....	47
V. CONCLUSÕES.....	55
VI. REFERÊNCIAS.....	57
VII. APÊNDICE.....	68
VIII. ANEXOS.....	70

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Maria, minha avó Conceição e meu irmão Vinícius por todo apoio e amor incondicional e por nunca me deixarem desistir. Cada conquista da minha vida é de vocês também. Amo vocês!

Dedico também ao meu noivo Fernando, por sempre me apoiar e incentivar, especialmente durante essa fase da minha vida.

Agradecimientos

Agradecimentos

À Deus por sempre iluminar meus caminhos, por me dar força, serenidade e saúde para completar essa trajetória e por permitir que encontrasse ao longo dessa caminhada pessoas tão especiais.

Em especial à minha mãe Maria, por não medir esforços para que todos os meus sonhos se tornassem realidade, sem você nada disso seria possível. Não tenho palavras o suficiente para agradecer por tudo que você fez e faz por mim.

Ao meu pai, Dirceu, pelo pouco tempo que estivemos juntos, mas por tudo que me deixou. Você está sempre em meu pensamento.

Ao meu irmão, Vinicius, pela convivência, pelas brigas, alegrias e conselhos, e ainda pelos momentos que enfrentamos juntos.

À minha avó Conceição, por tudo que significa para mim, pelo amor e exemplo de força e por todo tempo que estivemos juntas. Agradeço por cada conselho, palavra de carinho e apoio e por todos os ensinamentos que levo comigo. Tenho certeza que você está sempre comigo.

Ao meu noivo e futuro marido, Fernando P. Pinheiro, por todo amor, carinho e companheirismo nessa fase da minha vida. Por estar sempre ao meu lado me apoiando com conselhos e palavras de conforto, me dando força e coragem nessa caminhada.

Aos meus sogros Marli L. S. P. Pinheiro e José O. P. Pinheiro e toda a família, Joana, Denise e avó Yolanda pelo carinho e dedicação, sempre torcendo pela minha vitória.

Aos meus tios, tias, primos e primas. Obrigada por estarem sempre presentes na minha vida e desejarem o meu sucesso.

À minha cunhada Larissa Gandolphi pela amizade e companheirismo ao longo dessa caminhada.

À minha amiga Daiana C. Prado, por toda a trajetória desde a faculdade, pelas horas de estudo, pelos momentos de alegria que compartilhamos e por cada passo importante que demos juntas. Obrigada pela amizade sincera e eterna.

À minha orientadora, Profa. Dra. Debora Zuccari, pelo apoio e confiança durante a realização desse trabalho. Agradeço também pela oportunidade de iniciar minha carreira científica e por todos os ensinamentos transmitidos.

Não tenho palavras para descrever os meus agradecimentos aos eternos amigos do LIMC: Bruna V. Jardim-Perassi, Gabriela B. Gelaleti, Camila Leonel, Larissa B. Maschio-Signorini, Thaiz F. Borin, Livia C. Ferreira, Juliana R. Lopes, Naiane do N. Gonçalves, Gustavo R. Martins, Giovanna R. Varallo, Jucimara Colombo, Nathália Sonehara, Rubens P. Junior, Jéssica Z. Lacerda, Tialfi Castro e André L. Mota pelos longos anos de amizade, companheirismo e por tudo que enfrentamos juntos. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma neste trabalho, só tenho a agradecê-los por isso, pois sozinha esta etapa não teria sido concluída. Agradeço especialmente aqueles que se tonaram amigos para a vida toda, nos quais posso confiar sempre. Vocês são muito especiais!

Aos antigos amigos do Núcleo de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular (NPBIM) e Laboratório de Imunologia e Transplante Experimental (LITEX) da FAMERP: Marcela A. S. Pinhel, Michele L. Gregório, Greiciane F. Florim e Camila M. Felício pelo primeiro contato com as técnicas de laboratório, por todos os ensinamentos e momentos de alegria que compartilhamos e pela amizade sincera. Agradeço também ao meu amigo de profissão Rafael F. Ferreira por compartilhar experiências e por toda ajuda sempre que preciso.

Agradeço especialmente a Profa. Dra. Dorotéia Rossi da Silva Souza e a Profa. Dra. Heloisa Cristina Caldas pela atenção e carinho e por sempre me acolherem em seus laboratórios.

Aos amigos da Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular (UPGEM) da FAMERP que compartilharam comigo tantos momentos bons, especialmente Glaucia

M.M. Fernandes e Stéphanie Piacenti. Agradeço também a Profa. Dra. Eny Maria Goloni-Bertollo e a Profa. Dra. Erika Cristina Pavarino pela parceria com nosso laboratório.

À Profa. Dra. Sonia Maria Oliani e sua aluna Caroline F. Zanon do Laboratório de Imunomorfologia da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – IBILCE/UNESP, pela infraestrutura e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À banca examinadora do exame geral de qualificação, Profa. Dra. Claudia Regina Bonini-Domingos por acompanhar minha trajetória desde o mestrado e a Profa. Dra. Gloria Elisa Florido Mendes por todo ensinamento e palavras de incentivo.

Aos Professores: Profa. Dra. Adriana Barbosa Gonçalves, Profa. Dra. Dorotéia R. S. Souza, Profa. Dra. Ana Paula Girol e Profa. Dra. Patrícia Simone Leite Vilamaior por aceitarem fazer parte da banca de defesa.

Ao Sr. Luis O. Bizuti e Prof. Dr. Sidney Pinheiro pela oportunidade da realização de estágio em seu laboratório. Agradeço pelo carinho e pelos ensinamentos.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de estudos e Auxílio Financeiro concedido, indispensáveis para a realização desse projeto.

À FAMERP pela infraestrutura e profissionais que possibilitaram a realização do projeto.

Meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que estiveram comigo neste momento...

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1. Representação das etapas envolvidas no processo de formação de novos vasos.....	4
Figura 2. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores.....	6
Figura 3. Processo de angiogênese, iniciado em resposta à situações de hipóxia, com ênfase na via de ativação do VEGF	7
Figura 4. Ativação do HIF-1 α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia).....	8
Figura 5. Avaliação da viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 por ensaio MTT.....	25
Figura 6. Cálculo do IC50 para as células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 após análise da viabilidade celular por ensaio MTT.....	27
Figura 7. Avaliação da viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CF41 por ensaio MTT.....	28
Figura 8. Cálculo do IC50 para as células da linhagem tumoral mamária canina CF41 após análise da viabilidade celular por ensaio MTT.....	29
Figura 9. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo das células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em condições normais de oxigênio e em hipóxia.....	31
Figura 10. Análise da expressão proteica do VEGF e do HIF-1 α nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em condições normais de oxigênio.....	32 e 33
Figura 11. Análise da expressão proteica do VEGF e do HIF-1 α nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em hipóxia.....	34 e 35
Figura 12. Análise realizada pelo Software DataAssist v3.0 mostrando a estabilidade dos genes candidatos à controles endógenos.....	37
Figura 13. Análise da expressão gênica do <i>VEGFA</i> e do <i>HIF-1A</i> nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em condições normais de oxigênio.....	39

Figura 14. Análise da expressão gênica do <i>VEGFA</i> e do <i>HIF-1A</i> nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em hipóxia.....	40
Figura 15. Análise do estado de saúde geral dos animais e dos dados relacionados ao crescimento tumoral nos diferentes grupos de tratamento após a implantação tumoral.....	42
Figura 16. Análise da MVD pela expressão proteica do CD31 no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002.....	43
Figura 17. Análise da expressão proteica do VEGF no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002.....	44
Figura 18. Análise da expressão proteica do HIF-1 α no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002.....	44
Figura 19. Análise da expressão gênica do <i>VEGFA</i> e do <i>HIF-1A</i> no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002.....	45

Lista de tabelas e quadros

Lista de tabelas e quadros

Quadro 1. Especificações dos anticorpos primários utilizados para o procedimento imunocitoquímico e imunohistoquímico	15
Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos dos genes <i>RPS19</i> e <i>RPS5</i> utilizados na técnica de PCR quantitativo para avaliar a expressão gênica relativa.....	18
Quadro 3. Especificações dos anticorpos primários utilizados para o procedimento imunocitoquímico e imunohistoquímico	22
Quadro 4. Valores referentes à viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 após o tratamento com diferentes concentrações de metformina e LY294002 por 24 horas.....	26
Quadro 5. Valores referentes à viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CF41 após o tratamento com diferentes concentrações de metformina e LY294002 por 24 horas.....	28
Quadro 6. Quantificação das amostras de RNA extraído pelo método do Trizol.....	36

Lista de abreviaturas e símbolos

Lista de abreviaturas e símbolos

μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetros
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina sérica bovina
CDKs	do inglês <i>Cyclin-dependent kinases</i>
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
CO₂	Fórmula química do gás carbônico
CoCl₂	Fórmula química do cloreto de cobalto
Ct	do inglês <i>Cycle Threshold</i>
D.O.M.	Densidade Óptica Média
DAB	Diaminobenzidina
DEPC	do inglês <i>Diethyl pirocarbonato</i>
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ELISA	do inglês <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FAMERP	Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FBS	Soro fetal bovino
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g	Grama
h	Horas
H₂O₂	Fórmula química do peróxido de hidrogênio
HB	Hospital de Base de São José do Rio Preto
HCL	Fórmula química ácido clorídrico

HE	Hematoxilina-eosina
HIFs	do inglês <i>Hypoxia Inducible Factors</i>
HPRT	do inglês <i>Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase</i>
HRP	do inglês <i>Horseradish peroxidase</i>
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Kg	Quilogramas
Km	Área da superfície corporal
LIMC	Laboratório de Investigação Molecular no Câncer
LITEX	Laboratório de Imunologia e Transplante Experimental
Log10	Logaritmo na base 10
MAPK	do inglês <i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMPs	Matriz Metaloproteinases
mTOR	do inglês <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTT	do inglês <i>(3{4,5- dimetiliazol-2-il}-2,5difeniltetrazolium bromídeo)</i>
MVD	Densidade microvascular
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
NO	Fórmula química do óxido nítrico
NPBIM	Unidade de Pesquisa em Bioquímica e Biologia Molecular
°C	Graus Celsius
OR	do inglês <i>Odds ratio</i>
p53	do inglês <i>Tumor protein p53</i>
pb	Pares de base
PBS	do inglês <i>Phosphate buffer solution</i>
PCR	do inglês <i>Polimerase chain reaction</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	do inglês <i>Propidium iodide</i>

PIGF	do inglês <i>Placental Growth Factor</i>
pVHL	do inglês <i>Protein Von Hippel-Lindau</i>
qPCR	do inglês <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
rcf	do inglês <i>Relative Centrifugal Force</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAr	RNA ribossômico
RPL8	do inglês <i>Ribosomal Protein L8</i>
RPS19	do inglês <i>Ribosomal Protein S19</i>
RPS5	do inglês <i>Ribosomal Protein S5</i>
RQ	do inglês <i>Relative quantification</i>
S.E.M.	Desvio Padrão
SDS	do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
T_m	do inglês <i>Temperature melting</i>
u.a.	Unidades arbitrárias
UNESP	Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UPGEM	Unidade de Pesquisa em Genética e Biologia Molecular
VEGF	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

Resumo

Resumo

Introdução: A hipóxia é um conhecido fator adverso ao tratamento do câncer, capaz de ativar as vias de sinalização PI3K e MAPK/Akt/mTOR, as duas principais vias envolvidas no processo de angiogênese. Esse processo é regulado por inúmeros fatores, sendo os mais importantes o Fator Induzido por Hipóxia-1 α (HIF-1 α) e o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF). A metformina tem demonstrado sua capacidade de diminuir a incidência de neoplasias em pacientes diabéticos com resultados positivos especialmente no câncer de mama, inibindo o crescimento celular através da via de sinalização MAPK/Akt/mTOR. Da mesma forma, o LY294002 é um importante inibidor da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR que possui propriedades anti-angiogênicas, capaz de diminuir a liberação de fatores de crescimento como o VEGF. A combinação do tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 tanto em condições normais de oxigênio quanto em hipóxia, bem como a ação no processo de angiogênese em tumores mamários caninos é inédita. **Objetivos:** Avaliar a influência do tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 na angiogênese tumoral como estratégia terapêutica nas neoplasias mamárias, em um estudo *in vitro* e *in vivo*. **Material e Métodos:** No estudo *in vitro*, foi analisada a viabilidade das células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 (tumor misto benigno) e CF41 (carcinoma metastático) antes e após o tratamento com metformina e/ou LY294002 por ensaio MTT. A distribuição das células nas fases do ciclo celular foi avaliada por citometria de fluxo, a expressão proteica e gênica do VEGF e do HIF-1 α por imunohistoquímica e PCR em Tempo Real, respectivamente. Todos os experimentos foram realizados em condições normais de oxigênio e sob hipóxia pela adição de cloreto de cobalto (CoCl₂). Para o estudo *in vivo*, células da linhagem tumoral mamária canina CF41 foram implantadas em 20 camundongos fêmeas Balb/c nude atímicos. Após 28 dias de tratamento com metformina e LY294002, foi analisada a microdensidade vascular pela expressão do CD31 por imunohistoquímica, bem como a expressão proteica e gênica do VEGF e HIF-1 α no tecido tumoral. **Resultados:** O tratamento com metformina e com LY294002 foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade celular, após 24 horas. A expressão proteica e gênica do HIF-1 α e do VEGF diminuiu após o tratamento com metformina e LY294002 tanto em hipóxia quanto em condições normais de oxigênio. No estudo *in vivo*, houve diminuição do tamanho tumoral e da

expressão proteica e gênica do VEGFA e HIF-1 α , além da diminuição da expressão do CD31, após os tratamentos. **Conclusões:** Nossos resultados demonstram a efetiva ação da metformina e do inibidor LY294002 no controle do processo de angiogênese em câncer de mama, por meio dos marcadores angiogênicos VEGF e HIF-1 α .

Palavras-chave: Angiogênese, Hipóxia, HIF-1 α , LY294002, Metformina, VEGF, Neoplasias mamárias.

Abstract

Abstract

Introduction: Hypoxia is a known adverse factor to cancer treatment, able to activate the signaling pathways PI3K and AMPK/Akt/mTOR, the two major pathways involved in the angiogenesis process. This process is regulated by many factors, being the most important factors the Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Metformin has demonstrated its ability to reduce the incidence of cancer in diabetic patients with positive results especially in breast cancer, inhibiting cell growth by AMPK/Akt/mTOR signaling pathway. Likewise, LY294002 is the major inhibitor of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway that has anti-angiogenic properties, capable to reduce the release of growth factors such as VEGF. The treatment with metformin in addition to the inhibitor LY294002 in both normal oxygen and hypoxia conditions, as well as the action in the process of angiogenesis in canine mammary tumors is unprecedented. **Objectives:** To evaluate the influence of metformin and LY294002 inhibitor treatment in tumor angiogenesis as a therapeutic strategy in mammary tumors in a *in vitro* and *in vivo* study. **Material and Methods:** In the *in vitro* study, we analyzed the cell viability of canine mammary tumor cell lines CMT-U229 (benign mixed tumor) and CF41 (metastatic carcinoma) before and after treatment with metformin and/or LY294002 by MTT assay. The cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry flow, protein and gene expression of VEGF and HIF-1 α by immunohistochemistry and RT-PCR, respectively. All experiments were performed in normal oxygen conditions and under hypoxia by the addition of cobalt chloride (CoCl₂). For the *in vivo* study, CF41 cells were implanted in 20 female mice BALB / c nude nude. After 28 days of treatment with metformin and LY294002, it was analyzed micro vessel density by CD31 expression by immunohistochemistry as well as gene and protein expression of HIF-1 α and VEGF in the tumor tissue. **Results:** The treatment with metformin and LY294002 was able to reduce the cellular viability after 24 hours. The protein and gene expression of HIF-1 α and VEGF decreased after treatment with metformin and LY294002, both in normal oxygen conditions and hypoxia. In the *in vivo* study, there was a decrease in tumor size, protein and gene expression of HIF-1 α and VEGFA, in addition to the decreasing of CD31 expression after all treatments. **Conclusions:** Our results demonstrated the effective action of metformin and

LY294002 inhibitor in controlling the angiogenesis process in mammary tumors by the angiogenic factors VEGF and HIF-1 α .

Keywords: Angiogenesis, Hypoxia, HIF-1 α , LY294002, Metformin, VEGF, Mammary tumors.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. Aspectos Gerais

O câncer de mama é o mais comum em mulheres ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma, sendo responsável por cerca de 30% dos novos casos de câncer por ano.⁽¹⁾ Dados do IARC (*International Agency for Research on Cancer*) estimam 14 milhões de novos casos de câncer no mundo para este ano, com previsão de 8.2 milhões de óbito.⁽²⁾ No Brasil, segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer), foram estimados para o ano de 2016, apenas no estado de São Paulo, 69,7 casos de câncer de mama para cada 100 mil mulheres.⁽¹⁾

Dentre todos os mamíferos, a espécie canina apresenta a maior incidência de neoplasias mamárias, e quando comparada à mulher, apresenta três vezes mais chances de desenvolver essa neoplasia.⁽³⁻⁶⁾ Os tumores da glândula mamária compartilham características comuns entre cães e seres humanos. Por esta razão, neoplasias mamárias caninas são consideradas excelentes modelos para o estudo da biologia do câncer assim como para testes de agentes terapêuticos, já que esses animais de estimação têm tumores com apresentação histopatológica similares àqueles que acometem os seres humanos e compartilham uma resposta semelhante à cirurgia e à quimioterapia.⁽⁷⁻¹⁰⁾

Apesar de todas as ações para controle, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, sendo a capacidade de invasão das células tumorais e consequente desenvolvimento de metástases, responsável por cerca de 90% dos óbitos em mulheres com neoplasias mamárias e cadelas com tumores mamários caninos.⁽¹¹⁻¹³⁾

Diversos estudos têm demonstrado que o crescimento tumoral, bem como a migração das células tumorais para outros tecidos formando as metástases são mecanismos dependentes do processo de angiogênese.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

Dessa forma, cresce o interesse pelo desenvolvimento de agentes terapêuticos capazes de bloquear o processo de angiogênese com o objetivo de diminuir a progressão do tumor.⁽¹⁷⁻¹⁸⁾

2. Hipóxia

A hipóxia é caracterizada pela redução dos níveis fisiológicos de oxigênio nos tecidos e é capaz de promover a progressão tumoral a partir da ativação do processo de

angiogênese e garantir a resistência das células tumorais à radioterapia e quimioterapia. (19-20)

Cerca de 50% dos tumores sólidos em estágio avançado apresentam uma região de hipóxia, e essa característica tem sido associada ao aumento da taxa de metástase e diminuição na taxa de sobrevivência dos pacientes, resultando no pior prognóstico. (21-23)

Dois principais condições de hipóxia são conhecidas. A primeira, denominada hipóxia crônica ou difusão-limitada ocorre devido à proliferação descontrolada das células e crescimento rápido do tumor resultando em longas distâncias de difusão de oxigênio do vaso sanguíneo mais próximo, e a segunda, conhecida como hipóxia aguda, é caracterizada pela formação de uma estrutura caótica dos novos vasos sanguíneos, resultando na perfusão inadequada em parte do tecido. (19, 24-27)

A hipóxia é prejudicial tanto para as células normais quanto para as tumorais, e de acordo com sua gravidade, pode diminuir a proliferação celular, parar o ciclo celular e induzir a apoptose ou ao contrário, impedir a morte celular, ocasionando a proliferação e crescimento do tumor, contribuindo para um comportamento tumoral mais agressivo. (22)

Diferente das células normais, para manter a sobrevivência em situações de hipóxia, as células tumorais iniciam mecanismos adaptativos como a alteração do metabolismo, a produção e liberação de fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e a ativação de fatores induzidos por hipóxia (HIFs), envolvidos no processo de angiogênese. (28-32)

Dessa forma, a hipóxia desempenha importante papel na modulação da angiogênese tumoral e está relacionada com o aumento da agressividade tumoral e pior prognóstico dos pacientes. (26)

3. Angiogênese

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos, a partir de um endotélio vascular preexistente. (33-35)

Em condições fisiológicas normais, a angiogênese é responsável por fornecer nutrientes e oxigênio para os tecidos periféricos mantendo a perfusão. No entanto, quando esse processo se torna incontrolável, tal como no desenvolvimento do câncer, a

formação de novos vasos sanguíneos se torna um fator patológico, favorecendo a proliferação das células e consequente crescimento e progressão do tumor. ^(32-33, 36-40)

A formação de novos vasos sanguíneos pela angiogênese envolve um número sequencial de passos e se inicia a partir de capilares pré-existentes no tumor (Figura 1A). Primeiramente, os vasos sanguíneos dilatam e os pericitos se soltam da parede dos vasos (b). Posteriormente, fatores de crescimento pró-angiogênicos produzidos e liberados pelas células tumorais, levam à degradação da matrix extracelular pela sua capacidade de induzir a síntese de enzimas proteolíticas tais como as metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) permitindo a remodelação do citoesqueleto, aumentando a permeabilidade das células endoteliais (c). ⁽⁴¹⁻⁴³⁾ Em seguida, ocorre a proliferação e migração das células endoteliais e essa proliferação continua até a formação completa dos novos vasos (d). Ao final do processo, ocorre o envelopamento dos novos vasos com estruturas da membrana basal e o recrutamento dos pericitos levando à formação do lúmen (e). Os pericitos formam uma camada única de células musculares lisas que ficam em torno das células endoteliais, proporcionando suporte mecânico e estabilidade à parede dos vasos, regulando a função vascular (Figura 1). ^(30, 44-48)

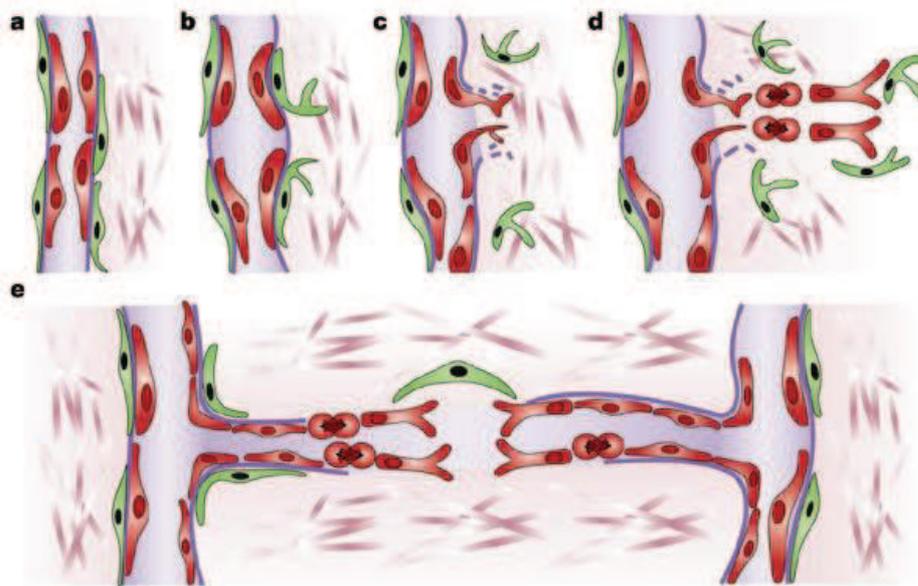


Figura 1. Representação das etapas envolvidas no processo de angiogênese. Adaptado de BERGERS E BENJAMIN, 2003. ⁽⁴²⁾

O processo de angiogênese é regulado pelo equilíbrio entre inúmeros fatores pró e antiangiogênicos. ^(32,49) Em processos patológicos como no desenvolvimento do

câncer, ocorre um desequilíbrio entre esses fatores promovendo alterações no microambiente tumoral. ⁽⁵⁰⁾ Dentre os fatores pró-angiogênicos, um dos principais fatores de crescimento específico para o endotélio vascular e mediador do processo de angiogênese é o VEGF. ^(49, 51)

4. Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF)

O VEGF é uma glicoproteína ligante à heparina que exerce efeitos múltiplos em tumores, dentre eles, formação de novos vasos sanguíneos, linfáticos e o aumento da permeabilidade vascular a partir da capacidade de estimular a mitose e migração de células endoteliais. ⁽⁵²⁻⁵³⁾

A família VEGF é composta por cinco isoformas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e o fator de crescimento placentário (PlGF). ^(38,54) Cada membro da família VEGF se liga a três receptores tirosina-quinase específicos, presentes na superfície celular, denominados VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3, exercendo diversas funções fisiológicas diferentes. ⁽¹⁴⁾ O receptor VEGFR-1 está localizado na superfície de células hematopoiéticas, macrófagos e monócitos, VEGFR-2 é encontrado no endotélio vascular e linfático e o VEGFR-3 é exclusivo do endotélio linfático. ⁽⁵⁵⁻⁵⁷⁾

O VEGF-A se liga à dois receptores específicos, o VEGFR-1 e o VEGFR-2 enquanto o VEGF-B e PlGF são reconhecidos apenas pelo receptor VEGFR-1. O VEGF-C e VEGF-D se ligam ao VEGFR-2 e também são reconhecidos pelo VEGFR-3 (Figura 2). ⁽⁵⁸⁾ O VEGF-A e o VEGF-B são os mais importantes reguladores do processo de angiogênese, enquanto o VEGF-C e VEGF-D estão especificamente envolvidos na linfoangiogênese. ^(14,54,59) Além disso, algumas isoformas ainda se ligam em outros receptores como os receptores da neurofilina (NRP), que funcionam como co-receptores dos VEGFRs. ⁽⁵⁷⁾

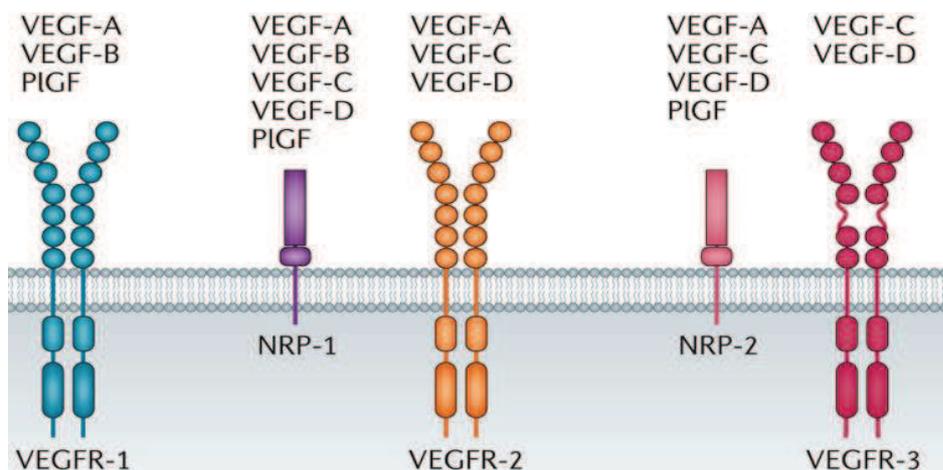


Figura 2. Esquema da ligação entre as isoformas de VEGF e seus receptores. Adaptado de LANG et al., 2016. ⁽⁵⁷⁾

O VEGF tem sido considerado o principal mediador do processo de angiogênese no câncer de mama. ⁽⁵⁶⁾ A ligação entre o VEGF-A e o VEGFR-2 está associada à proliferação das células tumorais, sendo a ativação do VEGFR-2 considerada o mais importante passo do processo de angiogênese. ⁽⁶⁰⁻⁶³⁾ O VEGF-A é produzido pelas células tumorais em situações de hipóxia e quando liberado se liga ao receptor VEGFR-2 localizado na membrana das células endoteliais, promovendo a angiogênese através da sua capacidade de estimular o crescimento, migração e invasão de células endoteliais ⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾ contribuindo para o crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases. ⁽²⁹⁾

Assim, o grau de progressão do tumor tais como o crescimento, aumento da densidade microvascular e desenvolvimento de metástases se correlacionam diretamente com o aumento da expressão do VEGF. ⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ Nesse sentido, o desenvolvimento de terapias que tem como alvo inibir o VEGF têm se mostrado eficazes em bloquear o processo de angiogênese, diminuindo o crescimento do tumor. ⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾

5. Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia

A expressão do VEGF nas células do câncer está sob o controle do fator induzível por hipóxia - 1 (HIF-1), que é um fator de transcrição induzido sob hipóxia e que nestas condições, migra desde o citoplasma para o núcleo das células, ligando-se à elementos de resposta à hipóxia (HRE), conduzindo à expressão de genes, principalmente o VEGF (Figura 3). ^(29, 54, 70-72)

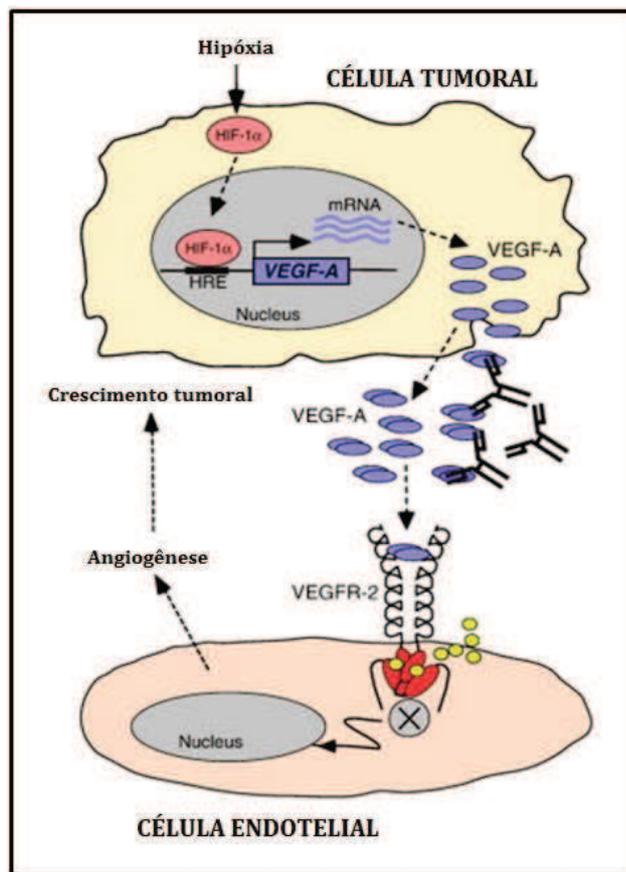


Figura 3. Processo de angiogênese, iniciado em resposta à situações de hipóxia, com ênfase na via de ativação do VEGF. Adaptado de HOLMES et al., 2007. ⁽⁷³⁾

O HIF-1 desempenha um papel importante no desenvolvimento do câncer, por ser modulador da resposta intracelular a microambientes em hipóxia, funcionando como fator de transcrição de genes, capaz de promover a angiogênese e metástase. ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾

Os efeitos da hipóxia são controlados pelo HIF-1 que por sua vez é essencial na manutenção da homeostase do oxigênio nas células, além de ser ativado em respostas adaptativas à redução nos níveis de oxigênio. ⁽⁷⁷⁻⁷⁸⁾

O HIF-1 é um fator de transcrição heterodímero composto por duas subunidades HIF-1 α e β . A subunidade HIF-1 α está predominantemente expressa em condições de hipóxia, enquanto a subunidade HIF-1 β é expressa constitutivamente. ⁽³⁰⁾

Em situações normais de oxigênio, o HIF-1 α é reconhecido pela proteína supressora tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL), ubiquitinilado e ao final sofre degradação proteossomal. No entanto, em situações de hipóxia, o pVHL se liga ao NO e o HIF-1 α não é reconhecido. Nesse caso, o HIF-1 α é ativado e induz a expressão de

genes de resposta à hipóxia, como o VEGF, que por sua vez estimula o processo de angiogênese (Figura 4).⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾

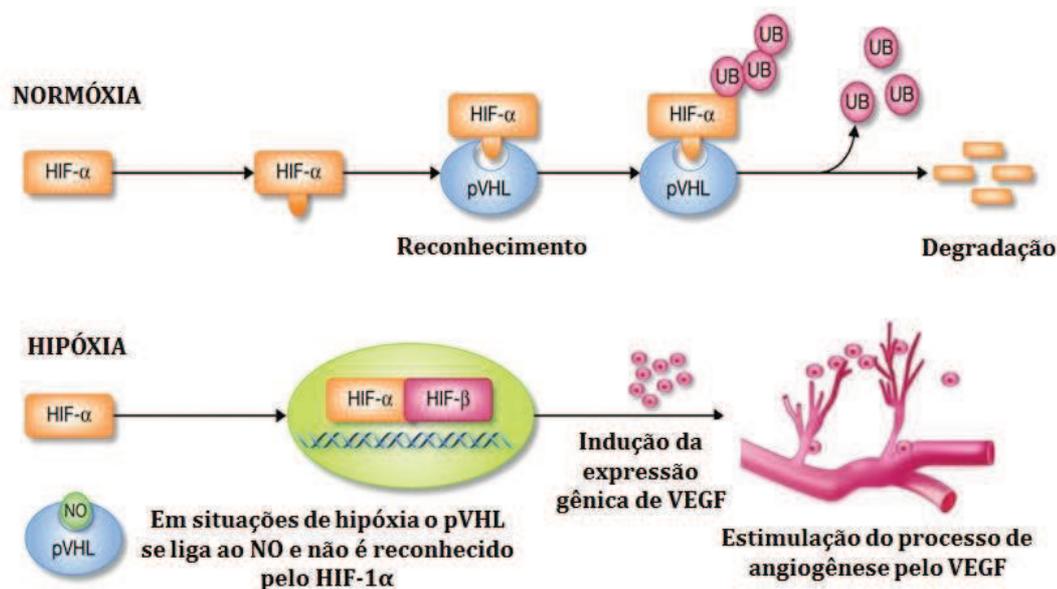


Figura 4. Ativação do HIF-1 α em situações de hipóxia e em condições normais de oxigênio (normóxia). Adaptado de RAHIMI, 2012.⁽⁵⁸⁾

Assim, a superexpressão do VEGF e/ou do HIF-1 α resulta no aumento da angiogênese associando-se com a progressão e com o aumento do potencial invasivo e metastático das células tumorais.^(22, 56, 64-65, 82-84)

6. O papel da metformina e do inibidor LY294002 no câncer

Dado o papel proeminente da angiogênese no câncer, muitas terapias buscam bloquear a angiogênese e, assim, inibir o crescimento do tumor.⁽⁸⁵⁾

As vias de sinalização PI3K e MAPK/Akt/mTOR são as principais vias envolvidas no processo de angiogênese.⁽⁸⁶⁻⁸⁷⁾ A via de sinalização MAPK/Akt/mTOR é capaz de controlar o crescimento, apoptose e migração das células tumorais.⁽⁸⁸⁾ Essa via de sinalização é ativada por qualquer estresse decorrente da privação de ATP nas células, como, por exemplo, em situações de hipóxia.⁽⁸⁹⁻⁹⁰⁾ Ainda, a via PI3K é ativada por fatores de crescimento, deficiência de nutrientes e também em situações de hipóxia.⁽⁹¹⁾

A ativação dessas vias é capaz de estimular a expressão do VEGF através do aumento da expressão do HIF-1 α e está associada com a progressão tumoral e

resistência ao tratamento, por outro lado, a inibição demonstrou ser capaz de diminuir a proliferação celular *in vitro* e o crescimento do tumor *in vivo*.^(89, 92-93)

Nesse sentido, diversas pesquisas têm como foco desenvolver estratégias de tratamento que possam intervir nas vias de sinalização PI3K-MAPK/Akt/mTOR da angiogênese mediada pelo VEGF e/ou HIF-1 α , na tentativa de inibir a progressão tumoral.⁽⁹⁴⁻⁹⁸⁾

A metformina é um derivado de biguanidas (N', N'dimetilbiguanida), utilizado por via oral para o tratamento de pacientes com diabetes tipo 2 e síndrome metabólica⁽⁹⁹⁻¹⁰¹⁾ capaz de reduzir a gliconeogênese hepática, em parte através da potencialização da ação da insulina e mediante a ativação da MAPK.⁽¹⁰²⁻¹⁰⁴⁾

Existem evidências crescentes de que a utilização da metformina no tratamento da diabetes é capaz também de reduzir significativamente a incidência de neoplasias e a taxa de mortalidade por câncer de pacientes com diabetes, desempenhado um papel importante na prevenção de vários tipos de neoplasias, incluindo o câncer de mama.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾

Diversos estudos têm demonstrado que o tratamento com metformina, um potente ativador da via de sinalização MAPK/Akt/mTOR é capaz de inibir o crescimento celular.^(89-90, 109-110) No entanto, os mecanismos de ação da metformina nessa via não estão completamente esclarecidos^(86,105), o que tem despertado especial atenção nas pesquisas.⁽¹¹¹⁾

O LY294002 é um importante inibidor da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR, que possui propriedades anti-angiogênicas, capaz de bloquear a ativação da via de sinalização PI3K/Akt/mTOR em situações de hipóxia agindo na diminuição da liberação de fatores de crescimento como o VEGF, diminuindo o crescimento tumoral *in vivo* em linhagens celulares de carcinoma de cólon, pulmão e melanoma.⁽⁹³⁾ Além disso, o uso do inibidor LY294002 diminuiu a expressão do HIF-1 α e os níveis de RNAm de *VEGF* transcritos na linhagem celular de câncer de mama MCF-7.⁽⁹¹⁾

No entanto, pouco se sabe quanto à influência do tratamento com metformina em combinação com o inibidor LY294002 na angiogênese tumoral mediada pelo HIF-1 α e/ou VEGF.⁽¹¹²⁻¹¹⁵⁾

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo geral foi avaliar a influência do tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 na angiogênese tumoral

mediada pelas vias de sinalização PI3K-MAPK/Akt/mTOR. Desse modo, os objetivos específicos foram:

- Estudo *in vitro*: Verificar a viabilidade celular, distribuição das células nas fases do ciclo celular, bem como a expressão gênica e proteica do HIF-1 α e VEGF em linhagens tumorais mamárias caninas após a indução da hipóxia e tratamento com metformina e com o inibidor LY294002;
- Estudo *in vivo*: Verificar a expressão gênica e proteica do HIF-1 α e VEGF no tecido tumoral induzido pela implantação das células de linhagem de câncer de mama canina em camundongos BALB/c nude atímicos após o tratamento com metformina e com o inibidor LY294002. Após o desenvolvimento tumoral, verificar o tamanho e volume do tumor e determinar a angiogênese através da imunomarcção do marcador de células endoteliais CD31.

Material e Métodos

II. MATERIAL E MÉTODOS

Considerações éticas

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP (Protocolo nº 001-003244/2013) (Anexo A) e foi realizado seguindo os padrões nacionais e internacionais de experimentação em animais.

Estudo *in vitro*

1. Cultivo celular

Células procedentes das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 (Tumor misto benigno) e CF41 (Carcinoma metastático) foram cultivadas em incubadora a 37 °C e 5 % de CO₂, em meio de cultura específico para cada linhagem, HAM-F12 suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS) e 1 % de antimicótico e antibiótico e DMEM com alta concentração de glicose suplementado com 10 % de FBS, 2 mM de L-glutamina e 1 % de antimicótico, antibiótico e anfotericina, respectivamente.

Quando apresentaram 80-100 % de confluência, as células foram tripsinizadas e contadas em câmara de *Neubauer* com solução de azul de tripan a 4 % para verificar o número de células viáveis, e então transferidas para os frascos de cultivo específicos para a realização do tratamento com metformina e LY294002 e posterior avaliação da viabilidade celular, do ciclo celular e análise da expressão proteica e gênica.

1.1 Contagem e plaqueamento das células

No estudo *in vitro*, antes de iniciar a indução da hipóxia com cloreto de cobalto (CoCl₂) e o tratamento com metformina e LY294002 para o desenvolvimento de todas as técnicas, realizou-se a tripsinização, contagem e transferência das células para placas de cultivo específicas. A contagem foi realizada nos quatro quadrantes laterais externos na câmara de *Neubauer*, e o resultado colocado na fórmula abaixo:

$$X = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células contadas em cada quadrante} \times 10^4 \times \text{Fator de diluição}}{\text{Total de quadrantes contados}}$$

A quantidade de células a ser colocada nos frascos de cultivo específicos para cada procedimento foi calculada de acordo com a área de cultivo. Para todos os procedimentos, o tratamento das células foi iniciado 24 horas após o plaqueamento. Além disso, todos os experimentos foram realizados em triplicata para garantir a credibilidade dos resultados.

1.2. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada por meio do ensaio colorimétrico MTT (3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromídeo) de acordo com Borin et al., 2015⁽¹¹⁶⁾, para avaliar a resposta celular às diferentes concentrações de metformina e LY294002. Primeiramente, células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 ($0,05 \times 10^6$ células/poço) foram divididas em placas de cultura de 96 poços contendo 100 μ l de meio de cultura específico suplementado com 2 % FBS. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de metformina (1 mM, 2 mM, 5 mM, 6 mM e 10 mM) (Sigma-Aldrich) e LY294002 (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 8 μ M e 10 μ M) (Cell Signaling - GIBCO), criando uma curva dose-resposta para a determinação da concentração capaz de inibir o crescimento celular em 50 % (IC_{50}), a partir da equação de regressão linear.⁽¹¹⁷⁾ A metformina foi diluída em PBS na concentração inicial de 10 mM e 20 mM e o LY294002 em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração inicial de 100 μ M, e então diluídos nas cinco diferentes concentrações. Todos os tratamentos foram realizados em triplicata, com duração de 24 horas. Em seguida, o meio de cultura contendo o tratamento foi descartado e adicionou-se 100 μ L de meio de cultura sem tratamento em cada poço. Posteriormente, foram adicionados a cada poço 10 μ L de solução MTT do *Vibrant MTT Cell Proliferation Assay Kit* (Invitrogen Life Technologies) e a placa foi incubada por 4 horas a 37 °C. Em seguida, para solubilização dos cristais de formazan, as células foram incubadas com 100 μ L de solução de SDS-HCl (0,01M)¹ por 12 horas. Ao final, foi realizada leitura em absorbância no leitor de ELISA sob comprimento de onda 570 nm. A viabilidade celular relativa (%) para cada grupo de tratamento foi calculada a partir da média dos valores de absorbância das triplicatas, em relação ao grupo controle (sem tratamento), estabelecido como 100%.

¹ Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

1.3. Grupos de tratamento

Após o ensaio MTT, para a realização dos procedimentos de citometria de fluxo, imunocitoquímica e biologia molecular foram estabelecidos oito grupos de tratamento: grupo I (controle) contendo células com meio de cultura sem tratamento; grupo II contendo tratamento com 5 mM de metformina; grupo III contendo 5 μ M de LY294002 e grupo IV contendo células tratadas com 5 mM de metformina em combinação com 5 μ M de LY294002 em condições normais de oxigênio. Os mesmos grupos de tratamento foram testados em condição de hipóxia, após a adição de 100 μ M de CoCl_2 no meio de cultura, sendo o grupo V contendo células sob hipóxia pela adição de CoCl_2 no meio de cultura; grupo VI contendo células tratadas com 5 mM de metformina e CoCl_2 ; grupo VII contendo 5 μ M de LY294002 e CoCl_2 e grupo VIII contendo células tratadas com 5 mM de metformina em combinação com 5 μ M de LY294002 sob hipóxia.

1.4. Citometria de fluxo

A ação da metformina na proliferação celular está relacionada com a sua capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G₀, assim, para a análise do ciclo celular foi realizada a técnica de citometria de fluxo de acordo com Li et al., 2012 ⁽¹¹³⁾. Inicialmente, $0,5 \times 10^6$ células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 foram transferidas para cada poço das placas de cultura de seis poços e mantidas em incubadora a 37 °C e 5 % de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas por 24 horas com metformina e LY294002 em condições normais de oxigênio e sob hipóxia, conforme os grupos de tratamento descritos no item 1.3. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, lavadas com 2 mL de PBS 1x gelado e fixadas com 1 mL de etanol 70 % gelado e mantidas a 4 °C *overnight*. Antes da análise, as células foram centrifugadas a 4.000G por 5 minutos a 4 °C, lavadas com 1 mL de PBS 1x gelado. Ao final, as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS contendo 50 μ g/mL de RNase A e 50 μ g/mL de iodeto de propídeo (PI) e incubadas a 37 °C por 30 minutos. A fase do ciclo celular foi obtida a partir da leitura no aparelho Guava easyCyte e análise no *software* Guava Cell Cycle (Millipore®) do Laboratório de Imunomorfologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP/IBILCE.

1.5. Imunocitoquímica

Para analisar a expressão proteica dos fatores angiogênicos VEGF e HIF-1 α , 6 x 10⁴ células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 foram transferidas para cada poço de uma lâmina contendo separadores de silicone previamente autoclavados e mantidas em placas de Petri em incubadora a 37 °C e 5 % de CO₂. Em seguida, as células foram tratadas conforme os grupos previamente descritos no item 1.3. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e fixadas com 250 μ L de paraformaldeído a 4 % por 24 horas.

Para o desenvolvimento da técnica de imunocitoquímica, foi utilizado o kit REVEAL Sistema de Detecção livre de Biotina (Biogen®). Inicialmente, as lâminas foram lavadas com água destilada por 5 minutos e mantidas por 35 minutos em panela a vapor a 96 °C com tampão citrato (pH 6,0)² para recuperação antigênica. Após a estabilização em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS³ (1x 5min), e incubadas com solução de 0,1% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 15 minutos. Após lavagem com PBS (3x 5min), adicionou-se a solução de bloqueio de proteína por 10 minutos, ao final, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários anti-HIF-1 α e anti-VEGF (Quadro 1) diluídos em albumina 5 % (BSA)⁴, a 4°C, *overnight*. Na sequência, as lâminas foram lavadas em tampão PBS (3x 5min) e incubadas com anticorpo secundário (anti-mouse e -rabbit) por 10 minutos, seguido da incubação com o conjugado HRP por 15 minutos. A revelação foi realizada com substrato cromogênico DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride) e a contra-coloração com Hematoxilina por 40 segundos. A montagem das lâminas foi realizada em glicerol 50%.

Todas as baterias de lâminas foram acompanhadas de um controle positivo para o anticorpo testado e um controle negativo (sem anticorpo primário).

Quadro 1. Quadro mostrando informações adicionais dos anticorpos primários.

Anticorpo	Especificidade	Clone	Diluição	Marca
VEGF	Policlonal (rabbit)	A20	1:500	Santa Cruz
HIF-1 alfa	Monoclonal (mouse)	H1 α 67	1:50	Santa Cruz

^{2,3,4} Os protocolos de preparo das soluções estão descritos no Apêndice A.

1.5.1. Quantificação imunocitoquímica

A expressão proteica do VEGF e do HIF-1 α foi quantificada pela técnica de densitometria óptica no analisador de imagens *software* ImageJ. As lâminas foram analisadas ao microscópio Nikon Eclipse E200 e cinco diferentes áreas imunorreativas foram fotografadas em objetiva de 40X. Em cada região fotografada foram marcados aleatoriamente 20 pontos, totalizando 100 pontos referentes à média de intensidade de imunomarcação para cada grupo de tratamento. Os valores foram obtidos como unidades arbitrárias (u.a.) e representados por densidade óptica média (D.O.M.).

1.6. Técnica de PCR quantitativo (qPCR): Análise da expressão gênica

Para o desenvolvimento da técnica de PCR em Tempo Real, $1,0 \times 10^6$ células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 foram transferidas para garrafas de cultura T25 (25 cm²), em duplicata, e tratadas conforme os grupos previamente descritos no item 1.3. Após o período de tratamento, foi realizada a extração de RNA total, de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies). Todos os procedimentos de PCR em Tempo Real foram realizados de acordo com MOSCHETTA et al., 2015⁽¹¹⁸⁾.

1.6.1. Extração de RNA total

Inicialmente, o meio de cultura foi desprezado das garrafas de cultura e acrescentados 2 mL de Trizol. Foram distribuídos 1 mL em cada tubo tipo eppendorf deixando descansar por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio para cada 1 mL de Trizol, homogeneizando por inversão e mantendo a temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 14.000 rcf por 20 minutos a 4 °C, resultando em uma fase vermelha inferior – fase fenol-clorofórmio – uma interfase, e uma fase aquosa superior, na qual o RNA se concentra. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 400 μ L de álcool isopropílico para precipitação do RNA, seguido de incubação a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, centrifugou-se a 14.000 rcf por 20 minutos à 4 °C formando um pellet de RNA, que foi lavado com 1 mL de etanol 75 % gelado e centrifugado novamente a 7.500 rcf por 7 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram deixados sobre papel absorvente até secar o *pellet*. Após esta etapa,

adicionou-se 30 μL de água DEPC (dietilpirocarbonato) (Invitrogen®) para diluir o *pellet* de RNA. A integridade e qualidade do RNA extraído, bem como a concentração foram analisadas no aparelho NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific®) em absorvância de 260nm e 280nm. Ao final, as soluções de RNA foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. O RNA total foi então utilizado para síntese de DNA complementar (cDNA) com a enzima transcriptase reversa.

1.6.2. Obtenção do cDNA

A obtenção do cDNA (DNA complementar), foi realizada pela técnica de RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*), seguindo as especificações dos fabricantes do Kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems®).

Para cada amostra foi preparado um mix com volume final de 20 μL e concentração final de 100 ng de RNA, contendo 0,8 μL de dNTP, 2 μL de Random Primer, 2 μL de Buffer, 1 μL da enzima Multicribe Reverse Transcriptase, 4,2 μL de água DEPC e 10 μL de amostra de RNA na concentração de 2 μg . Em seguida, a solução final foi colocada no termociclador, a reação apresentou uma etapa inicial de 25 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos, 37 $^{\circ}\text{C}$ por 120 minutos e foi finalizada a 85 $^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos. Por fim, as amostras foram armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1.6.3. Análise da expressão gênica

A reação de qPCR foi realizada pelo sistema StepOne Plus Real Time PCR (Applied Biosystems®) e TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems®). Inicialmente, para escolher apropriadamente os controles endógenos da reação foram testados quatro genes candidatos à normalizadores da reação: *RPS19* (*Ribosomal Protein S19*), *RPL8* (*Ribosomal Protein L8*), *HPRT* (*Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase*) e *RPS5* (*Ribosomal Protein S5*). A seleção dos genes endógenos foi feita com auxílio do software DataAssist v3.0 (Applied Biosystems®).

As sequências dos *primers* e *probe* dos genes *RPS19* e *RPS5* utilizados como controles endógenos foram desenhadas com auxílio do software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems®) considerando o tamanho do produto esperado (aproximadamente 80pb a 140pb), o conteúdo em dinucleotídeos GC (~60%), a temperatura de anelamento dos *primers* ($T_m^{\circ} = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) e da *probe* ($T_m^{\circ} = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a

ausência de homologia com seqüências repetitivas no genoma. O Quadro 2 mostra as seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes *RPS19* e *RPS5*.

Quadro 2. Sequência dos oligonucleotídeos dos genes *RPS19* e *RPS5* utilizados na técnica de PCR quantitativo para avaliar a expressão gênica relativa.

Gene	Sequência
RPS19	Sense 5' - GCC TTC CTC AAA AAG TCT GGG - 3'
	Antisense 5' - GTT CTC ATC GTA GGG AGC AAG C - 3'
	Probe 5' - 6FAM-CCC TGA ATG GGT GGA C-MGB - 3'
RPS5	Sense 5' - TCA CTG GTG AGA ACC CCC TG - 3'
	Antisense 5' - GCC TGA TTC ACA CGG CGT A - 3'
	Probe 5' - 6FAM-AAC AGT GGT CCC CGG GA-MGB - 3'

Após as etapas de padronização, foram realizadas as análises para verificar a expressão diferencial dos genes *HIF1A* e *VEGFA* e os ensaios utilizados foram: *HIF1A* (Cf02741632_m1) e *VEGFA* (Cf02623449_m1). As amostras foram testadas em triplicata e, em todos os experimentos houve controle negativo e o grupo controle (células sem tratamento) foi escolhido para calibração da reação.

O mix de cada gene foi preparado adicionando-se 10 µL de TaqMan Universal Master Mix, 1 µL de TaqMan Gene Expression e 8 µL de água DEPC. Em seguida, 19 µL da solução final foram transferidos para cada poço de uma placa de 96 poços de poliestireno e adicionou-se 1 µL da amostra de cDNA (100 ng) nos respectivos poços, homogeneizando a solução. A placa foi coberta com um adesivo próprio e centrifugada a 3.700 rpm por 1 minuto à 25 °C. As condições do qPCR compreenderam uma etapa inicial de 2 minutos a 50°C, desnaturação de 10 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por um minuto para anelamento dos iniciadores e extensão das cadeias e 35 segundos a 65 °C para coleta do sinal. A curva de dissociação foi gerada após amplificação e compreendeu um passo de 15 segundos a 95 °C seguido de 1 minuto a 60 °C.

1.6.4. Análise da expressão dos genes

O valor da expressão relativa dos genes de interesse foi determinado com auxílio do software DataAssist v3.0, pelo método de quantificação em relação à média dos genes normalizadores utilizados como controle endógeno ($\Delta\Delta Ct$)⁽¹¹⁹⁾. Os resultados foram apresentados em escala logarítmica de base 10 (Log_{10}).

Estudo *in vivo*

2. Implantação tumoral

Para o desenvolvimento do estudo *in vivo*, 20 camundongos fêmeas Balb/c nude atímicos com idade de 7 a 8 semanas e 16 g a 20 g de peso corporal foram adquiridos no biotério do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP. Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP em condições livres de patógenos, a temperatura ambiente (21 a 25 °C), expostos a luz por 12 horas e 12 horas no escuro com ração e água oferecidas *ad libitum*.

Antes da indução tumoral, os camundongos foram separados aleatoriamente em quatro grupos de tratamento diferentes, contendo cinco animais por grupo: grupo I (controle) sem tratamento; grupo II composto por animais tratados com metformina; grupo III composto por animais tratados com inibidor LY294002 e grupo IV composto por animais tratados com metformina e LY294002 em combinação.

Para indução tumoral, células da linhagem tumoral mamária canina CF41 cultivadas *in vitro* foram tripsinizadas, centrifugadas, lavadas duas vezes com 2 mL de PBS 1x, contadas em câmara de *Neubauer* e ressuspensas em meio de cultura RPMI sem soro (Cultilab). O volume final de 0,1 mL contendo 3×10^6 células foi implantado na mama inguinal direita de cada animal.

2.1. Grupos de tratamento

Uma semana após a implantação tumoral foram iniciados os tratamentos com metformina, de acordo com Rattan et al., 2011⁽¹²⁰⁾. O tratamento com o inibidor LY294002 foi iniciado duas semanas antes da eutanásia, de acordo com Zhao et al., 2011⁽⁹³⁾. O tratamento com metformina foi realizado intraperitonealmente durante 28 dias, na dose de 200 mg/kg, diluído com PBS em 100 μL /animal. O inibidor LY294002

foi diluído em DMSO (5 %) / PBS (95 %) e aplicado intratumoral a cada três dias, repetido três vezes no total, na dose de 7,5 mg/kg, em 50 µL/animal. A taxa de glicose, peso e tamanho tumoral foram avaliados semanalmente. Os animais foram acompanhados por cinco semanas e após esse período foi coletado o sangue para análise da toxicidade dos tratamentos, seguido da eutanásia e coleta do tecido tumoral para avaliação imunohistoquímica, análise da expressão gênica e determinação da microdensidade vascular (MVD).

2.2. Peso corporal e glicose sanguínea

Como indicador do estado de saúde dos animais, o peso corporal e o nível de glicose foram verificados semanalmente, bem como o *status* de saúde dos animais. Para a análise da glicemia, uma hora após a administração dos tratamentos, os animais foram mantidos em luz infravermelha e após a dilatação dos vasos periféricos, foram restringidos em contensor próprio. Em seguida, uma gota de sangue foi coletada utilizando-se uma agulha 26 gauge (G) para venopunção da veia lateral da cauda dos animais. Os níveis de glicose foram detectados utilizando-se o aparelho de glicemia capilar portátil padrão Breeze 2 (Bayer®), com tiras reagentes individuais de rápida determinação, indicando valores em miligramas por decilitros (mg/dL). Ao final da venopunção uma pequena compressão foi realizada no local para conter o sangramento.

2.3. Tamanho tumoral

O tamanho tumoral foi verificado ao longo das 4 semanas de tratamento, após a implantação das células. O diâmetro longitudinal (comprimento) e o diâmetro transversal (largura) foram determinados com auxílio de uma régua. O volume tumoral foi calculado com base nas medidas adquiridas, de acordo com Chiavarina et al., 2011⁽¹²¹⁾ pela fórmula: $\text{Volume tumoral} = (\text{comprimento} \times \text{largura}^2)/2$.

2.4. Ensaio de toxicidade

Para análise da toxicidade dos tratamentos administrados, uma amostra de sangue foi coletada por punção cardíaca utilizando-se uma agulha 26 gauge (G), em tubos contendo heparina. Este procedimento foi realizado enquanto os animais estavam sob anestesia profunda, imediatamente antes da eutanásia. Em seguida, o sangue foi

centrifugado e o plasma foi armazenado em freezer - 80°C para posterior análise da função hepática (aspartato aminotransferase [AST] e alanina aminotransferase [ALT]) e função renal (creatinina e ureia). Todas as análises foram realizadas no Laboratório Central do Hospital de Base de São José do Rio Preto – HB.

2.5. Eutanásia

Os animais foram eutanasiados com 0,250 mL de xilazina e 0,250 mL cetamina e perfundidos com 50 mL de PBS e formaldeído a 10 %. O fragmento tumoral foi dividido em duas partes, sendo (1) fixada por 48 horas em solução de formol a 10 % para inclusão em parafina para posterior realização da técnica de imunohistoquímica; e (2) armazenada em solução estabilizadora de RNA, RNAlater (Life Technologies), para posterior extração de RNA e realização dos procedimentos de biologia molecular.

2.6. Inclusão em parafina

O fragmento tumoral armazenado em tubo de polipropileno de 15 ml contendo formol 10 % foi incluído em parafina para posterior corte em micrótomo e execução da técnica de imunohistoquímica para os fatores angiogênicos VEGF e HIF-1 α e para o marcador de células endoteliais CD31. O preparo do tecido tumoral seguiu as etapas de Fixação: O fragmento tumoral foi colocado no formol 10 % por 48 horas e em seguida acondicionado em álcool 70 %. Inclusão: O material foi colocado no cassete seguindo as etapas de (1) Desidratação: O tecido foi embebido em etanol com aumento progressivo da concentração (70 %, 80 % e 95 %) por 1 hora cada, em seguida, submetido a dois banhos de etanol absoluto por uma hora cada (Álcool absoluto I e II); (2) Diafanização: O tecido passou por dois banhos de Xilol por 1 hora cada (Xilol I e II); (3) Impregnação: O tecido foi mergulhado duas vezes em parafina a 60 °C por 90 minutos cada, e finalmente incluído em parafina contendo cera de abelha (9:1). Ao final, o material emblocado foi submetido à microtomia, em espessura de 3 μ m. Os cortes histológicos permaneceram em lâmina previamente sinalizada e identificada, deixados na estufa a 60 °C por 24 horas.

2.7. Imunohistoquímica

Para o desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica, os cortes histológicos dos fragmentos tumorais emblocados em parafina foram desparafinizados em xilol e rehidratados em álcool em grau decrescente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com água destilada (1 x 5 min) e mantidas por 35 minutos em panela a vapor a 96 °C com tampão citrato (pH 6,0) para recuperação antigênica. Assim como no estudo *in vitro*, para o desenvolvimento da técnica de imunohistoquímica, foi utilizado o kit REVEAL Sistema de Detecção livre de Biotina (Biogen®) conforme protocolo descrito no item 1.5. Além dos anticorpos primários VEGF (Santa Cruz Biotechnology) e HIF-1 α (Santa Cruz Biotechnology), para os tecidos tumorais, também foi analisada a marcação imunohistoquímica do CD31 (Quadro 3), um marcador de célula endotelial para determinar a microdensidade vascular (MVD).

Quadro 3. Quadro mostrando informações adicionais dos anticorpos primários.

Anticorpo	Especificidade	Clone	Diluição	Marca
CD31	Monoclonal (mouse)	JC70A	1:100	Dako

2.8. Técnica de PCR quantitativa

2.8.1. Extração de RNA Total

O RNA total foi extraído dos 20 fragmentos tumorais seguindo o protocolo que acompanha o reagente Trizol (Invitrogen®). Os tecidos tumorais armazenados em tubos falcon de polipropileno de 15 mL contendo solução estabilizadora de RNA – RNAlater foram cortados manualmente com o auxílio de uma navalha no tamanho de 100 mg e inseridos em tubo falcon de polipropileno de 50 mL já contendo 1 mL do reagente Trizol. Os fragmentos foram triturados com auxílio do macerador (Politron®) e mais 1 mL de Trizol foi adicionado ao tubo, resultando em 2 mL do reagente Trizol para cada 100 mg de fragmento tumoral triturado, sendo dividido em 2 tubos eppendorfs de polipropileno (1 mL em cada tubo). Os passos seguintes da técnica, desde a extração de RNA das amostras até a análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real, foram detalhados previamente no estudo *in vitro* no item 1.6.

3. Análise Estatística

Os dados foram submetidos previamente à análise descritiva para determinação da normalidade. Para amostras com distribuição normal, os diferentes grupos de tratamento foram comparados pela Análise de Variância (*ANOVA*) seguido do teste de *Bonferroni* e para aquelas com distribuição não normal utilizou-se o teste de *Kruskal-Wallis*. Todos os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão (S.E.M.). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software *GraphPad Prism5*.

Resultados

III. RESULTADOS

1. Estudo *in vitro*

1.1. Análise da viabilidade celular pelo ensaio MTT (3{4,5- dimetiliazol-2-il}-2,5difeniltetrazolium bromídeo)

As células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular após o tratamento com metformina e com o inibidor LY294002. Após o período de tratamento com metformina, a viabilidade das células da linhagem CMT-U229 diminuiu conforme o aumento da concentração das doses de tratamento (1 mM a 10mM), mostrando diferença estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle (sem tratamento) ($p < 0,05$; Figura 5A). Do mesmo modo, para o tratamento com o inibidor LY294002, todas as concentrações testadas reduziram significativamente a viabilidade celular comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 5B). Todas as porcentagens da viabilidade celular referentes às concentrações de tratamento utilizadas para as células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 estão demonstradas no Quadro 4.

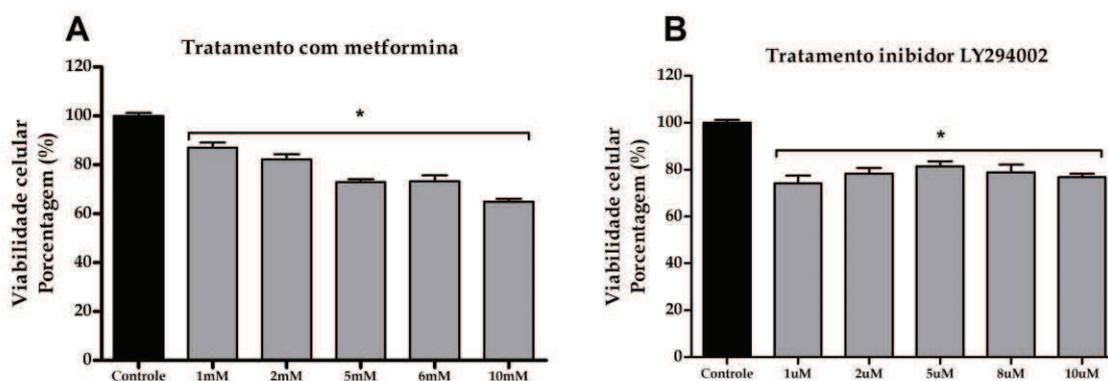


Figura 5. Avaliação da viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 por ensaio MTT. **(A)** Viabilidade celular após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de metformina e **(B)** após tratamento com o inibidor LY294002. Cada coluna corresponde à média \pm erro padrão da porcentagem calculada para a viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%). Valor de p significativo para o teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. * = $p < 0,05$ comparação entre as diferentes concentrações de tratamento e o grupo controle).

Quadro 4. Valores referentes à viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 após o tratamento com diferentes concentrações de metformina e LY294002 por 24 horas.

Grupos	Média da absorbância	Viabilidade celular relativa (%)	Erro padrão
Controle	1,279 / 1,283	100	1,215 / 1,211
1 mM de metformina	1,113	87,01	2,070
2 mM de metformina	1,051	82,18	2,161
5 mM de metformina	0,932	72,89	1,205
6 mM de metformina	0,935	73,23	2,481
10 mM de metformina	0,830	64,92	1,092
1 μ M LY294002	0,951	74,17	3,243
2 μ M LY294002	1,004	78,30	2,442
5 μ M LY294002	1,043	81,30	2,121
8 μ M LY294002	1,010	78,76	3,334
10 μ M LY294002	0,985	76,81	1,371

Para avaliar a eficácia das drogas em inibir a proliferação celular, utilizamos o cálculo do IC₅₀. Para a linhagem CMT-U229, o valor de IC₅₀ para o tratamento com metformina foi 5mM ($R^2 = 0,938$; Figura 6A) e para o inibidor LY294002 foi 5 μ M ($R^2 = 0,322$; Figura 6B).

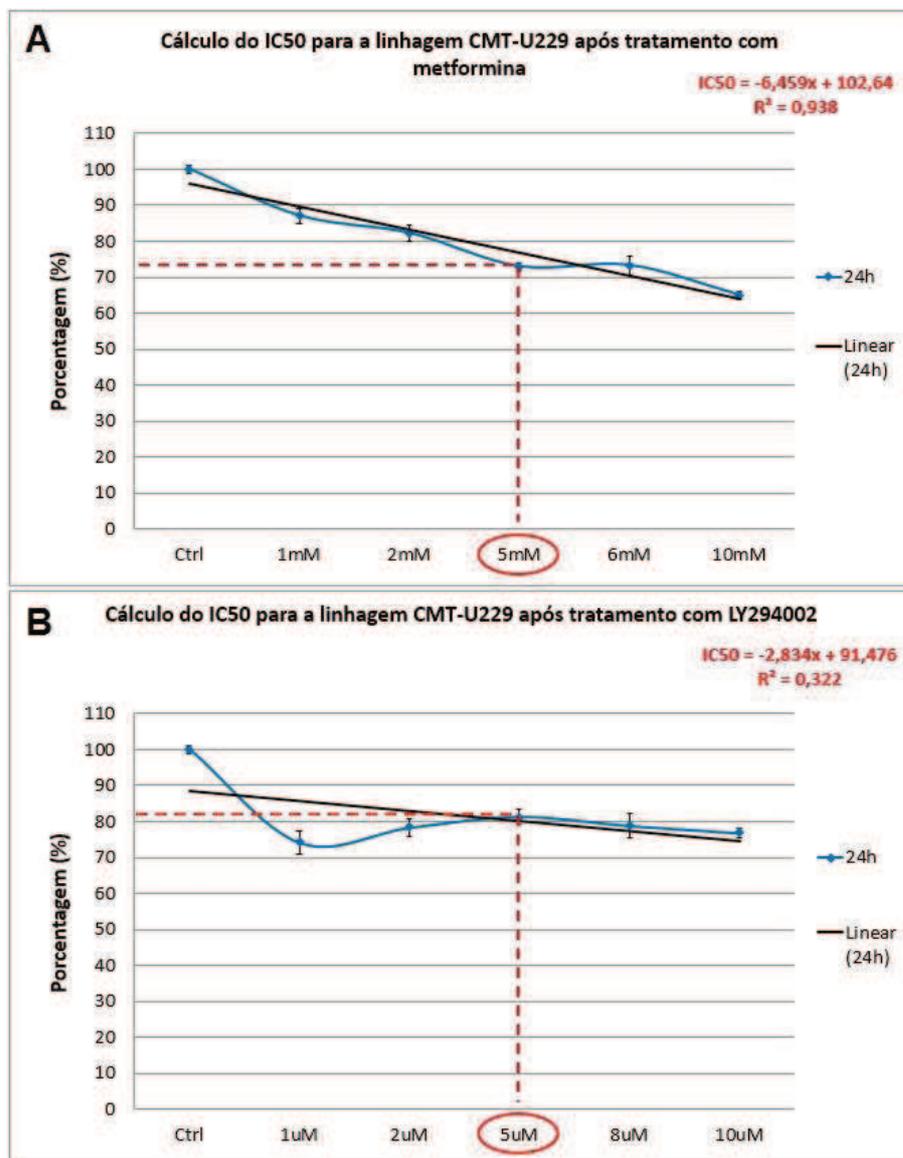


Figura 6. Cálculo do IC50 para as células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 após análise da viabilidade celular por ensaio MTT. **(A)** Cálculo do IC50 após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de metformina e **(B)** cálculo do IC50 após tratamento com o inibidor LY294002. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão da porcentagem calculada para a viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%).

Para as células da linhagem tumoral mamária canina CF41 apenas as concentrações de 5 mM, 6 mM e 10 mM de metformina diminuíram significativamente a viabilidade celular, após 24 horas de tratamento, comparadas ao grupo controle (sem tratamento) ($p < 0,05$; Figura 7A). Da mesma forma, quase todas as concentrações testadas para o inibidor LY294002 foram eficazes em diminuir a viabilidade celular comparadas ao grupo controle, após 24 horas de tratamento ($p < 0,05$; Figura 7B). As concentrações de 8 μ M e 10 μ M de tratamento do LY29402 diminuíram em mais de

50% a viabilidade celular, sendo consideradas tóxicas para as células. Além disso, as células da linhagem tumoral mamária canina CF41 demonstraram ser mais sensíveis ao tratamento com o inibidor LY294002. Todas as porcentagens da viabilidade celular referentes às concentrações de tratamento utilizadas para as células da linhagem tumoral mamária canina CF41 estão demonstradas no Quadro 5.

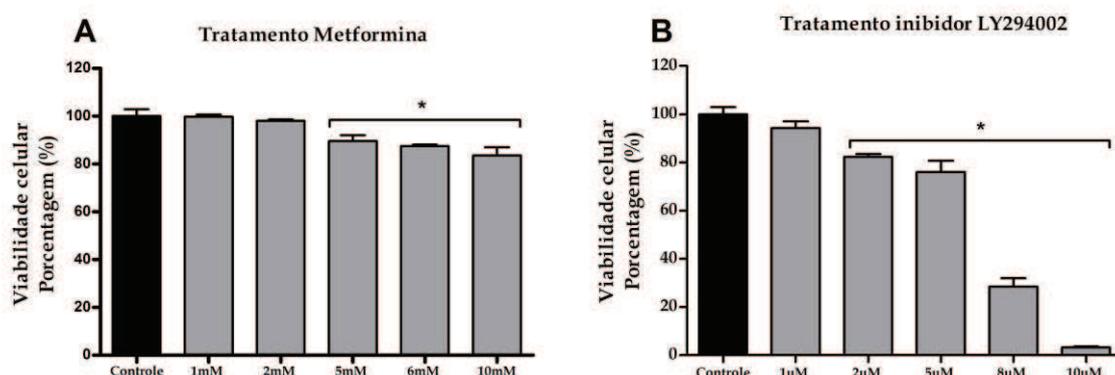


Figura 7. Avaliação da viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CF41 por ensaio MTT. (A) Viabilidade celular após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de metformina e (B) após tratamento com o inibidor LY294002. Cada coluna corresponde à média \pm erro padrão das triplicatas. Valor de p significativo para o teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. * = $p < 0,05$ comparação entre as diferentes concentrações de tratamento e o grupo controle).

Quadro 5. Valores referentes à viabilidade das células da linhagem tumoral mamária canina CF41 após o tratamento com diferentes concentrações de metformina e LY294002 por 24 horas.

Grupos	Média da absorbância	Viabilidade celular relativa (%)	Erro padrão
Controle	2,359 / 1,784	100	2,783 / 2,948
1 mM de metformina	2,353	99,73	0,862
2 mM de metformina	2,312	98,00	0,641
5 mM de metformina	2,113	89,59	2,465
6 mM de metformina	2,063	87,43	0,631
10 mM de metformina	1,972	83,58	3,378
1 μ M LY294002	1,682	94,30	2,802
2 μ M LY294002	1,468	82,27	1,169
5 μ M LY294002	1,355	75,97	4,723
8 μ M LY294002	0,509	28,52	3,412
10 μ M LY294002	0,058	3,22	0,465

O valor de IC50 para o tratamento com metformina foi 5mM ($R^2 = 0,925$; Figura 8A) e para o inibidor LY294002 foi 5 μ M ($R^2 = 0,883$; Figura 8B). Portanto, baseado nos resultados do ensaio MTT, foram selecionadas as concentrações de 5mM de metformina e 5 μ M de inibidor LY294002 para o tratamento das células das linhagens tumorais mamárias caninas e realização dos experimentos seguintes.

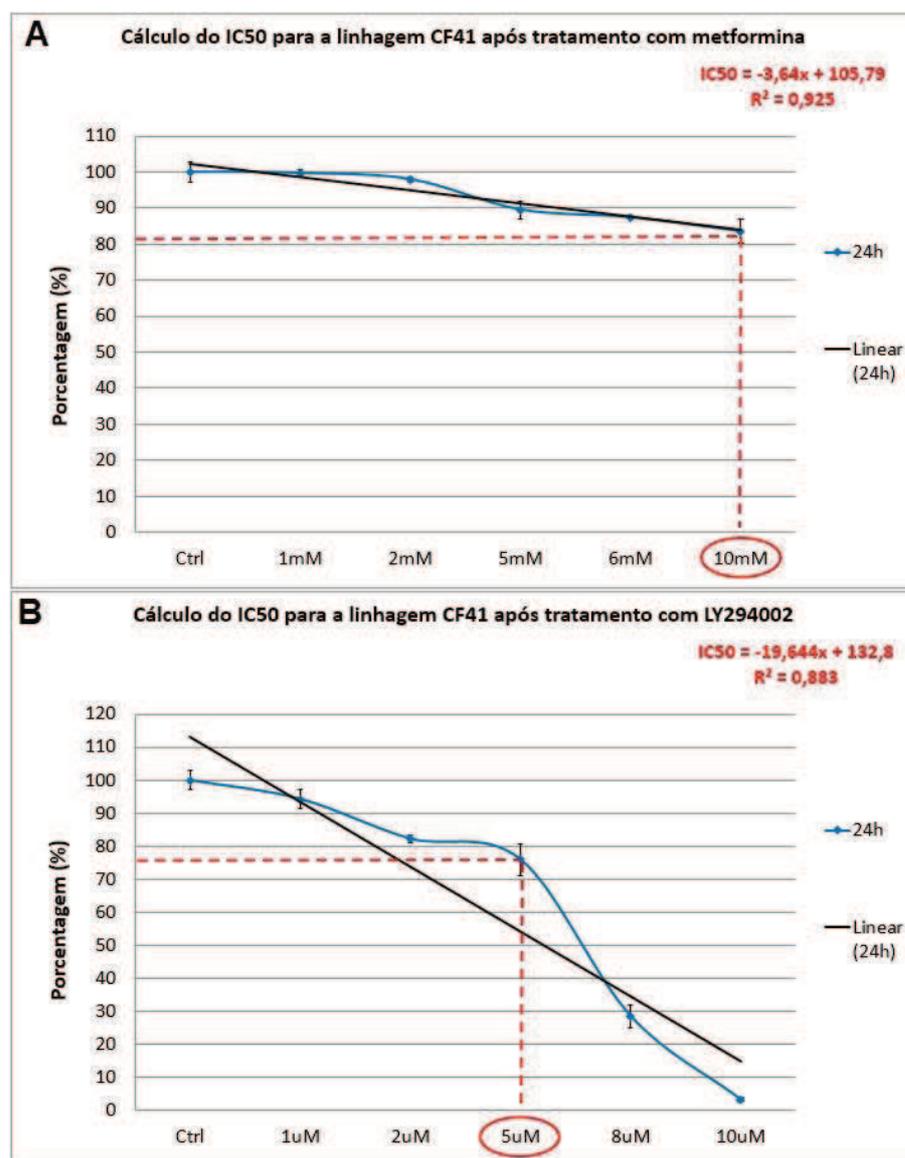


Figura 8. Cálculo do IC50 para as células da linhagem tumoral mamária canina CF41 após análise da viabilidade celular por ensaio MTT. **(A)** Cálculo do IC50 após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de metformina e **(B)** cálculo do IC50 após tratamento com o inibidor LY294002. Cada ponto corresponde à média \pm erro padrão da porcentagem calculada para a viabilidade celular em relação ao grupo controle (100%).

1.2. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A distribuição das células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 nas fases do ciclo celular foi analisada por citometria de fluxo, antes e após o tratamento com metformina e LY294002.

Para a linhagem CMT-U229, os resultados mostraram que em condições normais de oxigênio, a porcentagem das células na fase G0/G1 aumentou conforme foram adicionados os tratamentos (metformina 53,40 %, LY294002 54,35 % e combinação 63,35 %) quando comparada à fase S (33,55 %, 31,85 % e 25,65 %, respectivamente) e G2/M (13,05 %, 13,80 % e 14,00 %, respectivamente) ($p < 0,05$; Figura 9A). O tratamento com metformina em combinação com o inibidor LY294002 é mais eficaz em bloquear a proliferação celular nessa linhagem do que o tratamento apenas com metformina ou LY294002, especialmente em condições normais de oxigênio. Em hipóxia, apenas o tratamento com o inibidor LY294002 foi capaz de parar significativamente a progressão do ciclo celular na fase G0/G1 (52,75 %), restando apenas 31,20 % das células na fase S e 16,00 % na fase G2/M ($p < 0,05$; Figura 9A).

Para a linhagem CF41, no grupo controle, a maior porcentagem de células estava na fase S da distribuição do ciclo celular (45,03 %) ($p < 0,05$; Figura 9B), 18,10 % na fase G2/M comparada à 34,05 % do total das células na fase G0/G1 ($p < 0,05$; Figura 9B). Apenas o tratamento com metformina foi significativamente capaz de parar o ciclo celular na fase G0 (53,55 %) em condições normais de oxigênio ($p < 0,05$; Figura 9B). Entretanto, a porcentagem total das células tratadas com inibidor LY294002 e em combinação com a metformina na fase G0/G1 (40,67 % e 47,35 %, respectivamente) foi maior do que a porcentagem de células na fase G0/G1 do grupo controle (34,05 %). Este resultado também foi observado em todos os grupos de tratamento em condição de hipóxia (metformina 48,67 %, LY294002 45,50 % e em combinação 47,03 %, respectivamente) quando comparado ao grupo hipóxia (38,03 % do total das células). Além disso, houve aumento estatisticamente significativo na porcentagem de células na fase G0/G1 comparada à fase S após o tratamento com metformina (48,67%) e em combinação com LY294002 (47,03%) ($p < 0,05$; Figura 9B).

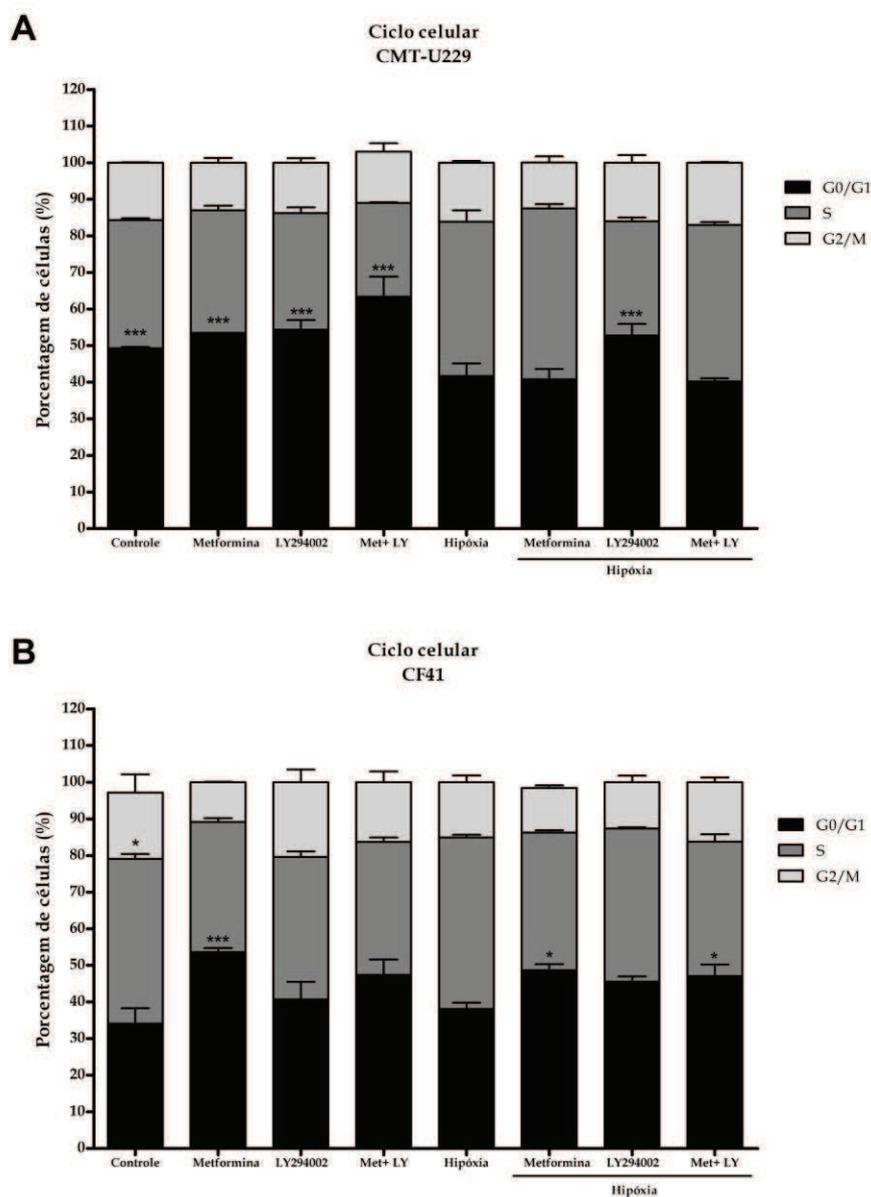
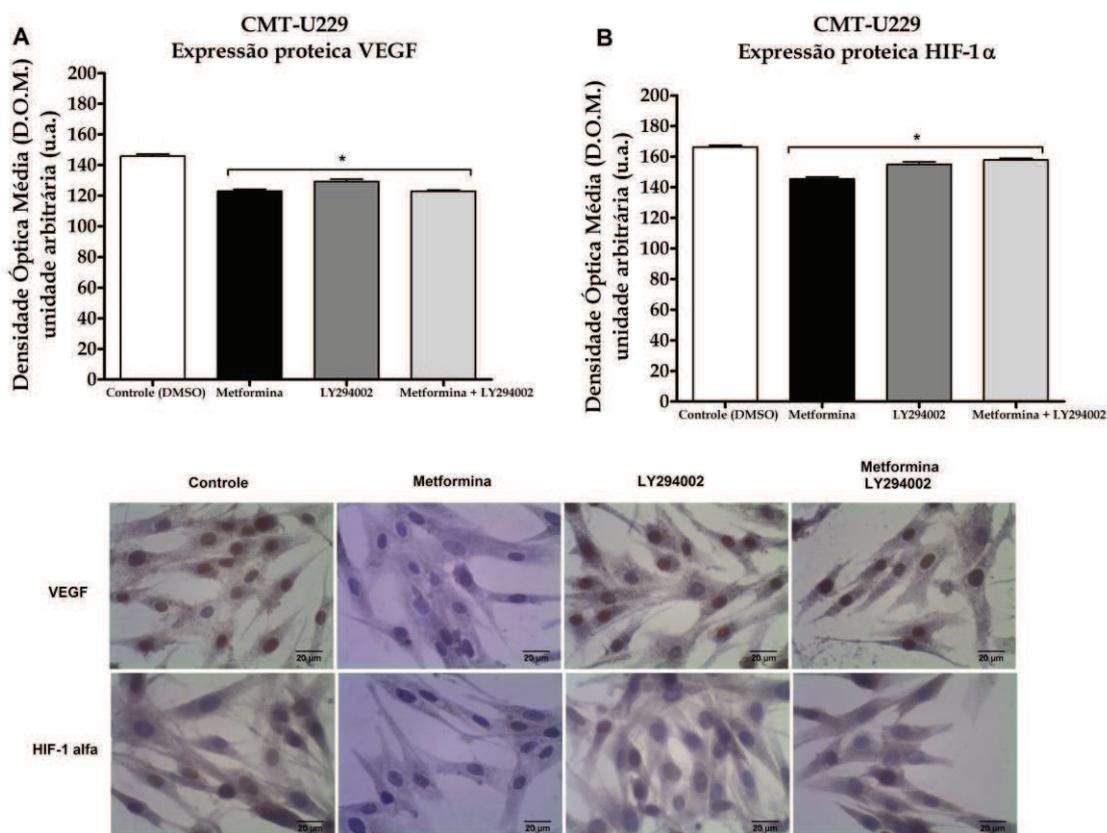


Figura 9. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo das células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em condições normais de oxigênio e em hipóxia. **(A)** Distribuição das células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229 e **(B)** distribuição das células da linhagem tumoral mamária canina CF41. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. * = $p < 0,05$ e *** $p < 0,0001$ comparação entre as diferentes fases do ciclo celular no mesmo grupo de tratamento).

1.3. Análise da expressão proteica do VEGF e HIF-1 α por imunocitoquímica

Com o objetivo de verificar a eficácia desses tratamentos na regulação do processo de angiogênese, foi realizada a técnica de imunocitoquímica para analisar a expressão proteica dos fatores angiogênicos VEGF e HIF-1 α . Os resultados obtidos nas

reações mostraram imunomarcação positiva para o VEGF e para o HIF-1 α nas células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41, com marcação evidente no citoplasma e no núcleo, respectivamente. A expressão proteica do VEGF e do HIF-1 α diminuiu após tratamento com metformina e/ou LY294002 em condições normais de oxigênio comparado ao grupo controle em ambas linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 ($p < 0,05$; Figura 10).



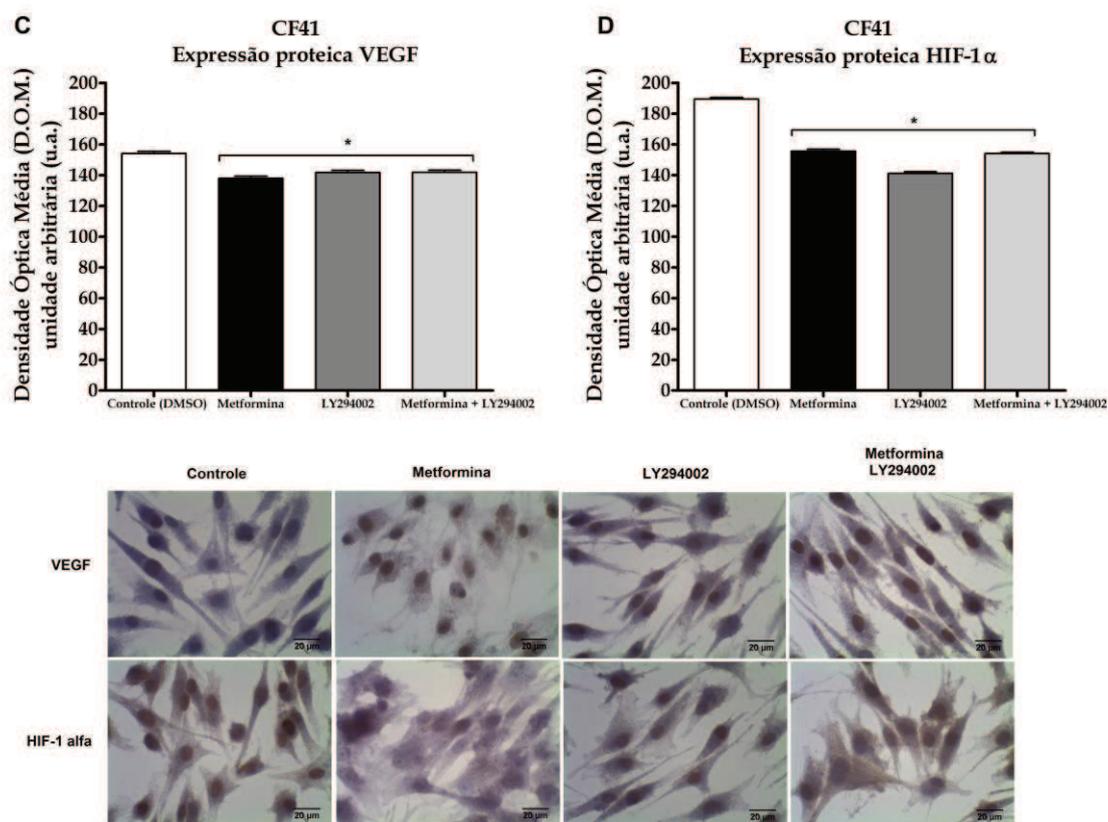
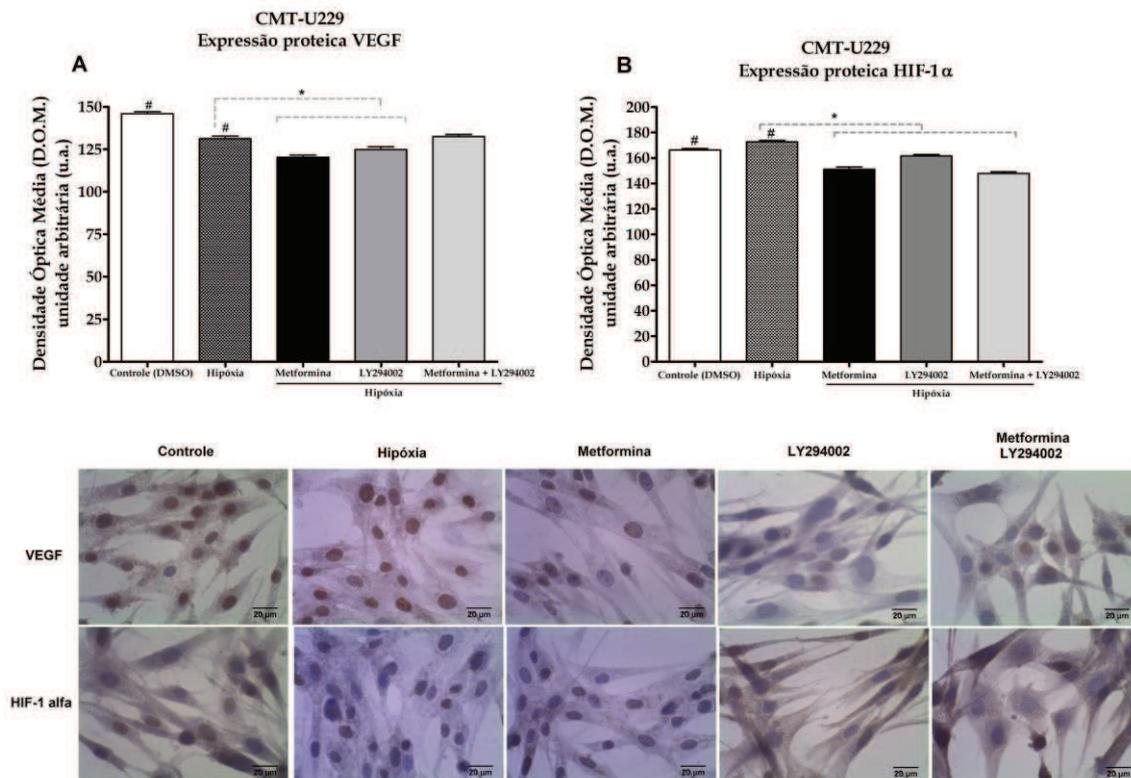


Figura 10. Análise da expressão proteica do VEGF e do HIF-1 α nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em condições normais de oxigênio. **(A)** Expressão proteica do VEGF e **(B)** do HIF-1 α nas células da linhagem CMT-U229; **(C)** expressão proteica do VEGF e **(D)** do HIF-1 α nas células da linhagem CF41. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. * = $p < 0,05$ comparado ao grupo controle).

Após a indução da hipóxia nas células da linhagem tumoral mamária canina CMT-U229, a expressão proteica do VEGF diminuiu e do HIF-1 α aumentou significativamente quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 11A e 11B). Tanto a expressão proteica do VEGF quanto do HIF-1 α diminuíram após o tratamento com metformina e LY294002 comparado ao grupo hipóxia ($p < 0,05$; Figura 11A e 11B), sendo que, a expressão proteica do HIF-1 α também diminuiu significativamente após o tratamento com metformina e LY294002 em combinação ($p < 0,05$; Figura 11B). Ao contrário, para a linhagem CF41, após a indução da hipóxia, a expressão proteica do VEGF aumentou e do HIF-1 α diminuiu significativamente comparado ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 11C e 11D). Além disso, ambas expressões diminuíram após o tratamento com metformina e LY294002 comparado ao grupo hipóxia ($p < 0,05$;

Figura 11C e 11D), entretanto, a expressão proteica do VEGF também diminuiu significativamente após o tratamento com metformina e LY294002 em combinação ($p < 0,05$; Figura 11C).



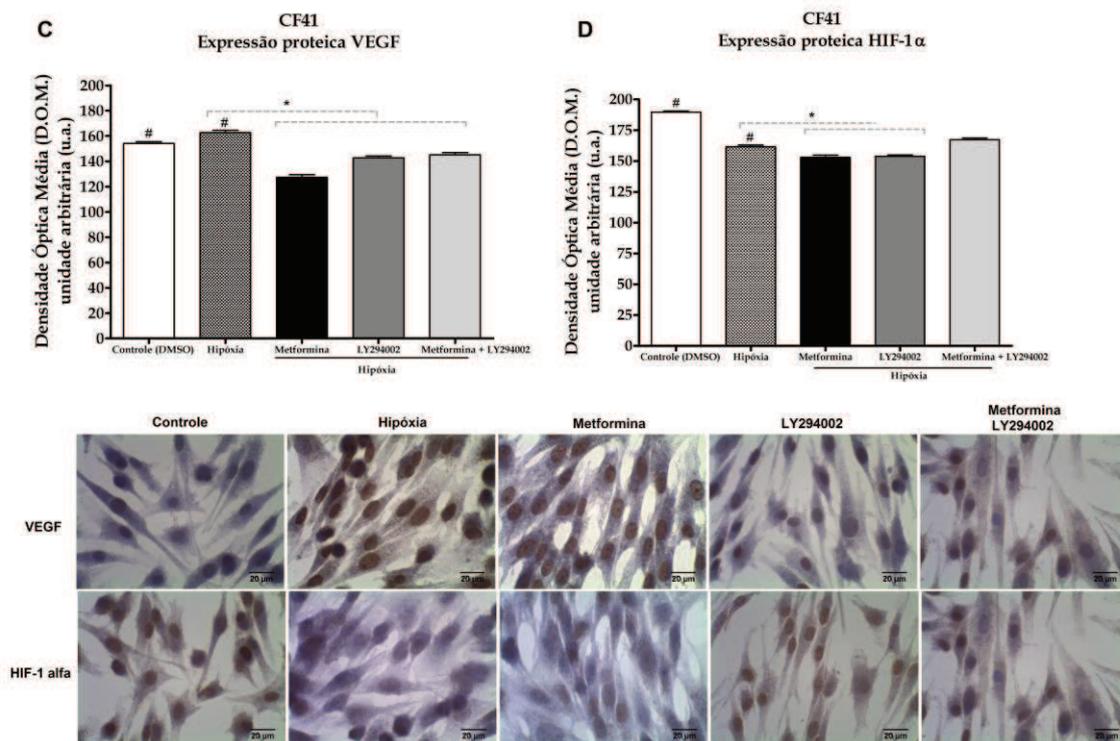


Figura 11. Análise da expressão proteica do VEGF e do HIF-1α nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em hipóxia. **(A)** Expressão proteica do VEGF e **(B)** do HIF-1α nas células da linhagem CMT-U229; **(C)** expressão proteica do VEGF e **(D)** do HIF-1α nas células da linhagem CF41. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. *# = $p < 0,05$ comparado ao grupo controle).

1.4. PCR em Tempo Real

1.4.1. Quantificação do RNA

A concentração dos RNAs foi determinada utilizando-se o aparelho NanoDrop 2000C Spectrophotometer (Thermo Scientific®) na absorvância de 260 nm e 280 nm. Todas as quantificações estão descritas no Quadro 6.

Quadro 6. Quantificação das amostras de RNA extraído pelo método do Trizol.

Grupos de tratamento	Leitura (ng/uL) CMT-U229			Leitura (ng/uL) CF41		
	260/280	260/230		260/280	260/230	
Controle 1	551,5	2,00	0,89	668,2	2,02	1,50
Controle 2	721,5	2,02	0,69	557,5	1,85	0,90
Met 5mM 1	490,7	1,90	0,53	945,6	1,93	1,11
Met 5mM 2	424,3	1,94	0,71	576,4	1,84	1,07
LY294002 1	450,8	1,68	1,08	353,0	2,09	0,68
LY294002 2	295,6	1,55	0,74	347,9	2,07	0,92
LY + Met 5mM 1	167,4	1,71	1,01	340,4	2,04	0,99
LY + Met 5mM 2	203,9	1,71	0,72	336,3	2,04	0,95
Hipóxia 1	484,7	1,98	0,77	690,6	1,78	0,81
Hipóxia 2	904,0	2,00	0,52	666,9	1,88	0,71
H + Met 5mM 1	332,8	1,81	0,54	988,2	2,01	1,52
H + Met 5mM 2	308,1	1,81	0,43	697,2	1,98	1,05
H + LY 1	125,5	1,51	0,40	301,5	1,96	0,73
H + LY 2	275,2	1,79	0,56	354,4	1,97	0,77
H + LY + Met 5mM 1	177,4	1,73	0,56	291,3	1,99	1,13
H + LY + Met 5mM 2	217,6	1,73	0,46	306,6	1,91	0,60

1.4.2. Seleção dos genes endógenos

A seleção dos genes endógenos foi realizada com auxílio do software DataAssist v3.0 (Applied Biosystems®), sendo utilizados como normalizadores da reação os genes *RPS19* (*Ribosomal Protein S19*) (score 0,3786) e *RPS5* (*Ribosomal Protein S5*) (score 0,4032), que apresentaram maior estabilidade de amplificação entre as amostras do mesmo grupo de tratamento e entre todas as amostras analisadas. (Figura 12).

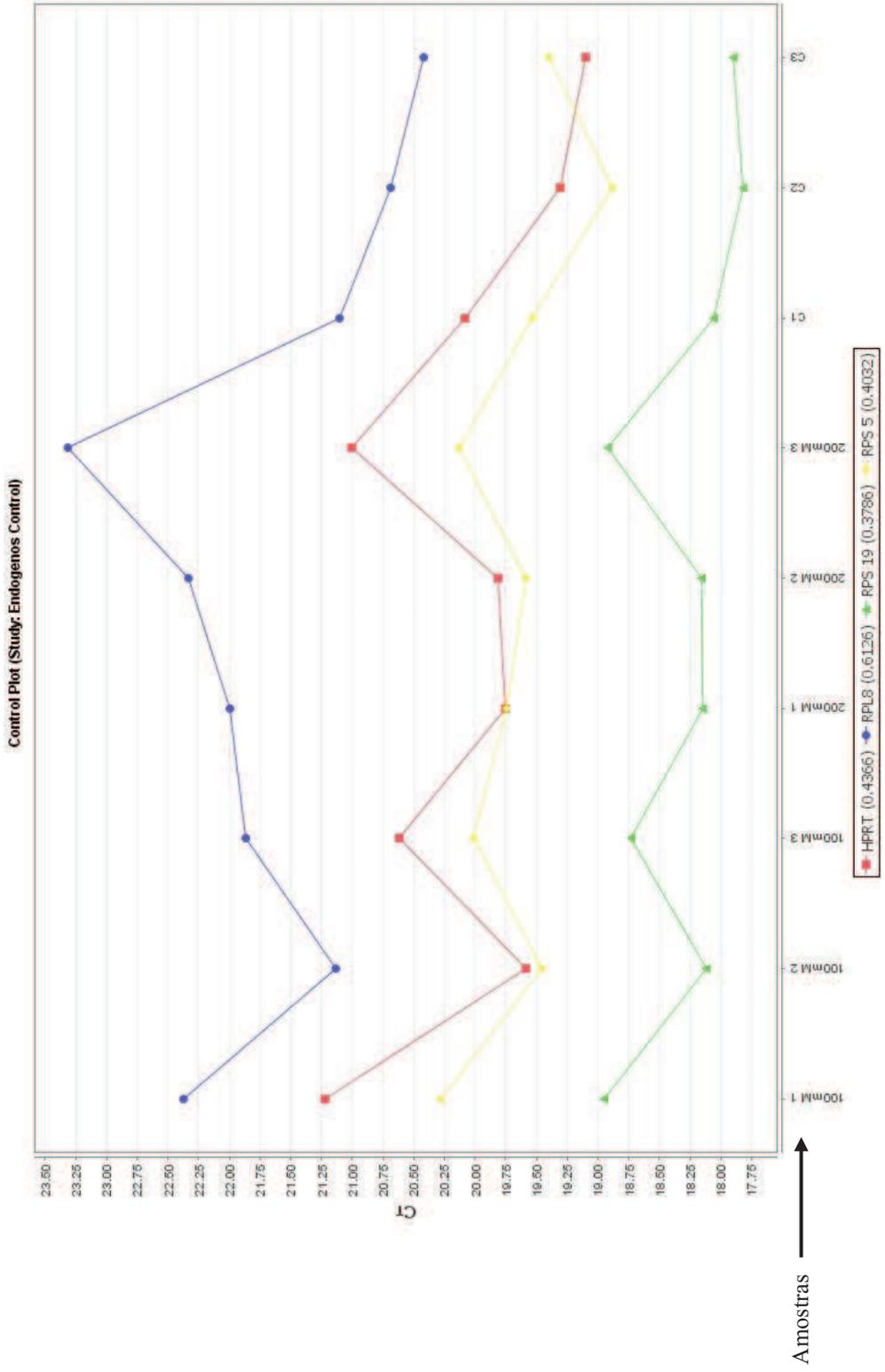


Figura 12. Análise realizada pelo Software DataAssist v3.0 mostrando a estabilidade dos genes candidatos à controles endógenos.

1.4.3. Análise da expressão gênica do *VEGFA* e *HIF-1A*

A expressão gênica do VEGFA e do HIF-1A após o tratamento com metformina e LY294002 para as células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 foi analisada por PCR em Tempo Real. Para esta análise, o valor da expressão relativa (RQ) para o grupo controle foi estabelecido como 0 (zero) e todos os resultados foram demonstrados como escala de log10.

A diferença da expressão gênica do VEGFA entre as células do grupo controle e tratadas com metformina foi de $-0,2327 (\pm 0,01079; p < 0,05)$, LY294002 foi de $-0,1115 (\pm 0,02142; p < 0,05)$ e combinados metformina e LY294002 foi de $-0,2358 (\pm 0,03096; p < 0,05; \text{Figura 13A})$. Por outro lado, com exceção do tratamento com o LY294002 ($-0,06383 \pm 0,007472$), a expressão gênica do HIF-1A diminuiu significativamente após o tratamento com metformina ($-0,1425 \pm 0,02254; p < 0,05$) e metformina com LY294002 ($-0,1233 \pm 0,02855; p < 0,05$) comparado ao grupo controle ($0,0001667 \pm 0,01338; \text{Figura 13B}$) nas células da linhagem tumoral mamária canina CM-U229. O tratamento com metformina ($-0,6138 \pm 0,03871$) e com o inibidor LY294002 separados ($-0,8478 \pm 0,06007$) ou em combinação ($-0,6510 \pm 0,03193$) diminuiu significativamente a expressão gênica do VEGFA, comparado ao grupo controle ($5,821e-011 \pm 0,006856; p < 0,05; \text{Figura 13C}$) nas células da linhagem tumoral mamária canina CF41. A expressão gênica do HIF1A diminuiu significativamente após o tratamento com metformina ($-0,4928 \pm 0,01503$) e LY294002 ($-0,5863 \pm 0,1579$) quando comparados ao grupo controle ($3,104e-010 \pm 0,02099; p < 0,05$), mas o mesmo não foi observado para o tratamento com metformina e LY294002 em combinação ($0,01217 \pm 0,04451; \text{Figura 13D}$).

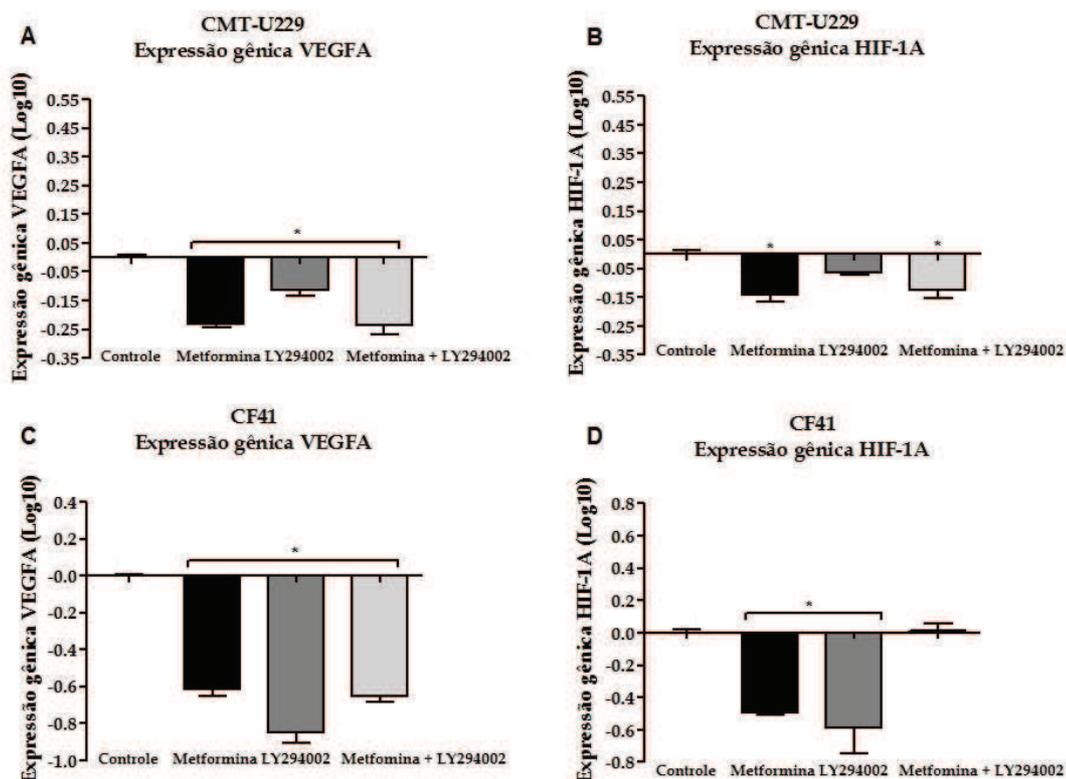


Figura 13. Análise da expressão gênica do *VEGFA* e do *HIF-1A* nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em condições normais de oxigênio. (A) Expressão gênica do *VEGFA* e (B) do *HIF-1A* nas células da linhagem CMT-U229; (C) expressão proteica do *VEGFA* e (D) do *HIF-1A* nas células da linhagem CF41. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. * = $p < 0,05$ comparado ao grupo controle).

Como esperado, após a indução da hipóxia pela adição de CoCl_2 no meio de cultura, tanto a expressão gênica do VEGFA quanto do HIF-1A aumentou significativamente comparada ao grupo controle nas células das linhagens tumorais mamárias caninas CMT-U229 e CF41 ($p < 0,05$; Figura 14). Contudo, após todos os tratamentos, a expressão gênica do VEGFA e do HIF-1A diminuiu quando comparada ao grupo hipóxia ($p < 0,05$; Figura 14). Dessa forma, os resultados alcançados na análise da expressão gênica para o tratamento com metformina e/ou LY294002 foram similares aos resultados demonstrados na expressão proteica descritos anteriormente.

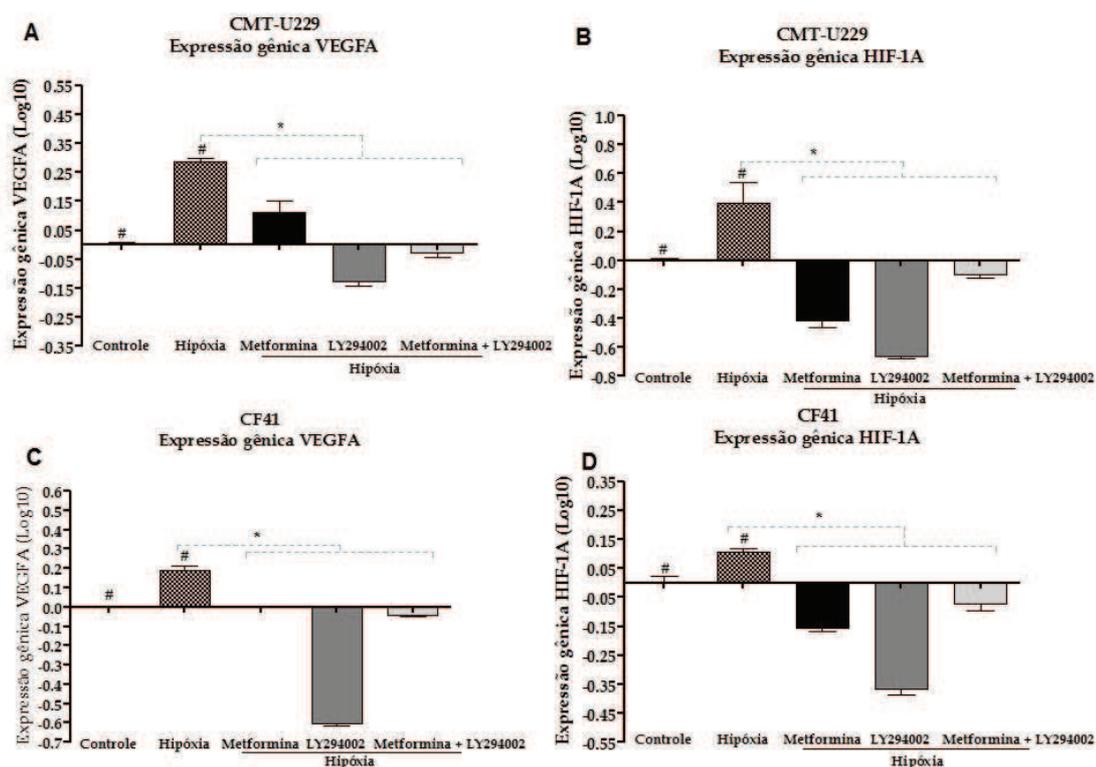


Figura 14. Análise da expressão gênica do *VEGFA* e do *HIF-1A* nas células das linhagens tumorais mamárias caninas antes e após o tratamento por 24 horas com metformina e inibidor LY294002 em hipóxia. **(A)** Expressão gênica do *VEGFA* e **(B)** do *HIF-1A* nas células da linhagem CMT-U229; **(C)** expressão proteica do *VEGFA* e **(D)** do *HIF-1A* nas células da linhagem CF41. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. *# = $p < 0,05$ comparado ao grupo controle).

Estudo *in vivo*

2. Modelo animal

Para determinar o papel da metformina e do inibidor LY294002, e a possível ação desses fármacos no bloqueio do processo de angiogênese, investigamos seus efeitos também no modelo animal.

2.1. Análise do peso corporal

O peso corporal dos animais utilizados no estudo *in vivo* foi verificado semanalmente, bem como o *status* de saúde dos animais. Quase todos os animais permaneceram sem qualquer alteração em sua homeostase durante a realização do experimento, sem demonstrar nenhuma mudança de comportamento ou sinal de toxicidade das drogas. Porém, na última semana de tratamento, três animais de diferentes grupos de tratamento (um animal tratado com metformina, um animal tratado

com LY294002 e um animal tratado com metformina em combinação com o LY294002) apresentaram ascite e ficaram apáticos. Ainda assim, não houve perda de peso durante os 28 dias de tratamento, e considerando a média do peso corporal de cada grupo de tratamento, não houve alterações significantes ($p > 0,05$; Figura 15A).

2.2. Verificação dos níveis de glicose

A metformina é o principal fármaco prescrito para o tratamento da diabetes tipo II, por esse motivo os níveis de glicose no sangue foram analisados semanalmente, uma hora após a aplicação da metformina. Não houve alteração significativa na glicemia durante o experimento, mesmo após o tratamento com metformina e/ou LY294002 ($p > 0,05$; Figura 15B), indicando que a metformina não afeta significativamente os níveis de glicose em pacientes não diabéticos.

2.3. Verificação do volume tumoral

No início do tratamento, a média do volume tumoral do grupo controle era de $13,8 \pm 2,2 \text{ mm}^3$, tratados com metformina era $19,5 \pm 5,4 \text{ mm}^3$, LY294002 era de $4,0 \pm 1,1 \text{ mm}^3$ e metformina em combinação com LY294002 era $5,6 \pm 0,4 \text{ mm}^3$. No último dia de tratamento, o volume tumoral era de $167,6 \pm 29,9 \text{ mm}^3$ para o grupo controle e para os grupos tratados era de $121,0 \pm 20,1 \text{ mm}^3$, $68,2 \pm 13,5 \text{ mm}^3$ e $131,2 \pm 16,9 \text{ mm}^3$, respectivamente. Dessa forma, o volume tumoral dos animais tratados com metformina em combinação com LY294002 aumentou significativamente (501,7%) do dia 14 ($8,4 \pm 2,5 \text{ mm}^3$) para o dia 21 ($45,2 \pm 12,8 \text{ mm}^3$) ($p < 0,05$; Figura 15C). Apesar disso, animais tratados com LY294002 apresentaram tumores significativamente menores a partir da terceira semana de tratamento (dia 21) ($20,5 \pm 5,8 \text{ mm}^3$) comparado ao volume tumoral do grupo controle ($67,1 \pm 16,6 \text{ mm}^3$) até o final do experimento (dia 28) ($p < 0,05$; Figura 15D). Esses resultados também foram observados na última semana de tratamento (dia 28) para os animais que receberam tratamento com metformina ($121,0 \pm 20,1 \text{ mm}^3$) ($p < 0,05$; Figura 15D).

Animais tratados com metformina e com o inibidor LY294002

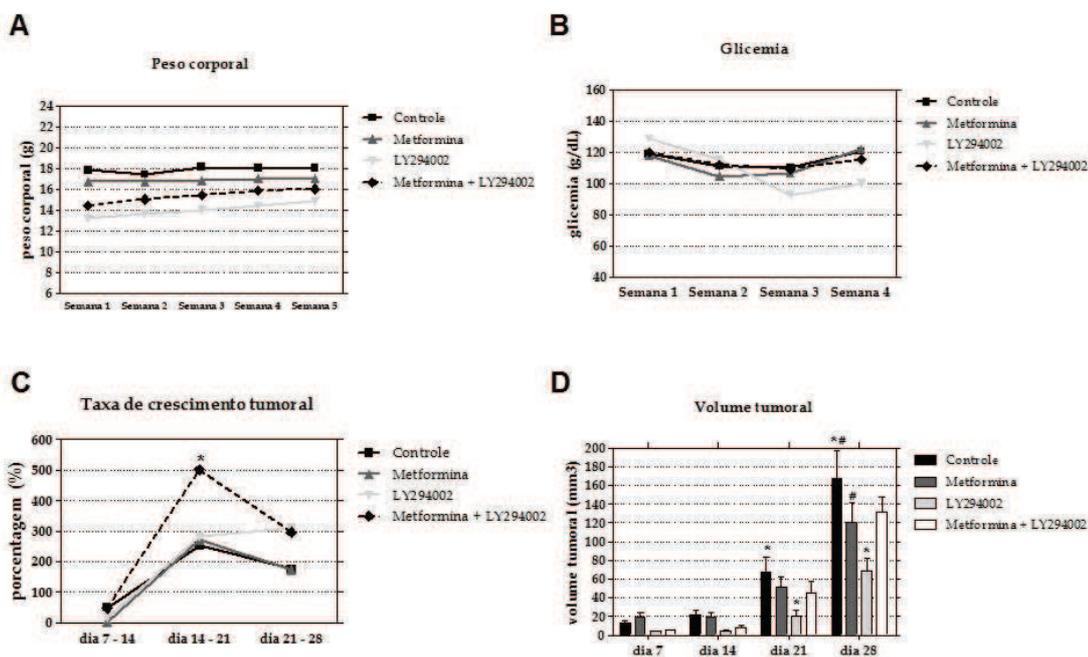


Figura 15. Análise do estado de saúde geral dos animais e dos dados relacionados ao crescimento tumoral nos diferentes grupos de tratamento após a implantação tumoral. **(A)** Média do peso corporal e **(B)** média dos níveis de glicose para cada grupo de tratamento; **(C)** Taxa de crescimento tumoral dos animais para cada grupo de tratamento (* = $p < 0,05$) e **(D)** Volume tumoral para cada grupo de tratamento (*# = $p < 0,05$ comparado ao grupo controle). Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M.).

2.4. Análise da citotoxicidade das drogas

Com o objetivo de avaliar a hepato e nefrotoxicidade do tratamento com metformina e LY294002, todos os animais foram submetidos ao painel: ALT, AST, uréia e creatinina. Não houve alterações significantes dos níveis de ALT, AST, uréia e creatinina nos grupos tratados com metformina e/ou LY294002 comparado ao grupo controle, mas os valores de AST permaneceram mais altos do que os limites normais estabelecidos por Araújo et al., 2000⁽¹²²⁾, mesmo no grupo controle. No entanto, esses valores não indicam alteração específica da função hepática induzida pela utilização dos fármacos.

2.5. Análise da MVD pela expressão proteica do CD31

Após a eutanásia, os fragmentos tumorais de todos os animais foram coletados e armazenados em parafina para avaliar a MVD e a expressão de fatores angiogênicos por imunohistoquímica e PCR em Tempo Real. O CD31 é um marcador de células endoteliais, presente na membrana das células, que é comumente utilizado para analisar a MVD nos tumores. Os resultados da análise imunohistoquímica do CD31 mostraram imunomarcção positiva em todos os grupos de tratamento, porém com maior intensidade no grupo controle ($p < 0,05$; Figura 16), o que por sua vez confirma a capacidade da metformina e do inibidor LY294002 em bloquear a MVD em modelo animal de câncer de mama.

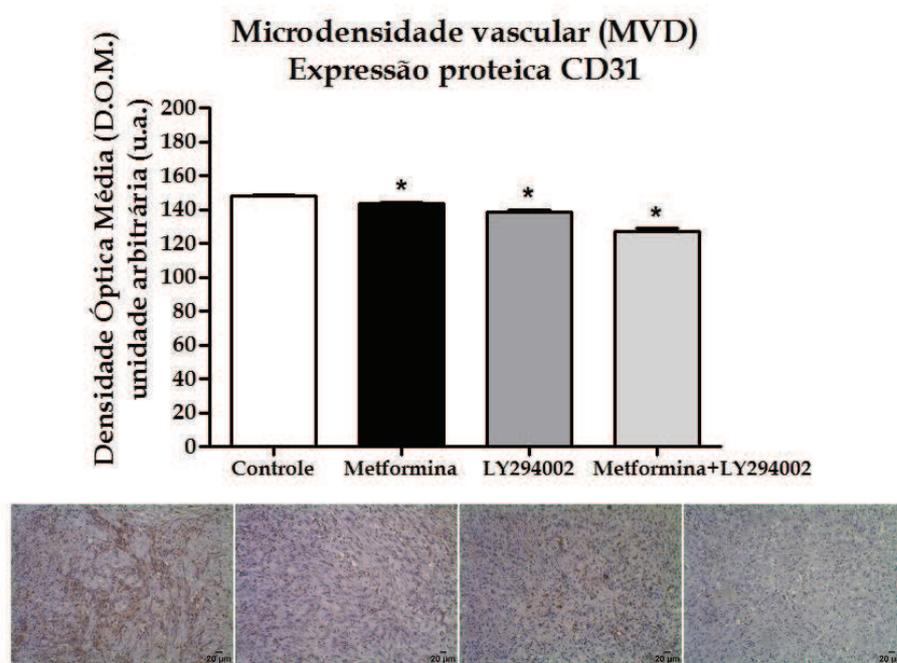


Figura 16. Análise da MVD pela expressão proteica do CD31 no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. * = $p < 0,05$ comparado ao grupo controle).

2.6. Análise da expressão proteica e gênica do VEGF e HIF-1 α

A quantificação da marcação imunohistoquímica do VEGF e do HIF-1 α foi avaliada por densitometria óptica e os resultados mostraram diminuição estatisticamente significativa da expressão proteica do VEGF e HIF-1 α no tecido tumoral dos animais tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com LY294002 comparados ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 17 e 18).

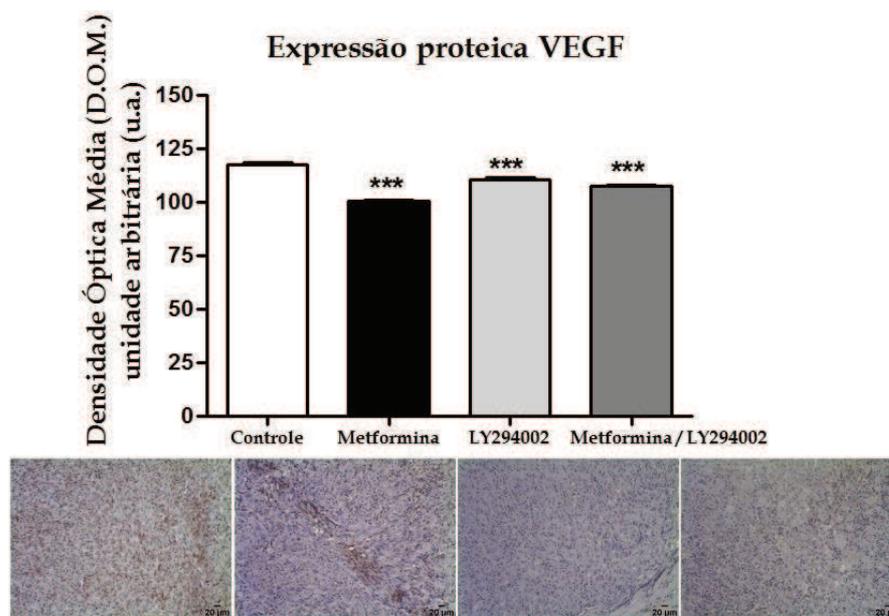


Figura 17. Análise da expressão proteica do VEGF no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. *** = $p < 0,001$ comparado ao grupo controle).

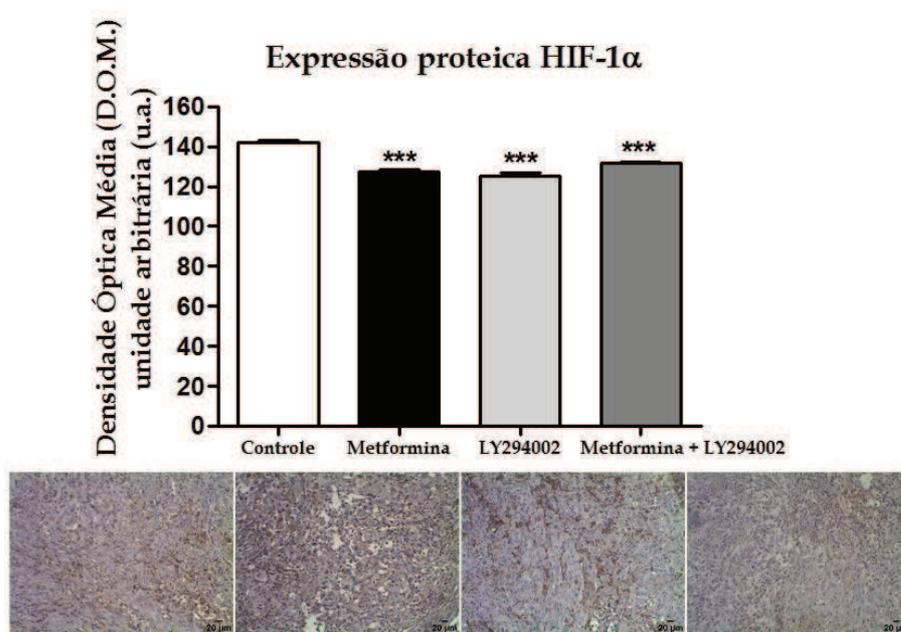


Figura 18. Análise da expressão proteica do HIF-1 α no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. *** = $p < 0,001$ comparado ao grupo controle).

Da mesma forma, o tratamento com metformina, LY294002 e metformina com LY294002 também diminuíram significativamente a expressão gênica do VEGFA e do HIF-1A comparados ao grupo controle ($p < 0,05$; Figura 19).

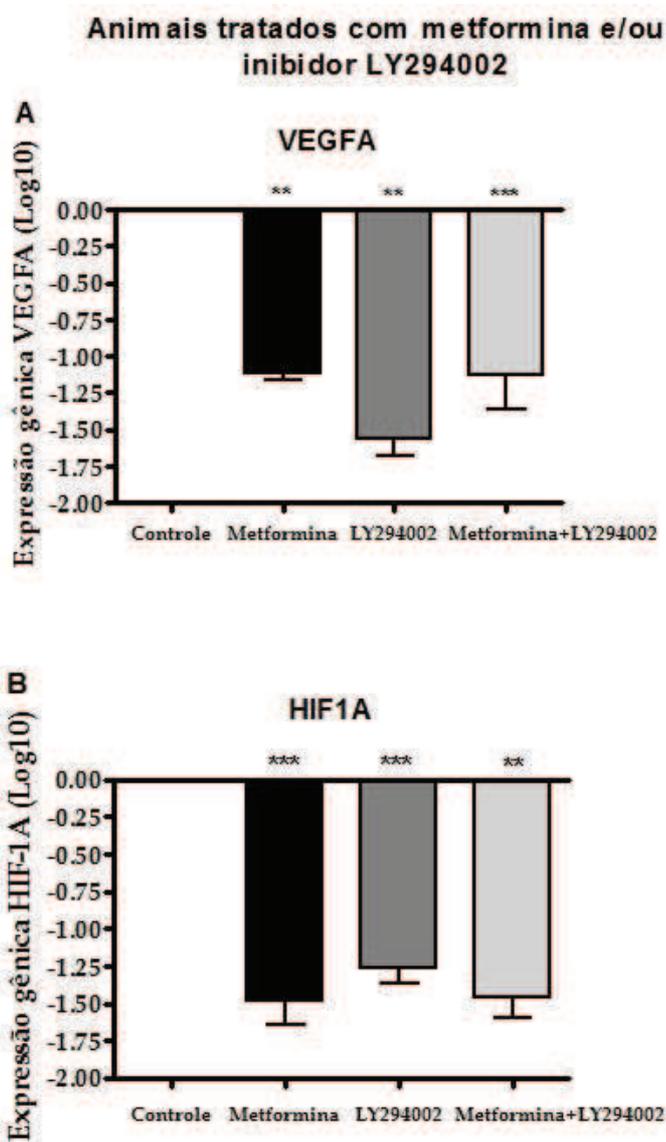


Figura 19. Análise da expressão gênica do *VEGFA* e do *HIF-1A* no tecido tumoral dos animais do grupo controle e tratados com metformina, LY294002 e metformina em combinação com o LY294002. **(A)** Expressão gênica do *VEGFA* e **(B)** do *HIF-1A*. Valor de p significativo no teste ANOVA seguido de Bonferroni (\pm S.E.M. ** = $p < 0,01$ *** = $p < 0,001$ comparado ao grupo controle).

Discussão

IV. DISCUSSÃO

Os fatores angiogênicos desempenham um papel importante no crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases ⁽¹²³⁾, sendo a hipóxia uma condição essencial para a ativação do processo de angiogênese. ^(16,40,82)

Nesse contexto, a proposta deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 no processo de angiogênese em condições normais de oxigênio e após a indução da hipóxia em células de linhagens tumorais mamárias caninas. Para avaliar o efeito do tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 na viabilidade celular foram testadas diferentes concentrações por 24 horas e os resultados mostraram que tanto a metformina quanto o inibidor LY294002 reduziram a viabilidade celular de ambas linhagens CMT-U229 e CF41, demonstrando seu papel oncostático.

A capacidade da metformina em alterar a viabilidade e proliferação celular tem sido demonstrada em diversas linhagens tumorais, incluindo linhagens humanas de câncer de mama como MDA-MB-435, MDA-MB-231 e MCF-7, mais especificamente após o tratamento com a concentração de 5mM, analisado pelo ensaio de viabilidade celular MTT. ⁽⁹⁰⁾ Da mesma forma, Kato et al. (2015) ⁽¹²⁴⁾ analisou os efeitos do tratamento com metformina na proliferação de células de câncer de próstata e encontrou diminuição estatisticamente significativa no número de células viáveis após o tratamento por 48 horas. Outro estudo recentemente publicado ⁽¹²⁵⁾, realizou tratamento com várias concentrações de metformina em células de câncer de cabeça e pescoço durante 7 dias, demonstrando a diminuição na viabilidade celular a partir da concentração de 1mM. Por outro lado, diversos autores ⁽¹²⁶⁻¹²⁸⁾ têm utilizado altas concentrações de metformina (5mM a 40mM) para reduzir a proliferação celular por diferentes tempos de incubação (24 h a 96 h) em vários tipos de câncer.

Dados recentes sugerem o envolvimento da via de sinalização PI3K/Akt no controle da resistência a drogas, tornando essa via um importante alvo para as terapias antitumorais. Nesse sentido, o uso do inibidor LY294002 na inibição dessa via de sinalização poderia aumentar a sensibilidade das células tumorais à quimioterapia. ⁽¹²⁹⁾ Com relação ao efeito antitumoral do inibidor LY294002, alvo das terapias utilizadas no bloqueio da via de sinalização PI3K/Akt, nossos resultados estão de acordo com Komeili-Movahhed et al. (2015) ⁽¹²⁹⁾ que demonstrou diminuição significativa da

proliferação celular em células MCF-7 após o tratamento com LY294002, dependente da concentração e do tempo de exposição. Além disso, um estudo com células de carcinoma nasofaríngeo tratadas com diferentes concentrações de LY294002 (10 μ M a 75 μ M) por 24 e 48 horas mostrou diminuição da proliferação celular e aumento da apoptose. ⁽¹³⁰⁾ Portanto, esses resultados sugerem a utilização da metformina e do LY294002 como agentes terapêuticos no câncer de mama devido a sua capacidade de controlar a proliferação celular.

A análise do ciclo celular é um importante passo para a compreensão das vias de sinalização envolvidas na proliferação celular. Esse processo segue uma sequência de eventos representados por diferentes estágios no ciclo celular (G0 / G1, S, G2/M), onde G0 corresponde à parada do ciclo celular, G1 à preparação das células para o crescimento e proliferação celular pela replicação dos cromossomos; S síntese do DNA e G2/M preparação para a divisão celular e separação das cromátides para a constituição de dois núcleos idênticos. ⁽¹³¹⁾ Os resultados da citometria de fluxo para a linhagem CMT-U229 mostraram que apenas em condições normais de oxigênio a porcentagem de células na fase G0/G1 aumentou de maneira dependente à adição dos tratamentos, mesmo no grupo controle. Para a linhagem CF41, apenas o tratamento com metformina, tanto em condições normais de oxigênio quanto em hipóxia, foi capaz de parar o ciclo celular na fase G0/G1, inibindo a proliferação celular e induzindo a apoptose, enquanto no grupo controle a maior porcentagem células permaneceu na fase S do ciclo celular.

Diversos estudos têm demonstrado a capacidade da metformina em parar o ciclo celular na fase G0/G1 inibindo a proliferação celular em diferentes tipos de câncer. ⁽¹³²⁻¹³⁴⁾ Na literatura, tem sido relatado que a metformina exerce esta ação por dois mecanismos distintos: agindo diretamente na célula tumoral inibindo o metabolismo mitocondrial e ativando a via de sinalização MAPK (efeito direto) e indiretamente através da redução dos níveis de glicose (efeito indireto), o que por sua vez, impediria a progressão tumoral pela inibição do mTOR e regulação da expressão de ciclinas e suas enzimas (CDKs) inibindo o ciclo celular. ^(133, 135) Apesar de bem descritos, os efeitos benéficos da metformina na prevenção e resposta ao tratamento do câncer não estão completamente esclarecidos. ⁽¹³⁶⁻¹³⁷⁾

Em concordância com os nossos resultados, Li et al. (2012) ⁽¹¹³⁾ demonstraram que tanto o tratamento com metformina quanto com o inibidor LY294002 foi capaz de

bloquear a progressão do ciclo celular na fase G0/G1. Além disso, nesse mesmo estudo, o tratamento com metformina combinado ao inibidor LY294002 aumentou o número de células de câncer de ovário em apoptose. Zhang et al. (2013)⁽¹³⁴⁾ e Saeki et al. (2015)⁽¹³⁸⁾ investigaram os efeitos da metformina, na progressão do ciclo celular por citometria de fluxo em linhagens de células de câncer de bexiga e linhagens de células de câncer de mama canino, respectivamente, e os resultados mostraram que o tratamento com metformina foi capaz de aumentar significativamente a porcentagem de células na fase G0/G1 reduzindo a porcentagem de células nas fases S e G2/M. Da mesma forma, Komeili-Movahhed et al. (2015)⁽¹²⁹⁾ mostraram a capacidade do inibidor LY294002 em parar o ciclo celular na fase G0/G1 em células da linhagem de câncer de mama MCF-7. A partir desses resultados e dos dados encontrados na literatura, sugere-se que esses fármacos desempenham importante papel na proliferação celular e consequentemente no crescimento do tumor.

Entretanto, nenhum estudo mostrou a ação da metformina e do inibidor LY294002 no ciclo celular em condições de hipóxia, especialmente em tumores mamários. As células podem responder de maneira diferente à alteração nos níveis de oxigênio, alterando seu metabolismo ou sua taxa de crescimento. Há evidências crescentes que relacionam a capacidade da hipóxia em alterar a proliferação celular por dois mecanismos distintos: através da morte celular programada ou por outro lado, prevenindo a morte celular iniciando uma série de respostas biológicas, levando à proliferação celular e crescimento do tumor.⁽²²⁾ Na primeira hipótese, a hipóxia induz a apoptose pela via de sinalização do Tp53, ou então, inicia a proliferação celular a partir da inativação de enzimas responsáveis pela síntese de nucleotídeos, inibindo a replicação do DNA o que ocorre em condições severas de hipóxia (níveis de oxigênio 0,01%) ou anóxia.⁽¹³⁹⁾ Nossos resultados demonstraram que a hipóxia não afetou o ciclo celular, mas o tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 foi eficiente em diminuir a progressão celular mesmo nessas condições.

No presente estudo, a expressão proteica do VEGF diminuiu e do HIF-1 α aumentou após a indução da hipóxia por adição de CoCl₂ na linhagem CMT-U229, enquanto o oposto foi observado na linhagem CF41. Por outro lado, a expressão gênica do VEGF e do HIF-1A aumentou após a indução por hipóxia e ambas as linhagens.

Para manter a sobrevivência em condições de hipóxia, as células tumorais iniciam mecanismos adaptativos como a alteração do seu metabolismo, produção e liberação de fatores de crescimento, tornando-se resistentes a apoptose e sendo capazes de induzir sua própria vascularização iniciando o processo de angiogênese. ⁽³¹⁾ Nesse sentido, a hipóxia é caracterizada como o maior estimulador da expressão do VEGF, resultante da ligação do HIF-1 aos elementos de resposta à hipóxia (HRE). ⁽¹⁴⁰⁾ No entanto, há uma razão que explica o motivo da expressão proteica do VEGF e do HIF-1 α não terem seguido o mesmo padrão, sugerida por Aranha et al. (2008) ⁽¹⁴¹⁾, pelo fato da expressão do HIF-1 α aumentar imediatamente sob condições de hipóxia, e após a ativação do VEGF para a reoxigenação, o HIF-1 α sofre degradação proteossomal.

Para mimetizar a hipóxia nesse estudo, foi utilizado o CoCl₂ na concentração de 100 μ M conforme Dai et al. (2008) ⁽¹⁴²⁾ e após 24 horas, as células foram tratadas com metformina e/ou inibidor LY294002. Os resultados mostraram que o tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 diminuiu a expressão proteica e gênica tanto do VEGF quanto do HIF-1 α nas células das linhagens CMT-U229 e CF41 em condições normais de oxigênio e sob hipóxia. De acordo com os nossos resultados, Tadakawa et al. (2015) ⁽⁵¹⁾ também induziram a hipóxia pela adição de CoCl₂ na concentração de 150 μ M em células da linhagem de leiomioma uterino de ratos, 30 minutos antes do tratamento com metformina, e os resultados mostraram que após a indução com hipóxia houve aumento da expressão do VEGF e do HIF-1 α e diminuição dos mesmos após o tratamento, demonstrando sua ação antiangiogênica.

O VEGF está superexpresso em células de câncer renal, pulmonar, câncer de mama e de ovário. Nesse contexto, mecanismos terapêuticos para bloquear a vascularização de tumores, bloqueando o processo de angiogênese a partir da regulação do VEGF podem significar um caminho para o tratamento efetivo de diversos tipos de câncer. ⁽¹⁴⁰⁾

De acordo com os nossos resultados, Soraya et al. (2012) ⁽¹⁴³⁾ demonstraram que o tratamento com metformina foi capaz de diminuir a expressão do gene *VEGFA* em linhagem de células endoteliais HUVEC. Da mesma forma, Treins et al. (2006) ⁽⁸⁹⁾ demonstraram que a metformina foi capaz de inibir a expressão do HIF-1 α em células epiteliais.

Além disso, o tratamento com LY294002 diminuiu a expressão do HIF-1 α e do VEGF na linhagem celular de câncer de mama MCF-7, de acordo com Du et al. (2011)⁽⁹¹⁾. Zhao et al. (2011)⁽⁹³⁾ demonstraram que o tratamento com o inibidor LY294002 foi capaz de bloquear a ativação da via de sinalização PI3K/Akt em situações de hipóxia, diminuindo a taxa de proliferação celular *in vitro* e o crescimento tumoral *in vivo* em linhagens celulares de carcinoma de cólon, pulmão e melanoma.

No entanto, pouco se sabe quanto à influência do tratamento com metformina em combinação com o inibidor de PI3K, LY294002 na angiogênese tumoral. Apenas os trabalhos de Liu et al. (2011)⁽¹¹⁴⁾ e Li et al. (2012)⁽¹¹³⁾ demonstraram que o tratamento com LY294002 em combinação com a metformina foi eficaz em diminuir a proliferação celular em câncer de ovário e no tratamento do câncer de mama, porém não foi verificada relação com o processo de angiogênese, o que torna este estudo inédito.

Assim, para avaliar a ação da metformina e do inibidor LY294002 na angiogênese tumoral, células da linhagem CF41 foram implantadas em camundongos fêmeas Balb/c nude atímicos, e esses por sua vez foram tratados com metformina e com o inibidor LY294002. No presente estudo, o tratamento com metformina foi realizado na dose de 200 mg/kg intraperitonealmente de acordo com Rattan et al. (2011)⁽¹²⁰⁾. Em humanos, a dose de metformina normalmente utilizada para o tratamento da diabetes tipo 2 varia de 1000 a 2500 mg, administrada duas vezes ao dia, o que corresponde a 6mM⁽¹⁴⁴⁾, maior do que a concentração utilizada no estudo *in vitro*. No estudo *in vivo*, os animais receberam 200 mg/kg de metformina diariamente, que pode ser traduzido para o equivalente a dose humana pelo método de Regan-Shaw⁽¹⁴⁵⁾. Assim, a dose de 200 mg/kg utilizada no modelo animal é equivalente a 960 mg/kg em um humano saudável de aproximadamente 60 kg, o que corresponde a menos da metade da dose normalmente utilizada para o tratamento da diabetes tipo 2.

Outros estudos têm demonstrado o efeito anti-proliferativo da metformina em tumores tanto *in vitro* quanto *in vivo*.⁽¹⁴⁶⁾ No presente estudo, cabe reforçar que, não houve alteração significativa da média do peso corporal de cada grupo de tratamento e também na glicemia durante o experimento, mesmo após o tratamento com metformina e/ou LY294002.

Da mesma forma, Phoenix et al. (2009)⁽⁹⁰⁾ analisaram a taxa de glicose sanguínea de animais que receberam implante de células de linhagem de câncer de

mama MDA-MB-435 e que foram tratados com metformina, e os resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos durante os 40 dias de tratamento.

A metformina é capaz de reduzir a glicose sanguínea inibindo a gliconeogênese hepática e aumentando a captação de glicose em células musculares, sem estimular a secreção de insulina^(137,147); por esse motivo, é um medicamento seguro que tem efeitos positivos sobre a perda de peso e menor incidência de hipoglicemia comparado ao tratamento com outros agentes utilizados para a diabetes.^(100,148)

Quanto ao volume tumoral, os animais tratados com metformina e com LY294002 apresentaram tumores significativamente menores comparados ao volume tumoral do grupo controle. Diversos estudos têm como objetivo determinar o papel da metformina na prevenção do câncer⁽¹⁴⁸⁾ sendo que, estudos com modelo animal tem demonstrado que a metformina previne o crescimento tumoral inibindo a proliferação celular.⁽¹⁴⁹⁾

De acordo com nossos resultados, o estudo de Kato et al. (2012)⁽¹³³⁾ demonstrou que o tratamento intraperitoneal com metformina levou a inibição do crescimento tumoral em animais implantados com células de câncer gástrico. Ainda, o estudo de Ben Saha et al. (2008)⁽¹³²⁾ injetou células de carcinoma de próstata e realizou tratamento intraperitoneal e oral com metformina diariamente, demonstrando diminuição de 35% e 55%, respectivamente, do crescimento tumoral independente da via de administração. Além disso, a metformina não teve efeitos tóxicos nos animais e não afetou o peso corporal. Liu et al. (2009)⁽¹⁵⁰⁾ demonstrou que o tratamento oral com metformina foi capaz de diminuir o crescimento do tumor em animais implantados com células de câncer de mama MDA-MB-231.

Quanto à expressão proteica e gênica, nossos resultados mostraram que tanto o tratamento com metformina quanto com o inibidor LY294002 diminuiu a expressão proteica e gênica do VEGF e do HIF-1 α no tecido tumoral dos camundongos. Assim como, houve diminuição da expressão do marcador de células endoteliais CD31, demonstrando a ação da metformina e do inibidor LY294002 no controle da angiogênese. Da mesma forma, Jun et al. (2015)⁽¹⁵¹⁾ demonstraram diminuição da expressão do VEGF em pacientes com câncer gástrico tratados com metformina. Wang et al. (2015)⁽¹⁵²⁾ demonstraram a diminuição do VEGF e da microdensidade vascular após o tratamento com metformina.

A angiogênese é um processo complexo regulado pelo equilíbrio entre fatores pro-angiogênicos e anti-angiogênicos, incluindo fatores de crescimento, angiopoetinas, moléculas de adesão, entre outros. ⁽¹⁵³⁾ O tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 atua nas vias de sinalização MAPK e PI3K/Akt/mTOR, as duas principais vias de sinalização envolvidas no processo de angiogênese, que resultam na ativação do HIF-1, que por sua vez regula a produção do VEGF pelas células tumorais. ^(86,88,154) Assim, os resultados alcançados nesse estudo demonstram que a utilização tanto da metformina quanto do inibidor LY294002 é segura e eficaz como estratégia terapêutica no câncer de mama.

Conclusões

V. CONCLUSÕES

O presente trabalho permite concluir que:

1. A metformina e o inibidor LY294002 influenciam na viabilidade celular de células de linhagem tumoral mamária canina, após 24 horas de tratamento, além disso, esses tratamentos pararam o ciclo celular na fase G0/G1 tanto em condições normais de oxigênio quanto em hipóxia reduzindo a proliferação celular.
2. Tanto o tratamento com metformina quanto com o inibidor LY294002 apresentaram ação antiangiogênica no câncer de mama tendo em vista a inibição da expressão proteica e gênica do VEGF e do HIF-1 α em condições normais de oxigênio e também sob hipóxia nas células das linhagens tumorais mamárias caninas, assim como no tecido tumoral transplantado em camundongos fêmeas Balb/c nude atímicos.
3. No estudo *in vivo*, o tratamento com metformina e com o inibidor LY294002 influencia no volume tumoral e a microdensidade vascular, sem alterar os níveis de glicose e o peso corporal dos animais, corroborando a importância da metformina e do inibidor LY294002 no controle da proliferação celular, confirmando a regulação do processo de angiogênese e diminuindo assim a progressão da doença.

Referências

VI. REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2016; <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/mapa.asp?ID=5>.
2. International Agency for Cancer Research (IARC). 2016; <https://www.iarc.fr/>
3. Gelaleti GB, Jardim BV, Leonel C, Moschetta MG, Zuccari DAPC. Interleukin-8 as a prognostic serum marker in canine mammary gland neoplasias. *Vet Immunology Immunopathology* 2012; 146:106-12.
4. Michel E, Feldmann SF, Kowalewski MP, Bley CR, Boos A, Guscetti F. Expression of prolactin receptors in normal canine mammary tissue, canine mammary adenomas and mammary adenocarcinomas. *BMC Veterinary Research* 2012; 8:72.
5. Pawtowski KM, Mucha J, Majchrzak K, Motyl T, Król M. Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells. *BMC Vet Res* 2013; 9:119.
6. Hsiao YL, Hsieh TZ, Liou CJ, Cheng YH, Lin CT, Chang CY et al. Characterization of protein marker expression tumorigenicity and doxorubicin chemoresistance in two new canine mammary tumor cell lines. *BMC Vet Res* 2014; 1:229.
7. Andrade FH, Figueiroa FC, Bersano PR, Bissacot DZ, Rocha NS. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagn Pathol* 2010; 5:45.
8. Phillips JC, Lembcke L, Chamberlin T. A novel locus for canine osteosarcoma (OSA1) maps to CFA34, the canine orthologue of human 3q26. *Genomics* 2010; 96:220.
9. Rasotto R, Goldschmidt MH, Castagnaro M, Carnier P, Caliani D, Zappulli V. The dog as a natural animal model for study of the mammary myoepithelial basal cell lineage and its role in mammary carcinogenesis. *J Comp Pathol* 2014; 151:166-80.
10. Rismanchi S, Yadegar O, Muhammadnejad S, Amanpour S, Taghizadeh-Jahed M, Muhammadnejad A. Expression of vimentin filaments in canine malignant mammary gland tumors: A simulation of clinicopathological features of human breast cancer. *Biomed Rep* 2014; 5:725-728.
11. Santos RP, Benvenuti TT, Honda ST, Del Valle PR, Katayama ML, Brentani HP et al. Influence of the interaction between nodal fibroblast and breast cancer cells on gene expression. *Tumour Biol* 2011; 32:145-57.
12. Seyfried TN, Huysentruyt LC. On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*. 2013; 1:43–73.
13. Guan X. Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B* 2015; 5:402–418.
14. Hoff PM, Machado KK. Role of angiogenesis in the pathogenesis of cancer. *Cancer Treat Rev* 2012; 7:825-33.
15. Liu Q, Li A, Tian Y, Wu JD, Liu Y, Li T et al. The CXCL8-CXCR1/2 pathways in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016. [Epub ahead of print]
16. Arjaans M, Schröder CP, Oosting SF, Dafni U, Kleibeuker JE, de Vries EG. VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside. *Oncotarget* 2016; 16:21247-58.

17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 5:646-74.
18. Gacche RN, Meshram RJ. Targeting tumor micro-environment for design and development of novel anti-angiogenic agents arresting tumor growth. *Prog Biophys Mol Biol* 2013; 2:333-54.
19. Harris AL. Hypoxia — a key regulatoryFactor in tumour growth. *Nature* 2002; 2:38-47.
20. Masaki Y, Shimizu Y, Yoshioka T, Feng F, Zhao S, Higashino K et al. Imaging Mass Spectrometry Revealed the Accumulation Characteristics of the 2-Nitroimidazole-Based Agent "Pimonidazole" in Hypoxia. *PLoS One* 2016; 8:e0161639.
21. Sullivan R, Graham CH. Hypoxia prevents etoposide-induced DNA damage in cancer cells through a mechanism involving hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cancer Ther* 2009; 8:1702-13.
22. Flamant L, Notte A, Ninane N, Raes M, Michiels C. Anti-apoptotic role of HIF-1 and AP-1 in paclitaxel exposed breast cancer cells under hypoxia. *Mol Cancer* 2010; 9:191.
23. Lee SO, Kim JS, Lee MS, Lee HJ. Anti-cancer effect of pristimerin by inhibition of HIF-1 α involves the SPHK-1 pathway in hypoxic prostate câncer cells. *BMC Cancer* 2016; 16:701.
24. Carmeliet, P, Jain, RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407:249-257.
25. Vordermark D. Hypoxia-specific targets in cancer therapy: role of splice variants. *BMC Med* 2010;8:45.
26. Milani M, Harris AL. Targeting tumour hypoxia in breast cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44:2766-73.
27. Zhang C, Zhi WI, Lu H, Samanta D, Chen I, Gabrielson E, Semenza GL.Hypoxia-inducible factors regulate pluripotency factor expression by ZNF217- and ALKBH5-mediated modulation of RNA methylation in breast cancer cells. *Oncotarget* 2016.[Epub ahead of print]
28. Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK et al. Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med* 2007; 4:e186.
29. Kallergi G, Markomanolaki H, Giannoukaraki V, Papadaki MA, Strati A, Lianidou ES et al. Hypoxia-inducible factor-1 α and vascular endothelial growth factor expression in circulating tumor cells of breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2009; 11:84.
30. Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of Hypoxia in the Hallmarks of Human Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 107:1053–1062.
31. Higashimura Y, Nakajima Y, Yamaji R, Harada N, Shibasaki F, Nakano Y et al. Up-regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression by HIF-1 activity depending on Sp1 in hypoxic breast cancer cells. *Arch BiochemBiophys* 2011; 509:1-8.
32. Kourtzelis I, Rafail S. The dual role of complement in cancer and its implication in anti-tumor therapy. *Ann Transl Med* 2016; 14:265.
33. Gavalas NG, Liontos M, Trachana SP, Bagratuni T, Arapinis C, Liacos C et al. Angiogenesis-related pathways in the pathogenesis of ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2013; 8:15885-909.

34. Kim CK, Han DH, Ji YS, Lee MS, Min CW, Park SK et al. Biomarkers of angiogenesis as prognostic factors in myelodysplastic syndrome patients treated with hypomethylating agents. *Leuk Res* 2016; 50:21-28.
35. Lai PX, Chen CW, Wei SC, Lin TY, Jian HJ, Lai IP et al. Ultrastrong trapping of VEGF by graphene oxide: Anti-angiogenesis application. *Biomaterials* 2016; 109:12-22.
36. Cao Y, Li CY, Moeller BJ, Yu D, Zhao Y, Dreher MR, et al. Observation of incipient tumor angiogenesis that is independent of hypoxia and hypoxia inducible factor-1 activation. *Cancer Res* 2005; 65:5498-505.
37. Al-Dissi AN, Haines DM, Singh B, Kidney BA. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 in canine simple mammary gland adenocarcinomas. *Can Vet J* 2010; 51:1109–1114.
38. Finley SD, Dhar M, Popel AS. Compartment model predicts VEGF secretion and investigates the effects of VEGF trap in tumor-bearing mice. *Front Oncol.* 2013; 3:196.
39. Wang Z, Dabrosin C, Yin X, Fuster MM, Arreola A, Rathmell WK et al. Broad targeting of angiogenesis for cancer prevention and therapy. *Semin Cancer Biol.* 2015; pii: S1044-579X(15)00002-4.
40. Hida K, Maishi N, Torii C, Hida Y. Tumor angiogenesis--characteristics of tumor endothelial cells. *Int J Clin Oncol* 2016; 2:206-12.
41. Milkiewicz M, Hudlicka O, Shiner R, Egginton S, Brown MD. Vascular endothelial growth factor mRNA and protein do not change in parallel during non-inflammatory skeletal muscle ischaemia in rat. *J Physiol* 2006; 577:671-8.
42. Bergers G, Benjamin LB. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature Reviews – Cancer* 2003; 3:401-410.
43. Pradeep CR, Sunila ES, Kuttan G. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in tumor angiogenesis and malignancies. *Integr Cancer Ther.* 2005; 4:315-21.
44. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003; 314:15-23.
45. Reinmuth N, Liu W, Jung YD, Ahmad SA, Shaheen RM, Fan F et al. Induction of VEGF in perivascular cells defines a potential paracrine mechanism for endothelial cell survival. *FASEB J* 2001; 15:1239-41.
46. Cappellari O, Cossu G. Pericytes in Development and Pathology of Skeletal Muscle. *Circulation Research* 2013; 113:341-348.
47. Georgiou HD, Namdarian B, Corcoran NM, Costello AJ, Hovens CM. Circulating endothelial cells as biomarkers of prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2008; 8:445-54.
48. Weis SM, Cheresh DA. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med* 2011; 17:1359-70.
49. Tang L, Ma X, Tian Q, Cheng Y, Yao H, Liu Z, et al. Inhibition of angiogenesis and invasion by DMBT is mediated by downregulation of VEGF and MMP-9 through Akt pathway in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 2013; 56:204–213.
50. Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1 α stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010; 48:178-84.

51. Tadakawa M, Takeda T, Li B, Tsuiji K, Yaegashi N. The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway in ELT-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 399:1-8.
52. Pande D, Negi R, Khanna S, Khanna R, Khanna HD. Vascular Endothelial Growth Factor Levels in Relation to Oxidative Damage and Antioxidant Status in Patients with Breast Cancer. *J Breast Cancer* 2011; 14:181-184.
53. Polz-Dacewicz M, Strycharz-Dudziak M, Dworzański J, Stec A, Kocot J. Salivary and serum IL-10, TNF- α , TGF- β , VEGF levels in oropharyngeal squamous cell carcinoma and correlation with HPV and EBV infections. *Infect Agent Cancer* 2016; 11:45.
54. Brito LGO, Schiavon VF, de Andrade JM, Tiezzi DG, Peria FM, Marana HRC. Expression of Hypoxia-inducible factor 1-a and Vascular endothelial growth factor-C in locally advanced breast cancer patients. *Clinics* 2011; 66:1313-1319.
55. Stefanini MO, Wu FT, Mac Gabhann F, Popel AS. A compartment model of VEGF distribution in blood, healthy and diseased tissues. *BMC Syst Biol* 2008; 2:77.
56. Taneja P, Maglic D, Kai F, Zhu S, Kendig RD, Fry EA et al. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. *Clinical Medicine Insights: Oncology* 2010; 4:15-34.
57. Lange C, Storkebaum E, de Almodóvar CR, Dewerchin M, Carmeliet P. Vascular endothelial growth factor: a neurovascular target in neurological diseases. *Nat Rev Neurol* 2016; 8:439-54.
58. Rahimi N. The ubiquitin-proteasome system meets angiogenesis. *Mol Cancer Ther.* 2012; 11:538-48.
59. Millanta F, Silvestri G, Vaselli C, Citi S, Pisani G, Lorenzi D et al. The role of vascular endothelial growth factor and its receptor Flk-1/KDR in promoting tumour angiogenesis in feline and canine mammary carcinomas: A preliminary study of autocrine and paracrine loops. *Research in Veterinary Science* 2006; 81:350-357.
60. Taimeh Z, Loughran J, Birks EJ, Bolli R. Vascular endothelial growth factor in heart failure. *Nat Rev Cardiol* 2013; 10:519-30.
61. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; 21:21-6.
62. Clinkard D, Amoodi H, Kandasamy T, Grewal AS, Chen S, Qian W et al. Changes in the cochlear vasculature and vascular endothelial growth factor and its receptors in the aging c57 mouse cochlea. *Otolaryngol.* 2013; 2013:430625.
63. Lopes-Bastos BM, Jiang WG, Cai J. Tumour-Endothelial Cell Communications: Important and Indispensable Mediators of Tumour Angiogenesis. *Anticancer Res* 2016; 3:1119-26.
64. Romon R, Adriaenssens E, Lagadec C, Germain E, Hondermarck H, Le Bourhis X. Nerve growth factor promotes breast cancer angiogenesis by activating multiple pathways. *Mol Cancer* 2010; 9:157.
65. Greenberg S, Rugo HS. Triple-negative breast cancer: role of antiangiogenic agents. *Cancer J* 2010; 16:33-8.
66. Delli Carpini J, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis* 2010; 13:43-58.

67. Koukourakis MI, Limberis V, Tentes I, Kontomanolis E, Kortsaris A, Sivridis E et al. Serum VEGF levels and tissue activation of VEGFR2/KDR receptors in patients with breast and gynecologic cancer. *Cytokine* 2011; 53:370–375.
68. Qui CY, Lin DG, Wang JQ, Li CY, Deng GZ. Expression and significance of PTEN and VEGF in canine mammary gland tumours. *Veterinary Research Communications* 2008; 32:463- 472.
69. Xiong J, Yang Q, Li J, Zhou S. Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. *Angiogenesis* 2014; 1:37-50.
70. Shin JM, Jeong YJ, Cho HJ, Park KK, Chung IK, Lee IK et al. Melittin Suppresses HIF-1 α /VEGF Expression through Inhibition of ERK and mTOR/p70S6K Pathway in Human Cervical Carcinoma Cells. *PLoS One* 2013; 23: 7:e69380.
71. Brito LGO, Schiavon VF, de Andrade JM, Tiezzi DG, Peria FM, Marana HRC. Expression of Hypoxia-inducible factor 1-a and Vascular endothelial growth factor-C in locally advanced breast cancer patients. *Clinics* 2011; 66:1313-1319.
72. Tung KH, Lin CW, Kuo CC, Li LT, Kuo YH, Lin CW et al. CHC promotes tumor growth and angiogenesis through regulation of HIF-1 α and VEGF signaling. *Cancer Lett* 2013; 331:58-67.
73. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cellular Signalling* 2007; 19:2003–2012.
74. Lu J, Zhang K, Chen S, Wen W. Grape seed extract inhibits VEGF expression via reducing HIF-1 α protein expression. *Carcinogenesis*. 2009; 30:636-44.
75. Recchia AG, De Francesco EM, Vivacqua A, Sisci D, Panno ML, Andò S et al. The G protein-coupled receptor 30 is up-regulated by hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in breast cancer cells and cardiomyocytes. *J Biol Chem*. 2011; 286:10773-82.
76. Yang L, Zhao W, Zuo WS, Wei L, Song XR, Wang XW et al. Silencing of osteopontin promotes the radiosensitivity of breast cancer cells by reducing the expression of hypoxia inducible factor 1 and vascular endothelial growth factor. *Chin Med J* 2012; 125:293-9.
77. Li L, Qu Y, Jin X, Guo XQ, Wang Y, Qi L et al. Protective effect of salidroside against bone loss via hypoxia-inducible factor-1 α pathway-induced angiogenesis. *Sci Rep* 2016; 6:32131.
78. Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol*. 2016 [Epub ahead of print]
79. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer and metastasis initiating cells *J Cell Mol Med* 2013; 17:30-54.
80. Tung KH, Lin CW, Kuo CC, Li LT, Kuo YH, Lin CW et al. CHC promotes tumor growth and angiogenesis through regulation of HIF-1 α and VEGF signaling. *Cancer Lett* 2013; 331:58-67.
81. Lee SO, Kim JS, Lee MS, Lee HJ. Anti-cancer effect of pristimerin by inhibition of HIF-1 α involves the SPHK-1 pathway in hypoxic prostate cancer cells. *BMC Cancer* 2016; 16:701.

82. Dales JP, Beaufile N, Silvy M, Picard C, Pauly V, Pradel V et al. Hypoxia inducible factor 1alpha gene (HIF-1alpha) splice variants: potential prognostic biomarkers in breast cancer. *BMC Med* 2010; 8:44.
83. Matsuo Y, Ding Q, Desaki R, Maemura K, Mataka Y, Shichi H, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha plays a pivotal role in hepatic metastasis of pancreatic cancer: an immunohistochemical study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2014; 2:105-12.
84. Maschio LB, Madalozzo BB, Capellasso BA, Jardim BV, Moschetta MG, Jampietro J et al. Immunohistochemical investigation of the angiogenic proteins VEGF, HIF-1 α and CD34 in invasive ductal carcinoma of the breast. *Acta Histochem* 2014; 1:148-57.
85. Finley SD, Chu LH, Popel AS. Computational systems biology approaches to anti-angiogenic cancer therapeutics. *Drug Discov Today* 2015; 2:187-97.
86. Tosca L, Ramé C, Chabrolle C, Tesseraud S, Dupont J. Metformin decreases IGF1-induced cell proliferation and protein synthesis through AMP-activated protein kinase in cultured bovine granulosa cells. *Reproduction* 2010; 139:40918.
87. Bauer TM, Patel MR, Infante JR. Targeting PI3 Kinase in cancer. *Pharmacol Ther* 2015; 146:53-60.
88. Chelouche-Lev D, Miller CP, Tellez C, Ruiz M, Bar-Eli M, Price JE. Different signalling pathways regulate VEGF and IL-8 expression in breast cancer: implications for therapy. *Eur J Cancer* 2004; 40:2509-18.
89. Treins C, Murdaca J, Van Obberghen E, Giorgetti-Peraldi S. AMPK activation inhibits the expression of HIF-1alpha induced by insulin and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 342:1197-202.
90. Phoenix KN, Vumbaca F, Claffey KP. Therapeutic metformin/AMPK activation promotes the angiogenic phenotype in the ER alpha negative MDA-MB-435 breast cancer model. *Breast Cancer Res Treat* 2009; 113:101-11.
91. Du J, Xu R, Hu Z, Tian Y, Zhu Y, Gu L et al. PI3K and ERK-induced Rac1 activation mediates hypoxia-induced HIF-1 α expression in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One* 2011; 6:e25213.
92. Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a Target for Cancer Treatment. *Annu Rev Med* 2016; 67:11-28.
93. Zhao L, Wen ZH, Jia CH, Li M, Luo SQ, Bai XC. Metformin induces G1 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Anat Rec* 2011; 294:1337-43.
94. Levashova Z, Backer M, Hamby CV, Pizzonia J, Backer JM, Blankenberg FG. Molecular Imaging of Changes in the Prevalence of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor in Sunitinib-Treated Murine Mammary Tumors. *J Nucl Med* 2010; 51:959-66.
95. Park SY, Jang WJ, Yi EY, Jang JY, Jung Y, Jeong JW et al. Melatonin suppresses tumor angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha stabilization under hypoxia. *J Pineal Res* 2010; 48:178-84.
96. Ali MM, Janic B, Babajani-Feremi A, Varma NR, Iskander AS, Anagli J et al. Changes in Vascular Permeability and Expression of Different Angiogenic Factors Following Anti-Angiogenic Treatment in Rat Glioma. *PLoS One* 2010; 5:e8727.
97. Anisimov VN. Metformin: do we finally have an anti-aging drug? *Cell Cycle* 2013; 22:3483-9.

98. Xiong J, Yang Q, Li J, Zhou S. Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. *Angiogenesis*. 2014; 1:37-50.
99. Salani B, Maffioli S, Hamoudane M, Parodi A, Ravera S, Passalacqua M et al. Caveolin-1 is essential for metformin inhibitory effect on IGF1 action in non-small-cell lung cancer cells. *FASEB J* 2012; 26:788-98.
100. Aksoy S, Sendur MA, Altundag K. Demographic and clinico-pathological characteristics in patients with invasive breast cancer receiving metformin. *Med Oncol* 2013; 2:590.
101. Jin Q, Cheng J, Liu Y, Wu J, Wang X, Wei S et al. Improvement of functional recovery by chronic metformin treatment is associate with enhance alternative activation of microglia/macrophages and increased angiogenesis and neurogenesis following experimental stroke. *Brain Behav Immun* 2014; 40:131-42.
102. Seufert J, Lübben G, Dietrich K, Bates PC. A comparison of the effects of thiazolidinediones and metformin on metabolic control in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Ther* 2004; 6:805-18.
103. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science* 2005; 310:1642-6.
104. Sen S, He Y, Koya D, Kanasaki K. Cancer biology in diabetes. *J Diabetes Investig* 2014; 5:251-64.
105. Ibarra-Drendall C, Dietze EC, Seewaldt VL. Metabolic Syndrome and Breast Cancer Risk: Is There a Role for Metformin? *Curr Breast Cancer Rep* 2011; 3:142-150.
106. Bonanni B, Puntoni M, Cazzaniga M, Pruneri G, Serrano D, Guerrieri-Gonzaga A, et al. Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. *J Clin Oncol* 2012; 30:2593-600.
107. Orecchioni S, Reggiani F, Talarico G, Mancuso P, Calleri A, Gregato G et al. The biguanides metformin and pheformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targetin both neoplastic and micrenvironment cells. *Int J Cancer* 2014; 6:E534-44.
108. Suwei D, Liang Z, Zhimin L, Ruilei L, Yingying Z, Zhen L et al. NLK functions to maintain proliferation and stemness of NSCLC and is a target of metformin. *J Hematol Oncol* 2015; 1:120.
109. Teng RJ, Du J, Afolayan AJ, Eis A, Shi Y, Konduri GG. AMP Kinase actvation improves angiogenesis in pulmonary artery endothelial cells within utero pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 1: L29-42.
110. Storozhuk Y, Hopmans SN, Sanli T, Barron C, Tsiani E, Cutz JC et al. Metformin inhibits growth and enhances radiation response of non-small cell lung cancer (NSCLC) through ATM and AMPK. *Br J Cancer* 2013; 10:2021-32.
111. Decensi A, Puntoni M, Gandini S, Guerrieri-Gonzaga A, Johansson HA, Cazzaniga M et al. Differential effects of metformin on breast cancer proliferation according to markers of insulin resistance and tumor subtype in a randomized pre surgical trial. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 1:81-90.
112. Shiu SW, Wong Y, Tan KC. Effect of advanced glycation end products on lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2012; 19:1083-92.

113. Li C, Liu VW, Chan DW, Yao KM, Ngan HY. LY294002 and metformin cooperatively enhance the inhibition of growth and the induction of apoptosis of ovarian cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 2012; 22:15-22.
114. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Yang X, Lind SE, Thor AD. Potent antiproliferative effects of metformin on trastuzumab-resistant breast cancer cells via inhibition of erbB2/IGF-1 receptor interactions. *Cell Cycle*. 2011; 10:2959-66.
115. Chen T, Shen L, Yu J, Wan H, Guo A, Chen J et al. Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging Cell* 2011; 10:908-11.
116. Borin TF, Arbab AS, Gelaleti GB, Ferreira LC, Moschetta MG, Jardim-Perassi BV et al. Melatonin decreases breast cancer metastasis by modulating Rho-associated kinase protein-1 expression. *J Pineal Res* 2016; 1:3-15.
117. Sebaugh JL. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. *Pharm Stat* 2011; 2:128-34.
118. Moschetta MG, Maschio LB, Jardim-Perassi BV, Gelaleti GB, Lopes JR, Leonel C et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor 1 α in canine malignant mammary tumors. *Oncol Rep*. 2015; 5:2345-53.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols* 2008; 3:1101-1108.
120. Rattan R, Graham RP, Maguire JL, Giri S, Shridhar V. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* 2011; 5:483-91.
121. Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, Martinez-Outschoorn UE, Witkiewicz AK, Birbe R, Howell A et al. Pyruvate kinase expression (PKM1 and PKM2) in cancer-associated fibroblasts drives stromal nutrient production and tumor growth. *Cancer Biol Ther* 2011; 12:1101-13.
122. Araújo LMB, Britto MMS, Cruz TRP. Tratamento do Diabetes Mellitus do Tipo 2: Novas Opções. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2000; 44.
123. Schindl M, Schoppmann SF, Samonigg H, Hausmaninger H, Kwasny W, Gnant M et al. Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 α is associated with an unfavorable prognosis in lymph node-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 2002; 8:1831-7.
124. Kato H, Sekine Y, Furuya Y, Miyazawa Y, Koike H, Suzuki K. Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 1:115-21.
125. Ueno S, Kimura T, Yamaga T, Kawada A, Ochiai T, Endou H et al. Metformin enhances anti-tumor effect of L-type amino acid transporter 1 (LAT1) inhibitor. *J Pharmacol Sci* 2016; 2:110-7.
126. Yang FQ, Wang JJ, Yan JS, Huang JH, Li W, Che JP et al. Metformin inhibits cell growth by upregulating microRNA-26a in renal cancer cells. *Int J Clin Exp Med* 2014; 10:3289-96.
127. Sesen J, Dahan P, Scotland SJ, Saland E, Dang VT, Lemarié A et al. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. *PLoS One* 2015; 4:e0123721.
128. Ochoa-Gonzalez F, Cervantes-Villagrana AR, Fernandez-Ruiz JC, Nava-Ramirez HS, Hernandez-Correa AC et al. Metformin Induces Cell Cycle Arrest, Reduced

- Proliferation, Wound Healing Impairment In Vivo and Is Associated to Clinical Outcomes in Diabetic Foot Ulcer Patients. *PLoS One* 2016; 3:e0150900.
129. Komeili-Movahhed T, Fouladdel S, Barzegar E, Atashpour S, Hossein Ghahremani M, Nasser Ostad S et al. PI3K/Akt inhibition and down-regulation of BCRP re-sensitize MCF7 breast cancer cell line to mitoxantrone chemotherapy. *Iran J Basic Med Sci* 2015; 5:472-7.
 130. Jiang H, Fan D, Zhou G, Li X, Deng H. Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor (LY294002) induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma in vitro and in vivo. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29:34.
 131. Molinaro E, Caputo LFG, Amendoeira MRR. *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde – volume 2*. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2010. 290p. ISBN: 978-85-98768-41-0.
 132. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auburger P et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 2008; 25:3576-86.
 133. Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H et al. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2012; 3:549-60.
 134. Zhang T, Guo P, Zhang Y, Xiong H, Yu X, Xu S et al. The antidiabetic drug metformin inhibits the proliferation of bladder cancer cells in vitro and in vivo. *Int J Mol Sci* 2013; 12:24603-18.
 135. Dallaglio K, Bruno A, Cantelmo AR, Esposito AI, Ruggiero L et al. Paradoxical effects of metformin on endothelial cells and angiogenesis. *Carcinogenesis* 2014; 5:1055-66.
 136. Coperchini F, Leporati P, Rotondi M, Chiovato L. Expanding the therapeutic spectrum of metformin: from diabetes to cancer. *J Endocrinol Invest* 2015; 10:1047-55.
 137. Koritzinsky M. Metformin: A Novel Biological Modifier of Tumor Response to Radiation Therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 2:454-64.
 138. Saeki K, Watanabe M, Tsuboi M, Sugano S, Yoshitake R, Tanaka Y et al. Antitumour effect of metformin in canine mammary gland tumour cells. *Vet J*. 2015; 2:297-304.
 139. Goda N, Ryan HE, Khadivi B, McNulty W, Rickert RC, Johnson RS. Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol Cell Biol* 2003; 1:359-69.
 140. Yoo SY, Kwon SM. Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:127170.
 141. Aranha, AMF. *Potencial angiogênico de células pulpares humanas em hipóxia*. Araraquara: Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2008. Dissertação (Doutorado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Araraquara, São Paulo, 2008.
 142. Dai M, Cui P, Yu M, Han J, Li H, Xiu R. Melatonin modulates the expression of VEGF and HIF-1 alpha induced by CoCl₂ in cultured cancer cells. *J Pineal Res* 2008; 44:121-6.
 143. Soraya H, Esfahanian N, Shakiba Y, Ghazi-Khansari M, Nikbin B, Hafezzadeh H, et al. Anti-angiogenic Effects of Metformin, an AMPK Activator, on Human Umbilical Vein Endothelial Cells and on Granulation Tissue in Rat. *Iran J Basic Med Sci* 2012; 15:1202-9.

144. Shank JJ, Yang K, Ghannam J, Cabrera L, Johnston CJ, Reynolds RK et al. Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecol Oncol* 2012; 2: 390-7.
145. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008; 3:659-61.
146. Ben Sahara I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther* 2010; 5:1092-9.
147. Shafae A, Dastyar DZ, Islamian JP, Hatamian M. Inhibition of tumor energy pathways for targeted esophagus cancer therapy. *Metabolism* 2015; 10:1193-8.
148. Li S, Meng W, Guan Z, Guo Y, Han X. The hypoxia-related signaling pathways of vasculogenic mimicry in tumor treatment. *Biomed Pharmacother* 2016; 80:127-35.
149. Kabel AM, Omar MS, Balaha MF, Borg HM. Effect of metformin and adriamycin on transplantable tumor model. *Tissue Cell* 2015. pii: S0040-8166(15)00058-0.
150. Liu B, Fan Z, Edgerton SM, Deng XS, Alimova IN, Lind SE et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell Cycle* 2009; 8:2031-40.
151. Jun KH, Lee JE, Kim SH, Jung JH, Choi HJ, Kim YI et al. Clinicopathological significance of N-cadherin and VEGF in advanced gastric cancer brain metastasis and the effects of metformin in preclinical models. *Oncol Rep* 2015; 4:2047-53.
152. Wang J, Li G, Wang Y, et al. Suppression of tumor angiogenesis by metformin treatment *via* a mechanism linked to targeting of HER2/HIF-1 α /VEGF secretion axis. *Oncotarget* 2015; 42:44579-44592.
153. Lokadasan R, James FV, Narayanan G, Prabhakaran PK. Targeted agents in epithelial ovarian cancer: review on emerging therapies and future developments. *E cancer medical science* 2016; 10:626.
154. Thomas SN, Liao Z, Clark D, Chen Y, Samadani R, Mao L et al. Exosomal Proteome Profiling: A Potential Multi-Marker Cellular Phenotyping Tool to Characterize Hypoxia-Induced Radiation Resistance in Breast Cancer. *Proteomes* 2013; 2:87-108.

Apêndice

VII. APÊNDICE

Apêndice A: Protocolos de preparo das soluções.

¹ **SDS-HCL 0,01M** SDS ----- 1g
 Água e-pure autoclavada ----- 9,992 µl
 HCL ----- 8 µl

² **Tampão citrato (pH 6,0)** Ácido Cítrico ----- 2,1 g
 Água Destilada ----- 1000 mL

Solução de hidróxido de sódio (NaOH) para regulação do pH do ácido cítrico

NaOH ----- 1,6 g
 Água Destilada ---- 20 ml

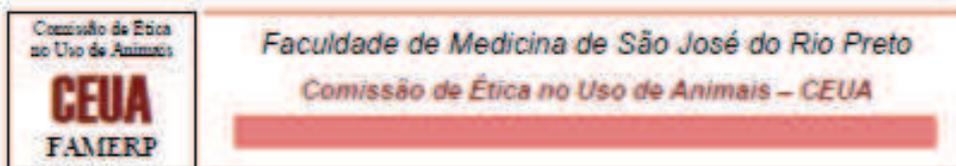
³ **PBS** Cloreto de Sódio ----- 16,36 g
 Fosfato de Sódio Dibásico ----- 2,1 g
 Fosfato de Sódio Monobásico di-hidratado ----- 0,6 g
 Água Destilada ----- 2000 mL

⁴ **BSA** PBS----- 12 mL
 BSA----- 0,5 g

Anexos

VIII. ANEXOS

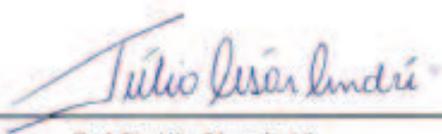
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



DELIBERAÇÃO CEUA Nº 021/2013

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEUA/FAMERP, em reunião, analisou o projeto intitulado "Inibição da metástase via transição epitélio mesenquimal por RNA de interferência e bloqueio da angiogênese pelas vias de sinalização PI3K e MAPK/Akt/mTOR após tratamento com metformina e LY294002 em neoplasia mamária." (Protocolo FAMERP nº 001-003244/2013)", sob responsabilidade da Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuocari, e deliberou que o mesmo está de acordo com os princípios éticos estabelecidos na Lei nº 11.794/2008 e na Resolução nº 714/2002, o projeto está APROVADO.

São José do Rio Preto, 31 de outubro de 2013.



Prof. Dr. Júlio César André
Presidente da CEUA – FAMERP