



Universidade de Brasília

Faculdade de Ciências da Saúde

Departamento de Farmácia

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA SOBRE A
EXPRESSÃO DE NF- κ B EM CÉLULAS DE FEOCROMOCITOMA DE
RATO**

RAFAEL ABE DA ROCHA MIRANDA

Brasília, 2018

RAFAEL ABE DA ROCHA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA SOBRE A
EXPRESSÃO DE NF- κ B EM CÉLULAS DE FEOCROMOCITOMA DE
RATO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia, da Universidade de Brasília
como requisito parcial à obtenção do título de
Farmacêutico

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Coorientadora: MSc. Cinthia Gabriel Meireles

Brasília, 2018

RAFAEL ABE DA ROCHA MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA SOBRE A
EXPRESSÃO DE NF- κ B EM CÉLULAS DE FEOCROMOCITOMA DE
RATO**

BANCA EXAMINADORA

PRESIDENTE: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni
(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

MEMBRO: Prof. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto
(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

MEMBRO: MSc. Gabriel Alvares Borges
(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus pais, Roberto Miranda e Elisete Naomi Abe, por terem me ensinado os valores do estudo e dedicação, por terem me apoiado e me ajudado sempre que precisei.

Ao meu orientador Luiz Alberto Simeoni e a minha co-orientadora Cinthia Gabriel Meireles pela oportunidade de aprendizado e dedicação na minha educação, pela paciência com meus erros e minhas dúvidas e pelo grande auxílio prestado na minha formação acadêmica.

Aos colegas do Farmol pela ajuda prestada em momentos em que tive dúvidas, cometi erros ou precisei de ajuda.

Aos meus amigos, pelos momentos de descontração e amizade que tivemos.

Obrigado pelo apoio e pela ajuda de todos que foram gentis e solidários comigo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de sinalização do NF-κB	17
Figura 2 - Western Blot e Quantificação das bandas de células PC12-Adh do experimento N1.	30
Figura 3 – Western Blot e quantificação das bandas de células PC12-Adh do experimento N2.	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva de Calibração para experimento N1	27
Gráfico 2 - Curva de Calibração para experimento N2.....	28
Gráfico 3 - Razão entre NF-κB/GAPDH de N1	34
Gráfico 4 - Razão entre NF-κB/GAPDH de N2	34
Gráfico 5 - Razão entre NF-κB/GAPDH de N1 e N2.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diluição seriada de proteína albumina do soro bovino para confecção de curva-padrão para quantificação de proteínas	22
Tabela 2 - Diluição seriada de proteína albumina do soro bovino estoque com adição de solução reagente para confecção de curva-padrão para quantificação de proteínas	23
Tabela 3 - Concentrações de proteínas obtidas das amostras do experimento N1	28
Tabela 4 - Concentrações de proteínas obtidas das amostras do experimento N2	29
Tabela 5 – Valores de proteína líquida NF-κB para experimento N1	32
Tabela 6 – Valores de proteína líquida do controle interno GAPDH para experimento N1	32
Tabela 7 – Valores de proteína líquida NF-κB para experimento N2	32
Tabela 8 – Valores de proteína líquida do controle interno GAPDH para experimento N2	33

LISTA DE ABREVIACOES

AMPK	Proteína quinase ativada por adenosina monofosfato
BSA	Proteína albumina de soro bovino
GAPDH	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
IκB	Proteína inibitória kappa B
IKK	Proteína kinase de IκB
MAX	Fator X associado ao MYC
MIBG	Metaiodobenzilguanidina
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF-κB	Fator nuclear kappa B
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
SDHB	Subunidade da succinato desicrogease B
SDHC	Subunidade da succinato desicrogease B
SDHD	Subunidade da succinato desicrogease B
TNFα	Fator de necrose tumoral alpha
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VHL	Von Hippel-Lindau

RESUMO

O feocromocitoma é um tipo de tumor que afeta as células cromafins das glândulas suprarrenais, podendo ser esporádico ou hereditário. Embora sua ocorrência seja rara e na maioria dos casos ocorra desenvolvimento de tumor benigno, quando se desenvolve para um acometimento maligno possui baixo prognóstico de recuperação, sendo necessária intervenção cirúrgica e quimioterapia, cuja resposta é baixa e induz diversos efeitos adversos no paciente. Metformina, uma biguanida utilizada comumente no tratamento do diabetes tipo 2, tem mostrado efeitos positivos no tratamento de determinados tipos de tumores, como câncer de fígado, câncer de pâncreas, câncer de esôfago, câncer colorretal, neuroblastomas e no feocromocitoma. Com o intuito de verificar um possível mecanismo de ação deste medicamento no tratamento do feocromocitoma, por meio da inibição do complexo transcricional NF- κ B, cuja expressão e atividade estão normalmente aumentadas no câncer, induzindo proliferação celular de células cancerígenas e redução do processo apoptótico, foi realizado Western Blot na linhagem celular PC12-Adh tratadas com metformina. Não foi observada alteração significativa na expressão de NF- κ B no grupo tratado com metformina, em comparação com o grupo controle. São necessário estudos futuros sobre a ação da metformina em células PC12-Adh e no complexo transcricional NF- κ B para melhor determinar o efeito antitumoral deste medicamento nesta linhagem celular.

Palavras chave: feocromocitoma; metformina, NF- κ B, Western Blot.

ABSTRACT

Pheochromocytoma is a type of tumor derived from chromaffin cells in the adrenal medulla, that can either be sporadic or hereditary. Although it's a rare tumor, and in most cases a benign one, once it develops into a metastatic phenotype, prognostic chance of recovery is lowered, requiring surgical removal and chemotherapy, to which response is low and several side effects are consequent. Metformin, a biguanide commonly used as treatment of diabetes mellitus type 2, has shown positive results on the treatment of certain types of tumors, such as liver, pancreatic, esophageal, colorectal cancers, neuroblastomas and pheochromocytomas. Aiming to investigate if it's anti tumorigenic effects might be exerted through inhibition of the transcriptional complex NF- κ B, whose expression and activity are upregulated in most cancers, which induces cell proliferation and inhibits apoptosis, PC12-Adh cell line were treated with metformin and submitted to Western Blot analysis. No major changes in NF- κ B expression were observed in metformin treated group when compared to control group. Future studies are needed to better understand metformin's anti-tumorigenic properties on PC12-Adh cell line and in the expression of transcriptional complex NF- κ B.

Key Words: pheochromocytomas, metformin, NF- κ B, Western Blot.

Sumário

1 Introdução e Revisão da Literatura	12
1.1 Feocromocitoma	12
1.2 Ação da metformina sobre o NF- κ B	14
1.3 NF- κ B em vias de proliferação tumoral.....	16
2 Justificativa	18
3 Objetivos	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 Metodologia	20
4.1 Cultura de células	20
4.2 Plaqueamento e tratamento das células	20
4.3 Coleta das proteínas.....	21
4.3 Quantificação das proteínas.....	21
4.4 Western Blot.....	23
4.5 Quantificação do Western Blot	25
4.6 Estatística	26
5 Resultados.....	27
5.1 Curva de calibração obtida para quantificação de proteínas.....	27
5.2 Efeito da metformina na via do NF- κ B.....	29
5.2.1 Experimento N1	30
5.2.2 Experimento N2	31
As mesmas condições testadas no experimento N1 foram repetidas e o N2 está	31
5.3 Razão entre NF- κ B/GAPDH de N1, N2 e de ambos.....	31
5.3.1 Experimento N1	33
5.3.2 Experimento N2	34
5.3.2 Experimento N1 e N2.....	35
6 Discussão	35
7 Conclusões.....	38
8 Referências	39

1 Introdução e Revisão da Literatura

1.1 Feocromocitoma

Os feocromocitomas são tumores decorrentes de mutações provenientes de células cromafins presentes na medula das glândulas suprarrenais ou paragânglios extra-adrenais simpáticos, caracterizados por alta produção de catecolaminas, como adrenalina e noradrenalina, que comumente geram hipertensão e paroxismos nos pacientes (JOCHMANOVA; PACAK, 2016). Sua incidência, segundo Chen e col. (2010) é rara, sendo contados, nos Estados Unidos, de 500 a 1600 casos por ano.

Podem ser classificados em tumores esporádicos (cuja causa não é decorrente de fatores genéticos familiares, mas de alterações nos genes ao longo da vida), ou tumores hereditários (cuja causa provém de fatores genéticos familiares), sendo a maioria dos feocromocitomas tumores esporádicos. Observa-se o aparecimento de feocromocitoma hereditário em pacientes acometidos de doença de von Hippel-Lindau (atribuída a mutações no gene de supressão von Hippel-Lindau – VHL), neoplasia endócrina múltipla tipo II (atribuída a mutações no proto-oncogene RET), tumores de corpo carótido familiares e neurofibromatose tipo 1 (PACAK e col., 2010). Os tumores de corpo carótido familiares estão associados a paragangliomas com mutações germinativas nos genes que codificam subunidades da succinato desidrogenase B (SDHB), C (SDHC) e D (SDHD) (CHEN e col., 2010). Foi observado por Burnichon e col. (2012) que alterações no gene de supressão MAX (fator X associado ao MYC) também estão envolvidas no aparecimento de feocromocitomas esporádicos e hereditários.

Comumente, são tumores benignos, mas apresentam potencial metastático, associado a mutações nos genes SDHB, podendo afetar locais como ossos, pulmões, fígado, além de morbidade cardiovascular (LENDERS; EISENHOFER, 2017).

O tratamento tradicional recomendado é a remoção cirúrgica do tumor, e a resposta à quimioterapia é limitada ou induz alta toxicidade ao paciente, além de ser voltada, em grande parte, para tratamento de processos metastáticos. Estudos antigos de Averbuch e col. (1988) mostraram resposta de pacientes com feocromocitoma maligno ao tratamento com ciclofosfamida, vincristina e dacarbazina, entretanto a melhora foi limitada, ocorrendo progressão da doença novamente em 9 dos 14 pacientes tratados. O uso de altas doses de metaiodobenzilguanidina (MIBG) como carreador do radiofármaco iodo 31 no tratamento de feocromocitomas metastáticos por Gonias e col. (2009) mostrou que, em um grupo de 49 pacientes com feocromocitoma/paragangliomas metastáticos, 22% obtiveram resposta total ou parcial ao tratamento e 35% obtiveram baixa ao tratamento; entretanto, foi reportada hematotoxicidade, quatro pacientes com mielossupressão prolongada, dois pacientes com síndrome do desconforto respiratório do adulto.

O sunitinibe, um medicamento anticancerígeno antiangiogênico utilizado no tratamento de câncer de células renais metastático, atua inibindo ligação de ATP a domínios de tirosina quinase em receptores 2 de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), além de outras tirosino quinases como FLT3, RET, c-KIT (GOODMAN; GUILMAN, 2012). Seu uso no tratamento de feocromocitomas foi estudado por Ayala-Ramirez e col. (2012), que observaram que, em um grupo com 17 pacientes com feocromocitoma ou paragangliomas simpáticos metastáticos, 47% apresentaram melhora clínica, como redução do tamanho do tumor ou estabilização da doença, embora tenham sido observados efeitos adversos como hipertensão,

diarreia, feridas nos pés e mãos, boca seca e fadiga. Um estudo de Denorme e col. mostrou que o uso de sunitinibe e sorafenibe, outro medicamento antiangiogênico inibidor dos receptores de tirosina quinase, inibiu crescimento de células PC12, exerceu atividade antiangiogênica, induziu apoptose e diminuiu viabilidade celular desta linhagem de células. Entretanto, o estudo limitou-se a testes pré-clínicos, indicando a necessidade de estudos clínicos.

Devido às limitações no tratamento medicamentoso do feocromocitoma, novas alternativas terapêuticas são recomendadas, que apresentem menos eventos adversos ao paciente ou ocasionem menor desconforto e maiores chances de recuperação da saúde e possam atuar nos tumores benignos.

1.2 Ação da metformina sobre o NF- κ B

Metformina é um medicamento antidiabético da classe das biguanidas utilizado, comumente, no tratamento do diabetes tipo 2. Um dos mecanismos propostos para sua ação terapêutica está associado ao aumento de ativação de proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), que ocasiona aumento de captação de glicose por tecido muscular, fígado e tecido adiposo, aumento da sensibilidade à insulina, diminuindo os níveis séricos da glicemia (GOODMAN; GUILMAN, 2012). Além deste mecanismo, outros autores associam sua ação terapêutica à inibição não competitiva da enzima mitocondrial glicofosfato desidrogenase, o que reduziria conversão de lactato e glicerol em glicose, levando à diminuição de gluconeogênese hepática (MADIRAJU e col., 2014), ou por oxidação do conjunto NADH/NAD⁺ no complexo I mitocondrial, diminuindo quantidade de prótons disponíveis para produção de ATP por fosforilação oxidativa, levando à stress metabólico, que ocasiona

diminuição da resistência periférica à insulina e aumento da utilização de glicose pelas células (CAMERON e col., 2018).

Pesquisas mais recentes têm focado na ação deste medicamento no tratamento de diversos tipos de cânceres, propondo mecanismos como inibição da via do mTOR (mammalian target of rapamycin), envolvido em processos de metabolismo, crescimento e proliferação celular de células cancerígenas (KASZNICKI e col., 2014).

O estudo de Zi e col. (2018) mostram evidências epidemiológicas de pacientes diabéticos tratados com metformina que possuíam menor risco de desenvolvimento de câncer. Um estudo de meta-análise de Ma e col. (2017) mostrou que o uso de metformina por pacientes diabéticos reduziu o índice de ocorrência de câncer de fígado. Já Zhou e col. (2017) verificaram uma menor taxa de mortalidade em pacientes diabéticos com câncer de pâncreas tratados com metformina do que aqueles que não foram tratados com o medicamento. No estudo experimental de Meireles (2015), é mostrada ação da metformina em células de adenocarcinoma de próstata e feocromocitoma, observando diminuição da viabilidade celular em ambas as linhagens.

Além da inibição da via do mTOR, outro possível mecanismo proposto para a ação da metformina sobre células cancerígenas seria através da inibição do fator transcricional kappa B (NF- κ B). O estudo de Sekino e col. (2018), utilizando técnicas de imunocoloração, mostraram que o medicamento foi capaz de diminuir a atividade de NF- κ B no núcleo de células escamosas de câncer de esôfago, correlacionando esse efeito à sua ação antitumoral e mostrando diferenças na ação do NF- κ B quando ele se encontra no citoplasma ou no núcleo celular. Sung-Hee e col. (2017) mostraram inibição da via do NF- κ B em células SNU-C5 (células de câncer colorretal humanas) resistentes a fluororacil e não resistentes a fluororacil, quando ambas foram tratadas

com fluororacil e metformina, o que resultou em diminuição da proliferação celular desta linhagem celular. Esta inibição poderia ocorrer devido ao aumento de AMPK, proveniente da inibição do complexo de NAD⁺/NADH, com diminuição de ATP produzido e consequente aumento de AMP e ADP; este aumento de AMPK poderia inibir o NF-κB, como mostrado por Salminen e col. (2011).

1.3 NF-κB em vias de proliferação tumoral

O fator transcricional kappa B (NF-κB) é um complexo proteico, formado por um domínio Rel, cuja subfamília é composta por c-Rel, RelB, RelA(p65) e *Drosophila* Dorsal e Dif, e um domínio NF-κB, cuja subfamília é composta por p105, p100 e *Drosophila* Relish, que precisa ser reduzida a p50 ou p52 para exercer sua atividade. Os domínios das subfamílias Rel e NF-κB podem formar hétero ou homo dímeros, que se encontram, constitutivamente, ligados a proteínas inibitórias IκB no citoplasma. Existem diversas vias para ativação do complexo NF-κB, destacando-se, porém, a via clássica. A via clássica ocorre, normalmente, com complexos NF-κB formados por subunidades como p50/RelA. Quando fatores externos, como fator de necrose tumoral α (TNFα), encontram-se em maior quantidade no citoplasma, ocorre a ativação do complexo IκB kinase (IKK), que degrada a proteína inibitória IκB ligada ao dímero NF-κB, permitindo que este se desloque ao núcleo, onde se ligará ao DNA, em domínios kappa B, e iniciará processos de transcrição gênica (GILMORE, 2006).

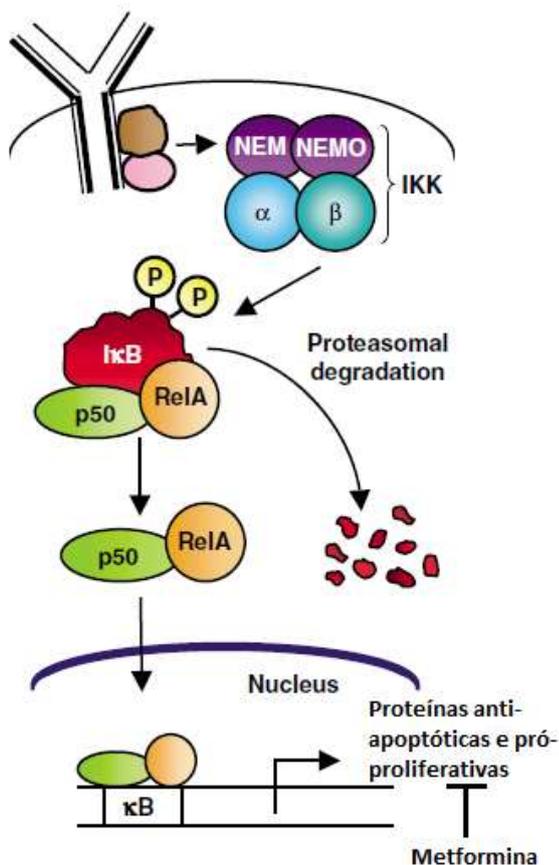


Figura 1 - Via de sinalização do NF-κB Fonte: Gilmore (2016), figura adaptada

O NF-κB está associado à regulação de genes ligados ao processo apoptótico, resposta imune, angiogênese, adesão, proliferação e diferenciação celular; e sua expressão comumente está alterada em processos oncogênicos (SUN; ZHANG, 2007). Agrawal e col. (2018) mostraram correlação entre aumento na expressão de NF-κB e progressão do carcinoma de mama, e Yu e col. (2017) relatam que o NF-κB está ativado constitutivamente em maior quantidade em casos de linfomas de células B, promovendo angiogênese e proliferação celular. Um estudo de Acuña e col. (2018) relacionou ação inibitória do NF-κB por Hapalindole H (Hap H) em linhagem de células de câncer de próstata 3 (PC-3) com indução de apoptose.

2 Justificativa

O feocromocitoma é um tumor, esporádico ou hereditário das células cromafins que se localizam na porção superior das glândulas suprarrenais. Estão relacionados ao aumento da produção de catecolaminas, como noradrenalina e adrenalina, ocasionando problemas cardiovasculares. O tratamento quimioterápico apresenta baixa eficácia, e pode ocasionar efeitos adversos que pioram a saúde e qualidade de vida do paciente, como náuseas, perda de apetite, alopecia, mielossupressão, leucopenia, trombocitopenia, sendo que alguns medicamentos utilizados auxiliam no desenvolvimento de novos tipos de cânceres. Por conta disso, a busca por novos fármacos que possam auxiliar no tratamento dessa doença e que exerçam menores efeitos adversos tem sido priorizada por diversos profissionais de saúde. Alguns fármacos utilizados para tratamento do diabetes tipo 2, como metformina, têm mostrado efeitos benéficos no tratamento de pacientes acometidos de determinados tumores e na prevenção do aparecimento da doença. Entretanto, os mecanismos envolvidos por trás desta ação terapêutica ainda precisam ser melhor elucidados. Uma possível forma pela qual esses fármacos possam atuar é na via do NF- κ B, que se encontra desregulada em pacientes acometidos da doença, auxiliando na proliferação de células cancerígenas e piora na condição do paciente. Dessa forma, o desenvolvimento do presente estudo torna-se essencial para verificar um possível mecanismo de ação da metformina sobre o feocromocitoma.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da metformina na expressão de NF-Kb na linhagem celular PC12-Adh.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Realizar o cultivo de células da linhagem PC12-Adh de ratos;
- 2- Realizar a extração de proteínas de células PC12-ADH-Adh e quantificá-las;
- 3- Avaliar o efeito da metformina sobre a expressão do complexo transcricional NF-κB;
- 4- Comparar resultados encontrados nesse trabalho com outros artigos que retratam alterações na via do NF-κB.

4 Metodologia

4.1 Cultura de células

Foram utilizadas células da linhagem PC12-Adh neste trabalho. As células PC12-Adh são células provenientes de feocromocitoma da medula suprarenal de ratos, que possuem grânulos semelhantes aos encontrados em células cromafins. Sintetizam e armazenam dopamina e norepinefrina, ambos neurotransmissores de catecolaminas (GREENE; TISCHLER, 1976).

As células da linhagem PC12-Adh, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Foram cultivadas em placa de Petri contendo 10 mL do meio de cultura HAM-F12 (composto de 5% de soro fetal bovino, 15% de soro de cavalo, 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina). O meio foi trocado a cada 2 dias. Antes da troca do meio, foi visto em microscópio a quantidade de células presentes na placa e quantidade de células aderidas à placa. Quando visto um número muito alto de células na placa, foi realizada tripsinização para diminuir esse número.

4.2 Plaqueamento e tratamento das células

Foi feito o plaqueamento das células em placa de 6 poços. As células foram separadas da placa de Petri com tripsina, a tripsina foi inativada com meio HAM-F12, as células foram centrifugadas em tubo falcon a 2000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente e ressuspendidas em 10 mL do meio HAM-F12. Foi feita contagem de 10 µL do meio com células na câmara de Neubauer. Cada poço continha 5×10^5 células. Por fim, a placa foi incubada em estufa a 25°C por 24 horas.

Posteriormente, foi realizado o tratamento com metformina, preparando-se a solução metformina/meio e controle/meio. Dois poços foram tratados com metformina 20 mM, dose utilizada por Meireles (2015), enquanto que dois poços foram mantidos como controle (contendo o meio de cultura HAM-F12).

4.3 Coleta das proteínas

O tratamento com metformina foi feito o tratamento por 48 horas. Todo procedimento de coleta de proteínas foi feito em gelo. As soluções de metformina/meio e controle/meio foram aspiradas de cada poço. Eles foram lavados com 1mL de PBS 1X e as células foram removidas da placa com auxílio de espalhadores de células, sendo coletadas em Eppendorfs (um para cada poço). Os Eppendorfs foram centrifugados a 4°C, 2000 rpm por 10 segundos e o sobrenadante foi descartado. A cada Eppendorf foram adicionados 50µL de tampão RIPA (que consiste de ortovanadato de sódio, pirofosfatase e inibidor de protease). As células foram lisadas com auxílio de sonicador e foi realizada centrifugação a 4°C, 2000 rpm por 10 segundos. As células foram incubadas por 30 minutos em gelo. Em seguida, foi feita centrifugação a 4°C, 12000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para posterior quantificação pelo método de Lowry.

4.3 Quantificação das proteínas

Foi realizado método de Lowry para quantificar das proteínas. O método, descrito por Lowry e col. (1951) possui duas etapas: reação de proteínas com cobre em solução alcalina (etapa 1) e redução do reagente de Folin pelas proteínas tratadas com cobre (etapa 2).

Na etapa 1, peptídeos presentes nas cadeias proteicas formam complexos com cobre II, que se encontra reduzido em meio alcalino. Na etapa 2, o reagente de Folin, composto por tungstênio, molibdato e ácido fosfórico, sofre redução do complexo proteína-cobre, emitindo coloração azul, detectável até 750 nm. As amostras são lidas, posteriormente, em aparelho espectrofotômetro, utilizando-se uma curva de calibração de albumina do soro bovino cuja concentração já é conhecida.

No presente experimento, foi realizada diluição seriada de concentrado de proteína albumina do soro bovino (BSA) e água desionizada, partindo-se de solução com concentração de 1 mg/mL até se obter uma solução com concentração de 0,15625 mg/mL, de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 1 - Diluição seriada de proteína albumina do soro bovino para confecção de curva-padrão para quantificação de proteínas

[] Inicial (mg/mL)	Quantidade de solução inicial (µL)	Quantidade de água desionizada (µL)	[] Final (mg/mL)
1	500	500	0,5
0,5	500	500	0,25
0,25	500	500	0,125
0,125	500	500	0,0621
0,0621	500	500	0,03125
0,03125	500	500	0,015625

Foram adicionados 50 µL de cada solução final a 950 µL de solução reagente (composta de 100 µL de reagente de Folin e 850 µL de reagente C. O reagente C, por sua vez, era composto de 30 mL de solução 0,1M de Na₂CO₃ em NaOH, 500 µL de CuSO₄, 500 µL de tartarato de potássio 2%), de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 2 - Diluição seriada de proteína albumina do soro bovino estoque com adição de solução reagente para confecção de curva-padrão para quantificação de proteínas

[] Inicial (mg/mL)	Quantidade de solução inicial (µL)	Quantidade de reagente (µL)	[] Final (µg/mL)
0,5	50	950	0,25
0,25	50	950	0,125
0,125	50	950	0,0621
0,0621	50	950	0,03125
0,03125	50	950	0,015625
0,015625	50	950	0,0078125

As amostras foram preparadas adicionando-se 1 µL das soluções obtidas na coleta das proteínas em 49 µL de água desionizada e 950 µL da solução reagente, e lidas no espectrofotômetro a 750 nm. Utilizando-se a equação da reta, obtida na curva de calibração, foram calculadas as concentrações de proteína em cada amostra.

4.4 Western Blot

O método tem como objetivo detecção de proteínas em amostras de células ou tecidos lisados. Uma das primeiras descrições da metodologia foi feita por Towbin e col. (1979), onde descreve as etapas do processo. Consiste na separação das proteínas em gel de poliacrilamida com passagem de corrente elétrica, separando-as de acordo com seu peso molecular: proteínas menores se separam mais rapidamente do que proteínas maiores. Depois, as proteínas separadas são transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), onde são incubadas com um anticorpo específico contra as proteínas de interesse (anticorpo primário) e, posteriormente, com anticorpo que reconheça o anticorpo primário e possua uma enzima reveladora (anticorpo secundário).

Foram utilizados tanto o gel gradiente 4% a 12% pronto da marca Amersham (TC) ECL (TC Gel 4-12%) quanto o gel preparado, (gel separador e gel concentrador) que continha água destilada; acrilamida 30%; Tris-HCL 1,5M com pH 8,8; APS 10% e TEMED (separador) e água destilada; acrilamida 30%; Tris-HCL 1,5M com pH 6,8; APS 10% e TEMED (concentrador) .

As amostras foram preparadas adicionando-se quantidade suficiente das soluções de proteínas em tubos de 1,5 mL para que cada tubo contivesse 40 µg de proteínas. Foram adicionados 2,5 µL de tampão de amostra (que contém glicerol e Beta-mercaptoetanol) e os tubos foram submetidos a banho maria por 5 minutos, para desnaturação das proteínas.

Foi preparado tampão de corrida e adicionado à cuba de corrida. Foi realizada pré-corrída por 10 minutos a 110 V. Feita a pré-corrída, as proteínas foram adicionadas ao gel de corrida e foi realizada a separação das proteínas a 110 V por 2 horas.

Foram preparados os materiais para transferência úmida das proteínas do gel para membrana de PVDF. Uma membrana de PVDF de tamanho aproximado do gel de corrida foi cortada, submetida a lavagem com metanol por 2 minutos, lavagem com água destilada por 2 minutos e mergulhada no tampão de transferência por 2 minutos. Uma vez terminada a separação das proteínas, o gel concentrador foi cuidadosamente descartado. O gel separador foi removido das placas de vidro e montou-se um sistema em uma vasilha grande, contendo, nesta ordem, o ânodo, tela, papel de filtro fino, membrana, gel, papel de filtro fino, tela e cátodo. O sistema foi transferido para a cuba de transferência e coberto com solução de transferência. Foi iniciada a transferência do gel para membrana de PVDF, a 30 V durante 3 horas.

Ao término da transferência, foi feito bloqueio da membrana com solução de leite 5% e TBS-T 1x. Após bloqueada, foi preparada solução de leite em pó e TBS-T

1x com anticorpo primário GAPDH -1 (Abkam). A solução de leite e TBS-T foi adicionada à membrana e deixada sob agitação por 1 hora. Depois, a solução foi descartada e a membrana foi incubada com a solução de leite, TBS-T e anticorpo primário, sob agitação *overnight* a 4 °C.

Foi preparada solução com anticorpo secundário (Santa Cruz) – 1:5000 em leite em pó e TBS-T 1x. A membrana foi incubada com esta solução por 1 hora. Após a incubação, a solução com anticorpo secundário foi descartada e foi feita lavagem da membrana com TBS-T 1x três vezes por 5 minutos. Ao final das lavagens, foi preparada solução contendo Luminol Enhancer e solução de peróxido. Essa solução foi adicionada à superfície da membrana, que foi lida em aparelho espectrofotômetro Amersham Imager 600.

A membrana foi recuperada e foi repetido o procedimento desde incubação com anticorpo, porém desta vez foi utilizada solução com anticorpo primário anti- NF- κ B (Cell Signaling) 1:1000 e solução com anticorpo secundário (Abkam) 1:5000.

4.5 Quantificação do Western Blot

A quantificação das bandas de Western Blot foi realizada utilizando-se o programa ImageJ. A densidade das bandas de NF- κ B foi lida com o programa. Foi calculado o valor de densidade invertida (255 – densidade lida), e retirado o valor do “background” invertido (255 – “background” lido), obtendo-se o valor de proteína líquida (proteína invertida – “background” invertido). O mesmo procedimento foi realizado para as bandas de GAPDH, obtendo-se os valores de proteína líquida do controle interno. Por fim, foi calculada razão entre o NF- κ B/GAPDH (proteína

líquida/proteína líquida do controle interno) de cada experimento e representada graficamente.

4.6 Estatística

Os dados apresentam distribuição não normal e o teste estatístico empregado foi o Mann-Whitney com valor de significância $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Curva de calibração obtida para quantificação de proteínas

Foi realizado plaqueamento e tratamento das células PC12-Adh com metformina. Depois de 48 horas de tratamento, proteínas das células foram coletadas e foi feita a quantificação das proteínas e foi construída uma curva de padrão utilizando-se proteínas BSA. A curva foi lida em aparelho espectrofotômetro, obtendo-se a seguinte curva de calibração para o experimento N1:

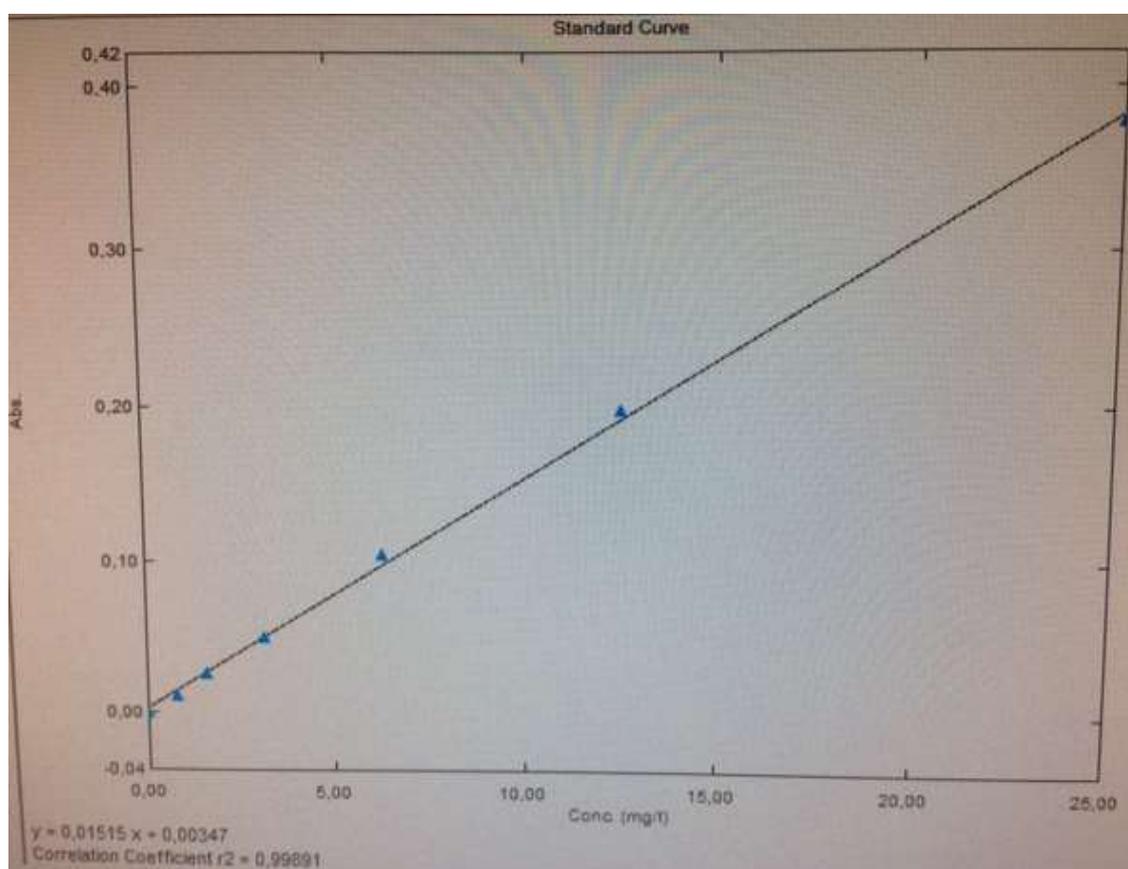


Gráfico 1 - Curva de Calibração para experimento N1

A equação da reta obtida foi: $y = 0,01515x + 0,00347$, onde y = valor de absorbância a 750 nm e x = concentração de proteínas, com $r^2 = 0,99891$. As concentrações de cada amostra foram obtidas de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 3 - Concentrações de proteínas obtidas das amostras do experimento N1

Amostras	Absorbância a 750 nm (y)	Equação da reta	Concentração de proteínas (x)
Controle 1	0,05	$0,05 = 0,01515x + 0,00347$	3,12
Controle 2	0,06	$0,06 = 0,01515x + 0,00347$	4,03
Tratamento com metformina 1	0,07	$0,07 = 0,01515x + 0,00347$	4,08
Tratamento com metformina 2	0,09	$0,09 = 0,01515x + 0,00347$	5,43

As concentrações de proteínas do experimento N1 foram consideradas válidas uma vez que o valor do r^2 desta curva de calibração foi próximo a 1.

Da mesma forma, para o experimento N2, após a diluição seriada, foi obtida a seguinte curva de calibração:

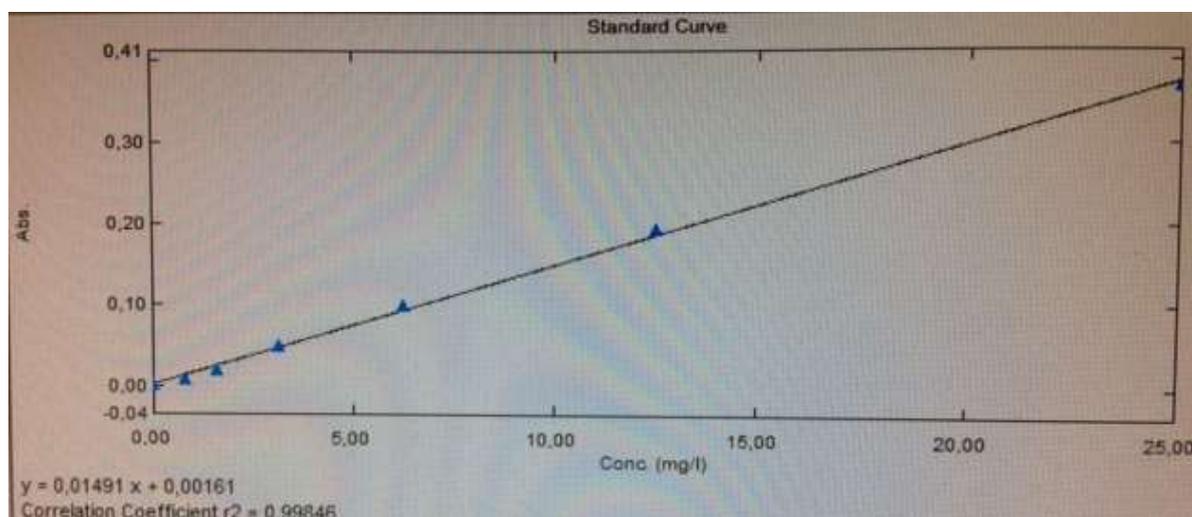


Gráfico 2 - Curva de Calibração para experimento N2

A equação da reta foi: $y = 0,01491x + 0,00161$, onde y = valor de absorbância a 750 nm e x = concentração de proteínas, com $r^2 = 0,99846$. As concentrações de cada amostra foram obtidas de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 4 - Concentrações de proteínas obtidas das amostras do experimento N2

Amostras	Absorbância a 750nm (y)	Equação da reta	Concentração de proteínas (x)
Controle 1	0,07	$0,07 = 0,01515x + 0,00347$	4,82
Controle 2	0,07	$0,07 = 0,01515x + 0,00347$	4,44
Tratamento com metformina 1	0,05	$0,05 = 0,01515x + 0,00347$	3,40
Tratamento com metformina 2	0,05	$0,05 = 0,01515x + 0,00347$	3,47

As concentrações de proteínas do experimento N2 foram consideradas válidas uma vez que o valor do r^2 da curva de calibração foi próximo a 1.

5.2 Efeito da metformina na via do NF- κ B

Para avaliar os efeitos da metformina na via NF- κ B de células de feocromocitoma de ratos foi realizado o ensaio Western Blot com proteínas extraídas das células PC12-Adh tratadas e não tratadas com metformina 20mM por 48h, utilizando-se o programa ImageJ para quantificar suas densidades e verificar a razão de NF- κ B/GAPDH em cada experimento.

5.2.1 Experimento N1

Após a quantificação das proteínas, 40ug destas proteínas de células tratadas e não tratadas com metformina foram submetidas a eletroforese e incubação com anticorpos de NF-κB e GAPDH e o resultado está indicado na figura 2-A.

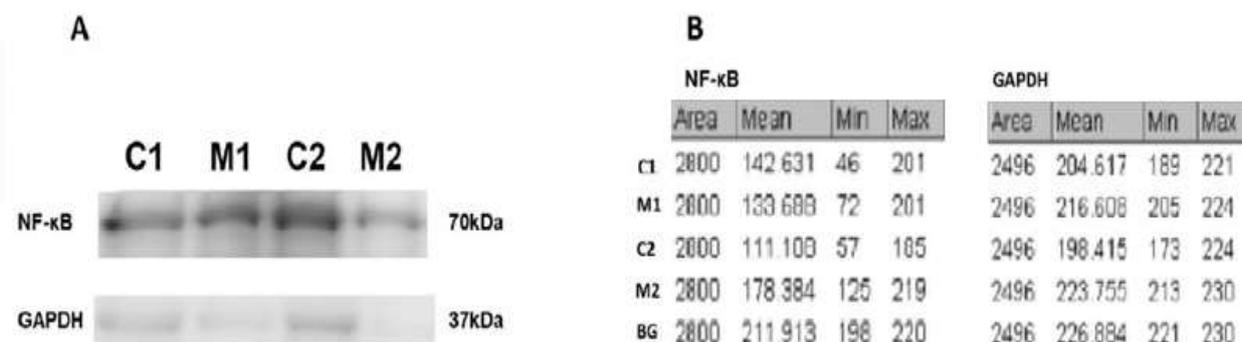


Figura 2 - Western Blot e Quantificação das bandas de células PC12-Adh do experimento N1. A: Western Blot das proteínas de células PC12-Adh do experimento N2. C1-controle 1; C2- controle 2; M1- tratamento com metformina 1; M2-tratamento com metformina 2. B: Densidade das bandas do experimento N2. C1- controle 1; C2- controle 2; M1- tratamento com metformina 1; M2-tratamento com metformina 2, BG- background.

Para calcular suas densidades médias (mean), foi utilizado o programa ImageJ mostradas na figura 2-B. Estas densidades seriam utilizadas para calcular os valores de proteína líquida (NF-κB) e proteína líquida do controle interno (GAPDH) e a razão entre NF-κB/GAPDH do grupo tratado com metformina e do grupo controle.

5.2.2 Experimento N2

As mesmas condições testadas no experimento N1 foram repetidas e o N2 está indicado na figura 3-A.

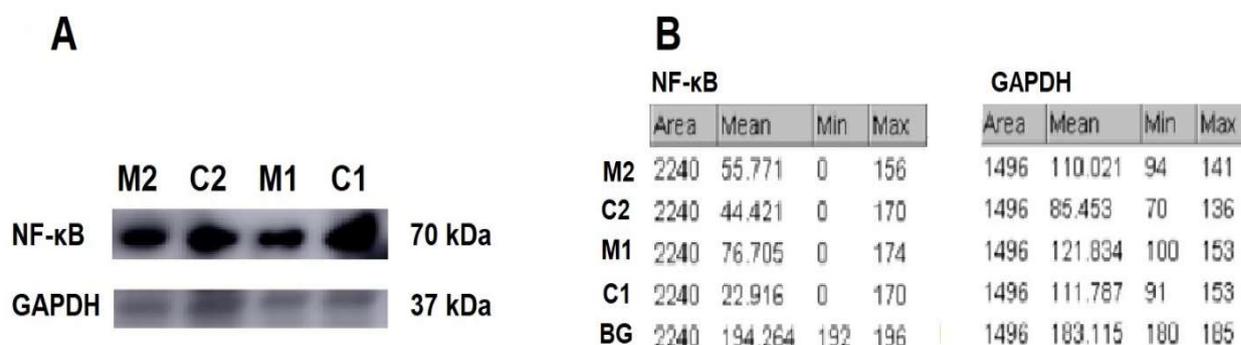


Figura 3 – Western Blot e quantificação das bandas de células PC12-Adh do experimento N2.
 A: Western Blot das proteínas de células PC12-Adh do experimento N2. C1-controle1; C2- controle 2; M1-tratamento com metformina 1; M2-tratamento com metformina 2. B: Densidades das bandas do experimento N2. C1- controle 1; C2- controle 2; M1- tratamento com metformina 1; M2-tratamento com metformina 2, BG- background.

Para calcular suas densidades médias (mean), foi utilizado novamente o programa ImageJ, mostradas na figura 3-B. Estas densidades seriam utilizadas para calcular os valores de proteína líquida (NF-κB) e proteína líquida do controle interno (GAPDH) e a razão entre NF-κB/GAPDH do grupo tratado com metformina e do grupo controle.

5.3 Razão entre NF-κB/GAPDH de N1, N2 e de ambos

A partir das densidades médias (mean) dos experimentos N1 e N2, foram calculados os valores de proteína líquida para NF-κB e proteína líquida do controle interno para GAPDH para o experimento N1 (tabela 5 e 6) e N2 (tabela 7 e 8).

Tabela 5 – Valores de proteína líquida NF-κB para experimento N1

Amostras	Densidade	Densidade invertida	Background	Background invertido	Proteína líquida (NF-κB)
Controle 1	142,631	112,369	211,913	43,087	69,282
Tratamento com metformina 1	133,688	121,312	211,913	43,087	78,225
Controle 2	111,108	143,892	211,913	43,087	100,805
Tratamento com metformina 2	178,384	76,616	211,913	43,087	33,529

Tabela 6 – Valores de proteína líquida do controle interno GAPDH para experimento N1

Amostras	Densidade	Densidade invertida	Background	Background invertido	Proteína líquida do controle interno (GAPDH)
Controle 1	204,617	50,383	226,884	28,116	22,267
Tratamento com metformina 1	216,608	38,392	226,884	28,116	10,276
Controle 2	198,415	56,585	226,884	28,116	28,469
Tratamento com metformina 2	223,755	31,245	226,884	28,116	3,129

Tabela 7 – Valores de proteína líquida NF-κB para experimento N2

Amostras	Densidade	Densidade invertida	Background	Background invertido	Proteína líquida (NF-κB)
Controle 1	22,916	232,084	194,264	60,736	171,348
Tratamento com metformina 1	76,705	178,295	194,264	60,736	117,559
Controle 2	44,421	210,579	194,264	60,736	149,843
Tratamento com metformina 2	55,771	199,229	194,264	60,736	138,493

Tabela 8 – Valores de proteína líquida do controle interno GAPDH para experimento N2

Amostras	Densidade	Densidade invertida	Background	Background invertido	Proteína líquida do controle interno (GAPDH)
Controle 1	111,787	143,213	183,115	71,885	71,328
Tratamento com metformina 1	121,834	133,166	183,115	71,885	61,281
Controle 2	85,453	169,547	183,115	71,885	97,662
Tratamento com metformina 2	119,021	135,979	183,115	71,885	64,094

Com estes valores, foi feita a média das razões NF- κ B/ GAPDH (proteína líquida/ proteína líquida do controle interno) para os grupos controle e para os grupos tratados com metformina. Os dados foram apresentados na forma de gráficos.

5.3.1 Experimento N1

Para o experimento N1, foi observada maior média das razões NF- κ B/GAPDH no grupo tratado com metformina quando comparado ao grupo controle, indicando um possível aumento da expressão de NF- κ B no grupo tratado com metformina, como mostra o gráfico 3. Deve-se considerar, porém, que as bandas de GAPDH, o controle interno, apresentaram densidades muito diferentes, podendo ter afetado o resultado.

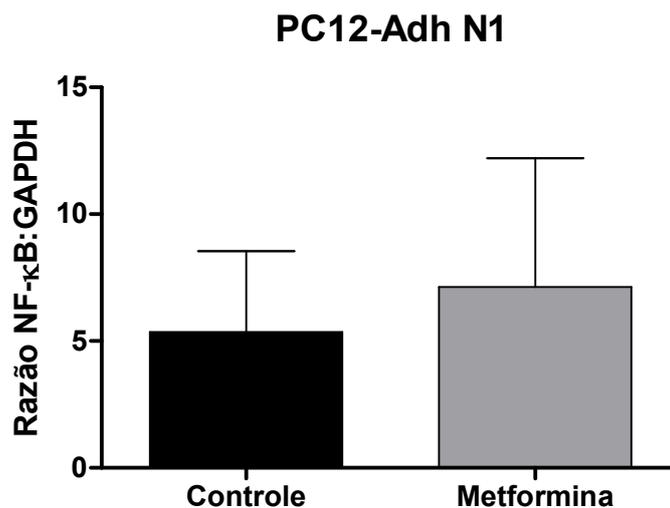


Gráfico 3 - Razão entre NF-κB/GAPDH de N1

5.3.2 Experimento N2

Para o experimento N2, foi observada menor média das razões NF-κB/GAPDH no grupo tratado com metformina quando comparado ao grupo controle, indicando uma possível diminuição da expressão de NF-κB no grupo tratado com metformina, como mostra o gráfico 4. Deve-se considerar, porém, que as bandas de GAPDH, o controle interno, apresentaram densidades mais próximas entre si.

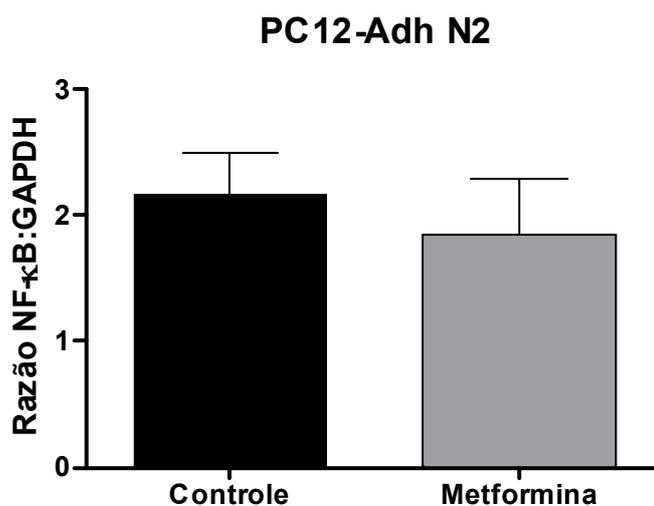


Gráfico 4 - Razão entre NF-κB/GAPDH de N2

5.3.2 Experimento N1 e N2

Considerando os dados de ambos os experimentos, foi visto que a razão entre NF- κ B/GAPDH foi maior no grupo tratado com metformina comparado com o grupo controle, como mostra o gráfico 5. Entretanto, devido à alta variação entre as razões e divergências de resultados entre o experimento N1 e N2, não foi possível concluir o efeito da metformina na expressão de NF- κ B em células PC12-Adh.

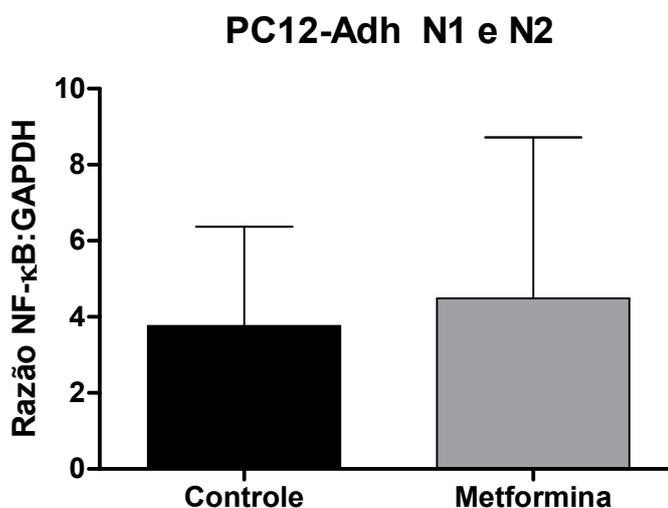


Gráfico 5 - Razão entre NF- κ B/GAPDH de N1 e N2

6 Discussão

O presente estudo foi um estudo piloto, ainda em estágios iniciais, podendo ser objeto de análise para estudos futuros sobre o efeito da metformina na expressão de NF- κ B em células de feocromocitoma de rato.

A metformina tem sido estudada por conta de seus possíveis efeitos terapêuticos no tratamento de diversos tipos de tumores. Estudos de coorte de Kim e col. (2018) mostraram que a cada 1000 pacientes do grupo não tratado com metformina e outros medicamentos antidiabéticos (sulfonilureias, inibidores de alfa-

glicosidase, tiazolidinadionas, insulina e inibidores da dipeptidil peptidase 4) houve incidência de câncer (de próstata, fígado, colorretal, tireoide) em 21,8 deles, enquanto que em pacientes tratados com metformina e outros antidiabéticos, houve incidência em apenas 13,2 deles. Outro estudo de coorte de Chuang e col. (2018) mostrou que o índice de sobrevivência de pacientes acometidos de câncer de pulmão de células não pequenas inoperável foi maior em pacientes tratados com o medicamento do que os que não receberam o medicamento. Estudos de Costa e col. (2014) mostraram efeito antiproliferativo da metformina em modelos de células de neuroblastoma SKNBE2 e SH-SY5Y. De forma similar, Kumar e col. (2014) mostraram que metformina foi capaz de reduzir o tamanho de neuroblastomas em modelos xenográficos de ratos, com implante de células SKNBE2 ou SH-SY5Y, além de induzir apoptose por meio da clivagem de caspase 3. Davies e col. (2017) analisaram o efeito da metformina na sensibilização de células MFC7 de câncer de mama resistentes à doxorrubicina e observaram não apenas um aumento da sensibilidade desta linhagem celular ao tratamento, mas também diminuição da proliferação celular, na presença de metformina. Os autores sugerem um mecanismo do efeito anticancerígeno da metformina por meio de sua ação sobre inibidores de histonas desacetilases. O presente estudo, porém, tentou verificar seu efeito por meio de outro mecanismo de ação, por meio da diminuição da expressão de NF- κ B, diminuindo a proliferação celular.

Meireles (2015) já havia estudado o efeito da metformina sobre a linhagem de células PC12-Adh, mostrando redução da viabilidade celular de cerca de 40% ao se utilizar uma concentração inibitória de 20,85 μ m do medicamento. Entretanto, alertou para a necessidade de estudos futuros que pudessem elucidar os mecanismos pelos quais o fármaco possa exercer esta ação terapêutica.

O presente estudo mostrou não haver alteração da expressão de NF- κ B com uso de metformina. Estes resultados estão em discordância com os achados de Araújo e col. (2017), que observaram diminuição da expressão de NF- κ B (p65) em células de ratos albinos Wistar cuja dieta foi complementada com metformina, em comparação com o grupo controle. Kim e col. (2017), por sua vez, mostraram diminuição da expressão de NF- κ B em células SNU-C5, uma linhagem celular humana de câncer colorretal, e células SNU-C5_5FuR, células da linhagem SNU-C5 resistentes a fluororacil, quando tratadas com metformina e fluororacil em comparação ao tratamento apenas com fluororacil.

Deve-se considerar, porém, que a linhagem de células PC12-Adh possui limitações. Elas são incapazes de sintetizar epinefrina, mesmo tratadas com dexametasona e, por possuírem inexistente ou baixa quantidade da enzima feniletanolamina-N-metiltransferase, conversora de adrenalina em noradrenalina, possuem caráter fenotípico noradrenérgico (GREENE; TISCHLER, 1976). Essas diferenças em suas características secretórias podem diminuir sua semelhança com modelos de feocromocitomas humanos.

Além disso, o presente estudo mostrou limitações, como número baixo de repetições dos experimentos, além de controle interno (no caso, GAPDH) em quantidades desiguais, onde foi observada maior diferença nas bandas de GAPDH do experimento N1 quando comparadas com o experimento N2.

Estudos futuros são necessários para melhor compreender a ação da metformina na via do NF- κ B, permitindo elucidar um possível mecanismo antitumoral exercido por este medicamento. Também, poderiam ser realizados estudos para melhor determinar a ação da metformina em NF- κ B do citoplasma e do núcleo celular, visto que Sekino e col. (2018) viram diferenças no efeito da metformina no NF- κ B no

núcleo celular. Além disso, poderia ser verificada sua ação sobre a atividade da AMPK, cuja ativação poderia inibir o NF- κ B, como mostrado por Salminen e col. (2011).

7 Conclusões

Foi possível realizar a cultura de células PC12-Adh de ratos, e realizar a extração de proteínas das células PC12-Adh em quantidades suficientes para dar seguimento ao estudo. Além disso, a quantificação foi possível utilizando-se o método de Lowry e confeccionando-se uma curva de calibração com r^2 próximo a 1.

O presente estudo mostrou não haver alterações significativas na expressão de NF- κ B em células tratadas com metformina, comparadas com o controle, sendo necessários estudos futuros, com maior número de repetições dos experimentos para determinar estas alterações.

8 Referências

ACUÑA, U. M.; MO, S.; ZI, J. e col. Hapalindole H Induces Apoptosis as an Inhibitor of NF- κ B and Affects the Intrinsic Mitochondrial Pathway in PC-3 Androgen-insensitive Prostate Cancer Cells. **Anticancer Res**, v.38, n.6, p.3299-3307, 2018.

AGRAWAL A. K.; PIELKA E.; LIPINSKI A. e col. Clinical validation of nuclear factor kappa B expression in invasive breast cancer. **Tumour Biol**, v.40, n.1, 2018.

ARAÚJO, A. A.; PEREIRA, A. S. B. F.; MEDEIROS. C. A. C. X. e col. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. **PLoS One**, v.12, n.8, 2017.

AVERBUCH, S. D.; STEAKLEY, C. S.; YOUNG, R. C. e col. Malignant pheochromocytoma: effective treatment with a combination of cyclophosphamide, vincristine, and dacarbazine. **Ann Intern Med**, v.109, n.4, p.267-73, 1988.

AYALA-RAMIREZ, M.; CHOUGNET, C. N.; HABRA, M. A. e col. Treatment with Sunitinib for Patients with Progressive Metastatic Pheochromocytomas and Sympathetic Paragangliomas. **J Clin Endocrinol Metab**, v.97, n.11, p.4040-4050, 2012.

BURNICHON, N.; CASCÓN, A.; SCHIAVI, F. e col. MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. **Clin Cancer Res**, v.18, n.10, p. 2828-37, 2012.

CAMERON, A. R.; LOGIE, L.; PATEL, K. e col. Metformin selectively targets redox control of complex I energy transduction. **Redox Biol**, p.187-197, 2018.

CHEN, H.; SIPPEL, R. S.; PACAK, K. The NANETS Consensus Guideline for the Diagnosis and Management of Neuroendocrine Tumors: Pheochromocytoma, Paraganglioma & Medullary Thyroid Cancer. **Pancreas**, v.39, n.6, p. 775–783, 2010.

CHUANG, M. C.; YANG, Y. H.; TSAI, Y. H. e col. Survival benefit associated with metformin use in inoperable non-small cell lung cancer patients with diabetes: A population-based retrospective cohort study. **PLoS One**, v.13, n.1, 2018.

COSTA, D.; GIGONI, A.; WÜRTH, R. e col. Metformin inhibition of neuroblastoma cell proliferation is differently modulated by cell differentiation induced by retinoic acid or overexpression of NDM29 non-coding RNA. **Cancer Cell International**, v.14, n.59, 2014.

DAVIES, G.; LOBANOVA, L.; DAWICKI, W. e col. Metformin inhibits the development, and promotes the resensitization, of treatment-resistant breast cancer. **PLoS One**, v.12, n.12, 2017.

DENORME, M.; YON, L.; ROUX, C. e col. Both sunitinib and sorafenib are effective treatments for pheochromocytoma in a xenograft model. **Cancer Lett**, v. 352, n. 2, p. 236-244, 2014.

FAIÇAL, S.; SHIOTA, D. Feocromocitoma: atualização diagnóstica e terapêutica. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.3, São Paulo, 1997.

GILMORE, T. D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, v.25, p. 6680–6684, 2006.

GOODMAN; GUILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Tradução por Augusto Langeloh et.al. 12 ed. Nova York: AMGH Editora, 2012.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.73, n.7, p. 2424–2428, 1976.

JOCHMANOVA, I.; PACAK, K. Pheochromocytoma: The First Metabolic Endocrine Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 1, 2016.

KASZNICKI, J.; SLIWINSKA, A.; DRZEWOSKI, J. Metformin in cancer prevention and therapy. **Ann Transl Med**, v.2, n.6, 2014.

KIM, H. J.; LEE S.; CHUN, K. H. e col. Metformin reduces the risk of cancer in patients with type 2 diabetes: An analysis based on the Korean National Diabetes Program Cohort. **Medicine** (Baltimore), v.97, n.8, 2018.

KIM, S. H.; KIM, S. C.; KU, J. L. Metformin increases chemo-sensitivity via gene downregulation encoding DNA replication proteins in 5-Fu resistant colorectal cancer cells. **Oncotarget**, v.8, n.34, 2017.

KUMAR, A.; AL-SAMMARRAIE, N.; DIPETTE, D. J.; SINGH, U. S. Metformin impairs Rho GTPase signaling to induce apoptosis in neuroblastoma cells and inhibits growth of tumors in the xenograft mouse model of neuroblastoma. **Oncotarget**, v.5, n.22, 2014.

KURGAN, N.; TSAKIRIDIS, E.; KOUVELIOTI, R. e col. Inhibition of Human Lung Cancer Cell Proliferation and Survival by Post-Exercise Serum Is Associated with the Inhibition of Akt, mTOR, p70 S6K, and Erk1/2. **Cancers**, v.9, 2017.

LENDERS, J. W. M.; EISENHOFER, G. Update on Modern Management of Pheochromocytoma and Paraganglioma. **Endocrinology and Metabolism**, v. 32, n. 2, 2017.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.** 1951. Disponível em <<http://www.jbc.org/content/193/1/265.citation>>. Acesso em 20 jun 2018.

MA S.; ZHENG Y.; XIAO Y. e col. Meta-analysis of studies using metformin as a reducer for liver cancer risk in diabetic patients. **Medicine** (Baltimore), v.96, n.19, 2017.

MADIRAJU, A. K.; ERION, D. M.; RAHIMI, Y. e col. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. **Nature**, v. 510, n.7506, p.542-6, 2014.

MEIRELES, C. G. **Avaliação do efeito citotóxico da metformina em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata e de feocromocitoma**. 2015. 71 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Brasília: Universidade de Brasília, Brasília, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unb.br/handle/10482/18424>>. Acesso em: 7 jun. 2018.

PACAK K.; LINEHAN, W. M.; EISENHOFER, G. e col. S. Recent Advances in Genetics, Diagnosis, Localization, and Treatment of Pheochromocytoma. **Ann Intern Med**, v.134, n.4, p.315-329, 2001.

SALMINEN, A.; HYTTINEN, J. M.; KAARNIRANTA, K. AMP-activated protein kinase inhibits NF- κ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan. **J Mol Med (Berl)**. v.89, n.7, p.667-76, 2011.

SEKINO, N.; KANO, M.; MATSUMOTO, Y. e col. Antitumor effects of metformin are a result of inhibiting nuclear factor kappa B nuclear translocation in esophageal squamous cell carcinoma. **Cancer Sci**, v.109, n.4, p.1066-1074, 2018.

SUN X.F.; ZHANG H. NFKB and NFKBI polymorphisms in relation to susceptibility of tumour and other diseases. **Histol Histopathol**, v.22, n. 12, p.1387-98, 2007.

SUNG-HEE, K.; SOON-CHAN, K.; JA-LOK K. Metformin increases chemo-sensitivity via gene downregulation encoding DNA replication proteins in 5-Fu resistant colorectal cancer cells. **Oncotarget**. v.8, n.34, p.56546–56557, 2017.

TOWBIN H; STAEHELIN T; GORDON J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.76, n.9, p.4350–54, 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Early cancer diagnosis saves lives, cuts treatment costs**. February 3, 2017. Geneva. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/early-cancer-costs/en/>>. Acesso em: 2 nov. 2017.

YU L.; LI L.; MEDEIROS L. J.; YOUNG K. H. NF- κ B signaling pathway and its potential as a target for therapy in lymphoid neoplasms. **Blood Ver**, v.31, n.2, p.77-92, 2017.

ZHOU P.T.; LI B.; LIU F.R. e col. Metformin is associated with survival benefit in pancreatic cancer patients with diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n.15, 2017.

ZI F.; ZI H.; LI Y. e col. Metformin and cancer: An existing drug for cancer prevention and therapy. **Oncol Lett**, v.15, n.1, p.683-690,2018.