

**CAMILA PEREA**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-METASTÁTICA DO EUGLICEMIANTE  
METFORMINA SOBRE CÉLULAS LEUCÊMICAS K562, LUCENA E FEPS**

**SANTO ANDRÉ - SP**

**2023**

**CAMILA PEREA**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-METASTÁTICA DO EUGLICEMIANTE  
METFORMINA SOBRE CÉLULAS LEUCÊMICAS K562, LUCENA E FEPS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal do ABC (UFABC), como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Ligia Petrolini de Oliveira

Coorientadora: Dra. Ana Carolina Santos  
de Souza Galvão

**SANTO ANDRÉ - SP**

**2023**

Universidade Federal do ABC

**CAMILA PEREA**

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-METASTÁTICA DO EUGLICEMIANTE  
METFORMINA SOBRE CÉLULAS LEUCÊMICAS K562, LUCENA E FEPS**

**Banca Avaliadora:**

Membro Titular: Prof. Dr.: Sergio Daishi Sasaki

Membro Titular: Me Gilmara Barros de Lima

Membro Titular: Profa Dra. Ligia Petrolini de Oliveira

Membro Suplente: Prof. Dr. Vinicius de Andrade Oliveira

*“What we know matter but who we are matters more.”*

*(Brené Brown)*

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Ilustração adaptada de ALVES, 2011 para representação do cromossomo Filadélfia característico das células da medula de pacientes com Leucemia Mieloide Crônica.....1
- Figura 2** - Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP2 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Tukey). \* =  $p < 0,05$ .....17
- Figura 3** - Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP9 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Tukey). \* =  $p < 0,05$ .....18
- Figura 4** - Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP2 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Delta CT” apresentam as diferenças estatisticamente significativas das linhagens K562, Lucena e FEPS tratadas com metformina quando comparadas entre si (Two Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .....18
- Figura 5** - Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP9 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Delta CT” apresentam as diferenças estatisticamente significativas das linhagens K562, Lucena e FEPS tratadas com metformina quando comparadas entre si (Two Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .....19
- Figura 6** - Fotos correspondentes aos géis de zimografia. As bandas brancas indicam a ação gelatinolítica das metaloproteinases. À esquerda estão identificados os tamanhos de bandas correspondentes às MMPs 2 e 9. A: amostras dos tratamentos com as linhagens K562 e Lucena após 24 horas de exposição com metformina. B: amostras dos tratamentos com as linhagens K562 e Lucena após 48 horas de exposição com metformina. C: amostras dos tratamentos com a linhagem FEPS após 24 e 48 horas de exposição com metformina.....20
- Figura 7** - Gráficos representativos da quantificação relativa de MMP2, avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas

com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .....21

**Figura 8** - Gráficos representativos da quantificação relativa de MMP9, avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .....21

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTI-METASTÁTICA DO EUGLICEMIANTE METFORMINA SOBRE CÉLULAS LEUCÊMICAS K562, LUCENA E FEPS

AUTORA: Camila Perea

ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Ligia Petrolini de Oliveira

COORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Ana Carolina Santos de Souza Galvão

A leucemia mielóide crônica (LCM), caracterizada primordialmente pela fusão gênica denominada BCR-ABL, ainda carece de novas terapias aos pacientes, devido à sua alta morbidade e mortalidade. Por ser uma neoplasia hematológica, a quimioterapia é a principal conduta terapêutica utilizada. Um dos principais impedimentos para que se obtenha sucesso no tratamento é o desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos. Vários fatores contribuem para esse cenário, dentre os quais, a falta de atuação seletiva dos tratamentos, a emergência de células tumorais resistentes simultaneamente à ampla variedade de agentes citotóxicos durante o tratamento e a formação de metástases, esta última responsável por grande parte das mortes por câncer. Estudos têm demonstrado que a metformina, euglicemiante oral utilizado no tratamento da diabetes Mellitus tipo II, apresenta potencial uso no tratamento do câncer. Dados prévios do nosso grupo de pesquisa têm mostrado potente atividade tóxica da metformina sobre células de LMC, potencializando os efeitos do quimioterápico padrão utilizado no tratamento. Células de LMC tratadas com metformina mostraram alterações na expressão de proteínas associadas ao fenótipo de Resistência à Múltiplas Drogas (MDR). Dessa maneira, este projeto se dispôs a avaliar os efeitos da metformina sobre a capacidade metastática das células da linhagem K562 - célula leucêmica não resistente – Lucena - célula leucêmica resistente a múltiplas drogas – e FEPS, através do estudo das metaloproteinases MMP2 e MMP9. Estas enzimas são essenciais para o processo metastático, pois degradam a membrana basal permitindo que as células neoplásicas adentrem os capilares de vasos sanguíneos e linfáticos e possam ser levadas a locais distantes. Dessa maneira, o projeto teve como objetivo avaliar a expressão gênica e a quantificação da expressão das metaloproteinases MMP2 e MMP9 em células de LCM K562, Lucena-1 e FEPS, antes e após tratamento com metformina, buscando verificar os efeitos da metformina na expressão dessas enzimas. A quantificação da expressão gênica foi realizada através de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) e a quantificação da expressão das proteínas foi realizada a partir da degradação do substrato copolimerizado pelo método de zimografia. Os resultados mostraram que a metformina apresenta potencial para modular a expressão e a atividade das metaloproteinases estudadas.

**Palavras-chaves:** Leucemia mieloide crônica, MMP2, MMP9, células leucêmicas; fenótipo MDR, metformina

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Leucemia Mielóide Crônica.....	1
1.2. Células K562, Lucena e FEPS.....	2
1.3. Metástase.....	4
1.4. Metaloproteinases.....	5
1.5. Tratamento da LMC.....	6
1.6. Metformina.....	8
1.7. PCR em tempo real.....	10
1.8. Zimografia.....	11
2.MATERIAS E MÉTODOS.....	13
2.1. Materiais.....	13
2.2. Cultura de células e tratamento com metformina.....	13
2.3. Quantificação da expressão de MMP2 e MMP9 por qPCR.....	13
2.3.1 Extração do RNA total.....	13
2.3.2 Quantificação do RNA.....	14
2.3.3 Obtenção de cDNA por RT-PCR.....	14
2.3.4 Confeção dos oligonucleotídeos.....	15
2.3.5 Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR).....	15
2.4. Avaliação da expressão de MMP2 e MMP9 por zimografia.....	16
3.RESULTADOS.....	17
3.1. PCR em tempo real para os genes alvo.....	17
3.2. Quantificação da expressão de MMP2 e MMP9 por zimografia.....	19
4.DISSCUSSÃO.....	22
4.1. Quantificação relativa dos transcritos de MMP2 e MMP9.....	22
4.2. Quantificação de expressão de MMP2 e MMP9.....	23
5.CONCLUSÃO.....	26
6.LITERATURA CITADA.....	28



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1. Leucemia Mielóide Crônica

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma desordem clonal de células tronco hematopoiéticas que resulta em um incremento de células mielóides alteradas no sangue periférico e na medula óssea. Uma alteração consistente e característica de pacientes com LMC foi identificada e denominada cromossomo Philadelphia (RUDKIN; HUNGERFORD; NOWELL, 1964). Esse cromossomo Philadelphia (Ph), resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22, isto é, a  $t(9;22)$  conforme a figura 1, e leva à formação de um novo gene leucemia-específico, o *BCR-ABL*, (SAWYERS, 1999), que está envolvido com a transdução de sinais ativadores de proliferação.

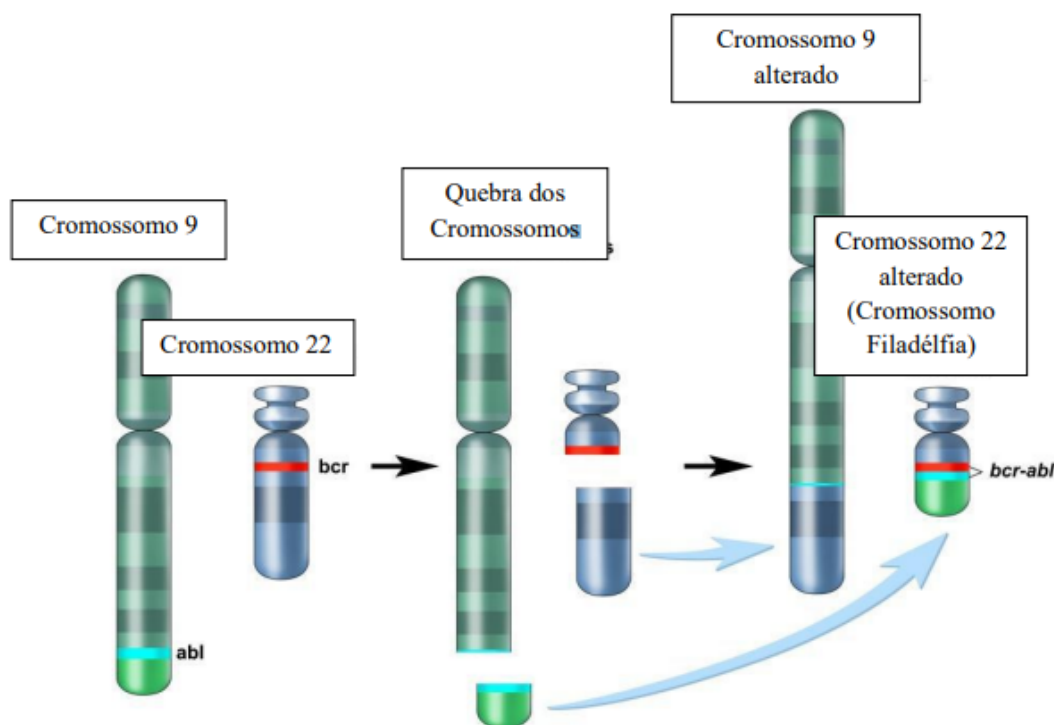


Figura 1 Ilustração adaptada de ALVES, 2011 para representação do cromossomo Filadélfia característico das células da medula de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica.

A proteína derivada desta fusão gênica é uma tirosina quinase citoplasmática que permanece constitutivamente ativa (QUINTÁS-CARDAMA; CORTES, 2009), e sua

presença é o que causa a mutação na célula-tronco, transformando-a em uma célula de leucemia uma vez que é capaz de modular positivamente muitas vias de sinalização que levam ao aumento da proliferação e à inibição da morte celular (DRUKER, 2008; THIELEN *et al.*, 2011).

O diagnóstico da doença está baseado principalmente na detecção do cromossomo Philadelphia (Ph). Os pacientes apresentam tipicamente perda de peso, anorexia e fadiga, além disso, é comum o achado de esplenomegalia em mais de metade deles no exame físico. Porém, por volta de 40% são assintomáticos e seus diagnósticos são baseados na contagem anormal de células (SAWYERS, 1999).

A LMC apresenta uma história trifásica. A progressão da doença se inicia na Fase Crônica (FC), benigna, caracterizada pela manutenção da capacidade de maturação das células mieloides; passa então pela Fase Acelerada (FA), em que ocorre evolução clonal resistente à terapia medicamentosa; finalizando na Fase Blástica ou Aguda (FB), também resistente à terapia convencional, em que as células falham em sua maturação e se assemelham aos mieloblastos ou linfoblastos encontrados em pacientes com leucemia aguda (SAWYERS, 1999).

Para o triênio de 2023 a 2025, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) o número estimado de casos novos de leucemia para o Brasil sendo de 11.540 casos, o que corresponde a um risco estimado de 5,33 por 100 mil habitantes, sendo 6.250 em homens e 5.290 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,90 casos novos a cada 100 mil homens e 4,78 a cada 100 mil mulheres em que a leucemia ocupa a décima posição entre os tipos de câncer mais frequentes. (SANTOS *et al.*, 2023)

Mundialmente, em 2020, foram estimados 475 mil casos de leucemia, o que equivale a 2,5% de todos os tipos de câncer. No Brasil, foram 6.738 óbitos por leucemia (3,18 por 100 mil). Nos homens ocorreram 3.703 óbitos (3,58 por 100 mil) e, nas mulheres, 3.035 óbitos (2,80 por 100 mil).

## **1.2. Células K562, Lucena e FEPS**

Admite-se que todas as células do sangue derivam de um único tipo celular da medula óssea, por isso chamada célula-tronco pluripotente. Estas células proliferam e formam duas linhagens: a das células linfoides, que forma linfócitos e as células NK (*Natural Killers*), e a das células mieloides, que origina os eritrócitos, granulócitos, monócitos e plaquetas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A hematopoiese está

acontecendo de forma contínua a fim de repor e renovar as células mieloides e linfoides. Entretanto, a perda da capacidade de manutenção deste processo homeostático pode desencadear um processo leucêmico.

As translocações cromossômicas são a causa mais comum de leucemias em humanos. Nesta anormalidade, o ponto de quebra nos cromossomos pode separar genes em duas partes e, durante o processo de reparo, produzir a justaposição de porções de genes diferentes. Em consequência, pode ocorrer ativação ou fusão gênica. A ativação gênica é produzida quando um proto-oncogene, que normalmente não seria expresso em um tipo celular, é introduzido no mesmo contexto cromossômico de um gene muito expresso nesta célula (TSUJIMOTO *et al.*, 1985).

A linhagem celular K562 foi estabelecida a partir do cultivo de células de um paciente com leucemia mieloide crônica, onde o cromossomo Philadelphia estava presente (LOZZIO; LOZZIO, 1975). Ela possui um considerável grau de plasticidade que permite sua diferenciação, quando submetida a diferentes agentes químicos (TSUJIMOTO *et al.*, 2003 - revisado), que faz da linhagem celular K562 um ótimo modelo experimental para o tratamento de células neoplásicas com agentes indutores de diferenciação celular. Esta linhagem celular apresenta mieloblastos como tipo celular (LOZZIO; LOZZIO, 1975) e é uma das linhas celulares mais estudadas e utilizadas na pesquisa sobre leucemia.

Essa linhagem celular K562 expressa a proteína oncogene BCR-ABL, a qual é responsável, em grande parte, pela resistência destas células aos protocolos de quimioterapia antineoplásica (COOPER, 2001; MARTINS *et al.*, 1997).

Essa é a proteína que se origina da translocação entre os braços longos dos cromossomos 9 e 22 (t(9,22)(q34; q11)), resultando em um cromossomo 22 encurtado. Nessa translocação, os primeiros exons do gene *c-BCR*, localizado no cromossomo 22, são fundidos aos exons 2-11 do gene *c-ABL*, oriundo do cromossomo 9. Assim, a proteína BCR-ABL, apresenta intensa atividade de tirosina-quinase, limitando a eficácia de quimioterápicos que tentam induzir a apoptose nos tratamentos da leucemia mieloide crônica (BEDI *et al.*, 1995). Além disso, a expressão de BCR-ABL é suficiente para transformar células hematopoiéticas em células leucêmicas (DALEY *et al.*, 1988).

Duas linhagens celulares, resistentes à múltiplas drogas, foram derivadas independentemente da mesma linhagem celular, K562: a Lucena e a FEPS.

Para induzir uma linhagem celular eritroleucêmica resistente, Rumjanek e colaboradores (V.M. RUMJANEK *et al.*, 1994; V.M. RUMJANEK *et al.*, 2001)

estabeleceram um modelo *in vitro* usando a linhagem celular K562, originalmente selecionada pela resistência ao alcaloide vincristina (T. TSURUO *et al.*, 1983), desenvolvendo assim um modelo experimental comparativo para células resistentes à múltiplos fármacos, e caracterizada pela alta expressão de glicoproteína-P (P-gp). O nome dado à linhagem celular MDR foi K562-Lucena1 (Lucena), para evitar a confusão com a linhagem celular parental K562.

Recentemente, o mesmo grupo desenvolveu outra linhagem celular derivada de K562 usando o quimioterápico daunorrubicina. A nova linhagem celular MDR, denominada FEPS, possui diferentes características da Lucena, como a menor expressão do receptor de morte celular CD95, maior expressão de P-gp e a presença de outra proteína relacionada ao MDR fenótipo, a ABCC1/MRP1 (N. DAFLON-YUNES *et al.*, 2013).

### 1.3. Metástase

Enquanto a remoção cirúrgica e a terapia adjuvante podem curar de maneira eficiente tumores primários que estejam localizados ou confinados, tumores metastáticos são mais desafiadores devido à natureza sistêmica e a resistência das células aos agentes terapêuticos. Este fato explica porque mais de 90% das mortes por câncer resultam de metástases (GUPTA, MASSAGUÉ, 2006).

Metástase é a presença de células ou massas tumorais em tecidos que não apresentam continuidade com o tumor primário. A principal característica das neoplasias malignas é a disseminação das células tumorais que ocorre através dos vasos sanguíneos, linfáticos ou cavidades corporais. Metástase é um processo complexo que envolve adesão, migração celular e proteólise da matriz extracelular e da membrana basal. O desenvolvimento dela diminui de maneira acentuada a possibilidade de cura dos pacientes (ALMEIDA, 2016).

A adesão de células progenitoras hematopoiéticas a células secretoras de citocinas, como é o caso das células estromais, regula o destino que estas células hematopoiéticas terão. Dependendo do sinal recebido através das citocinas, essas células progenitoras hematopoiéticas poderão sofrer apoptose ou proliferação, esta que pode gerar tanto novas células progenitoras (auto renovação) ou gerar células diferenciadas (diferenciação). Em células leucêmicas com a translocação BCR-ABL, esta adesão a

células estromais está grandemente reduzida e, desta forma, estas perdem a capacidade de regulação da proliferação (VERFAILLIE *et al.*, 1997).

As células malignas nos vasos sanguíneos e linfáticos são levadas pela circulação (MONTENEGRO MR., 1995). Na corrente sanguínea, necessitam ainda atravessar as células endoteliais e a membrana basal (MB) em um local distante, e só então emigrarem do vaso para um tecido íntegro, no qual irão se proliferar e caracterizar o processo de metástase (HONG SD, HONG SP, LEE JI, LIM CY., 2000). Para a degradação da MB, é necessária a presença de enzimas proteolíticas, dentre as quais as gelatinases apresentam grande importância. Como principais funções, as metaloproteinases-2 e -9 fragmentam laminina e colágeno tipo IV, componentes fundamentais da MB (THOMAS GT., LEWIS MP., 1999).

#### **1.4. Metaloproteinases**

De acordo com a especificidade do substrato, similaridade de sequência e organização dos domínios, as metaloproteinases (MMPs) são divididas em seis grupos principais: Colagenases, Gelatinases, Estromelinas, Matrilisinas, Metaloproteinases de membrana e outras MMPs (MURPHY; NAGASE, 2008; AMALINEI *et al.*, 2007), sendo as Gelatinases (MMP-2 e MMP-9) as mais estudadas devido à sua habilidade em degradar os componentes da MB (AIMES; QUIGLEY, 1995).

Essas enzimas têm um papel importante no processo invasivo metastático e de tumores, incluindo o da LMC. Uma característica das células tumorais que se adaptam a diferentes tecidos é a habilidade em remodelar os componentes da matriz extracelular (MEC) do tecido invadido. Essa característica é atribuída à secreção de uma variedade de proteases, principalmente as MMPs (STAMENKOVIC, 2000).

Os níveis das MMPs nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis, entretanto, sua expressão é substancialmente aumentada na maioria das neoplasias malignas, apresentando importante ação proteolítica nos processos de invasão e metástase. Neste aspecto, as MMP2 e MMP9 têm um papel crucial na progressão tumoral, atuando diretamente sobre os componentes da MB, que é a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células neoplásicas (THOMAS GT, LEWIS MP, SPEIGHT PM, 1999). Uma das mais sérias consequências da invasão é a produção de metástases.

A MEC é definida como uma complexa rede de componentes proteicos, proteoglicanos e glicoproteínas adesivas que propiciam suporte mecânico para células e tecidos. A MEC regula processos celulares distintos como o crescimento, morte, adesão, migração, invasão, expressão gênica e diferenciação. Tais eventos celulares regulam processos fisiológicos como desenvolvimento embrionário, morfogênese tecidual e angiogênese. A MEC atua como um reservatório de fatores de crescimento estando envolvida também em diversos processos patológicos (VU; WERB, 2000; NAGASE; WOESSNER, 1999).

A remodelação da MEC exige quebra e síntese constante dos seus elementos, a qual é efetuada por uma série de enzimas proteolíticas dentre as quais se destacam as metaloproteinases da matriz (JOHN; TUSZYNSKI, 2001; MACCAWLEY LJ; MATRISIAN, 2001). As MMPs pertencem a uma família de enzimas que necessitam da presença do zinco para realizarem suas funções (WOESSNER, 1998).

A atividade das MMPs pode ser controlada por uma série de inibidores endógenos. Esses inibidores, secretados pelas próprias células, são conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). Assim, a atividade e a produção dessas enzimas são controladas através de sua ativação ou inibição (MATRISIAN, 1990).

O balanço entre as MMPs e os TIMPs é, em grande parte, responsável pelo controle da degradação dos elementos formadores da matriz extracelular. Um desequilíbrio entre essas duas moléculas é responsável por diversas condições patológicas, como por exemplo, a progressão do câncer e as doenças cardiovasculares agudas e crônicas (BODE *et al.*, 1999).

## **1.5. Tratamento da LMC**

Muitos são os marcos terapêuticos ao longo dos anos no tratamento da LMC. O arsênio foi utilizado em 1865 em dois pacientes (DEININGER, 2011). O uso de irradiação esplênica ocorreu por volta de 1900. O controle efetivo das contagens celulares em sangue periférico foi possível com o uso de busulfan, em 1953, que resultou em melhora na sobrevida e permaneceu como tratamento padrão durante 35 anos. Dez anos mais tarde, a hidroxiureia foi empregada com o mesmo propósito, proporcionando melhor tolerabilidade. Porém, nenhum desses agentes promove resposta citogenética ou evita a crise blástica (HEHLMANN; HEMPEL; HASFORD; KOLB; PRALLE; HOSSFELD, 1994).

Até 1970, a leucemia mieloide crônica era uma doença fatal. Essa realidade foi modificada após introdução do transplante de medula óssea alogênico, em 1986, com possibilidade de cura para a doença. Logo em seguida, o uso do interferon alfa mostrou induzir respostas citogenéticas completas e duráveis, além de sobrevida longa, embora numa proporção pequena de pacientes (PAVLU; SZYDLO; GOLDMAN; APPERLEY, 2011).

No final dos anos 80, o acúmulo de dados sobre o mecanismo molecular da proteína híbrida BCR-ABL, estimulou o desenvolvimento de terapias moleculares que possuíam como alvo o domínio tirosino quinase, com a finalidade de inibir este domínio (LEVITZKI; GAZIT, 1995; DRUKER; LYDON, 2000; TRAXLER *et al.*, 2001). O inibidor que apresentou maior sucesso na interrupção do sinal oncogênico foi o mesilato de imatinibe (IM - *imatinib mesylate*), conhecido comercialmente como STI571 ou Gleevec. Ele é o primeiro e principal inibidor seletivo de tirosino quinase indicado para LMC capaz de inibir não só a atividade das proteínas relacionadas à ABL (ARPs), como também o receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas e o receptor KIT (BUUCHDUNGER *et al.*, 1996; OKUDA *et al.*, 2001). Como consequência desta inibição, a proliferação das células é inibida, induzindo apoptose nas células leucêmicas (DRUKER *et al.*, 1996).

Apesar da aparente eficácia terapêutica do IM, alguns pacientes se tornam intolerantes ao mesmo e em outros casos, suas células adquirem resistência. A aquisição de resistência pelas células leucêmicas ao IM se deve principalmente à mutações no gene *BCR-ABL* (DRUKER *et al.*, 2006; GRISWOLD *et al.*, 2006; BRECCIA E ALIMENA, 2009).

O fenômeno de resistência levou ao desenvolvimento de inibidores de segunda geração, dentre os quais desatinibe e nilotinibe. O desatinibe é 325 vezes mais potente que o IM em inibir a proteína quinase BCR-ABL, sendo capaz de ser ativo contra a maioria das mutações da oncoproteína BCR-ABL resistentes ao IM (DELAMAIN; CONCHON, 2008). Além dela, o desatinibe também inibe outras quinases relacionadas à doença tais como: c-Kit, PDGFR e Src (WARMUTH *et al.*, 2003; TALPAZ *et al.*, 2006; HANTSCHHEL *et al.*, 2008). Já o nilotinibe é de 20 a 50 vezes mais potente que o IM, mas não tem nenhum efeito sobre a Src ou sobre a quinase BCR-ABL que apresenta a mutação T315I, na qual ocorre a troca do aminoácido treonina pela isoleucina (KANTARJIAN *et al.*, 2006).

Apesar da potência de inibição destes dois fármacos de segunda geração, existem relatos na literatura sobre a aquisição de resistência também à eles. Assim, inibidores de outras quinases têm sido desenvolvidos: o MK-0457 é um inibidor da aurora quinase e, portanto, afeta a formação do fuso mitótico e, conseqüentemente, induz a apoptose (GILES *et al.*, 2007). Além dos inibidores mencionados acima, existem os inibidores de terceira geração como o inibidor SKI006 (Bosutinibe) que atua sobre quinases da família Src (SFK) e Abl. Ao contrário do imatinibe e desatinibe, esse inibidor é mais específico por não inibir significativamente a atividade das quinases c-Kit e PDGFR (GOLAS *et al.*, 2003; GOLAS *et al.*, 2005).

## 1.6. Metformina

A Metformina (1,1-dimetilbiguanida) pertence à classe de biguanida de agentes antidiabéticos, que tem sido amplamente utilizado há muitos anos no tratamento de diabetes Mellitus de tipo 2 (VIOLLET; GUIGAS; SANZ GARCIA; LECLERC; FORETZ; ANDREELLI, 2012). Curiosamente, há uma crescente de estudo de evidências em que a metformina também tem efeitos quimio-sensibilizadores e quimiopreventivos contra a carcinogênese em geral (ZHUANG; KEITH, 2008; XIAO; HE; LU *et al.*, 2012).

A eficácia da metformina juntamente com seu baixo custo, faz da metformina uma das principais drogas para o tratamento da diabetes Mellitus de tipo 2 e das condições relacionadas com o diabetes. (AMERICAN DIABETES, A., 2016; MARUTHUR, N. M.; TSENG, E.; HUTFLESS, S.; WILSON, L. M.; SUAREZ-CUERVO, C.; BERGER, Z.; CHU, Y.; IYOHA, E.; SEGAL, J.B.; BOLEN, S., 2016)

É consumida por mais de 150 milhões de indivíduos em todo o mundo e, juntamente com glibenclamida, compreendem os dois antidiabéticos orais classificados na Organização Mundial da Saúde Lista Modelo de Medicamentos Essenciais (WHO, 2015).

A metformina tem sido associada a um impacto benéfico contra as complicações cardiovasculares da diabetes e, também, com menor risco de desenvolvimento de câncer e melhora do prognóstico do câncer em indivíduos diabéticos (GIOVANNUCCI, E.; HARLAN, D. M.; ARCHER, M. C.; BERGENSTAL, R. M.; GAPSTUR, S. M.; HABEL, L. A.; POLLAK, M.; REGENSTEINER, J. G.; YEE, D., 2010; COPERCHINI, F.; LEPORATI, P.; ROTONDI, M.; CHIOVATO, L., 2015).



Várias linhas de evidência apoiam que a metformina exerce seus efeitos antineoplásicos de uma forma sistêmica e também em uma célula-autônoma. Ela é uma biguadina que reduz a produção de glicose com uma menor ação sensibilizadora da ação da insulina sendo então uma redutora de neoglicogênese. Os efeitos antitumorais da metformina são baseados, então, na sua capacidade para inibir a gliconeogênese hepática e de estimular a captação de glicose no músculo e adipócitos, diminuindo assim os níveis de glicose e insulina no sangue. Este efeito da metformina sobre a insulina é importante no tratamento de tumores relacionados com hiperinsulinemia (tumores de insulina-sensível) (DOWLING; GOODWIN; STAMBOLIC, 2011).

Estudos epidemiológicos recentes têm mostrado que o uso de metformina é capaz de reduzir a incidência do aparecimento de tumores em pacientes diabéticos em comparação aos níveis apresentados por pacientes diabéticos tratados com terapias alternativas (GALLAGHER; LEROITH, 2011). Adicionalmente, tais estudos demonstraram também que o tratamento de pacientes diabéticos com metformina reduz o risco de desenvolvimento de câncer a níveis inferiores aos observados em pacientes não diabéticos (BERSTEIN *et al.*, 2011; ILIOPOULOS *et al.*, 2011; MONAMI *et al.*, 2011), sugerindo a potencialidade do uso da metformina como agente de quimioprevenção ao câncer. Importante ressaltar, que a capacidade quimiopreventiva da metformina também tem sido demonstrada em vários modelos animais, reforçando sua capacidade de inibir o desenvolvimento e progressão de tumores (MARTIN; MARAIS, 2012).

Ao nível sistêmico, o papel preventivo da metformina está associado, em primeiro lugar, à diminuição da produção de glicose hepática, o que leva ainda mais à melhoria da hiperinsulinemia secundária. A hiperinsulinemia aumenta o risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com diabetes Mellitus tipo 2 (GIOVANNUCCI, E.; HARLAN, D. M.; ARCHER, M. C.; BERGENSTAL, R. M.; GAPSTUR, S. M.; HABEL, L. A.; POLLAK, M.; REGENSTEINER, J. G.; YEE, D., 2010), sendo também um fator prognóstico adverso para certos tipos de tumores, incluindo os de mama, cólon e próstata (POLLAK, M. N., 2012).

Uma vez que a insulina e o Fator de Crescimento semelhante à Insulina têm sido largamente apontados por promover a tumorigênese através da estimulação da proliferação de células epiteliais (POLLAK, M., 2008), a restauração dos níveis plasmáticos de insulina pela metformina pode atuar contra o crescimento e desenvolvimento de células tumorais em tecidos sensíveis à insulina (PERNICOVA, I.; KORBONITS, M., 2014).

Embora consiga suprimir as reações imunes que promovem a tumorigênese, a metformina também pode aumentar as respostas inflamatórias antitumorais, aumentando a população de linfócitos infiltrantes de tumores T CD8<sup>+</sup>, protegendo-os da apoptose e da depleção funcional (EIKAWA, S.; NISHIDA, M.; MIZUKAMI, S.; YAMAZAKI, C.; NAKAYAMA, E.; UDONO, H., 2015). Dados encorajadores de Pearce e colegas demonstraram que a expansão das células T de memória CD8<sup>+</sup> aumenta a eficácia de uma vacina anticancerígena experimental em ratinhos, após a administração de metformina (PEARCE, E. L.; WALSH, M. C.; CEJAS, P. J.; HARMS, G. M.; SHEN, H.; WANG, L. S.; JONES, R. G.; CHOI, Y., 2009).

Ao nível celular, a capacidade antineoplásica da metformina é regida principalmente pela inibição do complexo mitocondrial I e pela ruptura da fosforilação oxidativa (PIEROTTI *et al*, 2013).

### 1.7. PCR em tempo real

O DNA consiste em uma dupla hélice de duas cadeias açúcar-fosfato antiparalelas e enroladas para a direita, com aproximadamente dez pares de bases por volta de 34 Å e com suas bases quase perpendiculares ao eixo da hélice. As bases de fitas opostas ligam-se por ligações de hidrogênio de uma maneira geometricamente complementar para formarem pares de base proposto no modelo de Watson-Crick (VOET, D., 2006).

O DNA é replicado na direção 5'→ 3' pela união de desoxinucleotídeos trifosfatados sobre moldes de DNA complementares. A replicação é iniciada pela geração de pequenos iniciadores de RNA pela primase e pela RNA-polimerase. O DNA é depois estendido a partir das extremidades 3' dos iniciadores pela ação de uma DNA-polimerase (Pol III). A fita-líder em uma forquilha de replicação é sintetizada de forma contínua, enquanto a fita tardia é sintetizada descontinuamente, pela formação de fragmentos de Okasaki (VOET, D., 2006).

A reação em cadeia polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) possibilita por meio do uso da enzima DNA-polimerase (que participa da replicação do material genético) a síntese de fragmentos de DNA. A enzima sintetiza uma sequência determinada por indicadores, desde que esta já se encontre ligada a uma das cadeias de DNA no ponto escolhido, e amplifica essa sequência em bilhões de cópias.

A PCR em tempo real realiza a quantificação de fragmentos de DNA e RNA de maneira precisa e com maior reprodutibilidade, porque determina valores durante a fase exponencial da reação.

O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *Cycle Threshold* (CT). Este ponto permite a quantificação exata e reprodutível baseado na fluorescência. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Os sistemas de detecção mais utilizados são os chamados sistema SYBR® Green e sistema TaqMan® (VITZTHUM *et al.*, 1999).

Na PCR, uma amostra de DNA é separada em fitas simples e incubada com DNA-polimerase, dNTP e dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers*), cujas sequências flanqueiam o segmento de DNA de interesse. Os iniciadores conduzem a síntese de fitas complementares ao DNA-alvo pela DNA-polimerase. Múltiplos ciclos desse processo, cada um multiplicando a quantidade do DNA-alvo, amplificam geometricamente um DNA a partir de quantidades ínfimas como uma única cópia do gene. Em cada ciclo, as duas fitas do duplex de DNA são separadas pelo aquecimento, então a mistura de reação é resfriada para permitir que os iniciadores se anelem aos seus segmentos complementares no DNA. Em seguida, a DNA-polimerase sintetiza as fitas complementares. A utilização de uma DNA-polimerase termoestável elimina a necessidade de se adicionar mais enzima após cada etapa de aquecimento (o calor inativa a maioria das enzimas). Dessa forma, na presença de quantidades suficientes de iniciadores e de dNTP, a PCR é realizada simplesmente pela variação cíclica da temperatura.

Vinte ciclos de PCR aumentam a quantidade de sequência-alvo em cerca de um milhão de vezes com alta especificidade. A PCR pode amplificar um DNA-alvo presente apenas uma vez em uma amostra de  $10^5$  células de modo que esse método pode ser usado sem purificação prévia do DNA. O DNA amplificado pode ser sequenciado ou clonado (VOET, D., 2014).

## **1.8. Zimografia**

A zimografia é uma técnica proteômica eletroforética que permite a quantificação e a visualização do tamanho aproximado de enzimas em amostras biológicas, com base na degradação de um substrato copolimerizado juntamente com os géis de eletroforese.

No caso das proteases, utilizam-se como substrato a gelatina, caseína, fibronectina e colágeno, dentre outros (LEBER; BALKWILL, 1997; ITOH; ITO *et al.*, 1998; TROEBERG; NAGASE, 2003; SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005).

Esta técnica é muito útil na análise da composição de proteases de amostras biológicas complexas, pois a visualização dessas proteases depende diretamente da atividade proteolítica (KJELDSEN; JOHNSEN *et al.*, 1993; FEITOSA; GREMSKI *et al.*, 1998; KIMURA; SHINOHARA *et al.*, 2001; SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005).

A zimografia com substrato de gelatina é uma técnica amplamente usada no estudo de metaloproteinases, especialmente as MMPs, sendo compatível com o sistema de tampão de Laemmli, comumente utilizado em eletroforese SDS-PAGE (HUMMEL, PENHEITER *et al.*, 1996).

Esta técnica consiste em copolimerizar o substrato de gelatina em um gel comum de SDS-PAGE. Como o substrato está preso nos poros do gel, ele não migra quando é aplicada a corrente elétrica durante a eletroforese. A amostra biológica é desnaturada por SDS, porém não reduzida, e então aplicada no gel para separação. Após a corrida eletroforética, as proteases separadas são renaturadas dentro do gel, por lavagens repetidas com um detergente não-iônico, como o Triton X-100, que substitui o SDS do gel (HEUSSEN; DOWDLE, 1980).

O gel é então incubado em um tampão adequado, permitindo que as proteases renaturadas realizem a digestão do substrato em uma zona ao redor de sua posição de eletroforese. Estas zonas são visualizadas ao corar o gel com Coomassie Blue, onde o gel inteiro fica azul e as áreas de digestão aparecem como zonas transparentes (TROEBERG; NAGASE, 2003).

As proteases são então identificadas comparando as áreas digeridas com os padrões de peso molecular e/ou fazendo testes de inibição com inibidores específicos a certas classes de proteases (KOYAMA H, IWATA H, KUWABARA Y, IWASE H, KOBAYASHI S, FUJII Y., 2000).

A maioria dos estudos para detecção dos níveis das MMP2 e MMP9 utilizam técnicas de zimografia. Ela demonstra a ação proteolítica mais do que a antigenicidade, e assim, fornece medidas semiquantitativas das MMP no tumor, além de distinguir a MMP de forma ativa da proenzima. Desta maneira, a avaliação da zimografia mostra-se importante na detecção das MMPs (IKEBE T, SHINOHARA M, TAKEUCHI H, BEPPU M, KURAHARA S, NAKAMURA S, ET AL., 1999).

## 2. MATERIAS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

Meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium), soro fetal bovino e antibióticos foram obtidos da Invitrogen (Eugene, OR, EUA). Metformina (1,1-Dimethylbiguanide hydrochloride) foi obtida da Enzo Life Sciences. Mesilato de imatinibe (Gleevec®) foi obtido da LC Laboratories (Woburn, MA, USA). MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Trizol<sup>®</sup>, *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, Deoxyribonuclease I e *SYBR<sup>®</sup>-Green PCR Master Mix* foram obtidos da Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA. *GoTaq<sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase* foram adquiridos da Promega, Wisconsin, EUA. Marcador de peso molecular Spectra foi adquirido da Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA. Todos os demais reagentes utilizados tinham o maior grau de pureza disponível comercialmente e água utilizada para o preparo das soluções foi bidestilada e purificada pelo sistema Milli-Q. Células K562, Lucena e FEPS, disponíveis no laboratório, foram gentilmente cedidas pela professora Vivian M. Rumjanek (Universidade Federal do Rio de Janeiro).

### 2.2. Cultura de células e tratamento com metformina

Células K562, Lucena e FEPS foram mantidas em meio RPMI, contendo 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram plaqueadas em uma densidade inicial de  $5 \times 10^4$  células/mL e mantidas em atmosfera umidificada, 5% CO<sub>2</sub> a 37°C procedendo-se a repiques a cada 48 horas em placas de 96 poços. Para os experimentos envolvendo exposição das células à metformina, as células foram plaqueadas na densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL e expostas ao euglicemiante por 24 e 48 horas. As concentrações utilizadas foram 5, 20 e 40 mM de metformina.

### 2.3. Quantificação da expressão de MMP2 e MMP9 por qPCR.

#### 2.3.1 Extração do RNA total

As células foram retiradas das placas de petri, colocadas em tubos falcon e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C, o meio de cultura foi descartado e na

fração celular acrescentado 1 ml de Trizol<sup>®</sup>, seguindo as especificações do fabricante. A ruptura e homogeneização das células até completa dissociação foi realizada utilizando equipamento Polytron (Polytron<sup>®</sup>, Kinematica AG, Luzern, Suíça) e, a seguir, transferidas para microtubos, aos quais foram adicionados 200 µL de clorofórmio e agitados por inversão por 15 segundos. Os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação, aproximadamente 400 uL da fase aquosa (superior) foram transferidos para um novo microtubo, ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol. Deixar a -20°C por 1 hora. Após centrifugação a 12000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de RNA foi lavado uma vez com 1 mL de etanol 75% em água livre de RNase. Os microtubos foram novamente centrifugados a 14000 rpm por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o RNA seco em temperatura ambiente, por 30 minutos. O RNA foi então solubilizado em 50 µL de água livre de RNase em banho seco por 5 min e depois mais 1 min em temperatura ambiente. Após a quantificação foi armazenado a -80°C.

### 2.3.2 Quantificação do RNA

O RNA livre de DNA foi avaliado quanto a sua concentração e pureza espectrofotometricamente a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

### 2.3.3 Obtenção de cDNA por RT-PCR

Os cDNAs foram sintetizados a partir de 2 µg do RNA total, utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, seguindo especificações do fabricante. A um microtubo foram adicionados 2 µg de RNA total, 2 ul de tampão RT, 0,8 ul de mix de dNTPs a 100 mM, 2 ul de oligonucleotídeos randômicos, 1 ul de enzima *Multi Scribe Reverse Transcriptase*, 1 ul de inibidor de RNase e água livre de RNase para um volume final de 10 µL (3,2 ul). As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 120 minutos, e mantidas a 4°C no termociclador Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Para checar a eficiência da reação de transcrição reversa, a integridade do RNA e a possível contaminação com DNA genômico, foram realizadas reações de PCR convencional, utilizando iniciadores específicos para amplificação do gene da *β-actina* e do

*GAPDH*. As reações foram feitas utilizando 1x de tampão GoTaq Flexi, 0,2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de mix de dNTPs, 0,5 mM de cada um dos iniciadores, 1,25 U de enzima GoTaq DNA Polymerase e 10 mg de DNA. Os ciclos das reações serão aquecidos previamente de 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 30 segundos.

#### 2.3.4 Confeção dos oligonucleotídeos

Para o desenho dos oligonucleotídeos foi utilizada a sequência consenso de RNAm dos genes estudados depositadas no *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) e o programa *CLC Main Workbench* (CLCbio version 4.6). A especificidade dos iniciadores foi avaliada utilizando o *Primer-Blast* ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)) (Ye et al., 2012) e a ferramenta de PCR *in silico* da *UCSC Genome Browser*. Para o desenho dos iniciadores procurou-se seguir os seguintes critérios: iniciadores em exons distintos; composição de bases C e G dos iniciadores de 40 a 60%; com citosina ou guanina nas extremidades; comprimentos de no mínimo 15 e no máximo 22 bases; temperatura de anelamento entre 50°C e 60°C; diferença de no máximo 2°C entre os pares de iniciadores; e tamanho de produto amplificado entre 80 e 150 pares de bases. Para verificar a presença de estruturas secundárias entre os homo ou heterodímeros foi utilizado o programa OLIGOTECH versão 1.00 (Copyright© 1995), considerando como permitido a formação destas estruturas na temperatura de até 20°C. Os iniciadores foram diluídos a uma concentração estoque de 100 µM, de onde foram feitas alíquotas de trabalho na concentração de 10 µM. A síntese destes oligonucleotídeos foi realizada pela empresa *Integrated DNA Technologies, Inc* (Coralville, IA, EUA).

#### 2.3.5 Reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)

A reação da polimerase em cadeia em tempo real (qPCR) foi realizada utilizando o reagente SYBR<sup>®</sup>Green PCR Master Mix, incluindo AmpliTaq-GOLD polymerase (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) no sistema *Step One Plus* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Todas as reações foram feitas em triplicata em placas de 96 poços para tempo real (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), com a utilização do sistema de detecção de sequências *StepOne Software v2.3* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). Para as reações foram utilizados 10-300 ng de cDNA,

5  $\mu\text{L}$  de SYBR<sup>®</sup>-Green, oligonucleotídeos nas concentrações que foram determinadas nas padronizações e água livre de RNase para volume final de 10  $\mu\text{L}$  por poço. As reações foram incubadas a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto e um ciclo final de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos no *Step One Plus Thermal Cycler* (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A quantificação relativa dos transcritos de cada gene estudado foi realizada de acordo com o método relativo de curvas padrão pelo método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Livak & Schmittgen, 2001). A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. Controles negativos foram utilizados em paralelo para confirmar a ausência de qualquer tipo de contaminante no meio reacional. Todas as reações foram submetidas às mesmas condições de análise e normalizadas pelo sinal do corante de referência passiva ROX (colocado na reação juntamente com o SYBR<sup>®</sup>Green) para correção de flutuações na leitura decorrentes a variações de volume e evaporação ao longo da reação. O resultado, expresso em valor de CT, se refere ao número de ciclos de PCR necessários para que o sinal o fluorescente atinja o limiar de detecção.

#### **2.4. Avaliação da expressão de MMP2 e MMP9 por zimografia**

Após exposição das células a metformina, o meio de cultura foi coletado, centrifugado a 14.000 rpm por 15 min e o sobrenadante concentrado. As concentrações de proteínas das amostras foram determinadas utilizando o método de Lowry, normalizadas com água e armazenadas a -20°C. A atividade gelatinolítica foi avaliada pelo fracionamento das metaloproteinases em gel de poliacrilamida 12% contendo 4% de gelatina através de eletroforese. Para isso foram aplicados ao gel 100  $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra. Após o fracionamento, os géis foram lavados em solução aquosa de Triton X-100 (2% m/v) para renaturação das enzimas e incubados por 18 h em tampão de proteólise (Tris-CaCl<sub>2</sub>) a 37°C. Os géis foram corados com solução contendo corante Coomassie Blue R-250 por 1 h. A seguir, os géis foram descorados e fixados com solução contendo 50% de metanol e 5% de glicerol (SHAPIRO *et al.*, 2001). As bandas obtidas foram quantificadas por densitometria empregando-se o programa *ChemiDoc<sup>™</sup> MP Imaging System with Image Lab<sup>™</sup> Software* (Bio-Rad, California, USA) e os resultados serão representados relativos ao controle (atribuído valor 1).



### 3. RESULTADOS

#### 3.1. PCR em tempo real para os genes alvo

A quantificação relativa dos transcritos de cada gene estudado foi realizada de acordo com o método relativo de curvas padrão pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Dessa maneira, como a eficiência da reação dos genes estudados não foi de 100%, os valores de eficiência calculados de acordo com a curva padrão foram utilizados através da seguinte fórmula:

$$RQ = \frac{E_{\text{alvo}}^{\Delta C_t \text{ alvo (controle - alvo)}}}{E_{\text{ref}}^{\Delta C_t \text{ ref (controle - alvo)}}$$

Os valores de RQ (*Relative Quantification*) representam a quantificação da expressão gênica, sempre em relação ao seu controle e normalizados contra um gene de referência (no caso, a actina), cuja expressão variou entre as linhagens e entre as concentrações dos tratamentos. Esses valores plotados originaram os gráficos ilustrados nas Figuras 2 e 3.

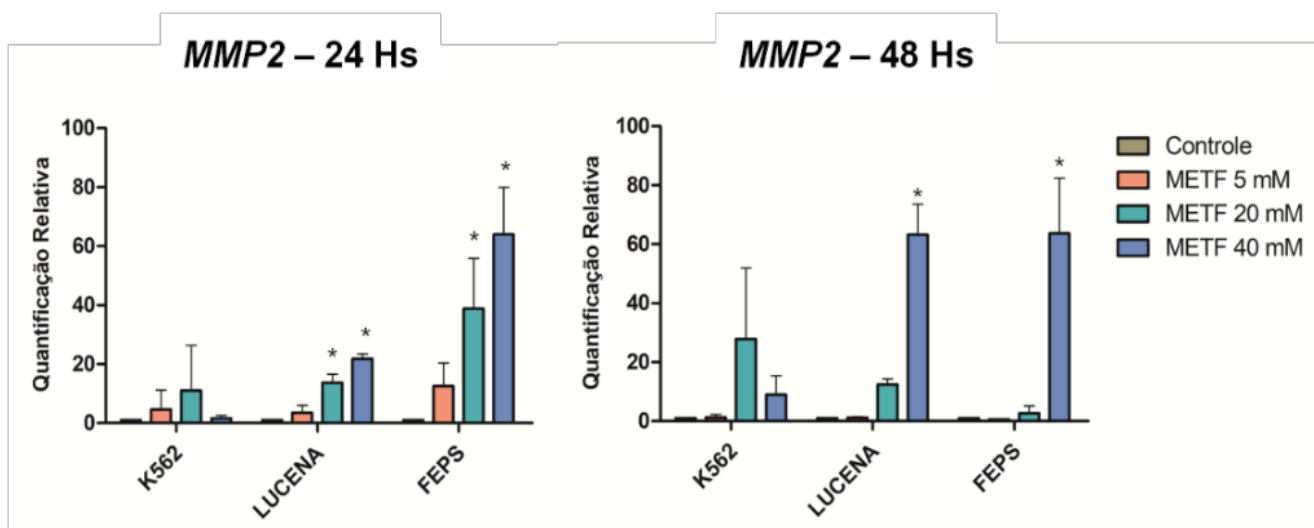


Figura 2. Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP2 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Tukey). \* =  $p < 0,05$ .

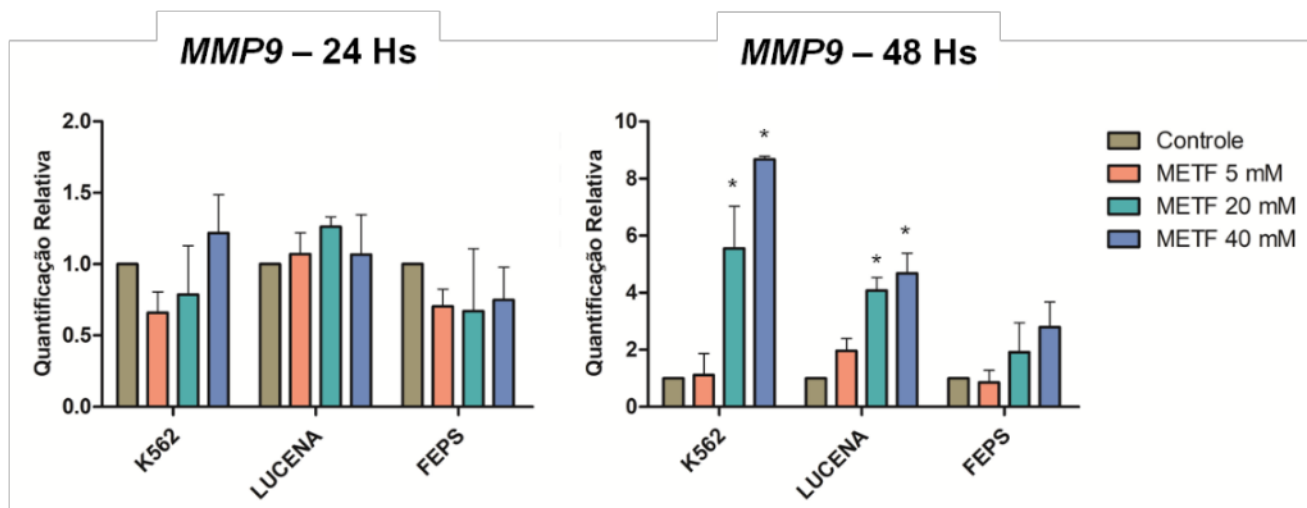


Figura 3. Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP9 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Tukey). \* =  $p < 0,05$ .

Os valores de Delta Ct representam as expressões dos transcritos de forma comparativa entre as linhagens. Esses valores plotados originaram os gráficos ilustrados nas Figuras 4 e 5.

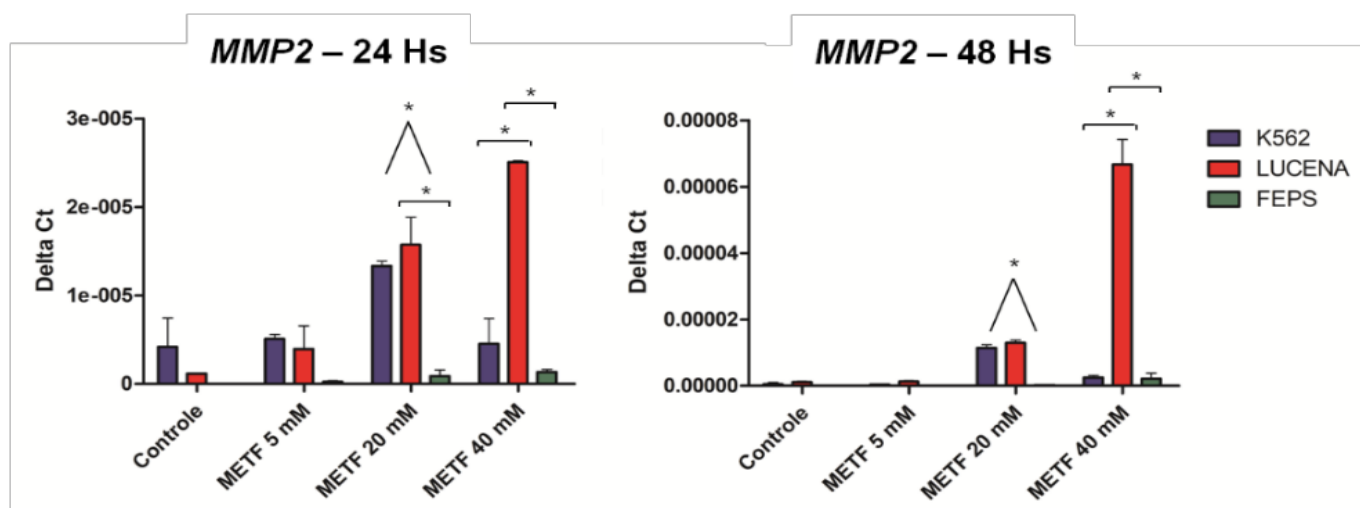


Figura 4 Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP2 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Delta CT” apresentam as diferenças estatisticamente significativas das linhagens K562, Lucena e FEPS tratadas com metformina quando comparadas entre si (Two Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .

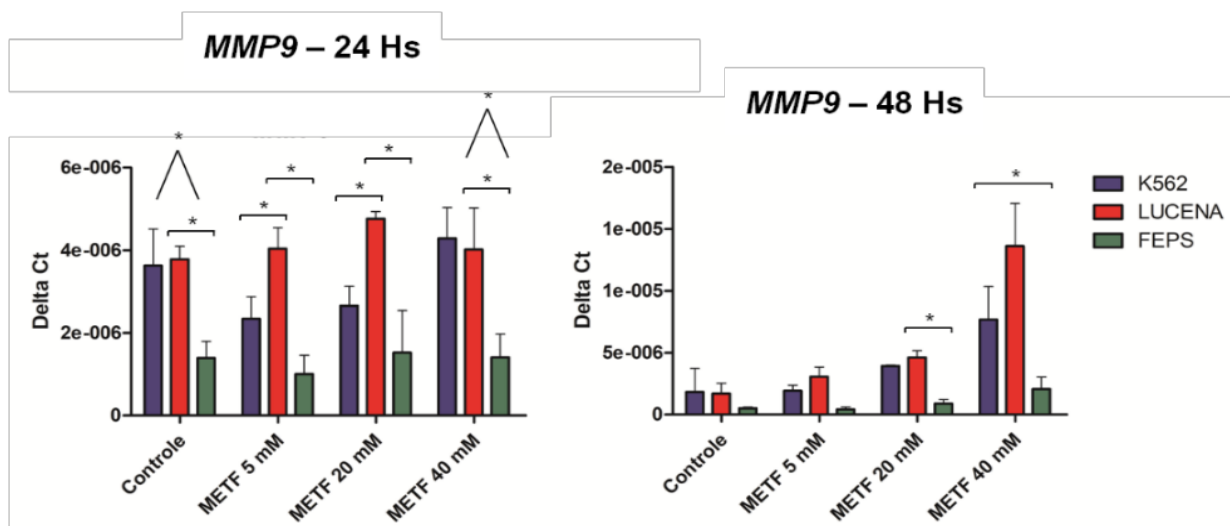


Figura 5 Gráficos representativos da expressão dos transcritos para o gene MMP9 avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Delta Ct” apresentam as diferenças estatisticamente significativas das linhagens K562, Lucena e FEPS tratadas com metformina quando comparadas entre si (Two Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .

### 3.2. Quantificação da expressão de MMP2 e MMP9 por zimografia

Os ensaios de zimografia foram padronizados para que fossem obtidos os resultados mais adequados, de forma que para estes ensaios foram utilizados géis de acrilamida/bisacrilamida 29:1 de 12%, 4% de gelatina, quantidade de 100 ug de proteínas totais e 18 horas de tempo de incubação para a ação das MMPs. A Figura 6 apresenta as fotos dos géis resultantes dos ensaios.

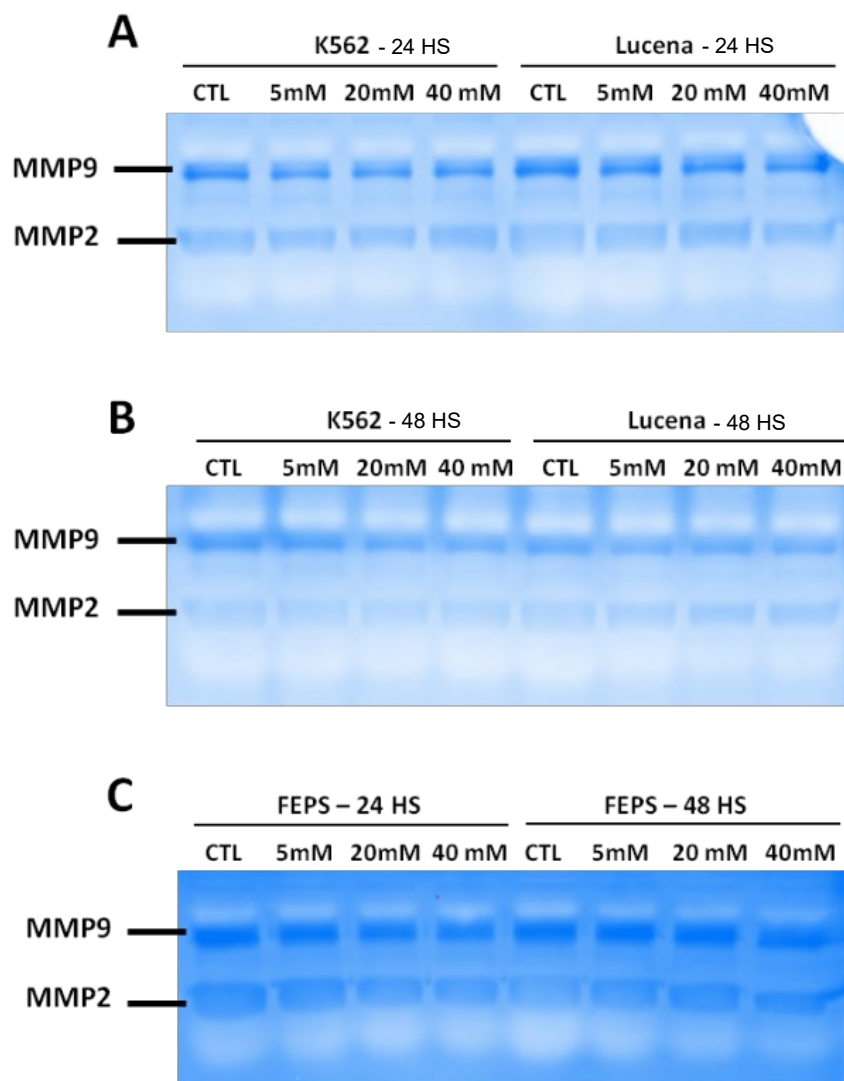


Figura 6. Fotos correspondentes aos géis de zimografia. As bandas brancas indicam a ação gelatinolítica das metaloproteinases. À esquerda estão identificados os tamanhos de bandas correspondentes às MMPs 2 e 9. A: amostras dos tratamentos com as linhagens K562 e Lucena após 24 horas de exposição com metformina. B: amostras dos tratamentos com as linhagens K562 e Lucena após 48 horas de exposição com metformina. C: amostras dos tratamentos com a linhagem FEPS após 24 e 48 horas de exposição com metformina.

Para as análises densitométricas foi utilizado o programa *ChemiDoc™ MP Imaging System with Image Lab™ Software* (Bio-Rad, California, USA) e os resultados serão representados relativos ao controle (atribuído valor de 1). As Figuras 7 e 8 representam as análises de densitometria das bandas evidenciadas nos géis apresentados

acima, bem como mostram as diferenças de atividade das metaloproteinases entre os tratamentos com metformina.

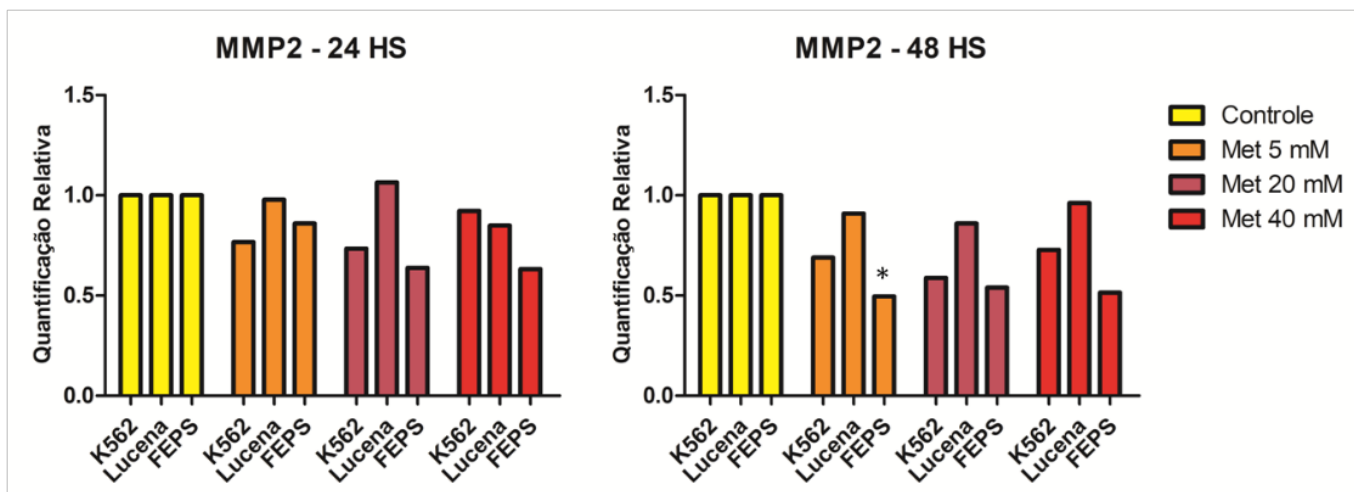


Figura 7. Gráficos representativos da quantificação relativa de MMP2, avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .

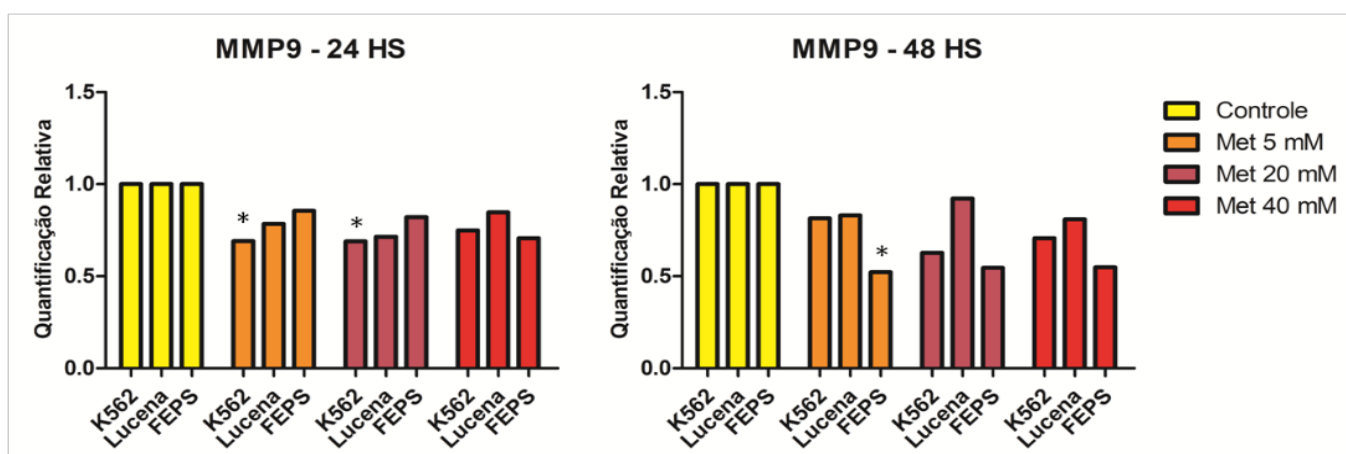


Figura 8. Gráficos representativos da quantificação relativa de MMP9, avaliados após 24 e 48 horas de tratamento com metformina. Os gráficos de “Quantificação Relativa” apresentam as diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens tratadas com metformina quando comparados aos seus controles (One Way ANOVA seguido de Teste de Bonferroni). \* =  $p < 0,05$ .

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Quantificação relativa dos transcritos de MMP2 e MMP9

A técnica da qPCR em tempo real permite a quantificação da expressão de genes induzidos em resposta a diferentes condições, apresentando um maior grau de sensibilidade que o PCR competitivo e uma boa reprodutibilidade. A quantificação da expressão dos genes é feita de forma relativa, isto é, pela comparação da expressão em um grupo exposto a um estímulo a outro grupo não exposto, denominado grupo controle (ZARLENGA; HIGGINS, 2001).

O programa de análise das reações de PCR em tempo real realiza o cálculo automático do limiar de detecção da fluorescência. Entretanto, objetivando uma melhor análise dos dados optou-se pela verificação individual das curvas de amplificação, remoção dos sinais não específicos e o ajuste manual do limiar de detecção para que os resultados fossem obtidos na faixa de amplificação exponencial. Definiu-se, dessa maneira, um limiar de detecção distinto para cada gene testado.

O uso de um gene constitutivo como controle endógeno na reação de PCR quantitativo e como fator de normalização dos dados é controverso (BUSTIN, 2002; THELLIN *et al.*, 1999). Um dos requisitos mais importantes para a escolha de um gene candidato a controle endógeno é a sua presença constante em todas as amostras testadas com pouca variação na expressão por influência de estímulos externos ou mudanças no metabolismo celular. Seguindo esse raciocínio, as flutuações decorrentes a variações de pipetagem e, conseqüentemente, na concentração final dos reagentes, da amostra ou variações nas condições das reações de RT ou de PCR, seriam corrigidas pela expressão do gene constitutivo.

No presente experimento, o gene *ACTB* (actina) foi detectado em quantidade similar em todas as condições experimentais. Essa ausência de variação na expressão do gene controle endógeno também pode ser interpretada como um indicador da integridade do RNA extraído, da adequada síntese de cDNA na reação de transcrição reversa e da boa amplificação do produto durante a PCR. Além desses fatores, o gene *ACTB* apresentou eficiência de amplificação semelhante aos demais genes testados.

A quantificação relativa dos transcritos de cada gene estudado foi realizada de acordo com o método relativo de curvas padrão, chamado de pelo método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Trata-se de um método de quantificação relativa que descreve a mudança na expressão de um gene alvo em um grupo de amostras estudadas,

normalizadas com um gene constitutivo, comparado com uma amostra de referência/controle.

Os ensaios se mostraram de difícil padronização porque os genes das proteínas MMP2 e MMP9 analisados são pouco expressos nessas células, de forma que houve amplificação apenas quando foram utilizadas grandes quantidades de cDNA total. Também foi possível verificar uma grande variação relativa entre as replicatas, o que pode ser explicado por essa baixa expressão. Poucas moléculas estavam presentes nas amostras, de forma que as diferenças inerentes de pipetagem tornaram-se mais evidentes após a amplificação exponencial das poucas moléculas existentes dentro do ensaio.

Foi observado um aumento significativo de expressão dos transcritos das MMPs estudadas, destacando-se a concentração de 40 mM de metformina. Além disso, as diferenças de expressão observadas foram mais evidenciadas após 48 horas de exposição à metformina.

A comparação da expressão das metaloproteinases entre as células também revelou diferenças significativas entre elas, com resultados mais concordantes para MMP2 quando foram comparados os dois intervalos de tratamento do que para a MMP9.

#### **4.2. Quantificação de expressão de MMP2 e MMP9**

Tendo em vista a complexidade do processo de invasão e formação de metástases, as terapias antitumorais podem atuar sobre diferentes etapas que antecedem a efetiva colonização do tecido-alvo para o desenvolvimento do tumor secundário. Como citado anteriormente, o processo é iniciado na intravasão, e permite que a célula tumoral adquira motilidade através de alterações fenotípicas chamadas de transição epitélio-mesenquimal (EMT) (DORSAM *et al.*, 2007; WEINBERG, 2007). Tal processo contempla não só a troca da expressão de proteínas de adesão (E-caderina por N-caderina), o que resulta em maior grau de liberdade, mas também no aumento da expressão de proteases que garantem a superação da barreira imposta pela lâmina basal, garantindo o alcance dos vasos linfáticos e sanguíneos (HWANG *et al.*, 2010). As MMPs constituem uma família de aproximadamente 23 enzimas proteolíticas zinco-dependentes, sendo capazes de degradar macromoléculas coesivas, como colágeno e fibronectina, entre outras proteínas constituintes da matriz extracelular. O aumento de expressão de MMPs ocorre naturalmente durante os processos de remodelação tecidual promovidos pelo organismo, sendo notoriamente explorado pelas células tumorais em processo metastático. De fato,

segundo a literatura, a expressão e atividade de MMP2 e MMP9 são constantemente observadas em tumores de alto potencial invasivo, atuando na degradação de colágeno IV, o principal constituinte da matriz extracelular da lâmina basal (CEREZZO *et al.*, 2013; DYE *et al.*, 2013).

Numerosos métodos têm sido desenvolvidos para avaliação das formas ativas e latentes de enzimas proteolíticas em amostras biológicas. Entretanto, a zimografia é o método mais usado por ser o mais completo, capaz de detectar formas ativas e latentes das MMPs e quantificar suas expressões, além de apresentar alta sensibilidade para diferentes classes de MMPs e baixo custo em comparação a outras técnicas (LEBER e BALKWILL, 1997; SNOEK-VAN BEURDEN e VON DEN HOFF, 2005; KUPAI *et al.*, 2010).

A importância das MMPs na patogênese de inúmeras doenças tem despertado a atenção de diversos grupos de pesquisa, justificando a aplicabilidade da técnica de zimografia na detecção e quantificação da expressão dessas endopeptidases.

A zimografia foi executada em múltiplos estudos que relacionam as MMPs com enfermidades, como a fibrose pulmonar idiopática, o diabetes, a artrite, as doenças infectoparasitárias e, principalmente, o câncer. Trata-se de uma técnica amplamente usada como o único ensaio para observar a atividade enzimática das MMPs, entretanto, outras técnicas podem ser associadas a fim de complementar os resultados alcançados. Dentre elas, o ensaio imunoenzimático (ELISA), o *Western blotting*, a imunistoquímica e a imunofluorescência (HITCHON *et al.*, 2002; LA ROCCA *et al.*, 2004; GUTIERREZ *et al.*, 2008; GHARAGOZLIAN *et al.*, 2009; GARCÍA-DE-ALBA *et al.*, 2010; ROOMI *et al.*, 2012).

Os resultados apresentados mostram que a metformina é capaz de modular a atividade de MMP2 e MMP9 expressas por células K562, Lucena e FEPS, tanto após uma exposição de 24 horas quanto após 48 horas. Ainda que as diferenças encontradas não tenham sido significativas para todos os casos, houve uma tendência à diminuição de atividade das metaloproteinases estudadas.

Ainda não existem estudos que mostrem como a metformina inibiria ou estimularia a atividade das metaloproteinases. Estudos anteriores mostraram que a metformina possui potencial em modular e diminuir a atividade das MMPs expressas por tumores de ovário, melanoma e sarcoma, entre outros, em concentrações de até 5 mM (CEREZZO *et al.*, 2013; DYE *et al.*, 2013, HADLER-OLSEN *et al.*, 2013; HWANG *et al.*, 2010).



Também é preciso ressaltar que buscou-se determinar unicamente a atividade das metaloproteinases quando na presença do euglicemiante, sem a análise quanto à expressão dessas proteínas e de suas antagonistas, as TIMPs. De acordo com a literatura, as metaloproteinases são inativadas através da atividade de TIMPs (inibidores de metaloproteinases teciduais), moléculas estas que se ligam ao sítio catalítico dessa classe de enzimas proteolíticas, que então passam ao estado latente (HADLER-OLSEN *et al.*, 2013). Nesse sentido, a avaliação da expressão de MMPs e TIMPs, bem como da atividade das últimas, serão de grande importância para os próximos estudos, esclarecendo o processo de funcionamento da metformina frente às neoplasias em estágio avançado.

É importante, ainda, que outra verificação seja feita, dado que como a metformina é um agente citotóxico, quanto maior a concentração de metformina utilizada, menor será a viabilidade celular daquele tratamento, de forma que um menor número de células estará presente ao final do tratamento. Sendo assim, um próximo passo será a realização do mesmo experimento, mas ao invés de nivelar a quantidade de proteínas pelas proteínas totais extraídas, nivelar as amostras pelo número de células vivas restantes após o fim do tratamento. Dessa forma, através da comparação de ambos os resultados, será possível inferir um modelo de ação mais específico desse agente frente à expressão das metaloproteinases.

## 5. CONCLUSÃO

A leucemia atingiu quase meio milhão de casos em 2020 pela estimativa divulgada pelo INCA em 2023 e segue dentro do top de maiores incidências e mortalidade no Brasil e mundo. Por ser uma neoplasia hematopoiética, seu tratamento é mais desafiador e pesquisas de base e clínica são fundamentais em busca de melhoria na qualidade de vida das pessoas diagnosticadas bem como a possibilidade de tornar uma doença fatal em algo que pode ser controlado.

Novas estratégias em pesquisa de base, como utilização de fármacos já aprovados comercialmente, que é o caso da metformina, agiliza temporalmente a disponibilidade de novas terapias aos diagnosticados. o tratamento atual com inibidores de tirosina quinase possibilitou para alguns casos remissões profundas, mas ainda é fundamental que a busca se mantenha para aplicação do número de beneficiários. Neste trabalho foi possível observar uma modulação da metformina nas metaloproteinases, principalmente na MMP2 com 40mM de concentração em células expostas por 48 horas.

Nos últimos dez anos, em uma incessante busca de terapias alternativas para o tratamento oncológico, a ANVISA tem sido generosa com o olhar para terapias avançadas como CAR-T e vacinas antitumorais (BATISTA; MATTOS; SILVA, 2015). No entanto, ainda são técnicas de alto custo e que depende de estratégias e estímulos públicos para sua implementação. Reforçando a importância de se saber resultados prévios de medicamentos e somá-los com efeitos antitumorais como a metformina com o de proteinases conhecidas pela contribuição no processo de metástase para entender o mecanismo e a partir dos resultados, em diferentes linhagens celulares, estabelecer melhores decisões perante ao rumo do desenvolvimento do tratamento da LMC, foco deste projeto.

A utilização de inibidores cada vez mais específicos geram questionamentos sobre sua eficácia no quesito de serem mais ou menos vantajosos para uma doença que possui múltiplos alvos, inibidores de terceira geração, por exemplo, são específicos para uma proteína.

Como alternativas aos futuros tratamentos, no presente projeto, foi possível adentrar nos efeitos da metformina na quantificação da expressão nas duas principais metaloproteinases responsáveis pela degradação da membrana basal, com resultados animadores principalmente em concentração de 40 mM em 48h de tratamento. Ainda que

nem todos os resultados tenham diferença significativa, é um grande passo para o melhor entendimento da doença e suas vias de contorno.

Ao final, os estudos concordam que os próximos passos são se adentrar para desvendar outros possíveis moduladores da expressão gênica das MMPs, bem como, paralelamente, nivelar a quantidade proteica e celular para melhor entendimento da via de estudo.

## 6. LITERATURA CITADA

AIMES RT, QUIGLEY JP. Matrix metalloproteinase 2 is an interstitial collagenase Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type 1 collagen regenerating the specific  $\frac{3}{4}$  and  $\frac{1}{4}$  fragments. **Journal Biological Chemistry**, 270: 5872-5876,1995.

ALMEIDA, O.P., **Patologia Oral**, 01 Ed. Artes Medicas LTDA, v. 1, p25. 2016.

ALVES, R. F. S. Avaliação molecular dos mecanismos envolvidos na sensibilidade e resistência ao Imatinibe independente do BCR-ABL em leucemia Mielóide Crônica. 2011, 111p. **Dissertação de Mestrado Universidade de Coimbra**, Coimbra, 2011

AMALINEI C. CARUNTU I-D, BLARAN RA. Biology of metalloproteinases. **Rom J Morphol Embryol** 48:323-334, 2007.

AMERICAN DIABETES, A., Standards of Medical Care in Diabetes- 2016. **Diabetes care** 2016, 39 *Suppl 1*, S1-S112.

BATISTA, D. R. R., MATTOS, M. DE, & SILVA, S. F. DA. Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. 2015. **Revista De Enfermagem Da UFSM**, 5(3), 499–510. <https://doi.org/10.5902/2179769215709>

BEDI, A., BARBER, J.P., BEDI, G.C., EL-DEIRY, W.S., SIDRANSKY, D., VALA, M.S., AKHTAR, A.J., HILTON, J., JONES, R.J. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents. **Blood** 86, 1148-1158, 1995.

BERSTEIN LM, BOYARKINA MP, TESLENKO SY. Familial diabetes is associated with reduced risk of cancer in diabetic patients: a possible role for metformin. **Med Oncol**. Jun;29(2):1308-13. doi: 10.1007/s12032-011-9840-0. Epub 2011 Feb 6.

BIRSOY, K.; POSSEMATO, R.; LORBEER, F. K.; BAYRAKTAR, E. C.; THIRU, P.; YUCEL, B.; WANG, T.; CHEN, W. W.; CLISH, C. B.; SABATINI, D. M., Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to glucose limitation and biguanides. **Nature** 2014, 508 (7494), 108-12.

BODE W, FERNADEZ-CASTALAN C, GRAMS F, GOMIS-RUTH FX, NAGASE H, TSCHESCHE H, MASKOS K. Insights into MMP-TIMP interactions. **Ann NY Acad Sci**; 878: 73-91. 1999.

BRECCIA M., ALIMENA G. Resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia and therapeutic approaches to circumvent the problem. **Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets**, v.9, n.1, p.21-8. 2009.

Brown, Brene. Gifts of Imperfection, The: **Hazelden Information & Educational Services**, 2010.

BUCHDUNGER E, ZIMMERMANN J, METT H, MEYER T, MULLER M, DRUKER BJ AND LYDON NB. Inhibition of the abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. **Cancer Res** 56:100-104, 1996.

CARRUTH JE, GLASSER SH, LEVIN J. Gastric carcinoma and other malignancies in patients with chronic myelogenous leukemia. Case report and review of the literature, with particular reference to young adults. **Johns Hopkins Med J**. 1980;147(6):213-6.

CEREZO M, TICHET M, ABBE P, et al. Metformin Blocks Melanoma Invasion and Metastasis Development in AMPK/p53-Dependent Manner. **Mol Cancer Ther**, 2013; 12, 1605-1615.

COOPER, G.M., **A célula**, 2º ed. Artmed LTDA, Porto Alegre, 712, 2001.

COPERCHINI, F.; LEPORATI, P.; ROTONDI, M.; CHIOVATO, L., Expanding the therapeutic spectrum of metformin: from diabetes to cancer. **J Endocrinol Invest**, 2015, 38 (10), 1047- 55.

COPERCHINI, F.; LEPORATI, P.; ROTONDI, M.; CHIOVATO, L., Expanding the therapeutic spectrum of metformin: from diabetes to cancer. **J Endocrinol Invest** 2015, 38 (10), 1047- 55.

DAFLON-YUNES N, PINTO-SILVA FE, VIDAL RS, NOVIS BF, BERGUETTI T, LOPES RR, POLYCARPO C, RUMJANEK VM. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. **Mol Cell Biochem**. 2013 Nov;383(1-2):123-35.

DALEY, G. Q. AND D. BALTIMORE. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210 bcr/abl protein. **Proc Natl. Acad. Sci.U.S.A.**, 85:9312-9316, 1988.

DEININGER, MW. Chronic myeloid leukemia: an historical perspective. *Hematology leukemia. Cancer J*;17(6):455-476. 2011

DELAMAIN, M. T.; CONCHON, M. Os inibidores de tirosino quinase de segunda geração. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.30, n. 1, p. 30-47, 2008

DOWLING R. J. O., GOODWIN P. J., STAMBOLIC V. Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment. **BMC Medicine**.;9, article 33 doi: 10.1186/1741-7015-9-33. 2011.

DORSAM RT, GUTKIND JS. G-protein-coupled receptors and cancer. **Nature Reviews Cancer**. 2007, v 7, p 79-94.

DRUKER B.J., GUILHOT F., O'BRIEN S.G., GATHMANN I., KANTARJIAN H., GATTERMANN N., DEININGER M.W., SILVER R.T., GOLDMAN J.M., STONE R.M., CERVANTES F., HOCHHAUS A., POWELL B.L., GABRILOVE J.L., ROUSSELOT P., REIFFERS J., CORNELISSEN J.J., HUGHES T., AGIS H., FISCHER T., VERHOEF G., SHEPHERD J., SAGLIO G., GRATWOHL A., NIELSEN J.L., RADICH J.P., SIMONSSON B., TAYLOR K., BACCARANI M., SO C., LETVAK L., LARSON R.A.. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med**, v.355, n.23, p.2408-17. 2006.

DRUKER BJ AND LYDON NB. Lessons learned from the development of an Abl tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **J Clin Invest** 105:3-7, 2000.

DRUKER BJ, TAMURA S, BUCHDUNGER E, OHNO S, SEGAL GM, FANNING S, ZIMMERMANN J AND LYDON NB Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nat Med** 2:561-566, 1996.

DRUKER, B. J. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. **Blood**, v. 112, n. 13, p. 4808–4817, 15 dez. 2008. Editora Guanabara Koogan. 2013. Pp. 234.

DYE DE, MEDIC S, ZIMAN M, COOMBE DR. Melanoma biomolecules: independently identified but functionally intertwined. **Frontiers in Oncology**, 2013: 3, 252.

EIKAWA, S.; NISHIDA, M.; MIZUKAMI, S.; YAMAZAKI, C.; NAKAYAMA, E.; UDONO, H., Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2015, 112 (6), 1809-14.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrogenolytic activities in brownspider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, v.36, p.1039-1051, 1998.

GALLAGHER EJ, LEROITH D. Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. **Ann N Y Acad Sci**. Dec;1243:54-68, 2011.

GARCÍADEALBA, C. et al. Expression of matrix metalloproteinases by fibrocytes: possible role in migration and homing. **Am J Respir Crit Care Med.**, v.182, n.9, p.1144-1152, 2010.

GHARAGOZLIAN, S. et al. Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes. **BMC Clin Pathol.**, v.9, n.1, p.15, 2009.

GILES F.J., CORTES J., JONES BERGSTROM D., KANTARJIAN H., FREEDMAN S.J. MK-0457, a novel kinase inhibitor, is active in patients with chronic myeloid leukemia or acute lymphocytic leukemia with the T315I BCR-ABL mutation. **Blood**, v.109, n.2, p.500-2. 2007.

GIOVANNUCCI, E.; HARLAN, D. M.; ARCHER, M. C.; BERGENSTAL, R. M.; GAPSTUR, S. M.; HABEL, L. A.; POLLAK, M.; REGENSTEINER, J. G.; YEE, D., Diabetes and cancer: a consensus report. **Diabetes care** 2010, 33 (7), 1674-85.

GIOVANNUCCI, E.; HARLAN, D. M.; ARCHER, M. C.; BERGENSTAL, R. M.; GAPSTUR, S. M.; HABEL, L. .; POLLAK, M.; REGENSTEINER, J. G.; YEE, D., Diabetes and cancer: a consensus report. **Diabetes care** 2010, 33 (7), 1674-85.

GOLAS J.M., ARNDT K., ETIENNE C., LUCAS J., NARDIN D., GIBBONS J., FROST P., YE F. D. H. BOSCHELLI, BOSCHELLI, F. SKI-606, a 4-anilino-3-quinolinecarbonitrile dual inhibitor of Src and Abl kinases, is a potent antiproliferative agent against chronic myelogenous leukemia cells in culture and causes regression of K562 xenografts in nude mice. **Cancer Res**, v.63, n.2, p.375-81. 2003.

GOLAS J.M., LUCAS J., ETIENNE C., GOLAS J., DISCAFANI C., SRIDHARAN L., BOGHAERT E., ARNDT K., YE F., BOSCHELLI D.H., LI F., TITSCH C., HUSELTON C., CHAUDHARY I., BOSCHELLI F. SKI-606, a Src/Abl inhibitor with in vivo activity in colon tumor xenograft models. **Cancer Res**, v.65, n.12, p.5358-64. 2005.

GRISWOLD I.J., MACPARTLIN M., BUMM T., GOSS V.L., O'HARE T., LEE K.A., CORBIN A.S., STOFFREGEN E.P., SMITH C., JOHNSON K., MOSESON E.M., WOOD L.J., POLAKIEWICZ R.D., DRUKER B.J., DEININGER M.W. Kinase domain mutants of BCR-ABL exhibit altered transformation potency, kinase activity, and substrate utilization, irrespective of sensitivity to imatinib. **Mol Cell Biol**, v.26, n.16, p.6082-93. 2006.

GUPTA GP, MASSAGUÉ J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, 127, p 679-695. 2006.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. Increased activities of cardiac matrix metalloproteinases matrix metalloproteinase (MMP)2 and MMP9 are associated with mortality during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Infect. Dis.**, v.197, n.10, p.1468-1476, 2008.

HADLER-OLSEN E, WINBERG JO, UHLIN-HANSEN L. Matrix metalloproteinases in cancer: their value as diagnostic and prognostic markers and therapeutic targets. **Tumor Biol.**, 2013: 34, 2041–2051.

HANTSCHER O., RIX U., SUPERTI-FURGA G. Target spectrum of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib and dasatinib. **Leuk Lymphoma**, v.49, n.4, p.615-9. 2008.

HEHLMANN R, HEMPEL H, HASFORD J, KOLB HJ, PRALLE H, HOSSFELD DK. Randomized comparison of interferon-alfa with busulfan and hydroxyureia in chronic myelogenous leukemia. **Blood** 84(12):4064-4077, 1994.

HEUSSEN, C.E.E.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecyl-Sulfate and Copolymerized Substrates. **Analytical Biochemistry**, v.102, n.1, p.196-202, 1980.

HITCHON, C. A. et al. Gelatinase expression and activity in the synovium and skin of patients with erosive psoriatic arthritis. **J Rheumatol.**, v.29, n.1, p.107-117, 2002.

HONG SD, HONG SP, LEE JI, LIM CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncol.** 2000 Mar;36(2):207-13.

HUMMEL, K.M.; PENHEITER, A.R.; GATHMAN A.C. et al. Anomalous estimation of protease molecular weights using gelatin-containing SDS-PAGE. **Analytical Biochemistry**, v.233, n.1, p. 140-142, 1996.

HWANG YP, JEONG HG. Metformin blocks migration and invasion of tumour cells by inhibition of matrix metalloproteinase-9 activation through a calcium and protein kinase Calpha-dependent pathway: phorbol-12-myristate-13-acetate-induced/extracellular signal-regulated kinase/activator protein-1. **Br J Pharmacol**, 2010:160, p 1195–1211.

IKEBE T, SHINOHARA M, TAKEUCHI H, BEPPU M, KURAHARA S, NAKAMURA S, ET AL. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase in tumor tissues correlates with the invasiveness of oral cancer. **Clin Exp Metastasis.** 1999 Jun;17(4):315-23.

ILIOPOULOS D, HIRSCH HA, STRUHL K. Metformin decreases the dose of chemotherapy for prolonging tumor remission in mouse xenografts involving multiple cancer cell types. **Cancer Res.** May 1;71(9):3196-201.

ITOH, Y.; ITO, A.; IWATA, K. *et al.* Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. **Journal of Biological Chemistry**, v.273,. 24360-24367, 1998.

Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2014 Jul 22;111(29):10574-9. doi: 10.1073/pnas.1409844111. Epub 2014 Jul 7. PMID: 25002509; PMCID: PMC4115496.

JOHN A, TUSZYNSKI G. The Role of Matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. **Pathology Oncology Research**, 17(1): 14–23, 2001.

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12ª Edição, 2013, p. 234.

KANTARJIAN H., GILES F., WUNDERLE L., BHALLA K., O'BRIEN S., WASSMANN B., TANAKA C., MANLEY P., RAE P., MIETLOWSKI W., BOCHINSKI K., HOCHHAUS A., GRIFFIN J.D., HOELZER D., ALBITAR M., DUGAN M., CORTES J., ALLAND L., OTTMANN O.G. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. **N Engl J Med**, v.354, n.24, p.2542-51. 2006.

KIMURA, A.; SHINOHARA, M.; OHKURA, R. *et al.* Expression and localization of transcripts of MT5-MMP and its related MMP in the ovary of the medaka fish *Oryzias latipes*. **Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression**, v. 1518, p.115–12, 2001.

KJELDSSEN, L.; JHONSEN, A. H.; SENGELOV, H. *et al.* Isolation and primary structure of Ngal, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. **The Journal of Biology Chemistry**, v. 268, p.10425–10432,1993.

KOYAMA H, IWATA H, KUWABARA Y, IWASE H, KOBAYASHI S, FUJII Y. Gelatinolytic activity of matrix metalloproteinase-2 and -9 in esophageal carcinoma; a study using in situ zymography. **Eur J Cancer.** 2000 Oct;36 (16):2164-70.

KUPAI, K. *et al.* Matrix metalloproteinase activity assays: Importance of zymography. **Journal of Pharmacological and toxicological methods**, v.61, n.2, p.205209, 2010.

LA ROCCA, G. *et al.* Zymographic detection and clinical correlations of MMP2 and MMP9 in breast cancer sera. **Br. J. Cancer**, v.90, n.7, p.14141421, 2004.

LEBER, T. M. & BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Anal Biochem.**, v.249, n.1, p.24-28, 1997.

LEVITZKI A AND GAZIT A (1995). Tyrosine kinase inhibition - an approach to drug development. **Science** 267:1782-1788.



LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) **Method. Methods.** Dec;25(4):402-8.

LOWE, S. W., Cepero, E., Evan, G. Intrinsic tumour suppression. **Nature** 432, 307-315, 2004.

LOZZIO CB AND LOZZIO BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive philadelphia chromosome. **Blood.** 1975. 45:321-334

LUGO TG, PENDERGAST AM, MULLER AJ AND WITTE ON. Tyrosine kinase activity and transformation potence of bcr-abl oncogene products. **Science.** 1990 247:1079-1082.

MACCAWLEY LJ, MATRISIAN LM. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Current Opinion in Cell Biology**, 13: 534-540, 2001.

MARTIN M, MARAIS R. Metformin: a diabetes drug for cancer, or a cancer drug for diabetics? **J Clin Oncol.** Jul 20;30(21):2698-700, 2012.

MARTINS, L.M., KOTTKE, T., MESNER, P.W., BASI, G.S., SINHA, S., FRIGON, N. JR., TATAR, E., TUNG, J.S., BRYANT, K., TAKAHASHI, A., SVINGEN, P.A., MADDEN, B.J., MCCORMICK, D.J., EARNSHAW, W.C., KAUFMANN, S.H. Activation of multiple interleukin-1beta converting enzyme homologues in cytosol and nuclei of HL-60 cells during etoposide-induced apoptosis. **J Biol Chem** 272, 7421-7430,1997.

MARUTHUR, N. M.; TSENG, E.; HUTFLESS, S.; WILSON, L. M.; SUAREZ-CUERVO, C.; BERGER, Z.; CHU, Y.; IYOH, E.; SEGAL, J. B.; BOLEN, S., Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis. **Annals of internal medicine** 2016.

MATRISIAN LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. **Trends in Genetics**, 6: 121-125, 1990.

MES-MASSON, A.M., MCLAUGHLIN, J., DALEY, G.Q., PASKIND, M., WITTE, O.N. Overlapping cDNA clones define the complete coding region for the P210c-abl gene product associated with chronic myelogenous leukaemia cells containing the Philadelphia chromosome. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 83, 9768-9772, 1986.

MOISEEVA, O.; DESCHENES-SIMARD, X.; ST-GERMAIN, E.; IGELMANN, S.; HUOT, G.; CADAR, A. E.; BOURDEAU, V.; POLLAK, M. N.; FERBEYRE, G., Metformin inhibits the senescence associated secretory phenotype by interfering with IKK/NFkappaB activation. **Aging Cell** 2013, 12 (3), 489-98.

MONICA K., LEBRUN P., DEDERA DA., BROWN R. AND CLEARY ML. Transforming properties of the E2a-Pbx1 chimeric oncoprotein: fusion with E2a is essential, but the Pbx homeodomain is dispensable. **Cell Mol Biol.** 1994, 14: 8304-8314.

MONTENEGRO MR. Neoplasias. In: Montenegro MR, Franco M. Patologia. Processos gerais. 3ª ed. Rio de Janeiro: **Atheneu**; 1995. p.205-16.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research. PMC. US National Library of Medicine National Institutes of Health. **Mol Aspects Med.** Oct; 29(5): 290–308.

NAGAKAWA O, MURAKAMI K, YAMAURA T, FUJIUCHI Y, MURATA J, FUSE H, SAIKI I. Expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) on prostate cancer cell lines. **Cancer Letters**, 31155(2): 173-179, 2000.

NAGASE H, WOESSNER JFJR. Matrix metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, 274(31): 21491-21494, 1999.

NOWELL, P.C. & D.A. HUNGERFORD. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. **J Natl Cancer Inst.**, 25, 85-109, 1960.

OKUDA K, WEISBERG E, GILLILAND DG AND GRIFFIN JD. ARG tyrosine kinase activity is inhibited by STI571. **Blood** 97:2440-2448, 2001.

PAVLU J, SZYDLO RM, GOLDMAN JM, APPERLEY JF. Three decades of transplantation for chronic myeloid leukemia: what have we learned? **Blood.**; 117(3):755-63. 2011.

PEARCE, E. L.; WALSH, M. C.; CEJAS, P. J.; HARMS, G. M.; SHEN, H.; WANG, L. S.; JONES, R. G.; CHOI, Y., Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. **Nature** 2009, 460 (7251), 103-7.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M., Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nat Rev Endocrinol** 2014, 10 (3), 143-56.

PIEROTTI, M. A.; BERRINO, F.; GARIBOLDI, M.; MELANI, C.; *et al.* Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. **Oncogene**, v. 32, n. 12, p. 1475-87, 2013 Mar 21 2013.

POLLAK, M. N., Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. **Cancer Discov** 2012, 2 (9), 778-90.

POLLAK, M., Insulin and insulin-like growth factor signaling in neoplasia. **Nat Rev Cancer** 2008, 8 (12), 915-28.

PORTER DL, LEVINE BL, KALOS M, BAGG A. Chimeric antigen receptor–modified T cells in chronic lymphoid leukemia. **N Engl J Med.** 2011; 365: 725–33. doi:10.1056/NEJMoa1103849.

QUINTÁS-CARDAMA, A.; CORTES, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 113, n. 8, p. 1619–1630, 19 fev. 2009.

ROOMI, M. W. et al. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human female cancer cell lines. **Oncol Rep.**, v.28, n.3, p.768776, 2012.

ROWLEY, J.D. Chromosomal patterns in myelocytic leukaemia. **N Engl J Med.**, 289,200-1, 1973.

ROY L, GUILHOT J, MARTINEAU G, LARCHEE R, GUILHOT F. Unexpected occurrence of second malignancies in patients treated with interferon followed by imatinib mesylate for chronic myelogenous leukemia. **Leukemia.** 2005;19(9):1689-92.

RUDKIN, C. T.; HUNGERFORD, D. A.; NOWELL, P. C. DNA contents of chromosome ph1 and chromosome 21 in human chronic granulocytic leukemia. **Science** (New York, N.Y.), v. 144, n. 3623, p. 1229–1231, 5 jun. 1964.

RUMJANEK, V. M. et al. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 73, n. 1, p. 57–69, mar. 2001.

RUMJANEK VM, LUCENA M, CAMPOS MM, MARQUES-SILVA VM & MAIA RC. Multidrug resistance in leukemias: the problem and some approaches to its circumvention. **Ciência e Cultura J. Braz. Assoc. Adv. Sci.** 46:63–69, 1994.

SANTOS M DE O, LIMA FC DA S DE, MARTINS LFL, OLIVEIRA JFP, ALMEIDA LM DE, CANCELA M DE C. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. **Rev. Bras. Cancerol.** [Internet]. 6º de fevereiro de 2023 ;69(1):e-213700. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/3700>

SAWYERS CL. Chronic Myeloid Leukemia. **N Engl J Med** 340:1330-1340, 1999.

SHAPIRO SD, KELLEY D, KOBAYASHI D. Measurement of metalloproteinases. **Methods Mol Med.** 2001;56:383-90.

SNOEK-VAN BEURDEN P.A.M.; VON DEN HOFF J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v. 38, p. 73–83, 2005.

STAMENKOVIC I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Cancer Biology**, 10:415-433, 2000.

TALPAZ M., SHAH N.P., KANTARJIAN H., DONATO N., NICOLL J., PAQUETTE R., CORTES J., O'BRIEN S., NICAISE C., BLEICKARDT E., BLACKWOOD-CHIRCHIR M.A., IYER V., CHEN T.T., HUANG F., DECILLIS A.P., SAWYERS C.L. Dasatinibe in imatinibe-resistant philadelfia chromossome-positive. Leukemias, N. **Eng J. Med**, v.354,n.24,p.2531-41.2006.

THIELEN, N. et al. New insights into the pathogenesis of chronic myeloid leukaemia: towards a path to cure. **The Netherlands journal of medicine**, v. 69, n. 10, p. 430–440, out. 2011.

THOMAS GT, LEWIS MP, SPEIGHT PM. Matrix metalloproteinases and oral cancer. **Oral Oncol.** 1999 May;35(3):227-33.

TRAXLER P, BOLD G, BUCHDUNGER E, CARAVATTI G, FURET P, MANLEY P, O'REILLY T, WOOD J AND ZIMMERMANN J. Tyrosine kinase inhibitors: From rational design to clinical trials. **Medicinal Research Reviews** 21:499-512, 2001.

TROEBERG, L.; NAGASE, H. Measurement of matrix metalloproteinase activities in the medium of culture dsynoviocytes using zymography. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 77-87, 2003.

TSUJIMOTO Y, GORHAM I, COSSMAN J, JAFFE E AND CROCE CM. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistake in VDJ joining. **Science**. 1985. 229:1390-1393.

TSURUO T, IIDA H, OHKOCHI E, TSUKAGOSHI S, SAKURAI Y. Establishment and properties of vincristine-resistant human myelogenous leukemia K562. **Gan**. 1983 Oct;74(5):751-8.

VERFAILLIE CM, HURLEY R, LUNDELL BI, ZHAO CH AND BHATIA R. Integrin-mediated regulation of hematopoiesis: Do BCR/ABL-induced defects in integrin function underlie the abnormal circulation and proliferation of CML progenitors? **Acta Haematol**. 1997. 97:40-52.

VIOLET B., GUIGAS B., SANZ GARCIA N., LECLERC J., FORETZ M., ANDREELLI F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. **Clinical Science**. ;122(6):253–270.

VITZTHUM, F., GEIGER, G., BISSWANGER, H., BRUNNER, H. & BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. **Anal Biochem**. 276(1):59-64, 1999.

VOET, D., **Bioquímica**, 3ª edição. 2006 p.1133;1209.

VOET, D., **Fundamentos de Bioquímica: A Vida em Nível Molecular**, 4ª edição, 2014 p. 67-68.

VONCKEN JW, VANSCHAICK H AND KAARTINE V. Increased neutrophil respiratory burst in BCR-null mutants. **Cell**. 1995 80: 719-728.

VU TH, WERB Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes & Development**, 14: 2123-2133, 2000.

WALSH, Z, YANG, Y, KOHLER, ME. Immunobiology of chimeric antigen receptor T cells and novel designs. **Immunol Rev**. 2019; 290: 100– 113. <https://doi.org/10.1111/imr.12794>

WARMUTH M., SIMON N., MITINA O., MATHES R., FABBRO D., MANLEY P.W., BUCHDUNGER E., FORSTER K., MOAREFI I., HALLEK M. Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant BCR-ABL kinases. **Blood**, v.101, n.2, p.664-72. 2003.

WEINBERG RA. **The Biology of Cancer**. Chapter 13. Moving Out: Invasion and Metastasis. Garland Science, Taylor & Francis Group, 2007.

WHEATON, W. W.; WEINBERG, S. E.; HAMANAKA, R. B.; SOBERANES, S.; SULLIVAN, L. B.; ANSO, E.; GLASAUER, A.; DUFOUR, E.; MUTLU, G. M.; BUDIGNER, G. S.; CHANDEL, N. S., Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. **Elife** 2014, 3, e02242.

WHO Model List of Essential Medicines (April 2015), 19 ed.; **WHO**, Ed. 2015.

WOESSNER JF JR. The matrix metalloproteinase family. In: Parks WC, Mecham RP. Matrix metalloproteinases. San Diego: **Academic Press**; 1998. p.1-14

XIAO X., HE Q., LU C., et al. Metformin impairs the growth of liver kinase B1-intact cervical cancer cells. **Gynecologic Oncology.**;127(1):249–255.

YE J, COULOURIS G, ZARETSKAYA I, CUTCUTACHE I, ROZEN S, MADDEN TL. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics.** Jun 18;13:134. doi: 10.1186/1471-2105-13-134.

ZHUANG Y, MISKIMINS WK. Cell cycle arrest in Metformin treated breast cancer cells involves activation of AMPK, downregulation of cyclin D1, and requires p27Kip1 or p21Cip1. **J Mol Signal.** 2008 Dec 1;3:18.