

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARIA EDUARDA AZAMBUJA AMARAL

**Avaliação *in vitro* da interação entre a aspirina e a metformina no câncer de mama:
participação das lipoxinas e da COX-2**

Porto Alegre
2018

PÓS-GRADUAÇÃO - STRICTO SENSU



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARIA EDUARDA AZAMBUJA AMARAL

**Avaliação *in vitro* da interação entre aspirina e a metformina no câncer de
mama: participação das lipoxinas e da COX-2**

Porto Alegre

2018

MARIA EDUARDA AZAMBUJA AMARAL

Avaliação *in vitro* da interação entre aspirina e a metformina no câncer de mama: participação das lipoxinas e da COX-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do Título de Mestre

Orientador:

Dr^a. Maria Martha Campos

Local de Execução:

Laboratório de Cultura Celular e Centro de Toxicologia e Farmacologia - PUCRS

Porto Alegre

2018

Ficha Catalográfica

A485a Amaral, Maria Eduarda Azambuja

Avaliação in vitro da interação entre aspirina e a metformina no câncer de mama : participação das lipoxinas e da COX-2 / Maria Eduarda Azambuja Amaral . – 2018.

115 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profª. Dra. Maria Martha Campos.

1. Câncer de Mama. 2. Reposicionamento de drogas. 3. Metformina. 4. Aspirina. 5. Combinação. I. Campos, Maria Martha. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável: Marcelo Votto Texeira CRB-10/1974

MARIA EDUARDA AZAMBUJA AMARAL

Avaliação *in vitro* da interação entre aspirina e a metformina no câncer de mama: participação das lipoxinas e da COX-2

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do Título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira - PUCRS

Prof Dr^a Natália Fontana Nicoletti – UCS

Prof Dr^a Leticia V. Costa-Lotufo – USP

Porto Alegre

2018

Dedico essa dissertação de mestrado ao meu Vô Flor Amaral,

Um ser humano ímpar, fonte de inspiração, que tenho como exemplo há 26 anos. Médico de excelência, que sempre acreditou na ciência, e, principalmente, em seus netos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Maria Martha Campos, pela confiança e atenção, pelo exemplo passado todos os dias dentro do laboratório. Obrigado por toda compreensão, paciência e pelo incrível conhecimento compartilhado.

A todos os colegas de laboratório, pelo companheirismo, pela confiança, pelo estímulo, pelos puxões de orelha e por me instigar a pensar e a formar uma opinião científica própria e crítica. Obrigado por tudo!

Um agradecimento especial à Nati Nicoletti e à Tânia Mielcke, por toda a ajuda e auxílio na cultura celular quando cheguei ao laboratório. Muito obrigado!

À Raquel Dal Sasso Freitas por todo o companheirismo nesses dois anos. Obrigado pelos desabafos!

À Nati Sperotto, pela companhia incansável de todas as manhãs. Os experimentos foram muito mais fáceis ao teu lado. Obrigado!

À Laura Nery e ao professor Walter pelo auxílio e atenção dada ao desenvolvimento de alguns experimentos. Obrigado!

À equipe do Laboratório de Toxicologia Analítica do InTox por toda a dedicação, auxílio nos experimentos, atenção, risadas e momentos compartilhados desde 2014. Carlos e Juliano, muito obrigado por tudo!

À Pri Schimdt e à Rafa Rubim, pelo companheirismo, pelos momentos compartilhados, pelos desabafos e refúgios e, principalmente, pela amizade criada. Levo vocês sempre no meu coração.

À minha família, principalmente aos meus pais, Renato e Suzana, meus maiores exemplos e professores da vida, pela confiança e pela base sólida proporcionada, pela educação ímpar que recebi e por muitas vezes abdicarem de seus sonhos para que eu realizasse os meus. Muito obrigado! Amo vocês!

À minha irmã e melhor amiga, Marina, pelos estímulos e apoio, pela paciência, pelos conselhos, pela preocupação, pela atenção e pelo companheirismo sincero. Muito obrigado por tornar tudo isso mais fácil. Te amo!

Aos meus amigos, pela amizade verdadeira, por entender minha ausência e por sempre me estimular a ser melhor. Obrigado, vocês são essenciais!

Ao PPGBCM da PUCRS pela oportunidade e à CAPES/PROEX por proporcionar o desenvolvimento do estudo.

RESUMO

O câncer de mama é uma doença altamente prevalente entre mulheres nos cinco continentes, sendo uma das principais causas de morte associadas ao câncer. Esse tumor é classificado em três subtipos principais: câncer de mama estrogênio positivo (ER+), câncer de mama HER2 positivo (HER2+) e, câncer de mama triplo negativo (TNBC). A necessidade da identificação do subtipo tumoral é de extrema importância para escolha do tratamento. Atualmente, o subtipo triplo negativo é o que gera maiores desafios clínicos, pois o tratamento ainda é pouco específico, não sendo eficiente em muitos casos. O reposicionamento de drogas baseia-se na determinação de indicações diferentes daquelas para as quais os fármacos foram previamente aprovados. Representa um método fácil e rápido para a identificação de novos tratamentos, se comparado com o desenvolvimento tradicional de novos fármacos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da aspirina e da metformina, dois medicamentos já aprovados internacionalmente, isolados ou em combinação, em linhagens de câncer de mama de três diferentes subtipos. As linhagens celulares utilizadas foram MCF-7 (ER+), MDA-MB-231 (triplo negativa) e SK-BR-3 (HER2+), as quais foram submetidas ao tratamento com metformina e/ou aspirina (0.01 mM - 10 mM). Após o tratamento, foram realizados ensaios funcionais *in vitro*. Além disso, análises *in silico* foram empregadas para identificar a interação entre o receptor de estrogênio (ER) e os fármacos. Na linhagem MCF-7, a metformina induziu alterações morfológicas, redução da viabilidade e da migração celular. Foi observado um efeito sinérgico entre a combinação de metformina e aspirina na linhagem MDA-MB-231, em relação à viabilidade celular e à capacidade de formação colônias. Entretanto, na linhagem SK-BR-3, não foram obtidos efeitos significativos. Acredita-se que os efeitos da metformina e da aspirina podem estar relacionados à indução da expressão de COX-2, independente da produção de lipoxinas. Dados *in silico* demonstraram que a aspirina e a metformina possuem a capacidade de se ligar, com a mesma energia, ao ER α . O presente estudo traz novas evidências sobre os mecanismos de ação da aspirina e da metformina em células de câncer de mama, com efeitos antitumorais predominantes nos subtipos ER+ e triplo negativo.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Reposicionamento de drogas. Metformina. Aspirina. Combinação.

ABSTRACT

Background Breast cancer is highly prevalent among women worldwide. It is classified into three main subtypes: the estrogen receptor positive (ER+), the human epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+), and the triple negative breast cancer (TNBC). This latter type is the most prevalent in clinics. Each type requires a specific treatment, being TNBC an actual challenge for treating. Drug repurposing is an easy and cheaper methodology to identify new therapies for cancer treatment. This study evaluated the effects of aspirin and metformin, isolated or in combination, in breast cancer cells of different subtypes. *Methods* The breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231, and SK-BR-3 were treated with aspirin and/or metformin (0.01 mM - 10 mM); functional *in vitro* assays were performed. The interactions with the estrogen receptors (ER) were evaluated *in silico*. *Results* Metformin altered the morphology, and reduced the viability and migration of the ER+ cell line MCF-7. A synergistic effect for the combination of metformin and aspirin was observed in the TNBC cell subtype MDA-MB-231, according to the evaluation of viability and colony formation. No significant effects were observed for either drugs in the HER2+ cell subtype SK-BR-3. The effects of metformin and aspirin partly rely on cyclooxygenase-2 (COX-2) upregulation, without any alteration of lipoxin production. *In silico*, metformin and aspirin bound the ER α receptor with the same energy. *Conclusion* We provide novel evidence on the mechanisms of action of aspirin and metformin in breast cancer cells, showing favorable outcomes for these drugs in the ER+ and TNBC subtypes.

Keywords: *Breast cancer. Drug repurposing. Metformin. Aspirin.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11-HETE: 11-hidroxi-eicosatetraenoico

12-LO: lipooxigenase 12

15(S)-HETE: 15S-hidroxi-eicosatetraenoico

15R- H(p)ETE: 15R-hidroxi-peroxi-eicosatetraenoico

5-LO: lipooxigenases 5

AINE: anti-inflamatórios não esteroidais

ALX: metabotrópicos de lipoxina A4

AMPK: proteína quinase ativada por AMP

ATL: *aspirin-triggered lipoxins* (lipoxinas desencadeadas por aspirina)

BRCA1: *breast cancer 1* (câncer de mama 1)

BRCA2: *breast cancer 2* (câncer de mama 2)

CDIS: carcinoma ductal *in situ*

CLIS: carcinoma lobular *in situ*

COX-1: ciclo-oxigenase-1

COX-2: ciclo-oxigenase-2

CXCL8: *C-X-C motif chemokine ligand 8*

ER: *estrogen receptor* (receptor de estrogênio)

ER α : *estrogen receptor alpha* (receptor de estrogênio alfa)

ER β : *estrogen receptor beta* (receptor de estrogênio beta)

FGFR2: *fibroblast growth factor receptor 2* (receptor 2 de fatores de crescimento de fibroblastos)

FPR2: *formyl peptide receptor 2* (receptores de formilpeptídeo)

HER2: *human epidermal growth factor receptor 2* (receptor 2 do fator de crescimento epidermal humano)

HIF1- α : *hypoxia-inducible factor 1-alpha* (fator 1 alfa induzido por hipóxia)

IGF1: *insulin-like growth factor 1* (fator de crescimento 1 semelhante à insulina)

IL-10: interleucina 10

IL-17: interleucina 17

IL-6: interleucina 6

IL-8: interleucina 8

IR: *insulin receptor* (receptor de insulina)

KLF5: *krueppel-like factor 5* (fator 5 semelhante à *krueppel*)

LTA4: leucotrieno A4

LXA4: lipoxina A4

MMP1: metaloproteinase 1

MMP9: metaloproteinase 9

MMP16: metaloproteinase 16

mTOR: *mammalian target of rapamycin* (alvo da rapamicina em mamíferos)

PALB2: *partner and localizer of BRCA2* (parceiro e localizador de BRAC2)

PGE2: prostaglandina E2

PIK3CA: *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate 3-kinase* (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato 3-quinase)

PR: *progesterone receptor* (receptor de progesterona)

STAT3: *signal transducer and activator of transcription 3* (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3)

TEM: transição epitelial-mesenquimal

TNBC: *triple negative breast cancer* (câncer de mama triplo negativo)

TNF: *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)

TXA2: tromboxano A2

VDAC: *voltage-dependent anion channels* (canais de ânions dependentes de voltagem)

VEGF: *vascular endothelial growth factor* (fator de crescimento vascular endotelial)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema da molécula da aspirina e ambos os princípios ativos - grupo acetila reativo e formação de salicilato por esterases	41
Figura 2: Vias de síntese de lipoxinas descritas atualmente	45
Figura 3: Esquema de desencadeamento da carcinogênese via inflamação crônica.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estadiamento do câncer de mama invasivo com as respectivas características e informações relevantes	20
Tabela 2: Características dos subtipos moleculares do câncer de mama	22
Tabela 3: Dados da taxa de incidência e mortalidade por câncer de mama nos Estados Unidos de 2007 a 2011. As taxas são por 100 mil habitantes e a idade ajustada para o padrão populacional norte americano em 2000	24
Tabela 4: Diferentes resultados pré-clínicos encontrados para a metformina no câncer de mama, com as respectivas doses e concentrações utilizadas.	39

SUMÁRIO

Capítulo 1.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Anatomia e Fisiologia da Mama.....	17
1.2 Câncer de Mama.....	17
1.3 Estadiamento do Câncer de Mama.....	20
1.4 Subtipos Moleculares do Câncer de Mama.....	22
1.5 Fatores de risco.....	23
1.5.1 Gênero.....	23
1.5.2 Idade.....	23
1.5.3 Raça/Etnia.....	24
1.5.4 Histórico familiar e/ou pessoal.....	25
1.5.5 Tecido Mamário Denso.....	25
1.5.6 Períodos Menstruais.....	26
1.5.7 Primeira Gestação e Amamentação.....	27
1.5.8 Utilização de Hormônios Contraceptivos.....	28
1.5.9 Álcool e Tabaco.....	28
1.5.10 Obesidade.....	29
1.5.11 Dieta e Atividade Física.....	30
1.5.12 Fatores Genéticos.....	31
1.6 Estatísticas e Epidemiologia.....	32
1.7 Tratamentos.....	33
1.8 Metformina.....	35
1.9 Aspirina.....	40
1.10 Metformina, Aspirina e Câncer.....	44
1.11 Câncer, Inflamação, COX-2 e Lipoxinas.....	44
2. JUSTIFICATIVA.....	50
3. HIPÓTESE.....	50
4. OBJETIVOS.....	51
4.1 Objetivo Geral.....	51
4.2 Objetivos Específicos.....	51

Capítulo 2.....53

Artigo científico submetido ao periódico Investigational New Drugs: Novel Anti-Cancer Therapeutics and Therapies, da editora Springer, intitulado Metformin and aspirin: old drugs, new insights in breast cancer.

Capítulo 3.....95

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....96

6. REFERÊNCIAS.....98

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

JUSTIFICATIVA

HIPÓTESE

OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Anatomia e Fisiologia da Mama

A mama é uma massa densa composta por tecido glandular, adiposo e fibroso conectivo. Essa estrutura glandular, em pares, está posicionada sob o músculo peitoral e possui ligação à parede torácica via ligamentos de Cooper. O tecido adiposo é responsável por revestir e manter a consistência mamária [1]. A principal função da mama é a produção de leite durante a amamentação. O leite é produzido majoritariamente pelos lobos do tecido glandular e, segue por uma sequência de três estruturas: lobos, lóbulos e bulbos - os quais se conectam pelos ductos – até chegar no mamilo. Além disso, o tecido conectivo, juntamente com vasos sanguíneos e linfáticos, encontra-se a redor desse complexo sistema de ductos lactíferos, que se abrem em pequenos orifícios em cada um dos mamilos [2], [3]. O desenvolvimento do tecido glandular mamário se inicia na puberdade, aproximadamente entre os 8 – 10 anos de idade, sendo dependente de estrogênio e de fatores de crescimento, como o fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF1) [4], [5]. O sistema linfático é um importante elemento associado à mama, composto por nódulos linfáticos ricos em células do sistema imune; estes, por sua vez, são conectados a vasos linfáticos, os quais são responsáveis pelo transporte da linfa para fora da mama. A linfa é composta por células imunes, fluido tecidual e produtos de excreção. A importância do entendimento do sistema linfático, além da drenagem do tecido mamário, deve-se ao fato de esta ser a primeira via pela qual as células mamárias cancerígenas conseguem se espalhar e atingir outros órgãos, resultando em metástase tumoral. Os linfonodos axilares são os principais conectados à mama e, por isso, a sua análise perante a presença ou ausência de células tumorais é essencial para o estadiamento do câncer e definição do protocolo de tratamento [3]. Linfonodos mamários internos e infraclaviculares também possuem ligação à mama e podem ser essenciais para o entendimento do tumor mamário.

1.2 Câncer de Mama

O câncer é um conjunto de doenças que se caracterizam pela proliferação celular descontrolada e perda de controle da multiplicação e morte celular [6]. O câncer de mama é um tumor maligno que inicia a partir de células mamárias, normalmente do tecido glandular e, pode adquirir a capacidade de se espalhar por

tecidos adjacentes e metastatizar. Como em todo o tipo de doença, quanto mais precoce a detecção, mais eficaz o tratamento e, maiores são as chances de recuperação e cura. Na maioria dos casos, a sintomatologia do câncer de mama é percebida quando há um crescimento significativo do nódulo, podendo ou não estar espalhado pela mama. O *screening* ou triagem consiste em uma série de testes e exames utilizados para identificar se há, ou não, a presença da doença. Normalmente o *screening* é mais eficiente para detectar a doença precocemente, em pacientes que ainda não manifestaram sintomas. O *screening* mamográfico consiste, basicamente, no exame de mamografia e, em alguns casos, a ressonância magnética é bastante útil na detecção de carcinomas mamários, enquanto o tumor ainda é pequeno e confinado à mama. O esquema abaixo sumariza a recomendação da *American Cancer Society* [7] em relação à mamografia de triagem do câncer de mama:

- Mulheres em idade de risco:
 - Entre 40 e 44 anos: devem receber a oportunidade de iniciar a triagem anual (recomendação qualificada);
 - Entre 45 e 54 anos: devem receber triagem anualmente (forte recomendação);
 - 55 anos ou mais: devem receber triagem a cada dois anos ou terem a oportunidade de seguir a triagem anual (recomendação qualificada);
 - O rastreio mamográfico deve ser seguido por todas aquelas mulheres saudáveis e com expectativa de vida de 10 anos ou mais (recomendação qualificada);
 - Não é recomendado o exame clínico para o rastreamento de câncer de mama em mulheres de risco médio em qualquer idade (recomendação qualificada).

É importante salientar que mulheres que não estão nas faixas etárias de recomendação da triagem devem realizar as visitas de rotina ao ginecologista, onde são realizados testes clínicos de toque na mama. Além disso, o autoexame é amplamente recomendado e auxilia na identificação de alterações da mama.

A maioria das alterações mamárias encontradas na mamografia são benignas; entretanto, quando há suspeita de malignidade, deve ser feita uma análise microscópica do tecido para chegar a um diagnóstico definitivo, com avaliação do espalhamento celular e caracterização do tipo da doença. A grande maioria dos cânceres de mama iniciam nos lóbulos e ductos do tecido glandular. De acordo com a

análise celular, o câncer de mama pode ser dividido em dois principais tipos: *in situ* e invasivo, descritos abaixo. As características moleculares serão explicadas na sequência.

- **Carcinoma Ductal *in situ* (CDIS):** ocorre quando células anormais começam a proliferar descontroladamente invadindo o ambiente epitelial dos ductos da mama, podendo se expandir para os lóbulos. É considerada uma doença não invasiva, uma vez que as células tumorais não atingem as camadas adjacentes. É o tipo de câncer de mama mais comum, totalizando cerca de 83% de todos os casos *in situ* diagnosticados durante 2008 e 2012. Deve-se salientar que o CDIS pode evoluir para uma doença invasiva, embora a maioria deles não apresente uma agressividade e proliferação consideradas debilitantes para a saúde da paciente. Cabe citar o fato de que algumas vezes é possível que o CDIS seja classificado erroneamente como lesão benigna, não sendo tratado e podendo evoluir para câncer de mama invasivo. Entretanto, não é possível prever se haverá ou não progressão para doença invasiva. Sendo assim, o tratamento usual para esse tipo tumoral consiste em cirurgia, podendo ou não ser seguida de radioterapia ou terapia hormonal. É importante, ainda, avaliar as características moleculares do CDIS para definir possíveis recorrências ou progressão da patologia [8].
- **Carcinoma lobular *in situ* (CLIS):** conhecido também como neoplasia lobular; ocorre quando células malignas passam a proliferar dentro dos lóbulos mamários. É um tipo tumoral muito menos frequente do que CDIS (13% dos casos *in situ* entre 2009-2012). Normalmente, não evolui para um tipo invasivo; entretanto, pode ser considerado um marcador de aumento de risco para o desenvolvimento de câncer invasivo [8].
- **Câncer de mama invasivo:** Nesse fenótipo tumoral, há a migração e proliferação das células tumorais para as camadas adjacentes àquelas do sítio original, podendo se espalhar para a mama. O prognóstico é bastante influenciado pelo estágio da doença, quando do diagnóstico. O estadiamento tumoral é baseado na classificação TMN, que leva em consideração o tamanho do tumor e quão invasiva é a doença no tecido mamário ou em tecidos adjacentes (T), a presença ou não de metástases (M) e a extensão dos linfonodos afetados (N). Uma vez determinada a classificação TMN, o estadiamento (estágio 0 até IV) pode ser definido [9].

- **Câncer de mama inflamatório:** é um tipo de câncer de mama mais invasivo, bastante incomum, aparecendo em 1 a 3% dos casos. Esse tipo de tumor possui como característica o aparecimento de manchas avermelhadas e quentes na mama. Diz-se que a mama fica com um aspecto de laranja, pelo enrugamento e alteração da pele. Sabe-se que essas alterações não ocorrem por inflamação ou infecção e, sim, pela grande quantidade de células tumorais que bloqueiam os vasos linfáticos da mama, impedindo que haja uma circulação da linfa adequada. Esse tipo tumoral pode ser confundido com a infecção da mama, conhecida como mastite e, ser tratado erroneamente com antibióticos. Por não apresentar nódulos tumorais, esse tipo de câncer pode ser de difícil detecção por mamografia. O câncer de mama inflamatório tende a ser mais agressivo e ter prognóstico pior do que os outros tipos de câncer de mama invasivos [3].

1.3 Estadiamento do Câncer de Mama

As características e informações dos estágios do câncer de mama após análise da classificação TMN estão especificados na Tabela 1:

Tabela 1: Estadiamento do câncer de mama invasivo com as respectivas características e informações relevantes. Adaptado de [3].

Estágio	Informações e Características
Estágio Zero	São o CDIS e CLIS. Não invasivos; podem se tornar invasivos ou não. Apresentam células anormais confinadas ao local de origem.
Estágio IA	Tumor glandular ≤ 2 cm, sem invadir os outros tecidos mamários.
Estágio IB	Pequenos aglomerados de células de câncer de mama (entre 0,2 e 2 mm) encontrados nos linfonodos próximos (1 a 3 linfonodos), com a presença de tumor na mama ≤ 2 cm ou ausência de tumor.

Estágio IIA	Sem presença de tumor na mama e acometimento de 1 a 3 linfonodos axilares ou próximos ao esterno ou, tumor mamário \leq 2 cm e acometimento de 1 a 3 linfonodos axilares ou próximos ao esterno ou, tumor mamário entre 2 e 5 cm, sem acometimento de linfonodos.
Estágio IIB	Tumor mamário entre 2 e 5 cm, com acometimento de 1 a 3 linfonodos ou, tumor maior de 5 cm, sem espalhamento tumoral para linfonodos.
Estágio IIIA	Tumor mamário menor do que 2 cm e espalhamento para 4 a 9 linfonodos proximais ou, tumor maior do que 5 cm e pequenos aglomerados de células de câncer de mama (entre 0,2 e 2 mm) encontrados nos linfonodos próximos (1 a 3 linfonodos) ou, tumor maior do que 5 cm com acometimento de 1 a 3 linfonodos.
Estágio IIIB	Tumor mamário de qualquer tamanho com espalhamento tumoral para a parede torácica ou tecido cutâneo mamário, além do acometimento de 4 a 9 linfonodos axilares ou mamários internos.
Estágio IIIC	Ausência ou presença de tumor mamário de qualquer tamanho e uma das aplicações a seguir: acometimento de 10 ou mais linfonodos axilares, presença de tumor em linfonodos próximos à clavícula, acometimento de linfonodos axilares e linfonodos mamários internos ou, presença de células tumorais em 4 ou mais linfonodos axilares e resultado positivo na biópsia do

linfonodo sentinela.

Estágio IV

Qualquer tamanho tumoral; pode haver ou não acometimento de linfonodos próximos à mama e, obrigatoriamente, a presença de metástases em órgãos ou linfonodos distantes, sendo o cérebro, o fígado, o pulmão e os ossos considerados os principais sítios de metástase.

1.4 Subtipos Moleculares do Câncer de Mama

Tabela 2: Características dos subtipos moleculares do câncer de mama. Adaptado de [9].

Subtipo	Características
Luminal A (ER+, PR+, <i>HER2</i> -)	Tumor de baixo grau, bom prognóstico e células tumorais bem diferenciadas. Aproximadamente 74% apresentam ER e PR positivos, e <i>HER2</i> negativo. Tendem a ter crescimento lento e são bem pouco agressivos.
Luminal B (ER+, PR+, <i>HER2</i> +)	Grau tumoral, taxa de crescimento e agressividade mais elevados do que no Luminal A. Positivos para ER e PR, além de ser altamente positivo para Ki67 ou <i>HER2</i> .
Basal (ER-, PR-, <i>HER2</i> -)	Também chamado de triplo negativo. Não apresenta positividade para ER, PR e <i>HER2</i> . Mais comuns em mulheres na pré-menopausa e em pacientes com mutação em <i>BRCA1</i> (<i>breast cancer 1</i>). A maior parte deles é do tipo basal e não luminal. Possuem um prognóstico ruim; são altamente agressivos e de difícil tratamento.
<i>HER2</i> + (ER-, PR-, <i>HER2</i> +)	Ocorre em aproximadamente 4% dos

cânceres de mama. Considerado hormônio negativo por não ter expressão de ER e PR. Há positividade para *HER2*. Tendem a ser mais agressivos e são associados com ruim prognóstico quando comparado com os hormônios positivos. Entretanto, terapias anti-*HER2* têm sido eficientes para reverter os efeitos da superexpressão de *HER2*.

ER: receptor de estrogênio; PR: receptor de progesterona; *HER2* (*human epidermal growth factor receptor 2*): oncogene localizado no cromossomo 17; Ki67: indicador de atividade de divisão celular

Embora, muitas vezes, o câncer de mama seja referido como uma doença singular, é importante salientar que há uma série de diferentes subtipos histológicos e moleculares, os quais possuem variações biológicas significativas responsáveis pela diferença de resposta farmacológica, estando associados com diferentes fatores de riscos. As análises genéticas têm sido uma ferramenta essencial para avaliar o perfil de expressão gênica de cada subtipo, facilitando o entendimento das diferenças entre os tipos tumorais, possibilitando uma análise mais detalhada para o desenvolvimento de protocolos de tratamentos específicos.

1.5 Fatores de Risco

1.5.1 Gênero

O sexo feminino possui um risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama em comparação ao sexo masculino. A doença pode ser desenvolvida em homens; entretanto, esta neoplasia é cerca de 100 vezes mais comum em mulheres [3], [9], [10]. Esse dado provavelmente está relacionado ao fato de homens possuírem menos hormônios femininos, como estrogênio e progesterona, os quais estão relacionados com o desenvolvimento da mama [11], [12].

1.5.2 Idade

A incidência de câncer de mama aumenta com a idade. Aproximadamente 1 entre 8 carcinomas mamários invasivos são encontrados em mulheres com menos de

45 anos; entretanto, aproximadamente 70% dos tumores de mama invasivos ocorrem em mulheres de 55 anos ou mais [3]. Nos Estados Unidos, entre 2008 e 2012, foi relatada uma diminuição das taxas de incidência de câncer de mama em mulheres de 80 anos ou mais. Acredita-se que esse fato se deve a uma redução de *screening* nessa faixa etária, ou a uma detecção precoce ou, ainda, ao aumento de falsos negativos nessas idades. Durante esse mesmo período, a média de idade no momento do diagnóstico era de 61 anos, ou seja, 50% das mulheres que foram diagnosticadas com câncer de mama tinham na faixa de 61 anos [9]. Embora mais raros, pacientes mais jovens normalmente apresentam tumores maiores e em estágio mais avançados, sendo frequente a presença de linfonodo positivo [13]. Pacientes com média de idade de 45 anos normalmente são as que possuem diagnósticos com os piores desfechos [14].

1.5.3 Raça/Etnia

Ainda há divergências sobre os riscos relacionados à etnia. Estudos norte-americanos demonstraram que, de um modo geral, mulheres brancas são mais propícias a desenvolver câncer de mama do que mulheres negras, embora o óbito seja maior entre a raça negra. Além disso, mulheres hispânicas e asiáticas possuem um risco menor de desenvolvimento e morte associada à doença [3], [10] (Tabela 3). As taxas de incidência de câncer de mama em mulheres brancas norte americanas entre 60 e 84 anos são nitidamente maiores do que em mulheres negras; entretanto, a incidência aumenta em mulheres negras quando a idade se reduz a 45 anos ou menos [9].

Tabela 3: Dados da taxa de incidência e mortalidade por câncer de mama nos Estados Unidos de 2007 a 2011. As taxas são por 100 mil habitantes e a idade ajustada para o padrão populacional norte americano em 2000. Adaptado de [10].

	Não Hispânica Branca	Não Hispânica Negra	Asiática/ Ilhas Pacífico	Índigenas/Nativas Alasca	Hispânica
	Incidência				
Câncer	127.6	123.0	86.0	91.7	91.6

Mama					
	Mortalidade				
Câncer	22.2	31.4	11.3	15.2	14.5
Mama					

*Não há dados brasileiros para raça/etnia

1.5.4 Histórico familiar e/ou pessoal

Homens e mulheres com histórico familiar de câncer de mama possuem um maior risco de desenvolvimento da doença, principalmente se for com parentesco de primeiro grau. Comparando com mulheres sem histórico familiar, o risco é ainda mais elevado se mais de um parente de primeiro grau desenvolveu a doença, chegando a ser 4 vezes mais alto para mulheres com 3 ou mais parentes afetados [15]. Há, ainda, uma possível associação entre histórico familiar de câncer de ovário, com aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama, independentemente do sexo [9]. Entretanto, vale salientar que apenas 15% das mulheres que desenvolvem câncer de mama possuem um histórico familiar, ou seja, a maioria das mulheres portadoras dessa doença não possuem histórico familiar relacionado [3], [9].

O histórico pessoal está relacionado com o desenvolvimento de um novo câncer de mama na mesma paciente. Mulheres com câncer em uma mama possuem uma probabilidade de 1,5 mais vezes de desenvolver a doença na outra mama ou, ainda, em outra parte da mesma mama, em relação à mulheres que nunca foram diagnosticadas com câncer de mama. Além disso, mulheres jovens em idade menor do que 40 anos diagnosticadas com câncer de mama possuem 3 vezes mais chance de desenvolver qualquer tipo de câncer e, 4,5 vezes mais risco de desenvolver outro câncer de mama. Já, mulheres diagnosticadas com carcinoma mamário aos 70 anos ou mais não possuem risco significativo de desenvolvimento de outro tipo neoplásico e, um pequeno risco (1.2 vezes) de desenvolver um segundo câncer de mama [16]. Deve-se salientar que esse dado é relacionado a tumores primários e não está associado à recorrência tumoral.

1.5.5 Tecido Mamário Denso

Como descrito anteriormente, a mama é composta por tecido fibroso, adiposo e glandular. A mama é dita densa quando, após uma análise mamográfica, a

quantidade de tecido glandular e fibroso se sobrepõe à de tecido adiposo [17]. Mulheres que possuem uma densidade maior na mama tendem a ter de 1,2 a 2 vezes mais chance de desenvolver câncer de mama do que aquelas com uma densidade média. Ademais, a densidade da mama pode interferir e reduzir a acurácia da mamografia [3]. A densidade mamária pode ser influenciada por fatores genéticos ou ambientais. A redução da densidade da mama pode ser associada aos seguintes fatores: peso corporal elevado [18], idade avançada [19], gravidez e menopausa [20], além do uso de medicamentos como o tamoxifeno [21], [22]. Já, o excesso de álcool [23] e hormonioterapia combinada para a menopausa [21] podem estimular o aumento da densidade mamária. De maneira contraditória, a idade avançada e a menopausa estão diretamente relacionadas a um risco mais elevado de desenvolver câncer de mama, mas inversamente relacionados à densidade mamária. Um estudo realizado com mulheres com idade média de 57 anos demonstrou que pacientes com 55 anos ou mais possuíam a mama menos densa do que aquelas com menos de 55 anos. Além disso, mulheres com uma densidade de 26-50% ou >50% possuíam, respectivamente, 1,6 e 2,3 vezes mais risco de desenvolver câncer de mama do que aquelas com densidade entre 11% e 25% [24]. Curiosamente, um estudo de coorte com mulheres com média de idade de 57 anos avaliou a associação entre o uso de aspirina e a densidade mamária, demonstrando uma associação inversa entre ambos, ou seja, quanto maior o uso de aspirina, menor a densidade da mama [25].

1.5.6 Períodos Menstruais

Em relação aos períodos menstruais, acredita-se que o risco de desenvolvimento de câncer de mama aumente a cada ano de menstruação precoce (cerca de 5%) e a cada ano de menopausa tardia (aproximadamente 3%) [26]. Ou seja, mulheres que entram na menopausa depois dos 55 anos possuem um risco aproximadamente 12% maior, do que aquelas que experimentaram da menopausa entre 50 e 54 anos. Além disso, o risco de desenvolver a doença é 20 vezes maior em uma menina que menstruou aos 11 anos, se comparado àquela que menstruou aos 13. Dados demonstram que possa haver uma maior chance de desenvolvimento de câncer de mama hormônio responsivo entre mulheres que menstruam precocemente ou, que apresentam menarca tardia, o que poderia ser explicado pela exposição aos hormônios femininos por um tempo mais prolongado [27].

1.5.7 Primeira Gestação e Amamentação

Ainda há uma divergência quando se relaciona o risco de desenvolvimento de câncer de mama e a idade da primeira gestação. Foi descrito que mulheres com a primeira gestação antes dos 40 anos possuem um risco maior de desenvolver câncer de mama quando comparado com mulheres nulíparas. Entretanto, essa relação se inverte para mulheres maiores de 40 anos [28], [29]. Foi relatado que em mulheres nulíparas, diagnosticadas com câncer de mama, o grau tumoral era muito menor, além de desenvolverem muito menos carcinoma mamário triplo negativo quando comparado com aquelas que possuíam filhos [30]. Além disso, foi demonstrado que esse aumento transitório do risco de desenvolvimento de câncer de mama pós gravidez é mais elevado em mulheres que tiveram filho com 30 anos ou mais [31]. Por outro lado, foi relatado que o fato de não ter filhos ou ter gravidez tardia pode estar associado com um risco elevado de desenvolvimento de câncer de mama, quando comparado com mulheres que tiveram a primeira gestação precocemente [9]. Dados sugerem um aumento do risco de câncer de mama com o aumento da idade na primeira gestação, o que é explicado como uma demora maior para a exposição da mulher ao efeito protetor da gravidez [32].

Tendo em vista a grande divergência de informações, acredita-se que possa haver um efeito dual da gravidez, o que explicaria esse aumento transitório no risco de câncer de mama após a primeira gravidez. O pico de detecção de câncer de mama em mulheres que já tiveram a primeira gravidez precocemente é dado no sexto ano após o parto, podendo se estender em até 10 anos após a gravidez. Ou seja, os carcinomas mamários detectados nesse período de 10 anos são considerados tumores de mama associados à gravidez. Entretanto, como a maioria dos tumores de mama são detectados em mulheres de idade mais avançada, o efeito cumulativo colocaria a gravidez como um fator de redução do risco de desenvolvimento de câncer de mama [31], [32]. Há, ainda, uma hipótese que sugere uma variedade de fatores interferindo nesse possível aumento do risco pós-gestação, incluindo fatores hormonais, supressão imune durante a gravidez e dificuldade de detecção de câncer de mama durante o período gestacional, devido ao aumento da densidade da mama [28], [33]. Embora os dados ainda sejam contraditórios, é evidente que há alguma associação entre o risco de câncer de mama e a gravidez.

1.5.8 Utilização de Hormônios Contraceptivos

Levando em consideração os efeitos dos hormônios femininos no desenvolvimento da mama, deve-se analisar o efeito do uso de métodos de contraceptivos hormonais no risco de desenvolvimento de câncer de mama. Um estudo envolvendo mulheres em fases pré- e pós-menopausa demonstrou que o uso de método contraceptivo hormonal exógeno elevou o risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres em fase pré-menopausa, mas não entre as pós-menopáusicas <65 anos ou ≥65 anos. Além disso, o risco de desenvolver a doença foi maior com o aumento da duração do tratamento contraceptivo nas pré-menopáusicas. Já a terapia de reposição hormonal pós-menopausa em mulheres <65 anos demonstrou modesta associação com o risco de desenvolver carcinoma mamário, sendo este risco elevado com a duração do tratamento. Dentre todos os grupos analisados, o maior risco de desenvolvimento de câncer de mama foi observado em mulheres pré-menopáusicas submetidas à reposição hormonal entre as idades de 43-53 anos, indicando que o início precoce do tratamento de reposição hormonal durante a perimenopausa confere aumento do risco de desenvolver a doença [34]. Outro estudo de base populacional de mulheres com menos de 45 anos relatou um aumento do risco de câncer de mama relacionado com ingestão de pílulas anticoncepcionais de doses elevadas de estrogênio ou de progestina durante os 5 anos prévios à entrevista, sendo ainda maior o risco entre mulheres com menos de 35 anos [35]. Além disso, a dose hormonal utilizada pode estar relacionada ao aumento ou redução do risco de desenvolver a doença. Dados demonstram que contraceptivos orais com baixas doses de estrogênio (20 µg) não demonstraram associação com aumento do risco de câncer de mama; entretanto, doses moderadas (30-35 µg) e elevadas (50 µg) foram relacionadas com elevação do risco. Ainda, quanto maior o número de pílulas administradas (de média e alta dose), maior o risco. Quando analisadas diferentes doses e tipos de progestina, foi demonstrado que maiores doses estão associadas a maiores riscos, embora observe-se variação entre os tipos de progestina [36].

1.5.9 Álcool e Tabaco

Diversos estudos têm relatado o efeito do consumo de álcool e tabaco sobre o risco de desenvolver câncer de mama [37]. Dados demonstram que o aumento do risco é de aproximadamente 7% a cada 10 g de álcool ingeridos por dia, tanto em

mulheres fumantes, como não fumantes. Quando associados os dados de fumantes e não fumantes, comparando com mulheres que não bebem, o risco relativo é de 1,35 quando o consumo de álcool é na faixa de 35 a 44 g por dia e, de 1,46 para um consumo maior de 45 g por dia, onde a média de consumo era de 57 g diários [38]. Quando o uso de tabaco foi avaliado entre mulheres que não bebem, não foi encontrada diferença significativa no risco de desenvolvimento de câncer de mama entre fumantes e não fumantes [38]. Outro estudo demonstrou que mesmo baixos níveis de consumo de álcool (5 g a 9,9 g por dia) estão significativamente associados com aumento do risco de câncer de mama e que independentemente da faixa etária em que ocorre o consumo de álcool, sempre há associação significativa com o consumo e o risco elevado [37]. Um dos possíveis mecanismos pelo qual o aumento do álcool aumenta o risco de câncer de mama pode ser pela elevação dos níveis hormonais de estrogênio [39].

1.5.10 Obesidade

Tem sido relatada uma associação entre o risco de desenvolvimento de câncer de mama e obesidade. Dados demonstram que mulheres com sobrepeso e obesas possuem, respectivamente, 1,5 e 2 vezes mais risco de desenvolver carcinoma mamários, em comparação com as de peso médio [40]. Além disso, foi demonstrado que a obesidade pode aumentar o risco de câncer de mama após a menopausa [41]. Acredita-se que uma maior produção de estrogênio, associada com uma maior quantidade de tecido adiposo, seja a principal causa desse aumento da incidência de câncer de mama. Além disso, uma explicação plausível seriam os altos níveis séricos de insulina em pessoas obesas, fato que também associa obesidade e diabetes tipo II com aumento do risco de câncer de mama, principalmente em mulheres pós-menopausa [42]–[44]. Dados demonstraram que pacientes com Diabetes tipo II possuem um risco 16% mais alto de desenvolver câncer de mama, independentemente de serem obesos ou não [43], e que o diabetes tipo II, além de ser um fator de risco para desenvolvimento de câncer de mama, pode ser considerado um fator de ruim prognóstico [44].

Entretanto, dados encontrados em mulheres pré-menopáusicas revelam uma contradição. Foi relatado que o risco de desenvolver câncer de mama entre mulheres de 40 a 49 anos com sobrepeso ou obesas é, respectivamente, 14% e 26% menor quando comparado com as de peso normal [45]. Entretanto, o mecanismo

relacionado com essa relação inversa ainda não está bem entendido e mais análises são necessárias.

1.5.11 Dieta e Atividade física

Como é sabido, tanto a alimentação balanceada, como a atividade física estão intimamente relacionados com a melhora de qualidade de vida. Dados sugerem que mulheres que praticam atividade física possuem de 10 a 25% menos risco de desenvolver câncer de mama, se comparado com mulheres não ativas. Além disso, evidências demonstram que o risco é menor em mulheres no período pós-menopausa do que as na pré-menopausa [46], [47]. Ademais, não foi encontrada diferença quando analisados os tipos tumorais (se estrogênio positivo ou não). Foi relatado que mulheres na pós-menopausa, que caminham 7 ou mais horas por semana, possuem 14% menos risco de desenvolver câncer de mama em relação àquelas que gastam 3 horas ou menos por semana para a prática de caminhada [46]. Acredita-se que a chave para o entendimento dessa relação entre risco de câncer de mama e atividade física deve-se à influência da atividade física nos valores hormonais séricos, no balanço energético e a na massa corporal [48].

Atualmente, a relação entre consumo alimentar e desenvolvimento tumoral tem sido muito discutida. Antigamente, os estudos baseavam-se principalmente na análise de gorduras; entretanto, atualmente, têm sido avaliados outros alvos nutricionais, com foco no consumo de carnes, verduras e legumes. Uma metanálise avaliando a ingestão de gordura animal e câncer de mama concluiu que não há associação [49]. Embora correlações não tenham sido encontradas, o tempo de exposição pode ter alguma importância. Estudos demonstram que uma dieta rica em gorduras saturadas, monoinsaturadas, poli-insaturadas e trans, durante a adolescência, pode estar associada com um pequeno aumento no risco de câncer de mama antes da menopausa, embora não tenha sido encontrada diferença significativa [50]. Dados sugerem que não há correlação significativa entre o consumo de carne vermelha ou de carne processada e risco de câncer de mama [51]. A soja também tem sido alvo de estudos. Dados de uma metanálise demonstraram uma associação inversa entre o consumo de soja e as taxas de câncer de mama, tendo uma redução significativa de aproximadamente 11% no risco em mulheres com alto consumo de isoflavonas, comparado com as de baixo consumo. Entretanto, essa redução significativa foi encontrada em populações asiáticas, e não em populações ocidentais. Além disso, foi

demonstrado que o risco é ainda mais reduzido em mulheres na pós-menopausa. Sendo assim, avaliar o período da vida fértil das pacientes pode ter um papel importante na associação entre consumo de soja e câncer de mama [52]. Em relação a frutas e vegetais, foi encontrada uma associação inversa significativa entre o consumo total de frutas e legumes e o desenvolvimento de câncer de mama ER- (ER = receptor de estrogênio). Para os tipos tumorais ER+, PR- (PR = receptor de progesterona) e PR+ não foram encontrados dados significativos [53]. Corroborando com esses dados, foi relatado que altos níveis séricos de carotenoides estão associados a baixos riscos de câncer de mama [54], [55], chegando a uma redução de 18-28% do risco [54]. Os carotenoides são nutrientes muito presentes em verduras e legumes. Isso sugere que frutas e legumes podem ter um efeito de proteção no câncer de mama; porém, mais estudos são necessários.

1.5.12 Fatores Genéticos

As aberrações genéticas são características recorrentes em genomas tumorais. Cada vez mais têm-se estudado alterações genéticas que possam ser possíveis causas do desencadeamento da doença e potenciais alvos farmacológicos. No câncer de mama, já foram descritas algumas alterações cromossômicas, como deleções das regiões 8p, 11q, 13, e 14q ou inserções nas regiões 6q22, 8q22, 11q13, 17q22-24 e 20q13 [56]. Além disso, análises genéticas têm demonstrado que polimorfismos de alelos em loci específicos podem elevar a ocorrência de câncer de mama [57], [58]. Foi demonstrado que o câncer bilateral está associado com homozigose do alelo G em rs13281615 (8q24). Além disso, o número de indivíduos homozigotos para esse alelo cresce à medida que passam as gerações. Ainda, no mesmo estudo, foi demonstrado que para pacientes com tipos tumorais estrogênio e progesterona positivo, há uma frequência maior de alelos T na região rs2981582 (gene *FGFR2* - *friboblast growth factor receptor 2*) [58].

Entretanto, as susceptibilidades genéticas associadas ao câncer, mais bem estudadas e estabelecidas, são as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*breast cancer 2*), sendo responsáveis por cerca de 5 a 10% de todos os carcinomas mamários femininos e 20% dos familiares, além de 5 a 20% dos cânceres masculinos [59], [60]. Comparando-se mulheres ≥ 70 anos da população em geral, que possuem 7% de chance de desenvolver câncer de mama, o risco se eleva significativamente na presença da mutação em *BRCA1* e *BRCA2*, chegando a 65% e 55% respectivamente

[61], [62]. Foi demonstrado, ainda, que mutações no gene *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2*), o qual está relacionado com a via do *BRCA2*, conferem um risco similar ao da mutação de *BRCA2* [63]. Algumas condições como a síndrome de Li-Fraumeni e Cowden estão associadas com um pequeno aumento no risco de câncer de mama [59]. Entretanto, acredita-se que o câncer de mama familiar seja resultado de pequenas mutações e interações ambientais [64]. Essas mutações genéticas podem ser passadas entre gerações. Entretanto, não é possível afirmar que se uma mulher carrega uma certa alteração genética ela irá com certeza desenvolver câncer de mama. Além disso, ainda não há testes disponíveis que detectem todas as variantes genéticas que afetam o câncer de mama. Alguns testes que já estão disponíveis no mercado possibilitam a identificação de algumas mutações no gene *BRCA*, bem como, de marcadores associados com o câncer de mama hereditário [65]. Entretanto deve-se levar em consideração as questões éticas e emocionais associadas à realização desses testes, podendo gerar problemas pessoais e/ou familiares quando do resultado positivo para mutações que predisõem ao desenvolvimento de câncer de mama.

1.6 Estatísticas e Epidemiologia

Apesar dos avanços de diagnóstico e tratamento, o câncer de mama ainda é um problema de saúde pública, com aproximadamente 1 milhão de novos casos e 459 mil mortes no mundo. A incidência e a mortalidade relacionadas ao câncer de mama aumentaram cerca de 18% desde 2008. Estima-se que em 2050, o número de novos casos globais seja de aproximadamente 3,2 milhões [14]. Em 2012, 1,7 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama e havia 6,3 milhões de mulheres vivas que tiveram o diagnóstico de câncer de mama nos 5 anos anteriores. Além disso, o câncer de mama é o tipo tumoral que mais causa morte entre mulheres e o mais diagnosticado entre mulheres em 140, de 184 países [66]. O carcinoma mamário representa 25% de todos os tipos de câncer em mulheres. Em 2015, foram estimados 231,840 novos casos de câncer de mama invasivos e, 60,290 casos de carcinoma mamário *in situ* em mulheres nos Estados Unidos. No mesmo ano, foi esperado que 40 mil mulheres norte americanas morressem por câncer de mama [9]. No Brasil, estima-se aproximadamente 57 mil novos casos de câncer de mama feminino, sendo essa estimativa válida para os anos de 2014 e 2015. O risco é de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres. Desconsiderando os tumores de pele não

melanoma, a região Sudeste é a que apresenta a maior prevalência de câncer de mama, 71,18 a cada 100 mil mulheres, seguida pelas regiões Sul - 70,98 a cada 100 mil mulheres -, Centro-Oeste - 51,30 a cada 100 mil - e Nordeste - 36,74 a cada 100 mil mulheres. Já na região Norte, é o segundo tumor mais incidente - 21,29 a cada 100 mil mulheres – perdendo apenas para o câncer de colo de útero [67].

1.7 Tratamentos

O tratamento do câncer de mama é definido levando-se em consideração a grande heterogeneidade associada ao desenvolvimento deste tipo tumoral, variando de acordo com características específicas. Além disso, em muitos casos, tratamentos direcionados e não rotineiros são necessários. O principal protocolo utilizado atualmente no Brasil é o MOC (Manual de Oncologia Clínica do Brasil) [68]. Previamente à escolha do tratamento, esse protocolo sugere que seja definido o subtipo tumoral – aqui descrito anteriormente – e identificado o risco da doença. Os riscos são definidos em três diferentes graus, como descrito abaixo:

- **Risco baixo:** doença sem necessidade de quimioterapia adjuvante, risco de morte do paciente menor do que 10%. Tumores normalmente menores do que 0,5 cm, sendo hormônio-responsivos e *HER2* negativos. Tumores entre 0,6 e 1 cm, com ausência de fatores como - invasão vascular ou linfática, grau III, hormônio-negativos e *HER2+*, além de ser paciente com idade menor do que 35 anos. Também são considerados de baixo risco, tumores entre 1 e 2 cm, em grau I, na ausência de invasão vascular ou linfática, hormônio-negativos e *HER2+*, em pacientes com mais de 35 anos. Pacientes sem linfonodos acometidos, hormônio-responsivos e risco de recorrência baixo são alocados no grupo de risco baixo.
- **Risco intermediário:** nesse grupo, o risco de morte varia entre 10 a 20%. Os tipos tumorais alocados nessa categoria são aqueles com tamanho tumoral entre 0,6 e 1 cm, com grau III e/ou, invasão vascular ou linfática e/ou, paciente com menos de 35 anos e/ou não responsivos a hormônio. Além disso, tumores com tamanho entre 1 e 2 cm *HER2-* e/ou, com grau maior ou igual a II e/ou, com invasão vascular ou linfática e/ou, pacientes com menos de 35 anos e/ou, não responsivos a hormônios, também são considerados de risco intermediário. Por fim, o último tipo tumoral alocado nesse grupo possui como

características o não acometimento de linfonodos, positividade para receptores hormonais e, risco de recorrência moderado.

- **Risco alto:** nessa categoria, o risco de óbito é maior do que 20%. Os tipos tumorais classificados em risco alto são: tumor maior do que 1 cm e *HER2+*; tumores com acometimento de linfonodos; tumores sem acometimento de linfonodos, mas com tamanho maior do que 2 cm, em particular aqueles que são negativos tanto para receptor hormonal, quanto para *HER2*; câncer sem acometimento de linfonodos, responsivos a hormônios e com risco de recorrência alto.

Sendo assim, após a classificação baseada no subtipo tumoral e, a alocação nos grupos de risco, os protocolos de tratamento são determinados. Os tratamentos adjuvantes são aqueles realizados após a cirurgia de retirada da mama, para tentar combater as possíveis células tumorais remanescentes. Eles levam em consideração a expressão ou não de *HER2*, o tamanho tumoral e o acometimento ou não de linfonodos. Alguns quimioterápicos utilizados no tratamento adjuvante são a doxorrubicina, a ciclofosfamida, o docetaxel e o trastuzumabe. Além disso, algumas vezes, é necessário que seja solicitado o *Oncotype Dx*, um teste genômico tumoral que determina o risco individual de recorrência de tumores de mama invasivos iniciais e que identifica se há a possibilidade de uma paciente ser beneficiada ou não por dada quimioterapia. O médico solicitante deverá indicar que é necessária a retirada e envio da peça histológica para o patologista. A análise do patologista resultará em um grau de *Oncotype Dx*, baseado nas características moleculares exclusivas e na biologia daquele tipo tumoral, as quais serão usadas para definir o tratamento. O grau de Nottingham, o qual é utilizado para a decidir se será necessário solicitar *Oncotype Dx* ou não, leva em consideração as alterações histológicas da peça, como índice mitótico, arranjo tubular e pleomorfismo nuclear. Esse grau varia de 3 a 9, sendo até 5 (Grau I) considerado tumor bem diferenciado, de 6 a 7 (Grau II) moderadamente diferenciado e de 8 a 9 (Grau III) pouco diferenciado.

A hormonioterapia, por sua vez, leva em consideração se a paciente está no período pré- ou pós-menopausa, além do risco associado ao tumor. Os principais medicamentos utilizados na hormonioterapia são os inibidores de aromatase e o tamoxifeno. Para pacientes que não se encontram em pós menopausa, recomenda-se o uso de ácido zoledrônico, epirrubicina e vinorelbina, podendo iniciar

concomitantemente com a hormonioterapia. Para o tratamento de tumores de mama localmente avançados, são levados em consideração os mesmos requisitos do tratamento adjuvante, além da idade da paciente (jovem ou idosa) e a presença ou não de mutação de *BRCA*. Dentre os medicamentos utilizados, destaca-se o pertuzumabe, o trastuzumabe, a epirrubicina, o anatrozol, a cisplatina e o paclitaxel, além de radioterapia.

Já, para doença metastática, a escolha do tratamento deve levar em consideração o perfil molecular do tumor, o local da metástase (visceral ou óssea), o intervalo livre de doença, a fase de menopausa da paciente e o tipo de quimioterapia administrada anteriormente. Após essa avaliação, será decidido qual protocolo seguir. De um modo geral, os tratamentos empregam anticorpos monoclonais (trastuzumabe, pertuzumabe e bevacizumabe), podendo ou não utilizar hormonioterapia ou quimioterapia.

Em resumo, o tratamento de câncer de mama é bastante heterogêneo e varia de paciente para paciente, além de depender de diversos de fatores. Ademais, essa utilização de diversos quimioterápicos combinados pode gerar efeitos adversos graves, resultando em uma piora na qualidade de vida. Sendo assim, a procura por fármacos já aceitos pelo FDA para o tratamento de outras doenças (*Food and Drug Administration*) e de toxicidade conhecida no auxílio da quimioterapia e redução dos efeitos colaterais tem crescido enormemente nos últimos anos, entre a comunidade científica.

1.8 Metformina

A metformina (N^4,N^4 -dimethylbiguanide) é um potente agente anti-hiperglicemiante oral, da classe das biguanidas, amplamente utilizada para o tratamento de *Diabetes Mellitus* tipo II. O principal efeito da metformina é a redução da gliconeogênese hepática, via bloqueio do complexo I da cadeia respiratória e redução da atividade do sensor metabólico AMPK (proteína quinase ativada por AMP) [69]. Entretanto, cada vez mais, tem sido proposta a utilização de metformina como agente antineoplásico. Um estudo de coorte investigou o efeito da metformina sobre o risco de desenvolvimento de câncer gástrico em pacientes com diabetes tipo II; os resultados sugerem um risco reduzido em pacientes tratados, de maneira independente da utilização de insulina ou de outras drogas antidiabéticas [70]. Dados têm demonstrado que o uso desse medicamento em pacientes diabéticas e

diagnosticados com câncer de mama pode aumentar a sobrevida, principalmente daquelas com tipo tumoral ER+ e *HER2+* [71]. Além disso, um estudo observacional com 4953 mulheres diabéticas e diagnosticadas com câncer de mama demonstrou que, após 5 anos de acompanhamento, o uso desta biguanida reduziu significativamente o risco de metástase tumoral [72]. Já, dados de pacientes com câncer de mama, mas não diabéticas, indicaram que a utilização de metformina, em esquema neoadjuvante, teve um impacto importante sobre as células tumorais, reduzindo os níveis do receptor de insulina (IR) e a sinalização pró-tumoral desencadeada por esse receptor [73]. Por outro lado, dados conflitantes relatam uma falta de associação significativa entre a terapia com metformina em pacientes diabéticas e a mortalidade associada ao câncer de mama, embora sugeriram uma pequena redução de mortalidade em 9% [74].

Muitos estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos para entender os possíveis efeitos deste fármaco no ambiente tumoral. Foi demonstrado em modelos *in vivo* e *in vitro* de carcinoma hepatocelular que a metformina reduziu a proliferação celular e aumentou a apoptose [75], além de diminuir a resistência a múltiplas drogas e induzir parada no ciclo celular [76]. Já, em modelo *in vivo* de adenocarcinoma pancreático ductal, sob condições de sobrepeso, a droga induziu redução do microambiente fibroinflamatório tumoral e de metástase, além de reduzir os níveis de quimiocinas envolvidas no recrutamento de macrófagos pró-tumorais [77]. Em modelos *in vitro* de cultura primária de câncer de tireoide, mas não em linhagens celulares, a metformina induziu a diminuição da secreção CXCL8 (*C-X-C motif chemokine ligand 8*), uma citocina descrita por sua atuação pró-tumoral, de maneira dependente de TNF (*tumor necrosis factor*) [78].

Como já descrito, um dos principais alvos da metformina é a proteína AMPK, associada ao metabolismo mitocondrial. Além disso, tem sido demonstrado que proteínas *downstream* à via da AMPK também são reguladas pela metformina, como, por exemplo, a proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*). Dados *in vitro*, utilizando a linhagem de câncer de mama triplo-negativa, MDA-MB-231, demonstraram que o tratamento apenas com metformina, ou com esta combinada à 2-deoxiglicose, induziu uma perda do potencial de membrana mitocondrial, além de reduzir a viabilidade das células [79]. Obara e colaboradores [80] demonstraram que, em linhagens de câncer hepático, a metformina induziu a ativação de um substrato inibitório da proteína mTOR, a qual está associada à proliferação celular, além de

demonstrar uma redução da atividade proteossômica via AMPK. Ainda, um estudo foi realizado utilizando linhagens de câncer de mama e tecido adiposo branco humano, que possui células progenitoras que influenciam no crescimento tumoral e no desenvolvimento angiogênico, a fim de avaliar o efeito da metformina. Foi relatado que a metformina leva à ativação de AMPK, com consequente redução da proliferação e indução de apoptose em ambos os tipos celulares. O mesmo estudo realizou análises *in vivo*, utilizando modelo de câncer de mama triplo-negativo e HER2+, em camundongos imunocompetentes e imunodeficientes, demonstrando que a metformina foi capaz de inibir o crescimento local das células tumorais, além de reduzir as lesões metastáticas pulmonares [81]. Seguindo na avaliação de AMPK, Sian-Siu Soo e colaboradores demonstraram que, independente da presença ou não de receptores hormonais, a metformina possui sinergia com outros quimioterápicos em diferentes linhagens de câncer de mama, levando a um aumento da citotoxicidade *in vitro*, tanto de células tronco tumorais, quanto de células não-tronco, por um mecanismo dependente de AMPK [82]. Já foi descrito, também, que a metformina induz uma redução na porcentagem de células tronco tumorais pela diminuição da expressão de KLF5 (*krueppel-like factor 5*), um fator de transcrição de células tronco [83]. Para corroborar com os dados supracitados, um estudo *in vitro* demonstrou que os níveis proteicos de mTOR se apresentam elevados em células de linhagem câncer de mama quando comparada com células não tumorais, provavelmente por um problema na proteólise proteica, e que a metformina induziu a degradação da proteína mTOR nas linhagens tumorais, provavelmente pela formação de agregossomos proteicos. Além disso, foi verificada a redução no potencial migratório e de proliferação dessas células que tiveram seus níveis proteicos reduzidos [84].

Fazendo uma relação com a angiogênese, foi demonstrado que, em linhagens de câncer de mama HER2+, há uma expressão aumentada de proteínas como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e HIF1- α (*hypoxia-inducible factor 1-alpha*), as quais estão associadas com um ambiente hipóxico e de grande formação de vasos sanguíneos, o que facilita o desenvolvimento tumoral. No mesmo estudo, foi demonstrado que a metformina induziu uma inibição da angiogênese pela redução da sinalização de HER2 *in vivo*, corroborando com os dados encontrados *in vitro*. Esses dados sugerem que HER2 possa estar agindo como um oncogene, estando relacionado com a expressão de proteínas pró-angiogênese [85]. Corroborando com as informações acima, foi descrito que condições hipóxicas podem estar associadas à

resistência a metformina e ao dicloroacetato, de modo que, a redução do ambiente hipóxico seria um requisito essencial para elevar a sensibilidade de células tumorais à metformina [86]. Também já foi descrito que a metformina induz uma redução na expressão de VEGF *in vitro* [87]. Já, em modelos animais de lesão pulmonar induzida por hiperóxia, foi demonstrado que a metformina prolongou a sobrevivência dos animais, além de reduzir as lesões teciduais por meio de redução da inflamação [88].

Como já descrito, a metformina possui atividade regulando a gliconeogênese hepática e, por isso, é possível imaginar que a concentração de glicose no ambiente fisiológico possa vir a influenciar a atividade desta biguanida. Diversas análises têm sido desenvolvidas nessa linha de estudo. Rahj e colaboradores demonstraram que, em ambientes com altas e baixas concentrações de glicose, as células da linhagem mamária tumoral triplo negativa MDA-MB-231, não sofreram alterações de viabilidade sob influência da metformina. Entretanto, em meios sem glicose, houve uma redução significativa dessas células [89]. Desse modo, eles sugerem que a metformina atua gerando uma elevação no consumo de glicose, o que resulta em uma depleção da mesma e conseqüente redução da viabilidade celular. Bizjak e colaboradores demonstraram, utilizando a mesma linhagem celular, que, em um meio com glicose, a metformina não induziu o desprendimento de células da garrafa de cultivo; entretanto, em um meio sem glicose, houve um elevado descolamento das células. Ademais, foi demonstrado que estas células que ficavam em suspensão eram na maioria, positivas para azul de tripan e para iodeto de propídio, ou seja, inviáveis. Por outro lado, no meio com glicose, as poucas células que estavam em suspensão não eram positivas para ambos os marcadores, associando, então, com uma maior viabilidade celular [90]. Para reforçar tais dados, foi demonstrado que, em linhagens de câncer de mama tanto triplo-negativo, quanto estrogênio positivo, a metformina foi mais eficiente em reduzir a inibir a viabilidade celular em meios com concentração mais reduzida de glicose (2.75 mM) quando comparado com concentrações mais elevadas (11 mM) [91]. Desse modo, é possível perceber que, em um meio de concentração reduzida de glicose, provavelmente, as células tumorais mamárias são mais sensíveis à metformina.

Em estudos pré-clínicos de câncer de mama, resultados bastante conflitantes têm sido encontrados. Isso porque a maioria dos estudos utilizam doses muito acima das séricas encontradas em pacientes, as quais seriam consideradas tóxicas. O pico plasmático é de aproximadamente 0.6 µg/mL (4 µM), 1.1 µg/mL (6.6 µM), 1.4 µg/mL

(8.4 μM), e 1.8 $\mu\text{g/mL}$ (10 μM) para doses diárias de 500, 1000, 1500, e 2000 mg, respectivamente [92] e, em grande parte dos estudos, concentrações tão altas quanto 50 mM ou 100 mM são utilizadas. Na Tabela 4 são apresentados os resultados para diferentes doses de metformina.

Tabela 4: Diferentes resultados pré-clínicos encontrados para a metformina no câncer de mama, com as respectivas doses ou concentrações utilizadas.

Resultado Encontrado	Doses ou Concentrações de Metformina	Referência
A metformina reduziu o efeito pró-metastático de citocinas pró-inflamatórias em TNBC (<i>triple negative breast cancer</i>)	0.1 mM	[93]
A metformina reduziu crescimento células câncer de mama <i>in vitro</i> . <i>In vivo</i> , o tratamento com metformina reduziu o tamanho tumoral, inibiu a migração celular e a invasão, bem como, a sobrevivência e autorenovação das células tronco tumorais.	3 mM (<i>in vitro</i>) 100 mg/kg (<i>in vivo</i>)	[94]
A metformina elevou a radiosensibilidade de células ER+, mas não de TNBC. Além disso, demonstrou um aumento de necrose em TNBC, mas não interferiu em eventos de apoptose ou para no ciclo celular.	10 mM	[95]
<i>In vitro</i> , a metformina (dose alta) inibiu 85% do crescimento de linhagens ER-, e 57% de ER+ em 72 h. Em concentrações baixas, a metformina reduziu a formação de colônias. A morte celular induzida por metformina (dose “média”) provavelmente não foi via apoptose. Tratamento com metformina (dose baixa) resultou em uma parada parcial no ciclo celular.	Dose alta: 50 mM Dose “média”: 20 mM Dose baixa: 2 mM	[96]
Em células TNBC <i>in vitro</i> , a metformina reduziu a viabilidade celular e induziu apoptose de maneira tempo e concentração-dependente; entretanto, foi demonstrado um aumento de	Doses utilizadas: 1.5 mM, 2.5 mM, 5 mM, 10 mM e 20 mM	[97]

espécies reativas de oxigênio após o tratamento com metformina.

In vitro, a metformina exibiu um efeito antiproliferativo maior do que o tamoxifeno, via inibição do receptor de estrogênio (ER) em células ER+. 15 mM, 20 mM e 25 mM [98]

Em células ER+, o tratamento com metformina resultou em uma redução da expressão do ER, além de suprimir proteínas associadas ao crescimento celular e reduzir a sensibilidade ao tamoxifeno. 2 mM, 5 mM, 10 mM e 15 mM [99]

Dessa maneira, percebe-se que estudos adicionais ainda se fazem necessários para definir o(s) mecanismo(s) que pode(m) estar implicado(s) no efeito antitumoral da metformina. Esse mecanismo pode ser dependente do tecido avaliado, atuando por diversas vias de sinalização. Além disso, diferentes concentrações são utilizadas nos ensaios *in vitro*, sendo algumas muito mais altas do que as séricas, sem um padrão nos resultados, o que reduz a possibilidade de translação para a clínica. No caso do câncer de mama, é importante salientar que diferentes respostas são encontradas, dependendo não só das doses ou concentrações utilizadas, mas também da característica tumoral (ER+, *HER2+* ou TNBC).

1.9 Aspirina

A aspirina (ácido acetilsalicílico) é o anti-inflamatório não esteroide mais amplamente utilizado na história. A primeira síntese ocorreu em 1853, mas só passou a ser sintetizada para comercialização, em 1899. Possui como principal mecanismo de ação a inibição da síntese de prostaglandinas e tromboxanos, com redução da agregação plaquetária, por meio de acetilação irreversível de resíduos de serina no sítio ativo das ciclo-oxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2) [100]. As duas isoformas da COX (1 e 2) demonstram diferentes funções e expressões celulares, embora apresentem 60% de identidade em suas sequências. A COX-1 é uma enzima constitutiva, expressa na maioria dos tecidos, possuindo funções de manutenção da homeostase tecidual e produção de prostaglandinas, as quais estão envolvidas em mecanismos fisiológicos, como proteção gástrica e agregação plaquetária. Por outro

lado, a COX-2 possui a sua expressão induzida nas células, em resposta a uma lesão ou infecção, sendo responsável pela produção de prostaglandinas durante a resposta inflamatória [101]. Inicialmente, acreditava-se que a ação da aspirina ocorria após a hidrólise da molécula e geração do seu metabólito ativo, o salicilato, o qual possuía atividade biológica. Entretanto, essa ideia foi contestada após a identificação do efeito inibitório da formação de prostaglandinas pela aspirina e, principalmente, após a demonstração da acetilação da COX em plaquetas. Assim, foi possível demonstrar dois componentes bioativos na molécula da aspirina: o grupo acetil reativo e a formação de salicilato [102] (Figura 1). Interessantemente, enquanto a acetilação de COX-1 resulta na inibição da molécula, foi descrito que a acetilação de COX-2 gera alterações na atividade enzimática da proteína e na formação de diferentes produtos, como o ácido 15R-hidroxiperoxi-eicosatetraenoico (15R- H(p)ETE) [102]. Em relação à angiogênese, dados *in vitro* demonstraram que os principais produtos formados a partir da ativação de COX-1 pela aspirina são os ácidos 11-HETE e 15(S)-HETE, sendo este último associado com a regulação endotelial pela formação de estruturas tubulares, e o bloqueio de 15(S)-HETE poderia gerar uma redução da angiogênese [103].

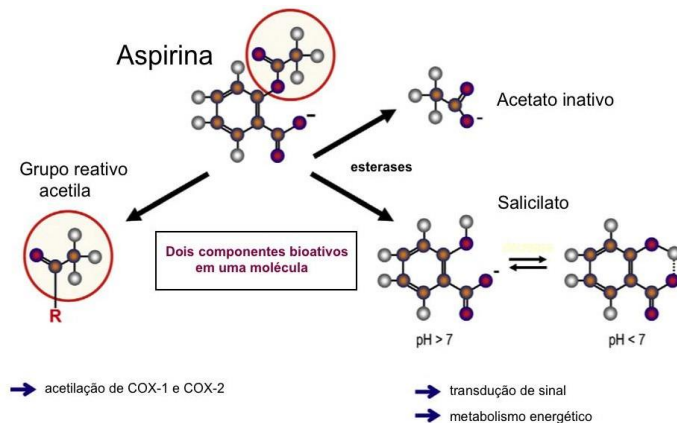


Figura 1: Esquema da molécula da aspirina e ambos os princípios ativos - grupo acetila reativo e formação de salicilato por esterases. Adaptado de [102]. *Publicação aprovada pela revista (Número de licença: 3895480568510).*

Atualmente, a principal utilização clínica da aspirina é na prevenção de eventos cardiovasculares tromboembolíticos. Entretanto, o papel da aspirina como possível agente antineoplásico ou adjuvante no tratamento de câncer tem sido investigado. Estudos observacionais demonstraram uma relação entre a utilização de aspirina após o diagnóstico de câncer de esôfago e um aumento na sobrevivência dos pacientes

[104]. Já, em pacientes com câncer de ovário, foi observada uma associação inversa, moderada, entre o uso da aspirina e o risco de desenvolvimento de câncer [105]. Uma metanálise demonstrou que a aspirina está associada com a redução das mortes associadas a tumores de mama, de próstata e de cólon e que possivelmente esse efeito pode estar relacionado a mutações do gene PIK3CA (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase*) ou à superexpressão de COX-2 [106]. Entretanto, os dados ainda são contraditórios. Um estudo de coorte com 2925 mulheres pós-menopáusicas, diagnosticadas com câncer de mama em estágios I e II, demonstrou que a utilização de aspirina pré-diagnóstico não teve associação significativa com a redução de mortalidade associada ao tumor. Contudo, houve redução da taxa de mortalidade associada ao câncer de mama feminino, sem acometimento linfonodal [107]. De forma interessante, a prescrição de aspirina, de inibidores seletivos de COX-2 ou, de outros anti-inflamatórios não esteroidais após o diagnóstico de câncer de mama não possui associação com a recidiva tumoral, embora o uso antes do diagnóstico tenha sido associado com uma redução da recorrência de câncer de mama [108]. Dados de metanálise revelaram que o uso regular de aspirina está associado com um risco reduzido de desenvolvimento de carcinoma mamário [109], o que corrobora os achados que demonstram que mulheres pré-menopáusicas, com irmãs também portadoras de câncer de mama, tiveram uma redução significativa no risco de desenvolver a doença após utilizar aspirina [110]. Além disso, foi relatado que o uso de aspirina pode ter um efeito protetivo em câncer de mama, cólon, pâncreas e ovário em mulheres senis [111]. Ainda, uma metanálise sugeriu que o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), dentre eles a aspirina, pode estar associado com uma pequena redução no risco de desenvolvimento de câncer de mama; entretanto, a disponibilidade de dados foi insuficiente para estimar um efeito dose-resposta mais fidedigno em relação à duração e à frequência do uso de cada tipo específico de AINE [112]. Em relação ao efeito protetivo dos AINES, foi descrito que este ocorre mais em mulheres em pós-menopausa que possuem tipos tumorais de câncer de mama estrogênio-positivo ou *HER2+* [113].

O possível mecanismo antineoplásico da aspirina ainda permanece obscuro. Sendo assim, diversos estudos pré-clínicos têm sido desenvolvidos a fim de elucidar essa questão. Um dos mecanismos descritos, embora não em linhagens tumorais, foi a modulação de canais de ânions dependentes de voltagem da mitocôndria (VDAC) pela aspirina, o que induziu morte celular [114]. Dados *in vitro* demonstram que o uso

de aspirina aumentou o efeito terapêutico do quimioterápico gencitabina em linhagens de câncer pancreático, além de reduzir as características das células troncos tumorais e a concentração de mediadores inflamatórios [115]. Além disso, a aspirina inibiu o crescimento de células MCF7, além de auxiliar na sensibilidade de células resistentes à tamoxifeno a este quimioterápico provavelmente via modulação do oncogene *c-myc*. A combinação de aspirina e tamoxifeno regulou proteínas do ciclo celular, como a ciclina D1, levando ao bloqueio deste mecanismo celular [116]. Já, em linhagens celulares de câncer de cólon, foi demonstrado um aumento de senescência celular de maneira independente de COX-1 ou COX-2, sugerindo um possível mecanismo de ação alternativo para a aspirina [117]. Ainda, quando células de câncer de cólon foram colocadas em co-cultura com plaquetas, houve alteração de proteínas associadas à transição epitelial-mesenquimal, gerando um estímulo desta, a qual foi reduzida quando da administração da aspirina [118]. O mesmo estudo, utilizando modelo *in vivo*, demonstrou a condição de co-cultura foi importante para gerar tumores mais metastáticos, com expressão elevada de prostaglandina E2 (PGE2) e tromboxano A2 (TXA2), sendo estes sinais químicos lipídicos gerados pela ativação de ciclo-oxigenases (COX) e lipo-oxigenases, que regulam diversos mecanismos celulares. Neste modelo, a aspirina reduziu tanto as metástases, quanto a expressão de PGE2 e TXA2 [118]. Ademais, foi demonstrado que a aspirina induziu um efeito inibitório sobre o crescimento celular de células de câncer mamário murino, co-cultivadas com fibroblastos [119]. Por fim, dados *in vitro* e *in vivo* de carcinoma mamário demonstraram que a aspirina não só preveniu o crescimento celular via apoptose, como também reduziu significativamente a capacidade de crescimento de células tronco tumorais, com redução da transição epitelial-mesenquimal (TEM) [120]. De forma importante, foi relatado que mutações no oncogene PIK3CA, que codifica o domínio catalítico da enzima PI3K, são necessárias para elevar a sensibilidade de linhagens de câncer de mama à aspirina quando administrada em concentrações semelhantes às encontradas fisiologicamente [121]. Outro mecanismo descrito foi a hiperacetilação pós-traducional de motivos proteicos, induzida por aspirina, em linhagens tumorais de mama, o que resultou em morte celular via apoptose de modo tempo-concentração dependente em linhagens triplo negativa (MDA-MB-231) e via necrose em linhagens estrogênio positiva (MCF7) [122]. Todavia, mais estudos são necessários para entender os possíveis efeitos da aspirina no microambiente tumoral.

1.10 Metformina, Aspirina e Câncer

Apesar do grande número de estudos que avaliaram os efeitos antitumorais da metformina e da aspirina quando utilizadas de forma isolada, poucos trabalhos científicos têm investigado os efeitos da interação dos dois medicamentos no câncer. O racional para tal ideia estaria baseado em alguns estudos que demonstram vias de sinalização intracelular comuns aos dois fármacos. Nesse contexto, foi descrito que a metformina combinada com aspirina reduz o crescimento *in vitro* e *in vivo* de células de câncer pancreático, por suprimir proteínas anti-apoptóticas, de maneira independente de AMPK [123]. Por outro lado, outro estudo demonstrou que a metformina e a aspirina atuam de forma sinérgica na ativação AMPK, em células de câncer de mama e, em células progenitoras de tecido adiposo branco. Esse sinergismo demonstrou um aumento da inibição do complexo I da cadeia respiratória em linhagens de câncer de mama triplo negativo e hormônio-responsivo. O mesmo estudo relatou dados *in vivo* de câncer de mama triplo negativo e ER+, onde a utilização de ambos os medicamentos não gerou redução de tumores locais, de metástase e da angiogênese em animais imunocomprometidos, mas elevou a ativação de AMPK. Em contraste, em animais imunocompetentes, o sinergismo farmacológico resultou em uma redução local e metastática de células mamárias tumorais hormônio-responsivas [124]. Entretanto, mais estudos são necessários para entender os mecanismos celulares e moleculares associados à possível interação farmacológica no contexto do tumor de mama, levando em consideração os diferentes tipos tumorais e as suas respostas distintas a cada medicamento.

1.11 Câncer, Inflamação, COX-2 e Lipoxinas

As lipoxinas são metabólitos endógenos, que atuam como moléculas pró-resolução no sítio da inflamação. Essas moléculas regulam componentes do sistema imune inato e adaptativo, como neutrófilos, células B e T, e macrófagos. As lipoxinas são responsáveis por reduzir a lesão tecidual severa, diminuindo marcadores da inflamação crônica [101], [125]. Um trabalho de revisão publicado por Jayashree e colaboradores [125] descreve que a formação das lipoxinas envolve duas grandes vias a partir do ácido araquidônico, como visto na Figura 2. A primeira via de síntese de lipoxinas ocorre nas plaquetas, onde o leucotrieno A4 (LTA4) é convertido a lipoxinas pela enzima lipo-oxigenase 12 (12-LO). A segunda via ocorre em diferentes células, onde o ácido araquidônico é convertido em lipoxinas A e B, pela influência de

duas lipo-oxigenases, a 15 (15-LO, em eritrócitos e reticulócitos) e a 5 (5-LO, em neutrófilos). Há, entretanto, uma terceira via descrita por Serhan et al [126], que é dependente de aspirina e resulta na formação de 15-epi lipoxina B4 e 15-epi-lipoxina A4, também conhecidas como *aspirin-triggered lipoxins (ATL)*. Nessa via, a aspirina acetila a COX-2 levando à formação do ácido 15R-hidroxiperoxieicosatetraenoico (15R-H(p)ETE), o qual é metabolizado pela lipo-oxigenase 5 (5-LO), gerando os metabólitos finais.

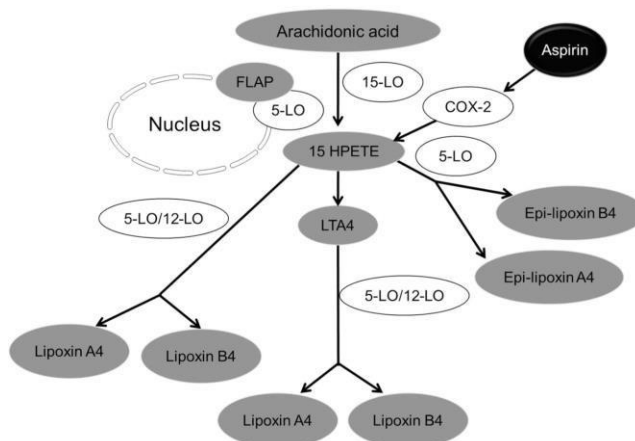


Figura 2: Vias de síntese de lipoxinas descritas atualmente. Retirado de [125]. A revista salienta que o uso não comercial do artigo é permitido sem nenhuma necessidade de solicitação adicional de permissão para a Dove Medical Press Limited.

Já foi descrito que a utilização de doses de aspirina tão baixas quanto 75 mg/dia resulta na redução do acúmulo de leucócitos no sítio inflamatório, além de envolver a produção de lipoxinas e a superexpressão dos receptores de lipoxinas [127]. Sendo assim, acredita-se que doses baixas de aspirina são suficientes para desencadear o sistema de formação de lipoxinas, com geração de epi-lipoxinas e resolução da inflamação. As lipoxinas e as epi-lipoxinas desencadeiam seus efeitos anti-inflamatórios, especialmente, pela ativação dos receptores metabotrópicos de lipoxina A4 (ALX), também conhecidos como receptores de formilpeptídeo (FPR2) [125]. Além disso, também já foi descrito que as lipoxinas podem atuar via receptor de estrogênio [128], o qual está expresso em vários tipos de carcinoma mamário.

Embora a inflamação seja um processo fisiológico, tem sido descrita uma forte associação entre os componentes da resposta inflamatória e o desenvolvimento

tumoral. De fato, a inflamação é caracterizada como um dos *hallmarks* do câncer [6]. Sabe-se que a falha na resolução da inflamação pode levar a um aumento das respostas crônicas. De acordo com a revisão de Ha-Na Lee et colaboradores [129], estima-se que aproximadamente 15% a 25% dos tumores humanos sejam desencadeados por um estado de inflamação crônica, que pode ser gerada a partir de uma infecção ou de anormalidades imunológicas com falha de resolução. O estado de inflamação crônica é caracterizado pela presença de infiltrado inflamatório e produção de mediadores pró-inflamatórios, os quais constituem um microambiente pró-tumoral, com geração de espécies reativas de oxigênio, dano ao DNA e alterações celulares (Figura 3).

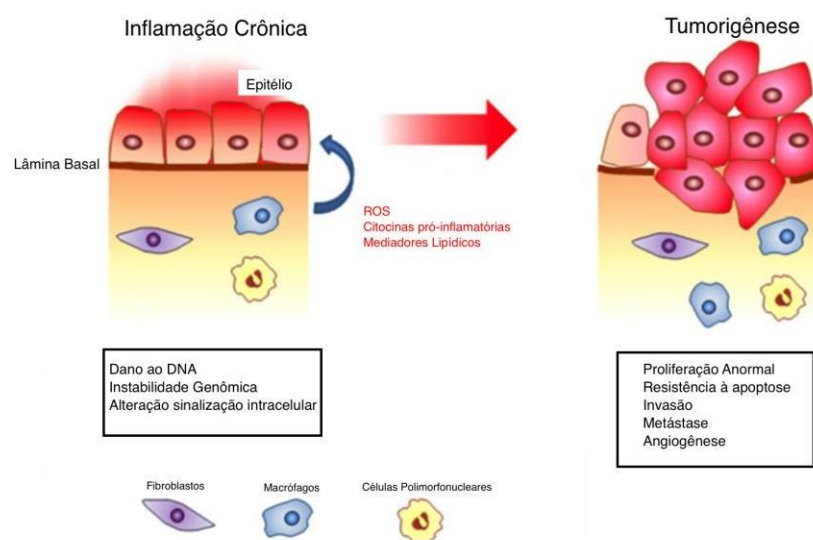


Figura 3: Esquema de desencadeamento da carcinogênese via inflamação crônica. Adaptado de [129]. *Publicação aprovada pela revista (Número de licença:3895471162814).*

Os neutrófilos são células importantes para a resposta imunológica; o *clearance* destas células, após o processo de recrutamento e ativação, é um passo essencial para a resolução da inflamação. Tem sido postulada a presença de dois fenótipos de neutrófilos em modelos animais: pró- (N2) e antitumoral (N1) [130]. Entretanto, estudos em humanos ainda são bastante controversos e, não se sabe com clareza a função dessas células no microambiente tumoral. Avaliações histológicas indicam que pacientes com carcinoma renal possuem maiores proporções de neutrófilos na região tumoral do que em áreas periféricas, além dos tumores de maiores graus apresentarem mais porcentagem desse tipo celular

inflamatório quando comparados com os de pequeno grau. O mesmo estudo, fazendo análises *in vitro*, demonstrou que os neutrófilos possivelmente ativam o receptor de estrogênio β (ER β), levando a uma promoção da proliferação celular de carcinoma mamário por uma via TGF- β /SMAD3 [131]. Dados *in vitro* demonstraram que o meio condicionado de células de câncer de mama induz os neutrófilos a produzir oncostatina M, a qual está associada a indução da expressão de VEGF, fator responsável pelo estímulo da angiogênese. Ou seja, a oncostatina M proveniente de neutrófilos pode possuir efeitos pró-tumorais [132]. Já, resultados *in vivo* demonstram que a presença de estradiol elevou o recrutamento de neutrófilos para o microambiente tumoral em modelo tumoral ER+, e não em ER-, além de induzir a polarização para N2. Além disso, uma linhagem ER+ não metastáticas, em modelo utilizando *Zebrafish*, se tornou metastática na presença de neutrófilos, além do estradiol estimular a disseminação celular [133]. Em modelos murinos de carcinoma mamário, foi demonstrado um aumento de infiltrado neutrofílico em tumores metastáticos, e a depleção dos neutrófilos promoveu uma redução significativa do volume tumoral, sugerindo que pode haver um recrutamento de neutrófilos pró-tumorais para o microambiente via estímulo de IL-17 (interleucina 17) [134]. Ademais, a análise da razão neutrófilos/linfócitos, presentes no tecido tumoral de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, demonstrou que essa razão está associada positivamente com o tamanho da massa tumoral, com envolvimento linfonodal, propensão a metástases e características desfavoráveis, como perda da expressão de *HER2* e grau elevado de malignidade [135]. Além disso, dados *in vivo* sugerem que o desenvolvimento de câncer de mama em um microambiente denso em colágeno resulta na secreção de diferentes citocinas, as quais podem recrutar subgrupos distintos de células imunes. Nesse mesmo estudo, a depleção de neutrófilos inibiu significativamente a metástase pulmonar em animais, com aumento de deposição de colágeno. Portanto, esse estudo propõe que neutrófilos possuem um possível efeito pró-tumoral no contexto de maior densidade mamária [136]. Como revisado por Chandrasekharan e Sharma-Walia [125], as lipoxinas podem auxiliar na indução de apoptose em neutrófilos, além de estimular a resolução da infecção por favorecer a redução do número de neutrófilos no sítio inflamatório. Percebe-se que ainda se sabe pouco sobre o "componente neutrofílico" no câncer. Entretanto, relata-se que o ambiente e os sinais aos quais os neutrófilos estão expostos são de extrema importância para direcionar o envolvimento desse tipo celular em diversas patologias,

resultando na interação com outras células, via interface de membrana ou pela secreção de diferentes moléculas de sinalização. Nesse sentido, mais estudos são necessários acerca do envolvimento de lipoxinas sobre o efeito dos neutrófilos no ambiente tumoral.

Dados pré-clínicos têm demonstrado uma possível atuação de COX-2 e das lipoxinas no câncer. Inicialmente foi demonstrada uma superexpressão anormal de COX-2 em certos tipos tumorais [137],[138],[139], o que sugere que possíveis eventos neoplásicos são desencadeados por essa via. A partir da avaliação de amostras de câncer de mama, foi identificada uma pequena porcentagem de tumores que possuíam expressão tanto de mRNA, quanto da proteína COX-2 elevados, sendo esses principalmente associados ao subtipo triplo-negativo [140]. Um estudo utilizando imunohistoquímica identificou a expressão de COX-2 em lesões apócrinas de glândulas mamárias e em glândulas normais, revelando que a COX-2 se encontra superexpressa nas lesões, as quais são benignas e não invasivas, mas que podem vir a ser precursoras de malignidade ou indicadoras de susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama. Ou seja, a modulação de COX-2 está, provavelmente, associada com o desenvolvimento de câncer de mama [141]. Outro estudo analisou a expressão diferencial de COX-2 em células epiteliais e estromais, em amostras de pacientes com câncer de mama, sendo algumas provenientes de pacientes com mama densa e outras não densa. A marcação para COX-2 foi principalmente identificada em células epiteliais, o que sugere que esta proteína provavelmente está realmente associada ao desenvolvimento tumoral, uma vez que a maioria dos cânceres de mama são de origem epitelial. Além disso, não foi encontrada diferença significativa entre mamas densas e não densas [141]. Ainda avaliando a atividade de COX-2, Wu e colaboradores demonstraram que as metaloproteinases 9 e 16 (MMP9 e MMP16) estão associadas com metástases cerebrais em pacientes com câncer de mama, e que a metaloproteinase 1 (MMP1) se apresenta superexpressa em todas as linhagens celulares metastáticas cerebrais, quando comparadas com as células parenterais correspondentes. No mesmo estudo, dados *in vitro* sugerem que, em linhagem de mama triplo-negativa, a expressão de COX-2 provavelmente está associada a uma maior capacidade de transmigração celular e com a indução de MMP1, a qual está relacionada à migração celular e ao *downregulation* de proteínas de ancoragem, como as claudinas e ocludinas [142]. Desse modo, esse estudo sugere que a ativação de COX-2 pode gerar a modulação

de MMP1, levando a um efeito permeabilizante da barreira hematoencefálica, facilitando a metástase cerebral. Ainda, dados *in vivo* e *in vitro* sugerem que a inibição de COX-2, utilizando tamoxifeno, em linhagens MCF7, suprime a proliferação celular e a metástase celular, além de induzir apoptose e reduzir crescimento tumoral [143]. Ainda sobre metástase tumoral, a superexpressão de COX-2 em modelo murino de carcinoma mamário resultou em um aumento da metástase óssea, além de resultar em um aumento de PGE2 e de reduzir células TCD8+ no sítio primário do tumor, células estas do sistema imune conhecidas por possuírem uma atividade antitumoral [144].

Em hepatocarcinomas, melanomas e câncer de cólon, foi demonstrado que a lipoxina A4 tem efeito antitumoral, pela redução de células B regulatórias e, conseqüentemente, de células T regulatórias no microambiente neoplásico, elevando a resposta de células T antitumorais e reduzindo a evasão do câncer ao sistema imune [145]. Em células de carcinoma hepatocelular, as lipoxinas induziram apoptose, redução da proliferação, da migração e da angiogênese [146]. Além disso, *in vitro*, foi demonstrado que a LXA4 reduziu a invasão celular de carcinoma pancreático, além de diminuir a produção de ROS e de metaloproteinases, via sinalização de ERK [147]. Adicionalmente, em linhagens de Sarcoma de Kaposi imortalizadas, expressando altos níveis de COX-2, o tratamento com LXA4 e 15-epi-lipoxina reduziu os níveis de COX-2 e de secreção de PGE2 E LTB4, além de induzir a secreção da interleucina anti-inflamatória, IL-10 (interleucina 10) e, de reduzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-8 (interleucina 8) e a IL-6 (interleucina 6) [139]. Em análises imunohistoquímicas de casos câncer de mama ER+ e HER2+, foi demonstrado que a superexpressão de COX-2 está associada a uma piora na sobrevida de pacientes, além de possuir uma correlação significativa com o aumento da fosforilação de Akt, a qual é importante para a proliferação celular [148]. Em adição, dados *in vivo* e *in vitro* de câncer de bexiga demonstraram que a metformina foi capaz de reduzir a proliferação celular, além de causar parada no ciclo celular e apoptose. No mesmo estudo, a utilização de metformina reprimiu a repopulação de células tumorais, possivelmente via inibição de COX-2 e ativação da via da STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) [149]. Corroborando esses dados, Tong e colaboradores demonstraram que a metformina inibe a transição epitelial-mesenquimal em células de câncer de próstata pela repressão do eixo COX2/PGE2/STAT3 [150]. Por fim, como já descrito, um estudo de coorte

prospectivo sugeriu que a utilização de aspirina e de inibidores seletivos de COX-2 previamente ao diagnóstico de câncer de mama demonstra associação com a redução de recidiva tumoral [108]. Apesar de algumas evidências científicas acerca da atuação das lipoxinas e da COX-2 em diferentes tipos tumorais, estudos adicionais são necessários para avaliar quais vias estão relacionadas e, se esses mecanismos podem variar dependendo do tecido ou tipo tumoral estudado.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama possui uma importância epidemiológica mundial relevante. Dificuldades no seu tratamento ainda são enfrentados, uma vez que, dependendo do subtipo tumoral, a resistência aos quimioterápicos disponíveis ainda é muito elevada. Visto que já foi descrita a importância da inflamação como evento crucial no desenvolvimento tumoral e, que a expressão de COX-2 anormal pode ser encontrada em carcinomas mamários, é de extrema importância avaliar o seu envolvimento no microambiente tumoral, bem como, analisar diferentes marcadores inflamatórios e vias alternativas associadas à COX-2. Já foi salientado que a COX-2 não só contribui para processos pró-inflamatórios, como também para a resolução da inflamação. Sendo assim, prevenir a tumorigênese desencadeada por inflamação crônica, via promoção de resolução inflamatória, pode ser uma estratégia eficiente para a redução da susceptibilidade tumoral e auxílio no tratamento da doença. Isso pode ser ainda mais relevante, se os efeitos modulatórios sobre a COX-2 e as lipoxinas estiverem associados ao uso de fármacos já disponíveis na clínica, sendo relacionados com menos efeitos colaterais. Além disso, uma vez que as concentrações de metformina utilizadas atualmente em estudos *in vitro* são muito elevadas, quando comparadas às séricas encontradas em pacientes e, que possivelmente, seriam consideradas tóxicas, é importante avaliar a resposta *in vitro* de células de câncer de mama expostas a concentrações semelhantes às séricas.

3. HIPÓTESE

Frente aos diversos dados coletados, torna-se claro que a inflamação é essencial para o desencadeamento da tumorigênese. Além disso, a presença elevada de COX-2 no câncer de mama sugere que possivelmente essa molécula está associada à progressão tumoral. Visto que foi descrito o possível efeito antitumoral da metformina por inibição de COX-2 e que há dados suficientes que relatam a via de

produção de lipoxinas pela acetilação de COX-2 mediada por aspirina, cabe avaliar se a exposição de diferentes linhagens de câncer de mama à metformina e/ou à aspirina, em concentrações consideradas fisiologicamente não-tóxicas aos pacientes, poderia resultar em alterações celulares e moleculares que beneficiem a diminuição da proliferação celular. Uma vez que neutrófilos são células inflamatórias presentes no microambiente tumoral, que expressam lipo-oxigenases importantes e que pouco se sabe da sua atuação no câncer, é possível que a interação entre esse tipo celular e linhagens de carcinoma mamário, frente à exposição com metformina e/ou aspirina resulte em diferentes padrões de crescimento celular e de expressão moléculas inflamatórias.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos *in vitro* da metformina e da aspirina de forma isolada ou combinada em diferentes linhagens humanas de câncer de mama, correlacionando seus efeitos com a modulação da COX-2 e das lipoxinas.

4.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito da metformina e da aspirina, separadamente ou, em combinação, na proliferação e viabilidade celular de três tipos de linhagens de carcinoma mamário;
2. Avaliar o efeito da metformina e da aspirina, separadamente ou, em combinação, na migração celular de três tipos de linhagens de carcinoma mamário;
3. Identificar o efeito dos tratamentos com metformina e/ou aspirina sobre a expressão de COX-2, em diferentes linhagens de câncer de mama;
4. Analisar se metformina e aspirina atuam de forma sinérgica em linhagens celulares de diferentes subtipos tumorais;
5. Avaliar o efeito do tratamento com metformina e/ou aspirina na sobrevivência celular e na capacidade de formar colônias em diferentes linhagens tumorais mamárias;
6. Avaliar o efeito dos tratamentos com metformina e/ou aspirina, na expressão de lipoxinas em diferentes linhagens de câncer de mama.

7. Verificar a possível interação entre a metformina ou a aspirina e os receptores de estrogênio (ER α e ER β) *in silico*.

Capítulo 2

ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo científico submetido ao periódico *Investigational New Drugs: Novel Anti-Cancer Therapeutics and Therapies*, da editora Springer, intitulado *Metformin and aspirin: old drugs, new insights in breast cancer*.

Maria Martha Campos
para mim

11:48 (Há 1 minuto)

inglês > português Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

----- Forwarded Message -----

From: Investigational New Drugs <em@editorialmanager.com>
To: Maria M Campos <camposmartha@yahoo.com>
Sent: Tuesday, December 12, 2017, 11:47:51 AM GMT-2
Subject: DRUG-D-17-00240 - Submission Confirmation

Dear Campos:

Thank you for submitting your manuscript, "Metformin and aspirin: old drugs, new insights in breast cancer", to Investigational New Drugs.

The submission id is: DRUG-D-17-00240

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

Your username is: camposmartha

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <http://drug.edmgr.com/>.

Should you require any further assistance, please feel free to contact the Editorial Office by clicking on the "contact us" in the menu bar to send an email to us. Alternatively, please call us at 001-630-468-7784 (outside the US)/(630)-468-7784 (within the US) anytime from Monday to Friday.

With kind regards,

The Editorial Office
Investigational New Drugs

Investigational New Drugs

Metformin and aspirin: old drugs, new insights in breast cancer

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	Metformin and aspirin: old drugs, new insights in breast cancer				
Article Type:	Preclinical Trials				
Keywords:	Breast cancer; Drug repurposing; Metformin; Aspirin				
Corresponding Author:	Maria M Campos Porto Alegre - RS, BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:					
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Maria Eduarda Azambuja Amaral				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	Maria Eduarda Azambuja Amaral Laura Roesler Nery Carlos Eduardo Leite Walter Filgueira de Azevedo Junior Maria M Campos				
Order of Authors Secondary Information:					
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (303842-2014-8)</td> <td>Dr Maria M Campos</td> </tr> <tr> <td>Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (3088832014-4)</td> <td>Dr Walter Filgueira de Azevedo Junior</td> </tr> </table>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (303842-2014-8)	Dr Maria M Campos	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (3088832014-4)	Dr Walter Filgueira de Azevedo Junior
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (303842-2014-8)	Dr Maria M Campos				
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (3088832014-4)	Dr Walter Filgueira de Azevedo Junior				

Maria Eduarda Azambuja Amaral^{1,5}

Laura Roesler Nery²

Carlos Eduardo Leite⁵

Walter Filgueira de Azevedo Junior¹

Maria Martha Campos^{1,4,5}

Metformin and aspirin: old drugs, new insights in breast cancer.

¹Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil.

²ZebLab & Laboratório de Biologia e Desenvolvimento do Sistema Nervoso, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6681, Prédio 12 D, sala 301, Porto Alegre, RS, 90619-900, Brasil.

³Laboratório de Biologia de Sistemas Computacionais, Escola de Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil.

⁵Centro de Toxicologia e Farmacologia, Escola de Ciências da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil.

Corresponding Author: Maria Martha Campos. E-mail address: maria.campos@pucrs.br; camposmmartha@yahoo.com

Telephone number: +555133203562

ABSTRACT

Background Breast cancer is highly prevalent among women worldwide. It is classified into three main subtypes: the estrogen receptor positive (ER+), the human epidermal growth factor receptor 2 positive (HER2+), and the triple negative breast cancer (TNBC). This latter type is the most prevalent in clinics. Each type requires a specific treatment, being TNBC an actual challenge for treating. Drug repurposing is an easy and cheaper methodology to identify new therapies for cancer treatment. This study evaluated the effects of aspirin and metformin, isolated or in combination, in breast cancer cells of different subtypes. *Methods* The breast cancer cell lines MCF-7, MDA-MB-231, and SK-BR-3 were treated with aspirin and/or metformin (0.01 mM - 10 mM); functional *in vitro* assays were performed. The interactions with the estrogen receptors (ER) were evaluated *in silico*. *Results* Metformin altered the morphology, and reduced the viability and migration of the ER+ cell line MCF-7. A synergistic effect for the combination of metformin and aspirin was observed in the TNBC cell subtype MDA-MB-231, according to the evaluation of viability and colony formation. No significant effects were observed for either drugs in the HER2+ cell subtype SK-BR-3. The effects of metformin and aspirin partly rely on cyclooxygenase-2 (COX-2) upregulation, without production of lipoxin. *In silico*, metformin and aspirin bound the ER α receptor with the same energy. *Conclusion* We provide novel evidence on the mechanisms of action of aspirin and metformin in breast cancer cells, showing favorable outcomes for these drugs in the ER+ and TNBC subtypes.

Keywords: *Breast cancer. Drug repurposing. Metformin. Aspirin.*

INTRODUCTION

Breast cancer is one of the most common tumors, being highly prevalent among women worldwide. In 2017, the American Cancer Society estimated approximately 260.000 new cases of breast cancer and 40.000 deaths [1]. Histologic and genetic markers are used to classify the subtypes of breast cancer [2, 3]. Estrogen receptor positive/progesterone receptor positive (ER+/PR+), HER2-positive (HER2+) and triple negative (ER-, PR-, HER2-) are the main subtypes described [4], and the treatment is different for each type. The therapy for ER+ breast cancer usually comprises selective inhibitors of estrogen receptor, such as tamoxifen. The treatment of HER2+ breast cancer subtypes involves the administration of the monoclonal antibody trastuzumab. Conversely, triple negative breast cancer is commonly the most aggressive type, and combined radiotherapy plus chemotherapy is frequently required. Breast cancer recurrence and metastasis are still very frequent and some cases are refractory to the current available treatments. Thus, it is important to investigate alternative drugs for the breast cancer treatment, and efforts are necessary to evaluate new approaches to manage this malignancy.

Drug repurposing is a methodology used to discover new uses for previously approved drugs, being cheaper and easier than analysis of novel innovative molecules. It can provide a quick transition from bench to bedside, facilitating the creation of new chemotherapy approaches for cancer treatment. Either metformin or aspirin have been described as potential drugs for the treatment of cancer. Several pre-clinical studies and cohort analysis revealed anti-cancer effects of both drugs in different types of tumors, such as a breast [5–11], hepatocellular [12], colorectal [13], pancreatic [14], ovarian [15], and a esophageal cancer [16].

Metformin is an antihyperglycemic agent used for treatment of type 2 diabetes, which has been described as a potential agent against cancer. The processes underlying the anti-tumor effects of metformin involve the reduction of angiogenesis [5] and colony formation, besides the induction of cell cycle arrest [9] and apoptosis [10], diminishing the tumor size *in vivo* [11]. Human studies have associated the use of metformin with a reduced risk of developing cancer [17] and metastasis [8], besides increasing the survival rates [18]. However, the precise mechanisms mediating the anticancer effects of metformin are not very clear, likely relying on the tumor type and microenvironment.

Aspirin is a nonsteroidal anti-inflammatory drug widely prescribed to prevent cardiovascular events. Nevertheless, the role of aspirin as a possible antineoplastic agent or adjuvant in the treatment of cancer has been investigated. Studies have shown a positive correlation between the use of aspirin and an increased survival of cancer patients [16], with a reduced risk of developing cancer [15]. Besides, aspirin might display a protective effect against breast, colon, pancreatic and ovarian cancer in old women [14]. Pre-clinical studies corroborates the anticancer effects of aspirin [19, 20]. However, its mechanisms of antitumor action remain unclear and further studies are necessary to unveil it. Despite the large number of studies evaluating the antitumor effects of metformin and aspirin alone, a few studies have investigated the potential synergism between these drugs on cancer. Some few reports have shown that metformin and aspirin can act synergistically against cancer [7, 21],[22], though just one evaluated this interaction in specific breast cancer models *in vivo* and *in vitro* (triple negative and ER+ cell lines) [7]. The present study was designed to further investigate the *in vitro* effects of low concentrations of aspirin and metformin alone or in combination, in three breast cancer cell lines (ER+, HER2+ and triple negative), attempting to assess the relevance of cyclooxygenase-2 (COX-2) and the resolution mediator lipoxin in the drugs' actions. Efforts have been made to analyze the interaction between these drugs and the estrogen receptors by using *in silico* models.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions

The human breast cancer cell lines SK-BR-3 (BCRJ code: 0226) and MDA-MB-231 (BCRJ code: 0164) were purchased from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil), and cultured in RPMI 1640 medium with 10 % fetal bovine serum (FBS). The MCF-7 cell line was kindly provided by Dr. Eduardo Filippi-Chiela from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HPCA, Porto Alegre, Brazil) and was grown in culture flasks with Dulbecco's Modified Eagle's Medium supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS). All cell cultures were maintained at 37 °C, under a minimum relative humidity of 95 %, at an atmosphere of 5 % CO₂.

Materials and Chemicals

Metformin was purchased from GPR Life Sciences Pvt. Ltd. (Honnabadi, Karnataka, India). Aspirin was obtained from Shandong Xinhua Pharmaceutical Co. Ltd. (Zibo, Shandong, China). Crystal Violet was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). RIPA Buffer and Coomassie Protein Assay Kit (Bradford) were purchased from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). Bolt™ Mini Gel Tank and iBlot® 2 Dry Blotting System were obtained from Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA). Novex® ECL HRP Chemiluminescent Substrate Reagent Kit was from Invitrogen (Carlsbad, California, EUA). Common reagents for cell culture were from Invitrogen (Carlsbad, California, EUA). Lipoxin LC-MS Mixture (Item number: 19412) was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, Michigan, USA).

Antibodies

Western blot analysis was performed with primary antibodies against β -actin (Catalog Number: MA1-140) and COX-2 (Catalog Number: PA5-16817), and secondary antibodies Goat anti-Mouse (Catalog Number: A24512) and Goat anti-Rabbit (Catalog Number: A24531) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA), respectively. Anti- α -tubulin (Catalog Number: T9026) was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

MTT Assay

SK-BR-3 (6×10^3 /well), MDA-MB-231 (8×10^3 /well) and MCF-7 (8×10^3 /well) cell lines were seeded in 96-well plates in triplicate. Twenty-four hours later, the cells were incubated with metformin, aspirin, or with the combination of metformin plus aspirin. Concentrations of 0.01 mM, 0.1 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM and 10 mM of metformin and aspirin were tested separately. For combination analysis, 2.5 mM, 5 mM and 10 mM of each drug were used. Cell viability was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, as described before [23] in 24 h, 48 h and 72 h.

Scratch Assay

To assess any positive effect of the tested drugs in cell migration, MFC-7 (1×10^5 /well), MDA-MB-231 (2×10^5 /well) and SK-BR-3 (2×10^5 /well) cells were plated in

12-well plates. Twenty-four hours (MCF7) or 48 h (MDA-MB-231 and SK-BR-3) later, they were treated with 1 mM, 2.5 mM and 5 mM of metformin and/or aspirin under starving conditions, in culture medium without FBS. Medium with 10 % FBS was used as positive control of cell migration. The scratch assay was performed as described before [24]. The images were captured in x4 magnification at 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h and 24 h using an Olympus IX71 microscope and analyzed by Image NIH Image J 1.36b Software (NIH, Bethesda, MD, USA). In a separate series of experiments, we aimed to evaluate if metformin and/or aspirin could inhibit the cell migration. Thus, MFC-7 (1×10^4 /well), MDA-MB-231 (2×10^4 /well) and SK-BR-3 (2×10^4 /well) cells were plated in 24-well plates, and 72 h after, they were treated with 5 mM of metformin and/or aspirin, without starving conditions, in a medium supplemented with 10 % FBS. A wound gap in a cell monolayer was performed by scratching, using a 200 μ L pipette tip. The cells were fixed in with 10 % formaldehyde solution for 30 min, and then stained with 1 % crystal violet, at 0 h, 12 h and 24 h after treatments.

Clonogenic Assay

MFC-7 (4×10^3 /well), MDA-MB-231 (4×10^3 /well) and SK-BR-3 (2×10^3 /well) cells were seeded in 24-well plates and exposed to 2.5 mM, 5 mM and 10 mM of metformin and/or aspirin for 72 h. Cells were trypsinized and the lineages MDA-MB-231 (500 cells), MCF-7 (100 cells), or SK-BR-3 (500 cells) were re-plated for clonogenic assay, in six-well plates. After 7 days, the medium was renewed and after 14 days, the colonies were fixed with 10 % formaldehyde solution for 30 min, and then stained with 1 % crystal violet.

Western Blotting

All cell lines were seeded in 75-cm² flasks, and exposed to 5 mM of metformin and/or aspirin for 72 h. Cell lysis was performed using RIPA Buffer, following the manufacturer's protocol. Protein concentration was determined in cell lysates using Coomassie Protein Kit, as described by the manufacturer. Forty μ g of protein were used for each sample and then separated by SDS-PAGE using Bolt™ Mini Gel Tank and transferred to a nitrocellulose membrane using iBlot® 2 Dry Blotting System. The membranes were incubated overnight with the primary antibody anti-COX-2 (1:500) or anti- β -actin (1:20.000). The samples were incubated for an additional period of 2 h with anti-rabbit or anti-mouse secondary antibodies. Novex® ECL and KODAK Gel

Logic 2200 Imaging System were used for detecting protein bands. Quantification of each band was made using Image NIH Image J 1.36b Software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Lipoxin Assay

Aspirin is known to induce lipoxin production via COX-2 acetylation [25, 26]. Thus, we assessed the possible modulation of this lipid mediator in our experimental paradigm. MCF-7, MDA-MB-231 and SK-BR-3 cell lines were maintained in 75 cm² flasks and treated with metformin and/or aspirin 5 mM, for 72h. After that, the cell numbers were measured and lipoxin extraction was performed as described before [27]. Lipoxin assay was performed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) (UHPLC 1290/MS 6460 TQXX-Agilent; all HPLC components and Mass Hunter software were from Agilent Technologies®), using Lipoxin LC-MS Mixture. Concentrations of 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 25 ng/mL, 50 ng/mL and 100 ng/mL were used for the standard curve. The transitions 351.5 → 221 (Lipoxin B₄) and 351.5 → 115 (Lipoxin A₄) were monitored. The assay was performed following the manufacturer's protocol.

In silico Analysis

ER α and ER β crystallographic structures were downloaded from the Protein Data Bank (PDB) [28] which will be referred to as datasets ER α and ER β , respectively. Table 1 brings the PDB access codes for the crystallographic structures used in this study. Metformin and aspirin chemical structures were obtained from PubChem (National Center for Biotechnology Information). The docking programs Molegro Virtual Docker (MVD) [29], AutoDock Vina [30] and AutoDock 4 [31] were applied to carry out protein-ligand docking simulations for protocol standardization. In all docking simulations, ligands and protein structures were prepared using default charge values for each program. Single bonds of ligands were considered as flexible and they were allowed to rotate during the docking simulations. Protein structures were kept rigid during all docking experiments. The highest crystallographic resolution was the parameter used to choose the main structures for re-docking simulations. AutoDock 4 has four search algorithms: Monte Carlo Simulated Annealing (SA), Genetic Algorithm (GA), Local Search (LS), and a Lamarckian Genetic Algorithm (LGA). Re-docking simulations were performed by LGA algorithm. For docking simulations using MVD, we tested a total of 32 docking protocols, as previously

described elsewhere [32]. We used the default docking protocol available for AutoDock Vina. Taken together, a total of 37 docking protocols were tested. Initially, we carried out re-docking simulations of the active ligand in the highest-resolution structure using AutoDock 4, AutoDock Vina, and MVD. After docking simulations, the program SAnDReS [32] was used to calculate docking root mean square deviation (RMSD) and also to evaluate the correlation coefficients (Spearman's and Pearson correlation coefficients) between docking scoring functions and docking RMSD for each docking protocol. In addition, SAnDReS was also used calculate docking accuracy (DA1) and extended docking accuracy (DA2), as defined elsewhere [5]. The best docking protocol was used for rest of structures in both datasets, in order to verify the docking accuracy for all structures in both datasets.

Statistical analysis

Data obtained with the cell lines are presented as the means \pm SEM from at least three separate experiments, each one performed in triplicate. The qualitative experiment to assess inhibition of cell migration was performed twice in triplicate. The significance of the data was analyzed using the One-Way ANOVA test followed by Bonferroni or Dunnett's multicomparison analysis. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Metformin or aspirin inhibited cell viability on breast cancer cell lines

Firstly, we evaluated the potential of each drug isolated on cell viability. A concentration-response curve was performed by using the MTT assay and different concentrations of metformin or aspirin in MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231 cell lines (which are ER+, HER2+ and triple negative, respectively). Concentrations from 0.01 mM to 10 mM were tested in 24 h, 48 h (Supplementary Figure 1) and 72 h (Figure 1). We observed that metformin, at 2.5 mM, 5 mM and 10 mM, was effective to reduce the cell viability of the MCF-7 cell line, displaying a similar effect on the SK-BR-3 cell line. Metformin had no effect on viability of the MDA-MB-231 lineage, irrespective of the used concentration. Aspirin, at a concentration of 10 mM, showed a significant reduction of cell viability in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. A similar profile of inhibition was observed with the SK-BR-3 cell line, but without statistical significance.

Metformin and aspirin inhibits cell viability and induces cell morphology changes

After evaluating the most effective concentration for reducing the cell viability, we aimed to identify if there was some synergism or additional effects when aspirin and metformin were combined. We tested the combinations of 2.5 mM, 5 mM 10 mM, for 24 h, 48 h (Supplementary Figure 2) and 72 h (Figure 2). MTT assay was used to assess the cell viability. Metformin (5 mM and 10 mM) displayed an inhibitory effect at 48 h in the MCF-7 cell line, whereas the concentration of 2.5 mM reduced the cell proliferation only at 72 h. When combined with aspirin, there was no significant difference, suggesting that the effect on MCF-7 cell viability is mediated by metformin and not by aspirin. An analysis of the morphology changes corroborates with this data. Conversely, aspirin (5 mM) did not alter the morphology of MCF-7 cells (Supplementary Figure 3). The viability of the SK-BR-3 cell line was reduced only by the higher concentration of aspirin (10 mM), at 72 h. However, the incubation of aspirin (5 mM), for 72h, induced changes of SK-BR-3 cell morphology (Supplementary Figure 3). Regarding the MDA-MB-231 cell line, the combination of aspirin and metformin, both at 5 mM, caused a significant reduction of cell viability, according to the assessment at 72 h, without triggering visible cell morphology alterations (Supplementary Figure 3). However, when using the combination of both drugs at 10 mM, it was possible to identify a significant difference at 72 h, pointing out a synergistic effect (Figure 2).

Metformin and aspirin inhibited colony formation

As it is known, reproductive viability in an important characteristic of metastatic and aggressive cancer cells. Thus, we sought to determine the effects of metformin and/or aspirin on the colony formation ability of breast cancer cells. As seen in the Figure 3, metformin (2.5 mM and 5 mM) and aspirin (10 mM) were effective in reducing the colony formation in both MCF-7 (A) and SK-BR-3 (B) cell lines. In the MDA-MB-231 lineage (C), the cells showed a reduced proliferation ability, when previously treated with aspirin (5 mM and 10 mM), an effect that was increased when both drugs were combined, suggesting that metformin plus aspirin especially targets triple negative breast cancer cell lines.

Metformin and aspirin do not induce cell migration in MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines

The wound healing assay was carried out to analyze the effects of metformin and/or aspirin on cell migration. As observed in the Figure 4, the treatment with metformin, aspirin, or both drugs in combination (5 mM) did not induce the migration of MCF-7 (A) and MDA-MB-231 (C) cell lines. However, the treatment with metformin (1 mM and 2.5 mM) caused a slight increase of cell migration in the SK-BR-3 cell line (B). A similar effect was observed when metformin and aspirin were combined at the same concentrations (1 mM or 2.5 mM), suggesting that proliferation of SK-BR-3 cells was stimulated only by metformin (1 mM and 2.5 mM). After evaluating the cell viability, the colony formation and the cell migration, we selected the concentration of 5 mM for further analysis. Next, we evaluated to what extent metformin and/or aspirin could reduce the cell migration, by using an alternative experimental protocol, with the maintenance of 10 % FBS supplementation. Figure 5 shows that metformin and/or aspirin were able to reduce the cell migration of the ER+ cell line MCF-7, indicating a possible modulation of estrogen receptors by metformin and/or aspirin in this cell lineage. Conversely, the combination of metformin and aspirin did not affect the migration of SK-BR-3 or MDA-MB-231 cells.

Metformin and aspirin induce COX-2 protein expression

Considering that aspirin can modulate inflammation by triggering cyclooxygenase-2 (COX-2) acetylation, we next examined whether metformin and/or aspirin could affect the expression of this enzyme in the different breast cancer cell lines. The Figure 6 shows the expression patterns of COX-2 and the internal control β -actin in MCF-7 (A), SK-BR-3 (B) and MDA-MB-231 (C) cells, treated with 5 mM of metformin or aspirin, alone or in combination for 72 h. For each treatment, the expression of COX-2 was normalized to the corresponding expression of β -actin. Metformin induced an increase of COX-2 expression in the MCF-7 cell line, and the combination of metformin plus aspirin demonstrated a synergistic effect on inducing COX-2 protein expression. In the SK-BR-3 cell line, metformin or aspirin tended to increase the COX-2 expression, but no significant difference was identified. In the triple negative cell line, MDA-MB-231, just metformin alone had a significant effect on COX-2 protein expression, suggesting that the effect on MDA-MB-231 cell line when both drugs are combined is COX-2-independent. The expression of both α -actin and

tubulin was also altered (Supplementary Figure 4), probably because metformin and aspirin induce changes of cell morphology, as described before [33].

Metformin and/or Aspirin do not induce lipoxin production in breast cancer cell lines

Lipoxin A4 and B4 are lipid mediators related with inflammation resolution that might display anti-cancer effects [34, 35]. Indeed, the mechanisms of action of aspirin rely on the production of lipoxins, via COX-2 acetylation and lipoxygenase activation [36]. Considering the COX-2 upregulation induced by metformin and aspirin, we investigated the possible modulation of lipoxins by these drugs in breast cancer cell lines. Metformin and/or aspirin did not induce lipoxin production on MCF-7, SK-BR-3 (data not shown) or MDA-MB-231 cell lines (Supplementary figure 5), suggesting that effects of either drugs in these breast cancer cell lines are lipoxin-independent.

***In silico* analysis indicate that metformin or aspirin bind to the active site of estrogen receptor alpha (ER α)**

Previous studies have shown that metformin could interact with the estrogen receptor, activating several signaling transduction pathways. In an attempt to understand the mechanisms underlying the actions of metformin and aspirin in the breast cancer cell lines, we assessed the ability of metformin and/or aspirin to bind the estrogen receptor, by employing an *in silico* analysis. The binding free energy was determined to check the ability of aspirin or aspirin to dock with ER α or ER β . This approach revealed that either drugs were capable of binding to the three different ER α crystallographic structures (Figure 7). Interestingly, both aspirin and metformin bound to the same structures, with similar energies. The Table 2 shows the binding energies of the tested drugs, in comparison to the crystallographic ligands. The binding energy values for metformin and aspirin corresponded to the half of the crystallographic ligand. This suggests that both metformin and aspirin can interact with ER α , but they likely trigger the activation of different cellular signaling pathways. Conversely, neither metformin nor aspirin displayed affinity for the ER β crystallographic structures (Table 2).

DISCUSSION

Despite the great efforts invested in cancer research during the last decades, this group of diseases still exhibit high mortality rates worldwide. Breast cancer is globally prevalent, representing almost 30 % of the estimated numbers of new cancer cases in 2017 [1]. The identification of breast cancer subtype is indispensable for treatment selection. The therapy of ER+ breast cancer usually relies on the use of selective estrogen receptor antagonists, while HER2+ breast cancer subtypes involves the administration of monoclonal antibody against this receptor. For treatment of triple negative breast cancers, a complex combination of radiotherapy and chemotherapy is often required. Nevertheless, breast cancer recurrence is frequent and efforts are necessary to identify new treatment options for this neoplasia.

New drug development requires huge investments of time and money, and in most cases, the drug candidates fail before entering the clinical trials. A reduction of success rates for Phase II trials has been observed from 2007 to 2009, corresponding to 28 % and 18 % respectively [37]. Conversely, drug repurposing has been gaining attention; the evaluation of drugs that had been previously approved for another disease is a faster and cheaper way to identify new potential antitumor strategies. The pharmacokinetics, pharmacodynamics and toxicity profiles of these drugs are usually well established, allowing an easier translation into the clinics. Moreover, drug combination therapy, which includes different targets, is a good way for reducing the drug concentration necessary for the therapeutic effect. Looking for drugs that demonstrate synergistic or additional effects can be an interesting manner for reducing the drug doses used in clinical assays [38]. Accordingly, this study aimed to identify the effects of two old approved drugs - aspirin and metformin – in three cell lineages representative of the three different breast cancer subtypes.

Several clinical studies have suggested that metformin increases the survival in diabetic patients with breast cancer [18], modulates apoptosis [39],[40], induces changes in breast cancer cells, when administrated as a neoadjuvant treatment [41], and reduces gastric cancer risk [17]. Likewise, human studies have shown that non-steroidal anti-inflammatory drugs can reduce breast cancer risk among premenopausal women [42], indicating a positive correlation between aspirin and reduction of metastasis [43]. As far we know, the effects metformin plus aspirin on breast cancer has not been fully investigated, except by a pre-clinical study that

evaluated the combination of both drugs at higher concentrations [7]. Thus, this is the first study that verifies the association of low doses of metformin and aspirin in breast cancer cells. The binding properties of metformin and aspirin to estrogen receptors were also assessed *in silico*.

The plasma concentration of metformin identified in patients usually ranges from 10 to 20 μM [44]. However, the concentrations of metformin tested in *in vitro* studies commonly varies from 2 to 100 mM [45–49]. Herein, we performed a concentration-response curve based on both the plasma concentrations and previous *in vitro* analysis. The concentrations of 2.5 mM, 5 mM and 10 mM were effective to reduce the cell viability of the ER+ MCF-7 cell line, and tended to display a similar effect on the HER2+ SK-BR-3 cell line. However, the same concentrations of metformin failed to alter the viability of the triple negative MDA-MB-231 cells. Our results extend previous evidence showing antiproliferative effects for metformin in MCF-7 cells, when tested in concentrations ranging from 2 to 15 mM in the MTT assay [50]. In another study [9], the authors demonstrated inhibitory effects for metformin on MCF-7 and SKBR-3 cell viability, but only at 10 mM and 50 mM. Alternatively, a previous publication by Zhen-Yuan Gao et al. [10] demonstrated a reduction of MDA-MB-231 cell viability after metformin incubation, at 10 mM and 20 mM, contrasting somewhat with the present results with this cell line. One might suggest testing higher concentrations of metformin in this triple negative cell line, but the rationale of the study was to select low concentrations of metformin for combination studies. Besides, we performed a concentration-response curve for evaluating the aspirin effects. Only the concentration of 10 mM was effective to reduce the cell viability of the ER+ MCF-7 and the triple negative MDA-MB-231 cell line, and tended to display a similar effect on the SK-BR-3 cell line. However, lower concentrations of aspirin failed to alter the viability of the three cell lineages. Alternatively, Maity et al. demonstrated inhibitory effects for aspirin on MCF-7 and MDA-MB-231 cell viability at 2.5 mM and 5 mM [51], and a similar effect was observed in a murine breast cancer cell line [52]. An explanation for this slight discrepancy can be the choice of the vehicle for aspirin. While we used ethanol, Maity et al. selected DMSO for aspirin dilution.

The effects of combination of metformin plus aspirin had been poorly explored, and the mechanisms underlying the interaction between the two drugs remain unclear. As mentioned before, just one study evaluated this combination in breast cancer models *in vivo* and *in vitro* (triple negative and ER+ cell lines). Talarico et al. reported

that association of metformin plus aspirin (both at 10 mM) reduced the cell viability, and significantly increased apoptosis, when compared with metformin alone [7]. The effects of metformin combined with aspirin were also tested in pancreatic cancer cells *in vitro*, demonstrating a synergistic inhibition of the cell viability. In that study, the concentrations of metformin and aspirin ranged from 1 mM to 10 mM, and 0.25 mM to 4 mM, respectively [21]. The third study that evaluated this combination, showed that a 24-h treatment with 20 mM of metformin plus 10 mM of aspirin was able to induce apoptosis and cell cycle arrest of the hepatocellular carcinoma HepG2 cell line [22].

Reproductive viability is an important characteristic for metastasis and tumor regrowth. Studying the ability of cell lines to form colonies is widely employed to assess differences in the capacity of cells to produce progeny. Both metformin (2.5 mM and 5 mM) and/or aspirin were effective to reduce colony formation in ER+ MCF-7 and HER2+ SK-BR-3 cell lines. Interestingly, in the triple negative cell line MDA-MB-231, the co-treatment was more effective. Similar results were demonstrated under metformin treatment in different breast cancer cell lines [9],[10]. Using higher concentrations of metformin (10 and 50 mM), Alimova et al. reported that this drug inhibited the colony formation in MCF-7, SK-BR-3 and BT-474 breast cancer cell lines [9]. Oppositely, lower concentrations of metformin (0.5 and 2 mM) were effective to decrease colony formation in triple negative cell lines [10]. When analyzed in the light of literature data, the present result allows suggesting that metformin plus aspirin might display an important role on reducing the metastatic profile of TNBC cells.

Cell migration is an essential mechanism by which tumor cells acquires the ability to invade and metastasize to distant organs. Based in this important characteristic, we further investigated whether the treatment with metformin and/or aspirin might induce or inhibit cell migration. Metformin plus aspirin did not induce cell migration in ER+ and triple negative cell lines, whilst metformin elicited a slight increase in HER2+ cell line migration. Interestingly, metformin and/or aspirin were effective to reduce the cell migration in the MCF-7 cell line, without significant effects on SK-BR-3 and MDA-MB-231 cell lines. Importantly, Fan et al. demonstrated that treatment with metformin (3 mM) was effective to reduce MDA-MB-231 cell migration [11]. Using a different methodology, but testing the cell migration ability as well, Maity et al. showed that aspirin was able to block the migration of MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines [51]. Beyond that, in another study, aspirin (5 mM and 10 mM) was also able to reduce the cell migration in a 4T1 mouse breast cancer cell line [52]. Therefore, the

effects of metformin and/or aspirin in cell migration are likely different, depending on the cancer cell subtype.

COX-2 is an enzyme whose gene expression is induced by different pathophysiological stimuli, such as hormones, cytokines, and growth factors. It is well known that COX-2 catalyzes the formation of prostaglandins from arachidonic acid (AA) [53]. COX-2 is overexpressed in the most types of breast cancer [54], suggesting that it possibly has an important role in breast cancer progression. The COX-2 expression was highly observed in breast epithelial cells, if compared with glandular and stromal cells [55], which is a relevant evidence, as epithelial cells are usually the origin of the most breast cancers. Controversially, Tury et al. demonstrated that COX-2 overexpression is predominant in triple-negative subtypes, and not in all breast cancer types [56]. This data corroborates with the importance of COX-2 for breast cancer biology at all.

Aspirin effects on COX-2 are not completely understood, but it has been described that aspirin possibly redirect the activity of COX-2 for producing aspirin-triggered lipoxins (ATL) by lipoxygenase-5 (5-LO) activation [57, 58]. Besides, several studies have demonstrated that aspirin can display a different role on COX-2 expression, stimulating [59, 60] or reducing its levels in different tissues [61–63]. By evaluating the effects of metformin on COX-2 expression, it was described that this drug was able to modulate COX-2 expression in renal tubular epithelial cells in rats [64]. Herein, we assessed the effects of metformin and/or aspirin on COX-2 expression in the three breast cancer cell lines, aiming to correlate these changes with the functional data. We showed that metformin (5 mM) led to increased COX-2 protein expression in the ER+ MCF-7 cell line, whereas aspirin plus metformin displayed a synergistic effect. There are no similar results in the literature, but Tong et al. demonstrated that metformin can inhibit the epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer in a COX-2 dependent manner [65]. Similarly, Liu et al. showed that metformin is able to reduce bladder cancer progression by inhibiting the COX-2/PGE2/STAT signaling axis [66]. Instead, our data demonstrated that in the MDA-MB-231 cell line, just metformin had a significant effect on COX-2 protein expression. Corroborating with this data, Maity et al. described that aspirin was not able to regulate COX-2 expression in MDA-MB-231 TNBC cell line [51]. Either drugs, aspirin or metformin, failed to significantly alter the COX-2 expression in the HER2+ positive cell line SK-BR-3. The increased COX-2 expression induced by metformin

plus aspirin in the MCF-7 cell line might be correlated with the visible changes in cell morphology caused by the drug combination, an idea that is supported by reduction in β -actin and tubulin protein expression.

Lipoxins are a group of anti-inflammatory lipid mediators, mainly represented by Lipoxin A₄ and Lipoxin B₄. Studies suggested that lipoxins can inhibit tumor growth by different pathways [34, 35],[67],[68]. Because aspirin can affect COX-2 and induce aspirin-triggered lipoxins (ATL) via lipoxygenase-5 (5-LO) activation, and the effects of metformin on COX-2 signaling is currently unclear, we hypothesized that lipoxin production could be an explanation for the metformin and aspirin effects in breast cancer cell lines. Nevertheless, lipoxin production was not identified in any of the tested lineages under aspirin and/or metformin treatment, suggesting that anti-tumoral effects observed in our study are not mediated by lipoxin production. More studies are necessary to unravel the mechanism by which aspirin and metformin induce breast cancer cell alterations, being the analysis of different lipid mediators a possible way to head this future research.

Taking in account the effects of aspirin and metformin on the MCF-7 cell line, we aimed to predict the drug target of aspirin and metformin against ER+ breast cancer, by using molecular docking. This is the first study investigating the possible interaction of aspirin or metformin with ER α or ER β by an *in silico* approach. Several efforts have been made to identify agonist and/or antagonist activity in different estrogen receptors. Using the same docking program and algorithm adopted by us, Vethakanraj et al. showed that anticancer effects of ceranib-2, in different breast cancer cell lines, is possibly related to an interaction of this molecule to the ER α , being the binding energy calculated as -11.10 kcal/mol [69]. Another study showed that dioscin could induce prostate cancer cell apoptosis, indicating that this effect is mediated by the interaction with ER β , with a binding energy of -7.89 kcal/mol [70]. Differently, our data demonstrated a binding energy about -4 kcal/mol, for either aspirin or metformin to ER α . This difference in the affinity might indicate the activation of distinct cellular pathways, or even an allosteric modulation of the receptor, without a direct agonist or antagonist effect. Corroborating our suggestion, Kim et al. demonstrated that even some ER agonists displaying an expressive binding energy (-8.19 kcal/mol), can trigger antiproliferative effects via ER-independent mechanisms [71]. Interestingly, both metformin and aspirin displayed affinity for the same estrogen receptor structures, with similar binding energies. It is tempting to suggest that

synergistic effects of metformin plus aspirin on COX-2 upregulation on MCF-7 cell line is related to ER α modulation.

Overall, our study demonstrated that metformin and/or aspirin display anticancer effects, according to assessment of breast cancer cells of different subtypes. We observed that metformin is able to induce cell morphology changes, to reduce cell viability and migration, and to increase COX-2 protein expression in ER+ MCF-7 cell lines. These effects are probably related to ER α modulation. Oppositely, the combination of aspirin plus metformin was more effective to reduce the viability and clonogenic capacity of the MDA-MB-231 TNBC cell line. It is possible to infer that HER2+ expression circumvent the aspirin and/or metformin actions, as indicated by the discrete effects of both drugs in the SK-BR-3 cell line. As far we know, this is the first study evaluating the interaction between metformin and aspirin at low doses in breast cancer cells. More studies are necessary to pave the way on the anticancer mechanisms of metformin plus aspirin, trying to identify the cell signaling pathways.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Eduardo Filippi-Chiela for providing the MCF-7 cell line, Dr. Mônica Ryff Moreira Roca Vianna for sharing the laboratory facilities for western blotting analysis. We would like to thank the grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) to W.F.A (CNPq, Brazil) (Process Numbers: 308883/2014-4).

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors has any conflict of interest to disclose regarding the publication of the present manuscript.

FUNDING

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil. MEAA is a master's degree student in Cellular and Molecular Biology supported by the CAPES/PROEX Program. M.M.C. is a researcher career awardee of CNPq (303842-2014-8).

REFERENCES

1. American Cancer Society (2017) Cancer Facts & Figures 2017. Am Cancer Soc Inc
2. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V (2010) Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 10:955–960 . doi: 10.4161/cbt.10.10.13879
3. Reis-Filho JS, Pusztai L (2011) Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 378:1812–1823 . doi: 10.1016/S0140-6736(11)61539-0
4. American Cancer Society (2016) Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016. Am Cancer Soc Inc
5. Orecchioni S, Reggiani F, Talarico G, et al (2015) The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Int J Cancer* 136:E534–E544 . doi: 10.1002/ijc.29193
6. Wang J, Li G, Wang Y, et al (2014) Suppression of tumor angiogenesis by metformin treatment via a mechanism linked to targeting of HER2/HIF-1 α /VEGF secretion axis. *Oncotarget* 6:1–14 . doi: 10.18632/oncotarget.6373
7. Talarico G, Orecchioni S, Dallaglio K, et al (2016) Aspirin and atenolol enhance metformin activity against breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells. *Sci Rep* 6:18673 . doi: 10.1038/srep18673
8. Jacob L, Kostev K, Rathmann W, Kalder M (2016) Impact of metformin on metastases in patients with breast cancer and type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 30:1056–1059 . doi: 10.1016/j.jdiacomp.2016.04.003
9. Alimova IN, Liu B, Fan Z, et al (2009) Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro. *Cell Cycle* 8:909–915 . doi: 10.4161/cc.8.6.7933
10. Gao Z-Y, Liu Z, Bi M-H, et al (2016) Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro. *Exp Ther Med* 11:1700–1706 . doi: 10.3892/etm.2016.3143
11. Fan C, Wang Y, Liu Z, et al (2015) Metformin exerts anticancer effects through the inhibition of the Sonic hedgehog signaling pathway in breast cancer. *Int J Mol Med* 204–214 . doi: 10.3892/ijmm.2015.2217
12. Chen M, Zhang J, Hu F, et al (2015) Metformin affects the features of a human

- hepatocellular cell line (HepG2) by regulating macrophage polarization in a co-culture microenvironment. *Diabetes Metab Res Rev* 31:781–789 . doi: 10.1002/dmrr.2761
13. Jung YR, Kim EJ, Choi HJ, et al (2015) Aspirin Targets SIRT1 and AMPK to Induce Senescence of Colorectal Carcinoma Cells. *Mol Pharmacol* 88:708–719 . doi: 10.1124/mol.115.098616
 14. Vaughan LE, Prizment A, Blair CK, et al (2016) Aspirin use and the incidence of breast, colon, ovarian, and pancreatic cancers in elderly women in the Iowa Women's Health Study. *Cancer Causes Control* 27:1395–1402 . doi: 10.1007/s10552-016-0804-8
 15. Zhang D, Bai B, Xi Y, et al (2016) Is aspirin use associated with a decreased risk of ovarian cancer? A systematic review and meta-analysis of observational studies with dose-response analysis. *Gynecol Oncol* 142:368–377 . doi: 10.1016/j.ygyno.2016.04.543
 16. van Staalduinen J, Frouws M, Reimers M, et al (2016) The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use after diagnosis on survival of oesophageal cancer patients. *Br J Cancer* 114:1053–1059 . doi: 10.1038/bjc.2016.65
 17. Tseng C-H (2016) Metformin reduces gastric cancer risk in patients with type 2 diabetes mellitus. *Aging (Albany NY)* 8:1636–1649 . doi: 10.18632/aging.101019
 18. Kim HJ, Kwon H, Lee JW, et al (2015) Metformin increases survival in hormone receptor-positive, HER2-positive breast cancer patients with diabetes. *Breast Cancer Res* 17:64 . doi: 10.1186/s13058-015-0574-3
 19. Tewari D, Majumdar D, Vallabhaneni S, Bera AK (2017) Aspirin induces cell death by directly modulating mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC). *Sci Rep* 7:45184 . doi: 10.1038/srep45184
 20. Cheng R, Liu Y, Cui J, et al (2017) Aspirin regulation of c-myc and cyclinD1 proteins to overcome tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells. *8:30252–30264*
 21. Yue W, Zheng X, Lin Y, et al (2015) Metformin combined with aspirin significantly inhibit pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* by suppressing anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2. *Oncotarget* 6:21208–21224 . doi: 10.18632/oncotarget.4126
 22. Abdelmonsif DA, Sultan AS, El-Hadidy WF, Abdallah DM (2017) Targeting

- AMPK, mTOR and β -Catenin by Combined Metformin and Aspirin Therapy in HCC: An Appraisal in Egyptian HCC Patients. *Mol Diagn Ther*. doi: 10.1007/s40291-017-0307-7
23. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
 24. Liang C-C, Park AY, Guan J-L (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2:329–333 . doi: 10.1038/nprot.2007.30
 25. With P, Stereochemistry R (2017) THE CRYSTAL STRUCTURE OF ASPIRIN ACETYLATED HUMAN CYCLOOXYGENASE-2: INSIGHT INTO THE FORMATION OF PRODUCTS WITH REVERSED STEREOCHEMISTRY. 55:1226–1238 . doi: 10.1021/acs.biochem.5b01378.THE
 26. Lecomte M, Laneuville O, Ji C, et al (1994) Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem* 269:13207–13215
 27. Gobbetti T, Ducheix S, Le Faouder P, et al (2015) Protective effects of n-6 fatty acids-enriched diet on intestinal ischaemia/reperfusion injury involve lipoxin a4 and its receptor. *Br J Pharmacol* 172:910–923 . doi: 10.1111/bph.12957
 28. Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al (2000) The protein data bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242 . doi: 10.1093/nar/28.1.235
 29. Thomsen R, Christensen MH (2006) MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *J Med Chem* 49:3315–3321 . doi: 10.1021/jm051197e
 30. Trott O, Olson AJ (2009) AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:NA-NA . doi: 10.1002/jcc.21334
 31. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30:2785–2791 . doi: 10.1002/jcc.21256
 32. Xavier MM, Pintro VO, Levin B, et al (2016) SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions SAnDReS a Computational Tool for Statistical Analysis of Docking Results and Development of Scoring Functions. doi: 10.2174/1386207319666160

33. Falah RR, Talib WH, Shbailat SJ (2017) Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis. *Ther Adv Med Oncol* 9:235–252 . doi: 10.1177/1758834016687482
34. Wang Z, Cheng Q, Tang K, et al (2015) Lipid mediator lipoxin A4 inhibits tumor growth by targeting IL-10-producing regulatory B (Breg) cells. *Cancer Lett* 364:118–124 . doi: 10.1016/j.canlet.2015.04.030
35. Zong L, Li J, Chen X, et al (2016) Lipoxin A4 Attenuates Cell Invasion by Inhibiting ROS/ERK/MMP Pathway in Pancreatic Cancer. *Oxid Med Cell Longev* 2016: . doi: 10.1155/2016/6815727
36. Pamplona FA, Menezes-de-Lima O, Takahashi RN (2010) Aspirin-triggered lipoxin induces CB1-dependent catalepsy in mice. *Neurosci Lett* 470:33–37 . doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.050
37. Gupta SC, Sung B, Prasad S, et al (2013) Cancer drug discovery by repurposing: Teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol Sci* 34:508–517 . doi: 10.1016/j.tips.2013.06.005
38. Sun W, Sanderson P, Zheng W (2016) Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discov Today* 0:1–7 . doi: 10.1016/j.drudis.2016.05.015
39. Niraula S, Dowling RJO, Ennis M, et al (2012) Metformin in early breast cancer: A prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res Treat* 135:821–830 . doi: 10.1007/s10549-012-2223-1
40. Kalinsky K, Zheng T, Hibshoosh H, et al (2017) Proteomic modulation in breast tumors after metformin exposure: results from a “window of opportunity” trial. *Clin Transl Oncol* 19:180–188 . doi: 10.1007/s12094-016-1521-1
41. Dowling RJO, Niraula S, Chang MC, et al (2015) Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. *Breast Cancer Res* 17:540 . doi: 10.1186/s13058-015-0540-0
42. Kim S, Shore DL, Wilson LE, et al (2015) Lifetime use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk : results from a prospective study of women with a sister with breast cancer. *BMC Cancer* 1–10 . doi: 10.1186/s12885-015-1979-1
43. Elwood PC, Morgan G, Pickering JE, et al (2016) Aspirin in the Treatment of

- Cancer: Reductions in Metastatic Spread and in Mortality: A Systematic Review and Meta-Analyses of Published Studies. *PLoS One* 11:e0152402 . doi: 10.1371/journal.pone.0152402
44. Bailey CJ, Path MRC, C.Turner R (1996) Metformin. *N Engl J Med* 334:574–579 . doi: 10.1080/1361767990200210
 45. Chen X, Hu C, Zhang W, et al (2015) Metformin inhibits the proliferation, metastasis, and cancer stem-like sphere formation in osteosarcoma MG63 cells in vitro. *Tumor Biol* 36:9873–9883 . doi: 10.1007/s13277-015-3751-1
 46. Chen G, Feng W, Zhang S, et al (2015) Metformin inhibits gastric cancer via the inhibition of HIF1 α /PKM2 signaling. *Am J Cancer Res* 5:1423–1434
 47. Cai X, Hu X, Tan X, et al (2015) Metformin induced AMPK activation, G0/G1 phase cell cycle arrest and the inhibition of growth of Esophageal squamous cell carcinomas in vitro and in vivo. *PLoS One* 10:1–14 . doi: 10.1371/journal.pone.0133349
 48. Ling S, Tian Y, Zhang H, et al (2014) Metformin reverses multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma Bel-7402/5-fluorouracil cells. *Mol Med Rep* 10:2891–2897 . doi: 10.3892/mmr.2014.2614
 49. Obara A, Fujita Y, Abudukadier A, et al (2015) DEPTOR-related mTOR suppression is involved in metformin's anti-cancer action in human liver cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 460:1047–1052 . doi: 10.1016/j.bbrc.2015.03.148
 50. Scherbakov AM, Sorokin D V., Tatarskiy V V., et al (2016) The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: The interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling. *IUBMB Life* 68:281–292 . doi: 10.1002/iub.1481
 51. Maity G, De A, Das A, et al (2015) Aspirin blocks growth of breast tumor cells and tumor-initiating cells and induces reprogramming factors of mesenchymal to epithelial transition. *Lab Invest* 95:702–17 . doi: 10.1038/labinvest.2015.49
 52. Hsieh CC, Huang YS (2016) Aspirin breaks the crosstalk between 3T3-L1 adipocytes and 4T1 breast cancer cells by regulating cytokine production. *PLoS One* 11:1–17 . doi: 10.1371/journal.pone.0147161
 53. Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH, et al (1999) Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Biochem Cell Biol* 31:551–557 . doi: 10.1016/S1357-2725(98)00152-6

54. McCarthy K, Bustin SA, Ogunkolade B, et al (2006) Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) mRNA expression and hormone receptor status in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 32:707–709 . doi: 10.1016/j.ejso.2006.02.024
55. Chew GL, Huo CW, Huang D, et al (2015) Increased COX-2 expression in epithelial and stromal cells of high mammographic density tissues and in a xenograft model of mammographic density. *Breast Cancer Res Treat* 153:89–99 . doi: 10.1007/s10549-015-3520-2
56. Tury S, Becette V, Assayag F, et al (2016) Combination of COX-2 expression and PIK3CA mutation as prognostic and predictive markers for celecoxib treatment in breast cancer. *Oncotarget* 7:85124–85141 . doi: 10.18632/oncotarget.13200
57. Romano M (2010) Lipoxin and Aspirin-Triggered Lipoxins. *Sci World J* 10:1048–1064 . doi: 10.1100/tsw.2010.113
58. Clària J, Serhan CN (1995) Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9475–9479 . doi: 10.1073/pnas.92.21.9475
59. Davies NM, Sharkey KA, Asfaha S, et al (1997) Aspirin causes rapid up-regulation of cyclo-oxygenase-2 expression in the stomach of rats
60. Gostomska K, Alicja P, Piotr O (2017) Protective effects of levamisole , acetylsalicylic acid , and α - tocopherol against dioxin toxicity measured as the expression of AhR and COX - 2 in a chicken embryo model. 523–536 . doi: 10.1007/s00418-016-1528-2
61. Duan Y, Chen F, Zhang A, et al (2014) Aspirin inhibits lipopolysaccharide-induced COX-2 expression and PGE2 production in porcine alveolar macrophages by modulating protein kinase C and protein tyrosine phosphatase activity. *BMB Rep* 47:45–50 . doi: 10.5483/BMBRep.2014.47.1.089
62. Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM, et al (1999) Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:5292–5297 . doi: 10.1073/pnas.96.9.5292
63. Shtivelband MI, Juneja HS, Lee S, Wu KK (2003) Aspirin and salicylate inhibit colon cancer medium- and vegf-induced endothelial tube formation: Correlation with suppression of cyclooxygenase-2 expression. *J Thromb Haemost* 1:2225–2233 . doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00446.x
64. Wang, Z.S., Liu, X. H., Wang, M., Jiang G.J., Qiu, T., Chen Z.Y., Wang L (2015)

- Metformin attenuated the inflammation after renal ischemia / reperfusion and suppressed apoptosis of renal tubular epithelial cell in rats 1. *Acta Cir Bras* 30:617–623 . doi: 10.1590/S0102-865020150090000006
65. Tong D, Liu Q, Liu G, et al (2017) Metformin inhibits castration-induced EMT in prostate cancer by repressing COX2/PGE2/STAT3 axis. *Cancer Lett* 389:23–32 . doi: 10.1016/j.canlet.2016.12.031
 66. Liu Q, Yuan W, Tong D, et al (2016) Metformin represses bladder cancer progression by inhibiting stem cell repopulation via COX2 / PGE2 / STAT3 axis. *Oncotarget* 7:
 67. Das UN (2012) Radiation resistance, invasiveness and metastasis are inflammatory events that could be suppressed by lipoxin A 4. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* 86:3–11 . doi: 10.1016/j.plefa.2011.09.008
 68. Marginean A, Sharma-Walia N (2015) Lipoxins exert antiangiogenic and anti-inflammatory effects on Kaposi's sarcoma cells. *Transl Res* 166:111–133 . doi: 10.1016/j.trsl.2015.02.009
 69. Vethakanraj HS, Sesurajan BP, Padmanaban VP, et al (2017) Anticancer effect of acid ceramidase inhibitor ceranib-2 in human breast cancer cell lines MCF-7, MDA MB-231 by the activation of SAPK/JNK, p38 MAPK apoptotic pathways, inhibition of the Akt pathway, downregulation of ER α . *Anticancer Drugs* 1 . doi: 10.1097/CAD.0000000000000566
 70. Tao X, Xu L, Yin L, et al (2017) Dioscin induces prostate cancer cell apoptosis through activation of estrogen receptor- β . *Cell Death Dis* 8:e2989 . doi: 10.1038/cddis.2017.391
 71. Kim T, Kim HI, An JY, et al (2016) Identification of novel estrogen receptor (ER) agonists that have additional and complementary anti-cancer activities via ER-independent mechanism. *Bioorganic Med Chem Lett* 26:1844–1848 . doi: 10.1016/j.bmcl.2016.01.089

TABLES

Table 1: PDB access codes used

PDB CODES	
ER α	ER β
1ZKY	1NDE
2AYR	1QKN
2B1V	1X7J
2FA	2FSZ
2POG	2I0G
2Q70	2JJ3
2QA8	2QTU
2QE4	2Z4B
2QXS	4J26
2R6W	1NDE
2R6Y	1QKN
3ERD	1X7J
3ERT	2FSZ
3L03	
3UUD	
466P	

Table 2: data obtained from *in silico* analysis

ER α			ER β		
System	Ligand	Free Energy (Kcal/mol)	System	Ligand	Free Energy (Kcal/mol)
ER α (1ZKY)	689	- 9.1	ER β (1NDE)	MON	- 13.17
ER α (2AYR)	L4G	- 14.1	ER β (1QKN)	RAL	- 12.07
ER α (2B1V)	458	- 8.68	ER β (1X7J)	GEN	- 8.98
ER α (2FAI)	459	- 8.97	ER β (2FSZ)	OHT	- 8.51
ER α (2POG)	WST	- 9.78	ER β (2I0G)	I0G	- 9.94

ER α (2Q70)	DC8	- 9.03	ER β (2JJ3)	JJ3	- 10.64
ER α (2QA8)	GEN	- 9.34	ER β (2QTU)	3AS	- 10.4
ER α (2QE4)	JJ3	- 9.71	ER β (2Z4B)	DC8	- 9.63
ER α (2QXS)	RAL	- 14.22	ER β (4J26)	EST	- 10.91
ER α (2R6W)	LLB	- 12.69			
ER α (2R6Y)	LLC	- 12.95			
ER α (3ERD)	DES	- 9,34			
ER α (3ERT)	OHT	- 11.71			
ER α (3L03)	4OH	- 10			
ER α (3UUD)	EST	- 10.59			
ER α (4PP6)	STL	- 8.43			
ER α (2B1V)	Aspirin	- 4.13			
ER α (2FAI)	Aspirin	- 4.46			
ER α (3ERD)	Aspirin	- 4.9			
ER α (2B1V)	Metformin	- 4.93			
ER α (2FAI)	Metformin	- 4.62			
ER α (3ERD)	Metformin	- 4.46			

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 Metformin or aspirin induces cell viability reduction. MCF-7 (a), SK-BR-3 (b) and MDA-MB-231 (c) cells were treated with metformin or aspirin at different concentrations for 72 h. The cell viability was evaluated by using the MTT assay. Data represent the means \pm SEM of four independent experiments, performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0004$, *** $p < 0.0001$, compared to the control. C, control; EtOH, ethanol

Fig. 2 Metformin combined with aspirin reduces cell viability. MCF-7 (a), SK-BR-3 (b) and MDA-MB-231 (c) cells were treated with metformin and/or aspirin at different concentrations for 72 h. The cell viability was evaluated by using the MTT assay. Data represent the means \pm SEM, of three independent experiments, performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.0068$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$ compared to the control. ## $p = 0.0025$, ### $p < 0.0001$ compared to Metformin. & $p < 0.04$, && $p < 0.0001$ compared to Aspirin. C, control; EtOH, ethanol. MET, metformin; ASP, aspirin

Fig. 3 Metformin and/or aspirin reduce colony formation. MCF-7 (a), SK-BR-3 (b) and MDA-MB-231 (c) cells were treated with metformin and/or aspirin at different concentrations for 72 h. Then, the cells were replated and fourteen days after they were fixed and stained with crystal violet. The number of colonies was measured by counting the colonies in each well. Data represent the means \pm SEM, of three independent experiments performed in duplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.009$, *** $p < 0.0006$, compared to the control. # $p < 0.05$ compared to Metformin. C, control; EtOH, ethanol. MET, metformin; ASP, aspirin

Fig. 4 Metformin and/or aspirin do not induce cell migration. MCF-7 (a), SK-BR-3 (b) and MDA-MB-231 (b) cells were treated with metformin and/or aspirin at different concentrations, and photos were taken at 0 h, 2 h, 4 h, 8 h, 12 h and 24 h. Five independent measures were performed to calculate the percentage of cell migration, by determining the length (mm) between the limits. Data represent means \pm SEM, of three independent experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ compared to the control. & $p = 0.0165$, && $p = 0.0019$ compared to Aspirin. C, control; EtOH, ethanol. MET, metformin; ASP, aspirin

Fig. 5 Metformin and/or aspirin reduced the migration of ER+ breast cancer cells. MCF-7 (a), SK-BR-3 (b) and MDA-MB-231 (c) cells, cultured in 10 % FBS-supplemented medium, were treated with metformin and/or aspirin at 5 mM; cells were fixed in 0 h, 12 h and 24 h. Qualitative analysis did not reveal any difference for SK-BR-3 and MDA-MB-231 cell lines. However, in MCF-7 cells, it is possible to identify that metformin or aspirin could reduce the cell migration. Besides, the co-administration of metformin and aspirin demonstrates a higher effect on reducing cell

migration. Two independent experiments were performed in triplicate. C, control; EtOH, ethanol. MET, metformin; ASP, aspirin

Fig. 6 Metformin and/or aspirin increase COX-2 protein expression. MCF-7 (a), SK-BR-3 (b) and MDA-MB-231 (c) cells were treated with metformin and/or aspirin at 5 mM and protein expression was evaluated 72 h after. Data represent means \pm SEM, of three independent experiments. $**p < 0.005$, $****p < 0.0001$ compared to the control. $***p = 0.0003$ compared to Aspirin. $##p = 0.0021$ compared to Metformin C, control; EtOH, ethanol. MET, metformin; ASP, aspirin

Fig. 7 Metformin or aspirin bind to the active site of Estrogen Receptor Alpha (ER α). *In silico* analysis showed that aspirin (a) or metformin (b) have affinity by the active site of different crystallographic structures of ER α (2FAI 3ERD, 2B1V). The main amino acid residues that bind to the drugs are indicated. Phe = phenylalanine; Leu = leucine; Met = methionine; Thr = threonine; Gly = Glycine; Ile = isoleucine; His = histidine; Ala = alanine; Glu = glutamic acid (glutamate); Arg = arginine.

Figure 1:

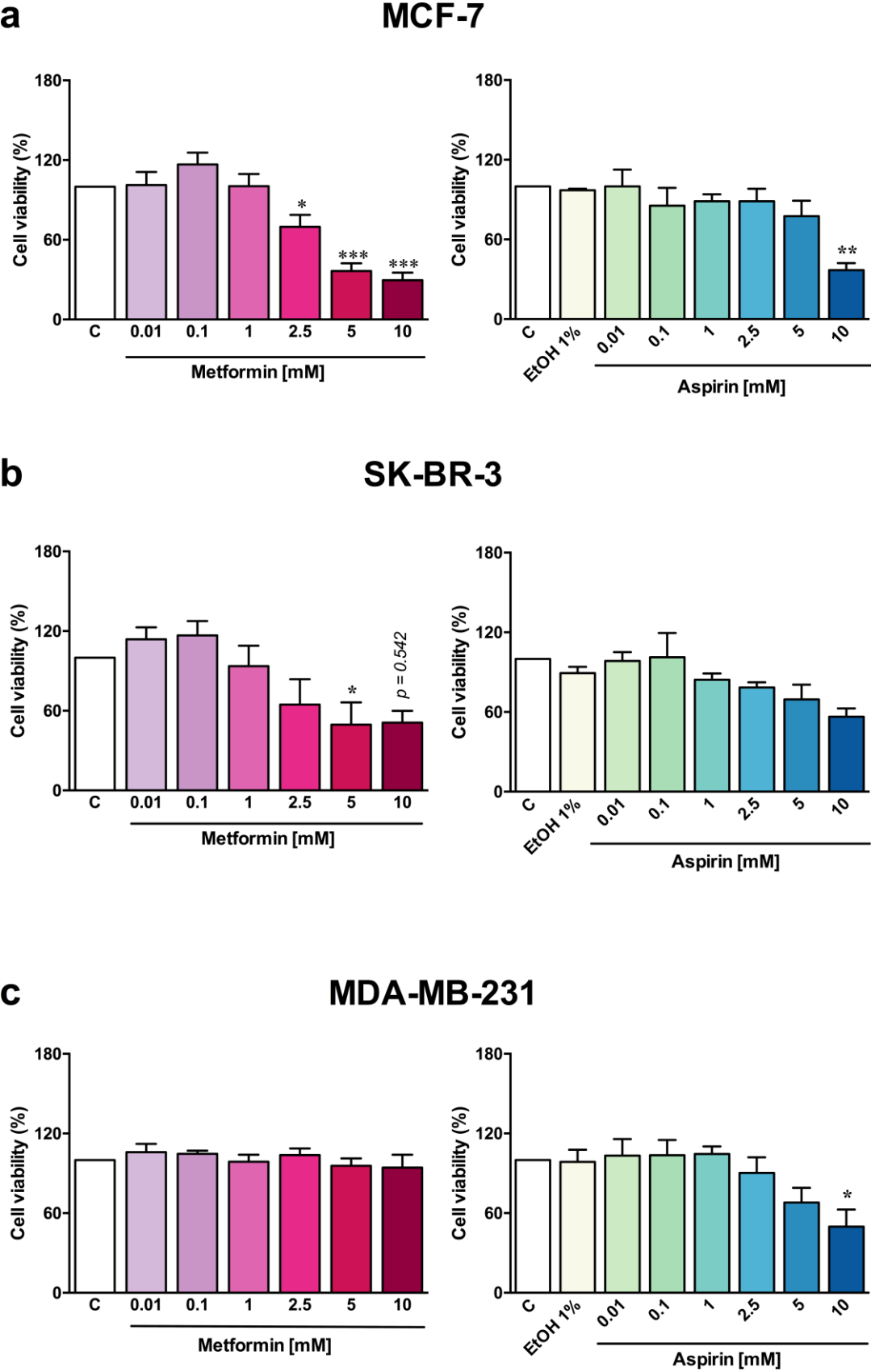
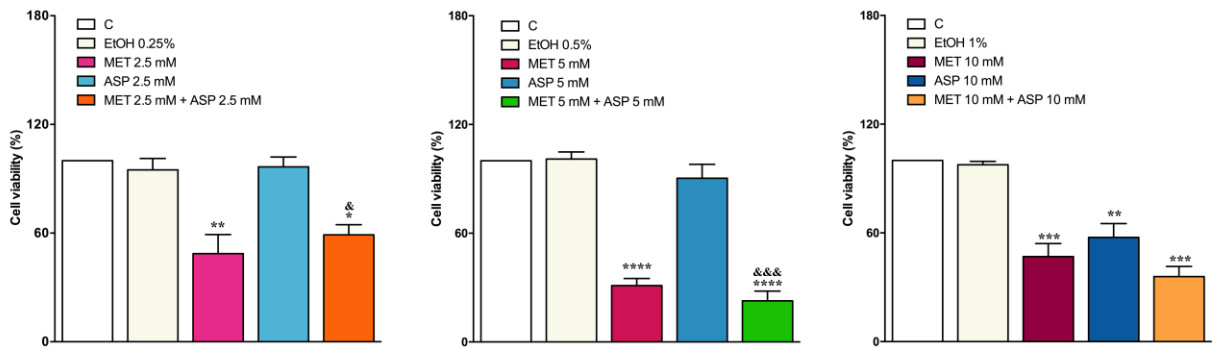


Figure 2:

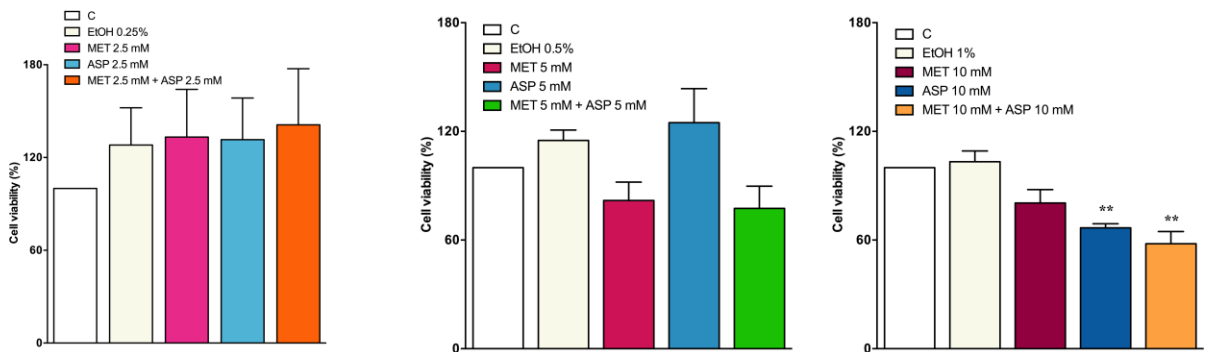
a

MCF-7



b

SK-BR-3



c

MDA-MB-231

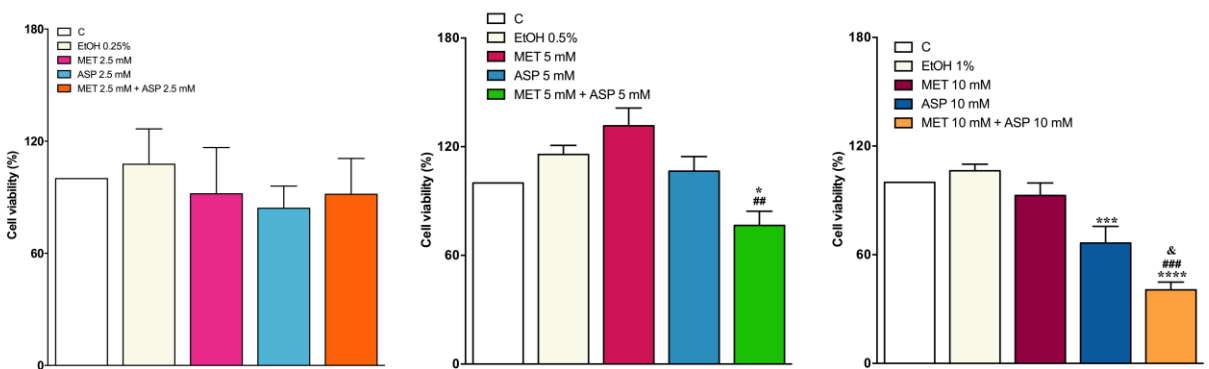


Figure 3:

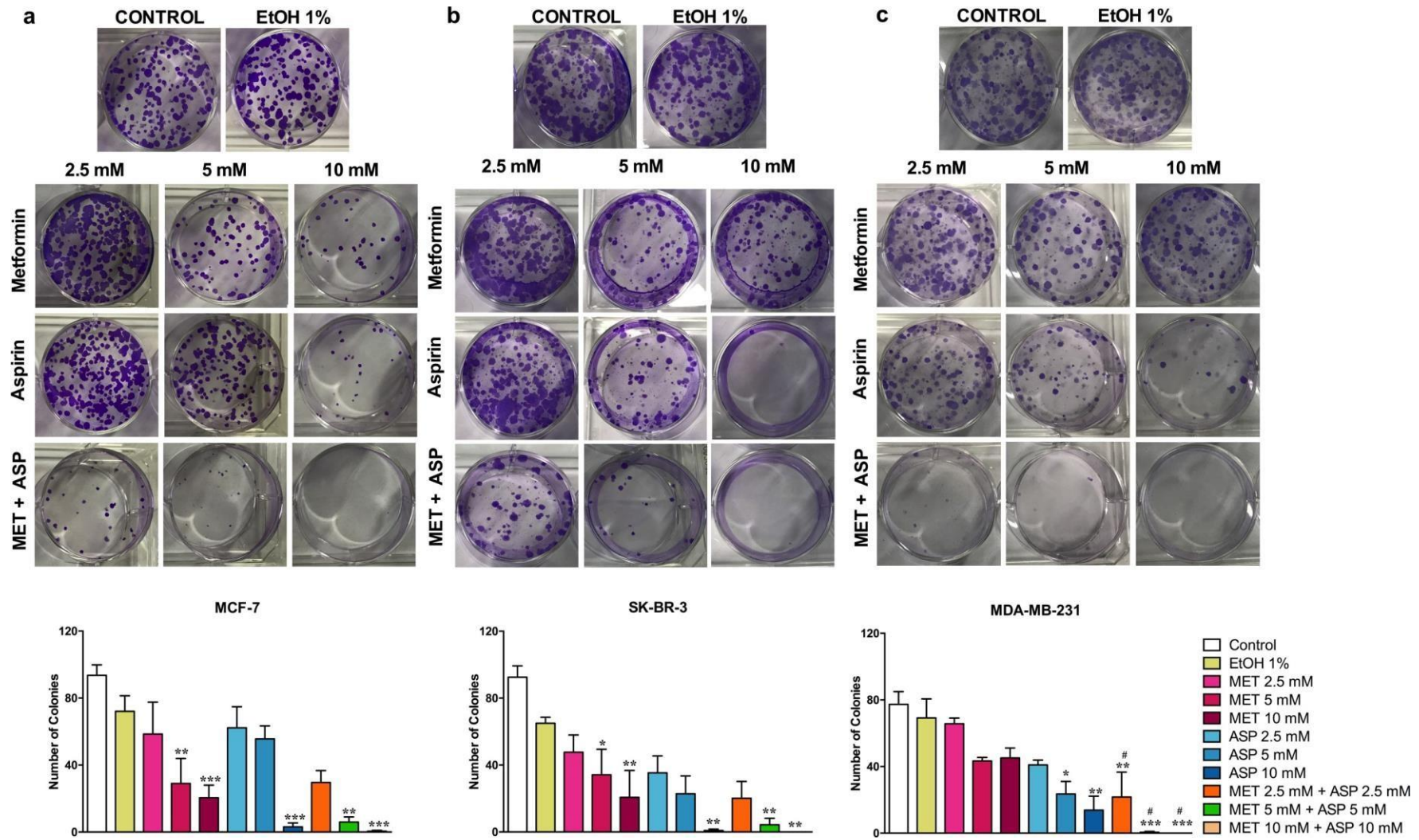


Figure 4:

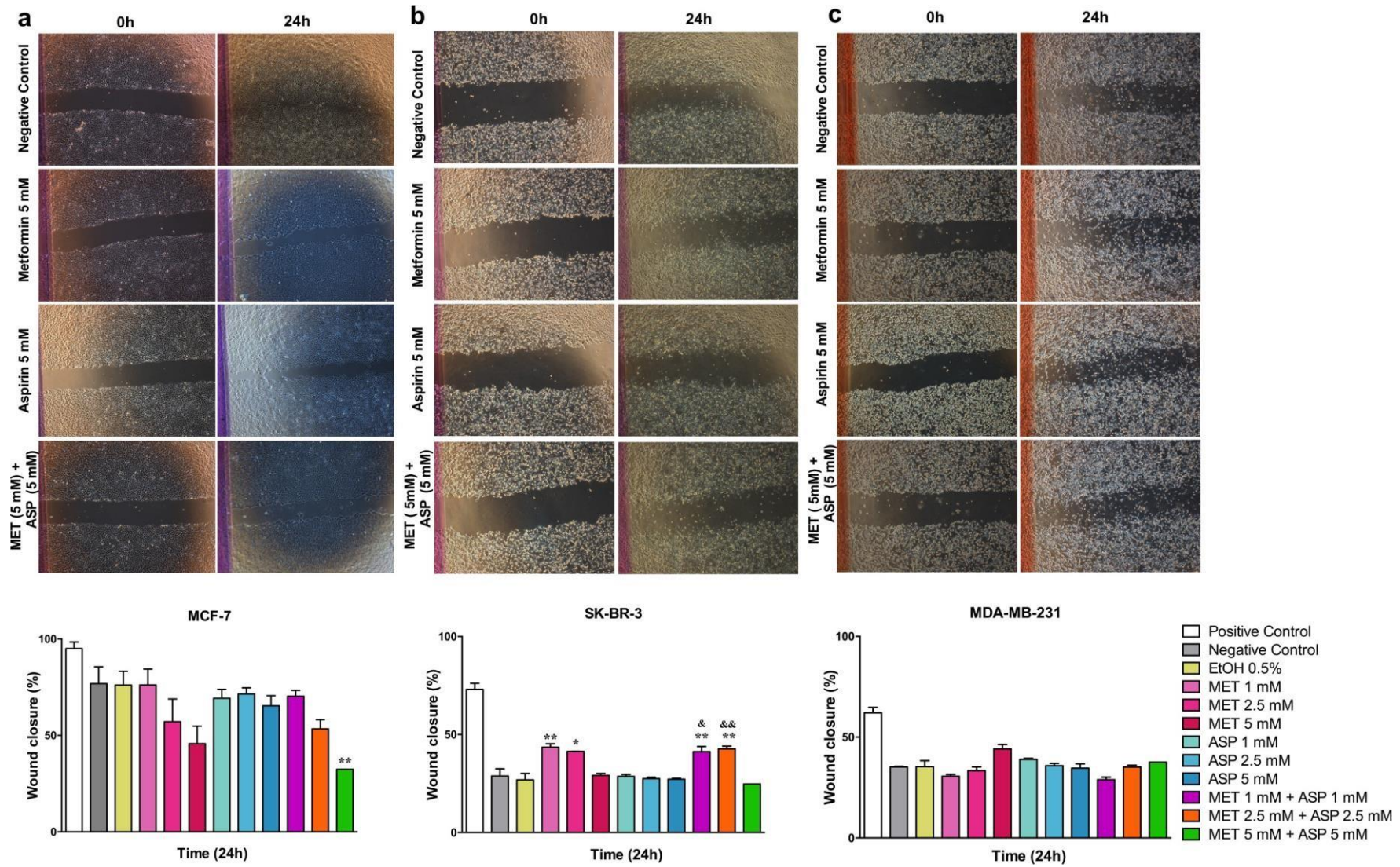


Figure 5:

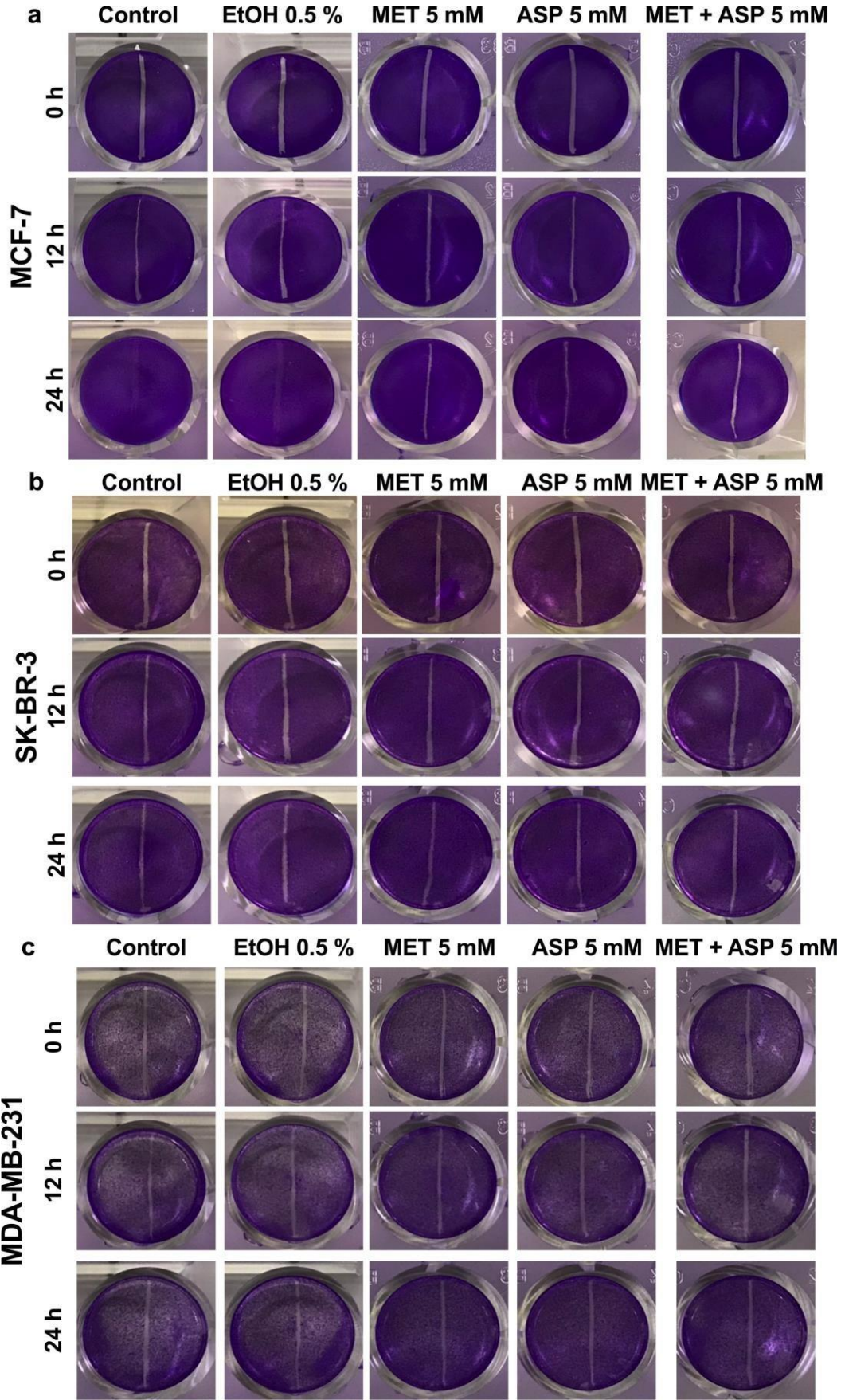


Figure 6:

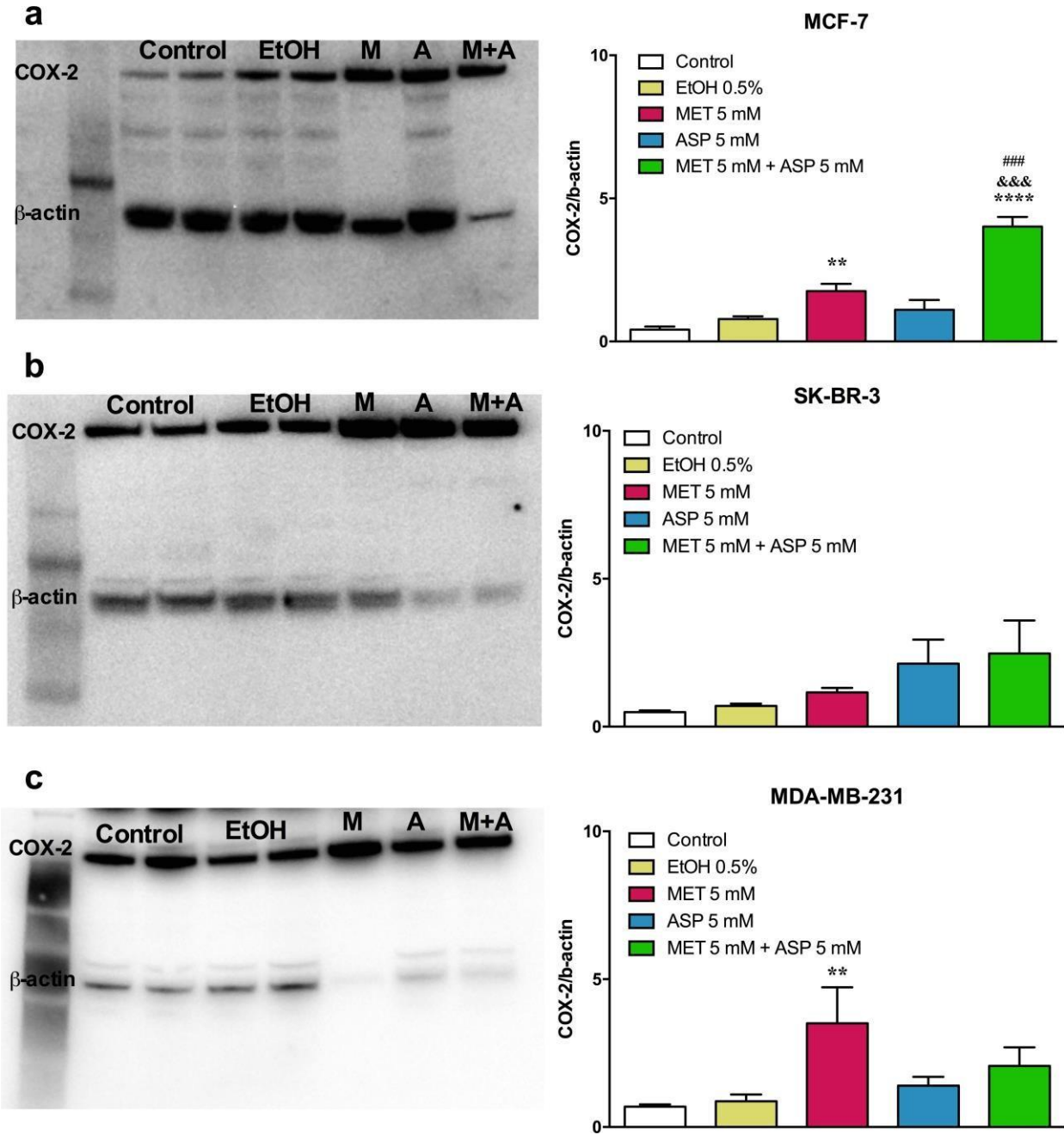
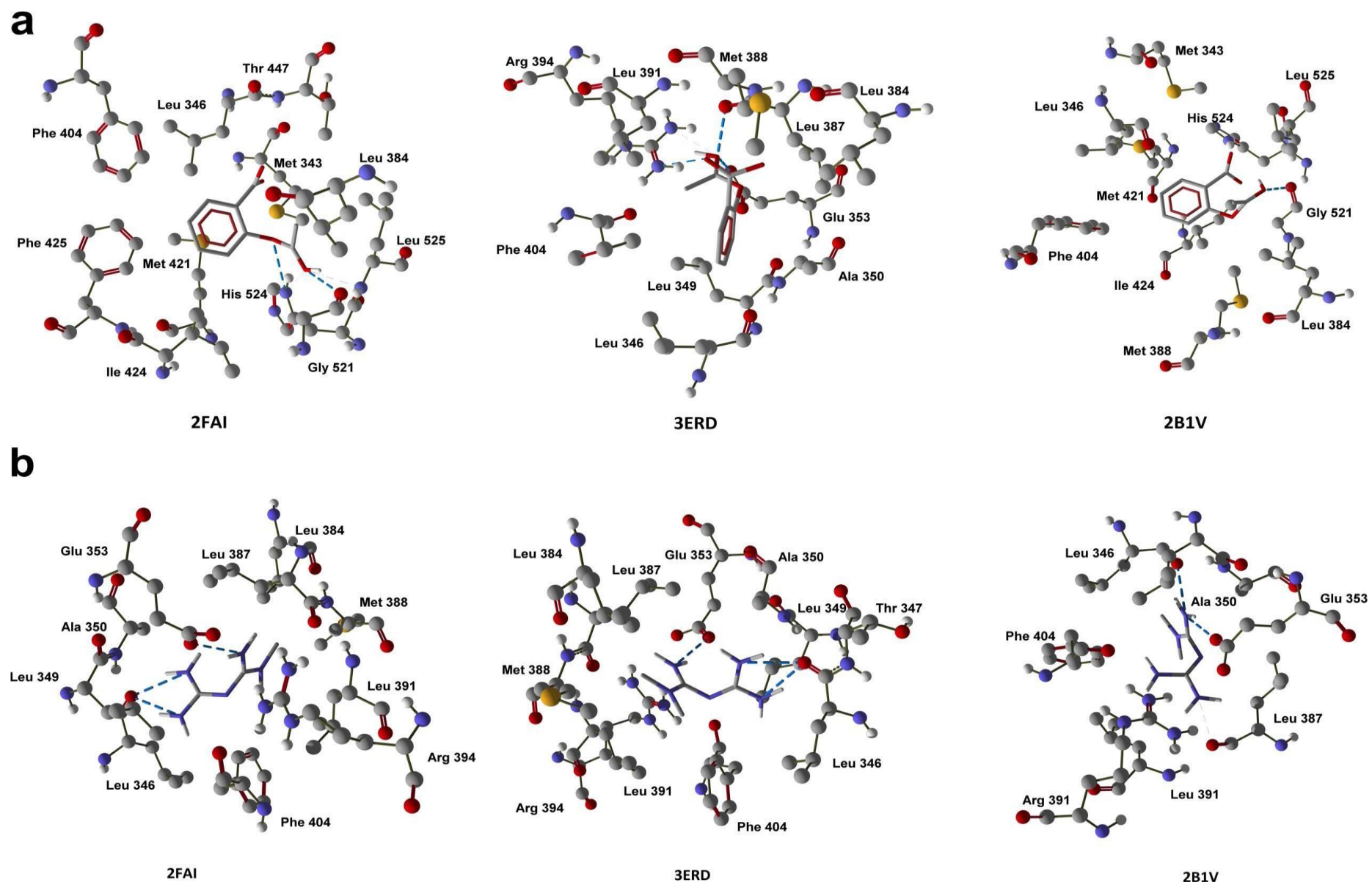
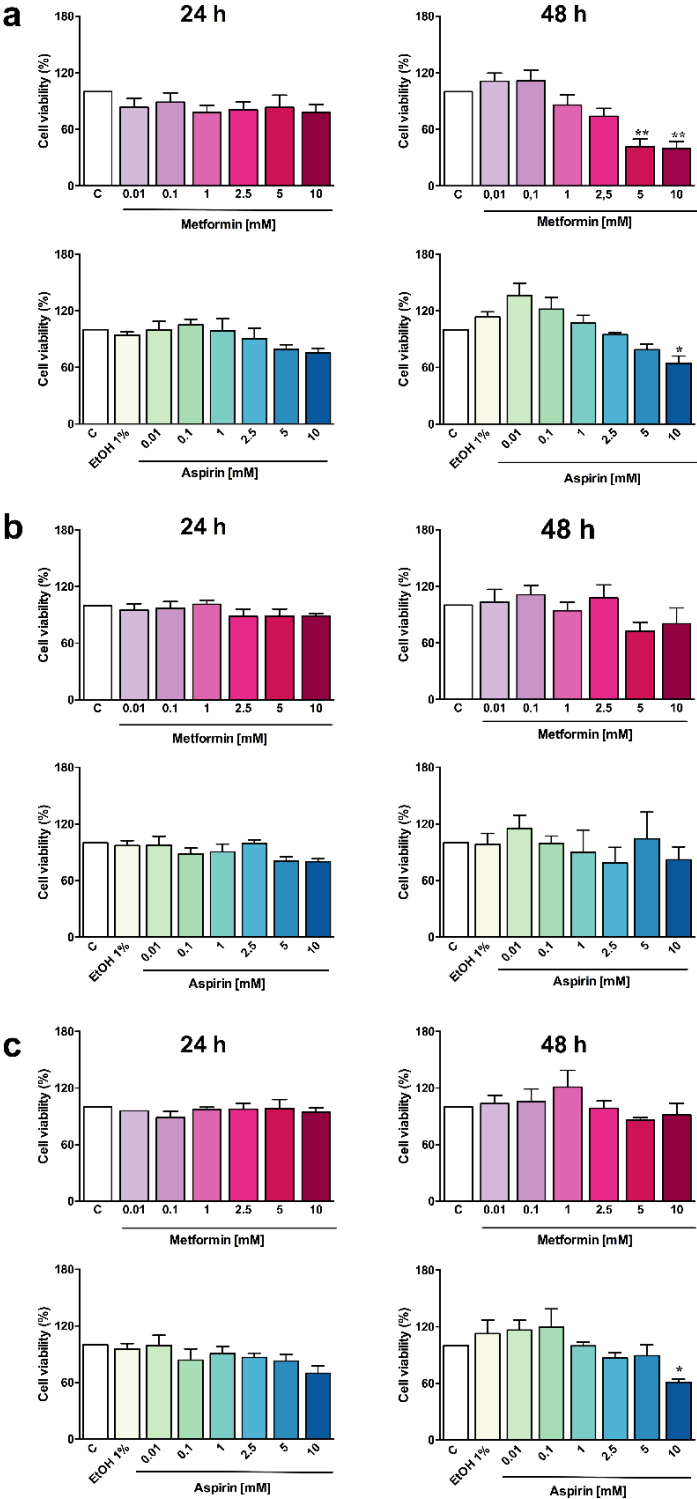


Figure 7:

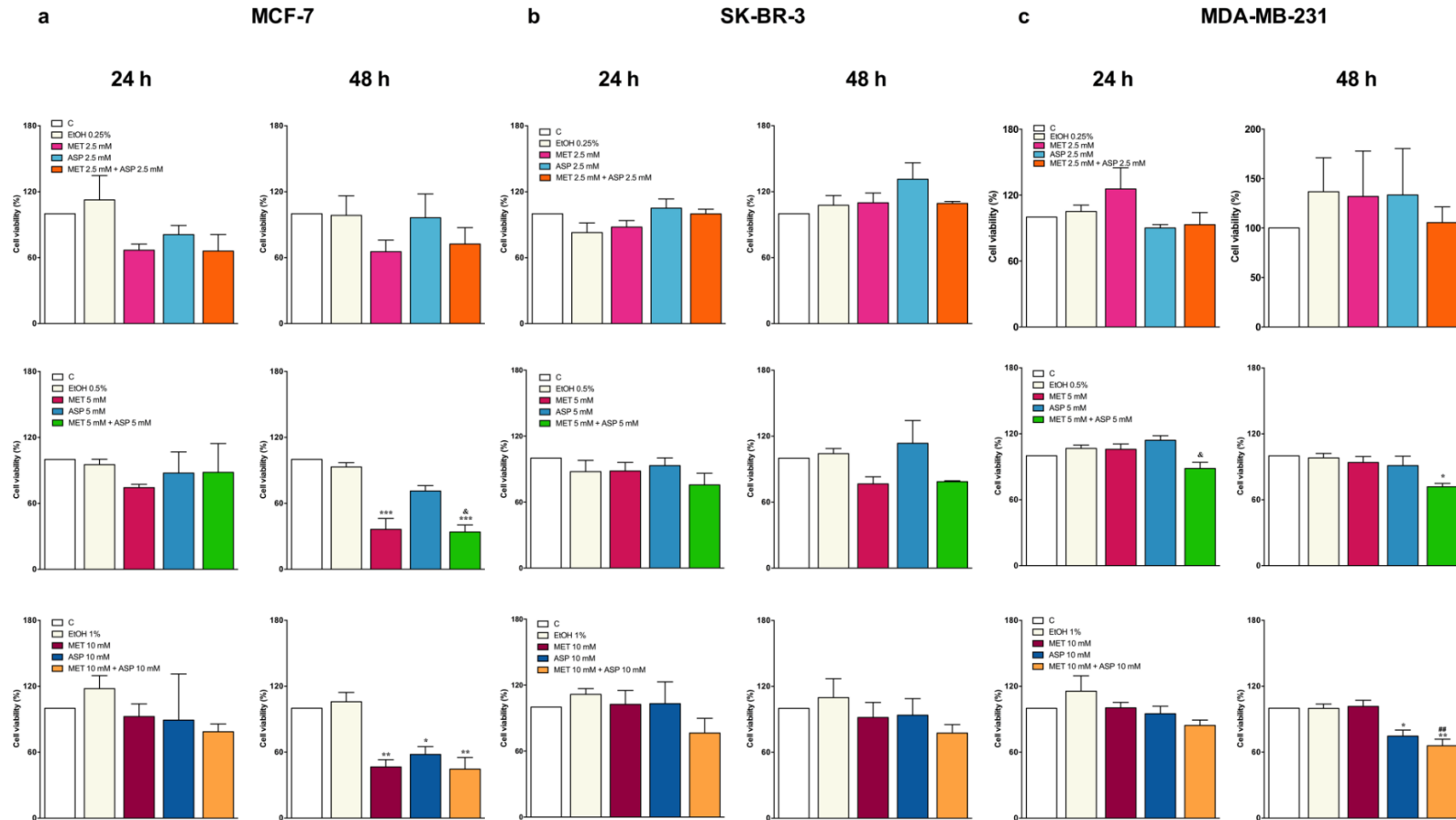


Supplementary Figure 1:



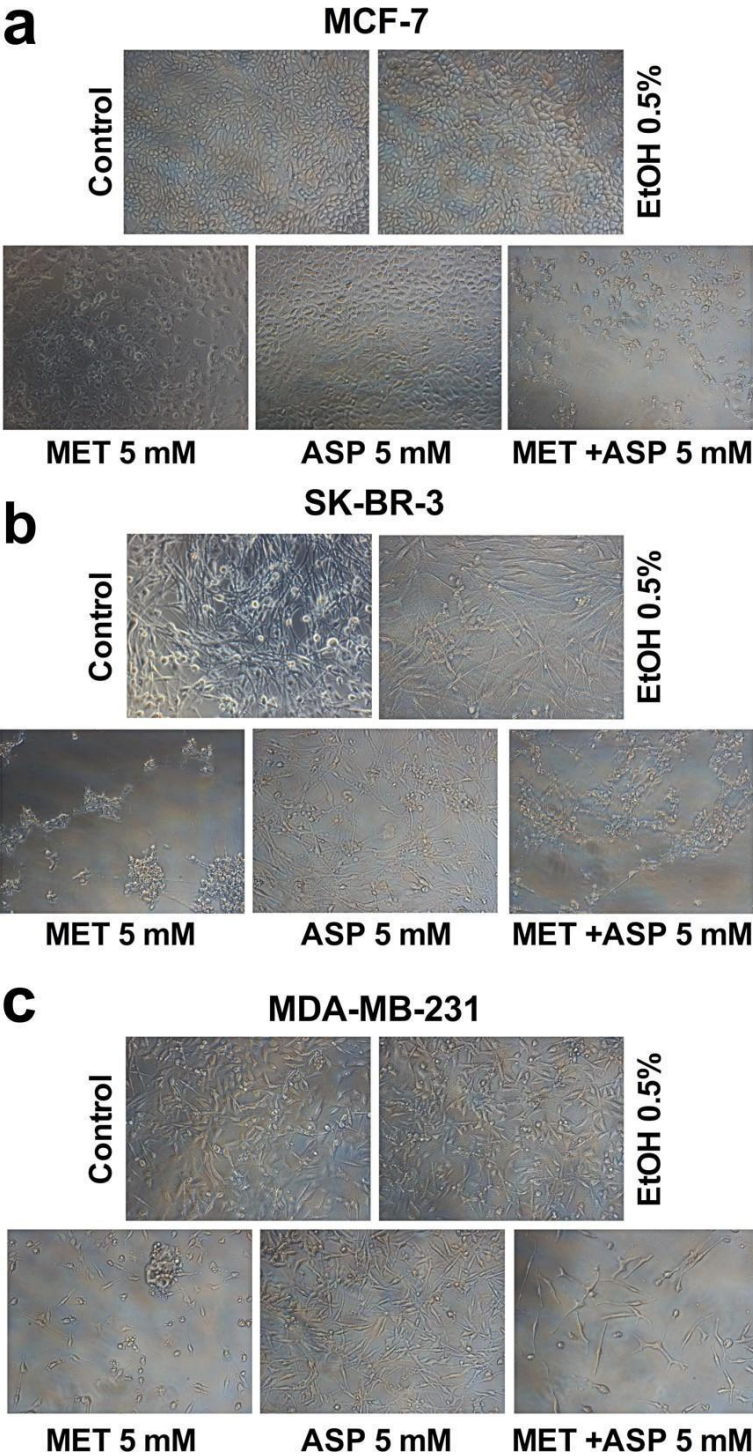
Supplementary Figure 1: Concentration-response curve performed by using the MTT assay. MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells were treated with metformin or aspirin with different concentrations as indicated for 72 hours. Cell viability was evaluated by using MTT assay. Data are means ± SEM, n = 4 means of triplicate measures. **p* < 0.05, ***p* < 0.0003, compared to the control. C, control; EtOH, ethanol

Supplementary Figure 2:



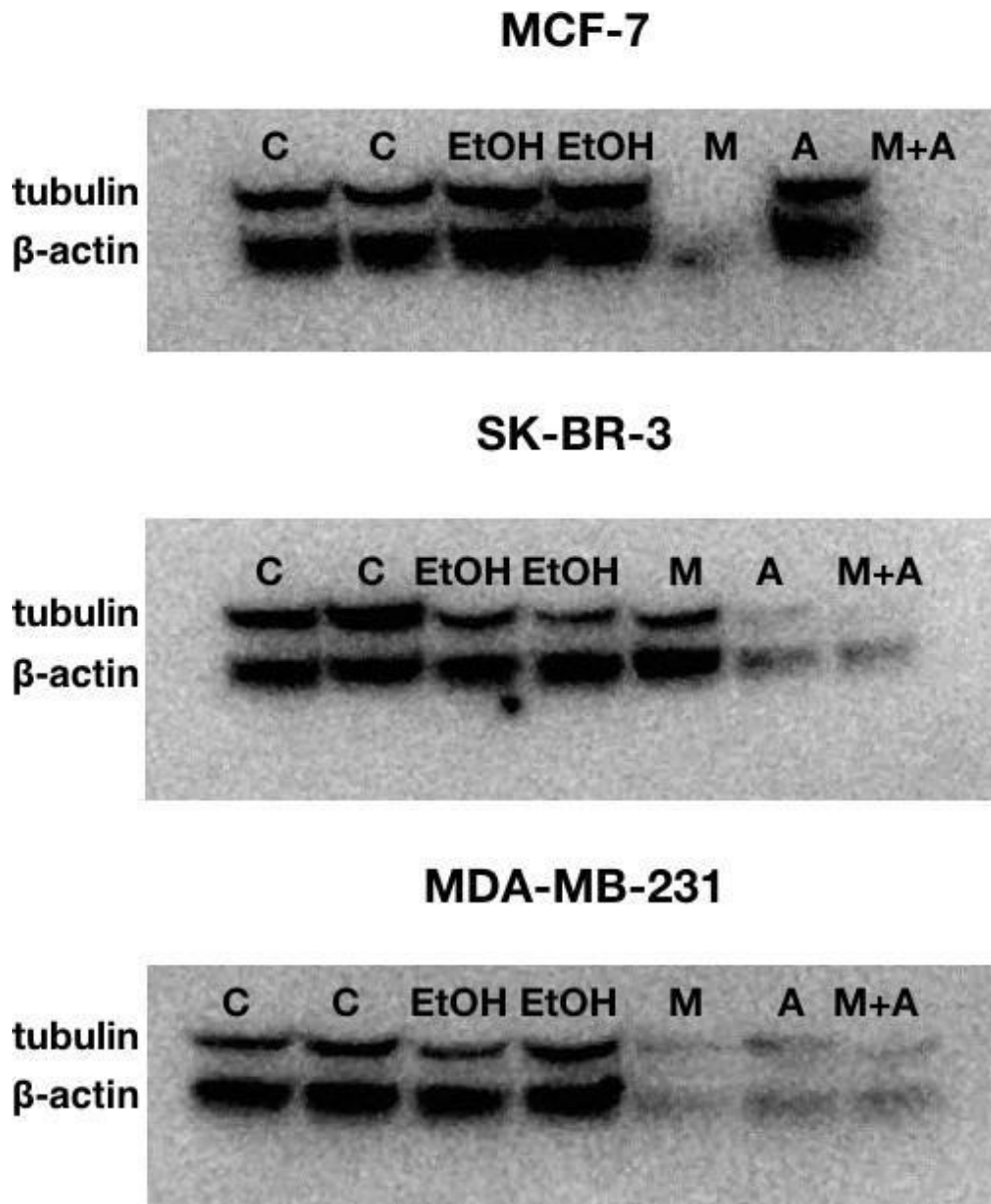
Supplementary Figure 2: Effects of metformin combined with aspirin. MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells were treated with metformin and/or aspirin with different concentrations as indicated for 72 hours. Cell viability was evaluated by using MTT assay. Data are means \pm SEM, $n = 3$ means of triplicate measures. * $p < 0.05$, ** $p < 0.003$, *** $p < 0.0004$ compared to the control. ## $p = 0.0008$ compared to Metformin. & $p < 0.02$ compared to Aspirin. C, control; EtOH, ethanol. MET, metformin; ASP, aspirin.

Supplementary Figure 3:



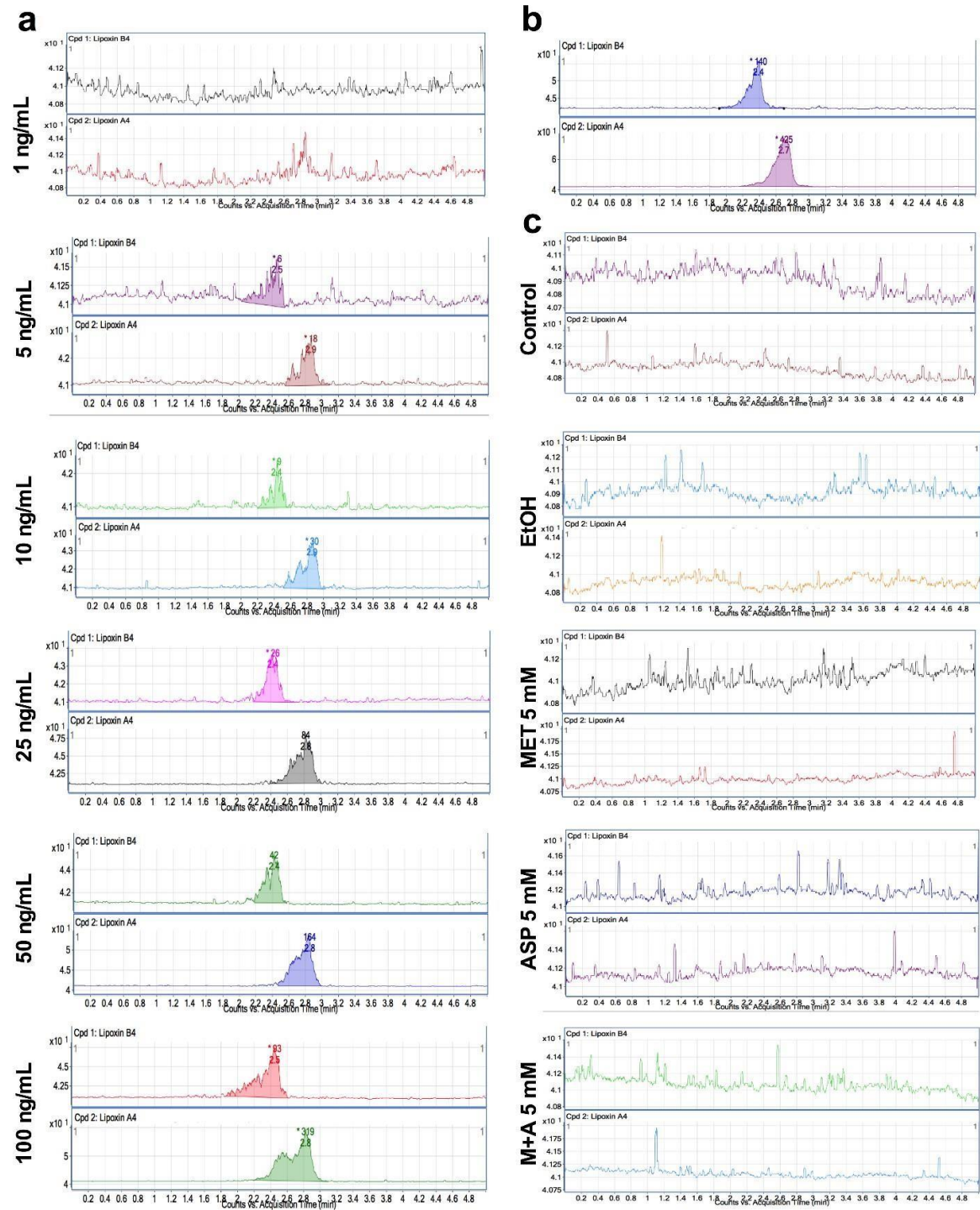
Supplementary Figure 3: Analysis of cell morphology by using optical microscopy. MCF-7 (A), SK-BR-3 (B) and MDA-MB-231 (C) cells were treated with metformin and/or aspirin 5 mM. The images were captured in x20 magnification at 72 h using an Olympus IX71 microscope.

Supplementary Figure 4:



Supplementary Figure 4: Western blotting analysis of two different internal controls (β - actin and tubulin). MCF-7, SK-BR-3 and MDA-MB-231 cells were treated with metformin and/or aspirin 5 mM both and protein expression were evaluated 72 h after.

Supplementary Figure 5:



Supplementary Figure 5: Analysis of lipoxins by using LC-MS. MDA-MB-231 cells were treated with metformin and/or aspirin 5 mM both and lipoxin production were evaluated 72 h after by LC-MS. **a.** Curve performed by using the standard. The area under the curve is proportional of each concentration **b.** Assay performed for testing the lipoxin extraction methodology for checking the efficacy. The lipoxin standard were extracted as described before. **c.** MDA-MB-231 cell line results showing that there is no lipoxin production under metformin and/or aspirin treatment.

Capítulo 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

REFERÊNCIAS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de mama é uma doença que acomete um grande número de mulheres em todo o mundo, sendo uma causa significativa de mortes associadas ao câncer. Além disso, no Brasil, o Rio Grande do Sul é um dos estados de maior prevalência da doença. Existem diferentes tipos de câncer de mama e o tratamento varia para cada um deles. Os efeitos adversos das terapias disponíveis ainda são muito significativos, além de não haver um tratamento definido e eficaz para o subtipo triplo-negativo. Sendo assim, é de extrema importância que sejam realizados novos estudos para a identificação de tratamentos alternativos, com respostas antitumorais superiores, aliadas à menor ocorrência de efeitos adversos.

A metformina e a aspirina são dois medicamentos de baixo custo, já aprovados para o tratamento de outras doenças, e, por isso, as características farmacocinéticas e farmacodinâmicas já são bem conhecidas. Doses tóxicas e efeitos adversos já são descritos, e, assim, o estudo desses medicamentos no contexto de outras patologias e o possível reposicionamento seria uma alternativa mais rápida e mais barata do que o desenvolvimento de novos fármacos desde as etapas iniciais. Desse modo, este estudo teve como objetivo avaliar o possível efeito da metformina e da aspirina, combinadas ou não, em diferentes linhagens de câncer de mama. Com o intuito de estudar os principais subtipos do câncer de mama, foram selecionadas linhagens que possuíam características semelhantes a cada um deles. Assim, foi possível abranger os principais tipos da doença.

De forma geral, os dados do presente estudo demonstram que não houve efeito significativo da metformina e da aspirina na linhagem celular HER2+. Já, na linhagem ER+, foi possível identificar que, principalmente a metformina, produziu efeito antiproliferativo e reduziu a viabilidade e a migração celular. A análise *in silico* revelou que a aspirina e a metformina apresentam afinidade similar de ligação ao receptor de estrogênio, o que pode estar relacionado com modulação e a ativação de vias de diferentes vias sinalização intracelular. Quando a linhagem TNBC foi avaliada, observou-se um efeito sinérgico entre a metformina e a aspirina sobre a viabilidade celular, sugerindo que o estudo da combinação desses fármacos no contexto do câncer de mama triplo-negativo é bastante promissor. Ademais, a aspirina e a metformina modularam a expressão da COX-2 de maneira positiva, indicando que parte dos efeitos antitumorais dos fármacos poderia ser relacionada à modulação de

produtos dessa enzima. Entretanto, no presente estudo, foi descartada a participação das lipoxinas.

Embora sejam necessários mais estudos e análises, principalmente em modelos *in vivo*, os dados desse estudo indicam que tanto a metformina quanto a aspirina podem representar fármacos potenciais para o tratamento de câncer de mama. Acredita-se, ainda, que esses medicamentos possam atuar como adjuvantes ao tratamento já empregado para o câncer de mama, de modo a reduzir as doses utilizadas dos quimioterápicos e, conseqüentemente, seus efeitos adversos. Entretanto, estudos de interação entre os fármacos utilizados na terapia do câncer de mama e a metformina e a aspirina ainda são necessários.

Por fim, este estudo foi pioneiro por investigar os efeitos de baixas concentrações de metformina e a aspirina no câncer de mama, sendo um primeiro passo para análises posteriores. Como perspectivas, seria de extrema importância dar segmento às análises em modelos animais, e, além disso, iniciar investigações acerca do tratamento combinado da metformina e da aspirina com medicamentos já utilizados na clínica para o tratamento do câncer mama.

6. REFERÊNCIAS

- [1] W. B. Nickell and J. Skelton, "Clinical Perspectives Breast Fat and Fallacies: More Than 100 Years of Anatomical Fantasy."
- [2] D. Heber and G. Blackburn, "Breast Cancer," 2006.
- [3] American Cancer Society, "Breast Cancer," in *Manual of Clinical Oncology*, 2014.
- [4] A. Javed and A. Lteif, "Development of the human breast.," *Semin. Plast. Surg.*, vol. 27, no. 1, pp. 5–12, 2013.
- [5] D. L. Kleinberg and W. Ruan, "IGF-I, GH, and sex steroid effects in normal mammary gland development.," *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 13, no. 4, pp. 353–60, Dec. 2008.
- [6] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: the next generation.," *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–74, 2011.
- [7] K. C. Oeffinger, E. T. Fontham, R. Etzioni, A. Herzig, J. S. Michaelson, Y.-C. C. Shih, L. C. Walter, T. R. Church, C. R. Flowers, S. J. LaMonte, A. M. Wolf, C. DeSantis, J. Lortet-Tieulent, K. Andrews, D. Manassaram-Baptiste, D. Saslow, R. A. Smith, O. W. Brawley, and R. Wender, "Breast Cancer Screening for Women at Average Risk: 2015 Guideline Update From the American Cancer Society," *JAMA*, vol. 314, no. 15, pp. 1599–1614, 2015.
- [8] American Cancer Society, "Cancer Facts & Figures 2015," *Cancer Facts Fig. 2015*, pp. 1–9, 2015.
- [9] American Cancer Society, "Breast Cancer Facts & Figures 2015-2016," *Am. Cancer Soc. Inc*, pp. 246–251, 2016.
- [10] S. RI, M. Kd, and a Jemal, "Cancer statistics , 2015 .," *CA Cancer J Clin*, vol. 65, no. 1, p. 21254, 2015.
- [11] N. E. Hynes and C. J. Watson, "Mammary Gland Growth Factors: Roles in Normal Development and in Cancer," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 8, pp. a003186–a003186, 2010.
- [12] B. A. Gusterson and T. Stein, "Human breast development," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 5, pp. 567–573, 2012.
- [13] C. Gajdos, P. I. Tartter, I. J. Bleiweiss, C. Bodian, and S. T. Brower, "Stage 0 to stage III breast cancer in young women.," *J. Am. Coll. Surg.*, vol. 190, no. 5, pp. 523–529, 2000.
- [14] Z. Tao, A. Shi, C. Lu, T. Song, Z. Zhang, and J. Zhao, "Breast Cancer:

Epidemiology and Etiology,” *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 72, no. 2, pp. 333–338, 2015.

- [15] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, “Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease.,” *Lancet (London, England)*, vol. 358, no. 9291, pp. 1389–99, 2001.
- [16] American Cancer Society, “Cancer Facts & Figures 2009,” *Am. Cancer Soc.*, pp. 1–72, 2009.
- [17] J. N. Wolfe, “Breast Patterns As An Index of Risk For Developing Breast Cancer,” pp. 1130–1139, 1976.
- [18] H. R. Harris, R. M. Tamimi, W. C. Willett, S. E. Hankinson, and K. B. Michels, “Body size across the life course, mammographic density, and risk of breast cancer,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 174, no. 8, pp. 909–918, 2011.
- [19] Y.-M. Zhao, J.-T. Wang, J. Liu, J. Wang, H.-L. Wang, and P.-F. Liu, “Differences between breast cancer patients younger and older than 40 years: mammographic findings.,” *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, vol. 15, no. 12, pp. 4929–32, 2014.
- [20] I. Schreer, “Dense Breast Tissue as an Important Risk Factor for Breast Cancer and Implications for Early Detection.,” *Breast Care (Basel)*, vol. 4, no. 2, pp. 89–92, 2009.
- [21] N. F. Boyd, “Tamoxifen, mammographic density, and breast cancer prevention,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 103, no. 9, pp. 704–705, 2011.
- [22] J. Cuzick, J. Warwick, E. Pinney, S. W. Duffy, S. Cawthorn, A. Howell, J. F. Forbes, and R. M. L. Warren, “Tamoxifen-induced reduction in mammographic density and breast cancer risk reduction: A nested case-control study,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 103, no. 9, pp. 744–752, 2011.
- [23] T. Trinh, S. E. Christensen, J. S. Brand, J. Cuzick, K. Czene, A. Sjölander, K. Bälter, and P. Hall, “Background risk of breast cancer influences the association between alcohol consumption and mammographic density,” *Br. J. Cancer*, vol. 113, no. 1, pp. 159–165, 2015.
- [24] K. A. Bertrand, C. G. Scott, R. M. Tamimi, M. R. Jensen, V. S. Pankratz, A. D. Norman, D. W. Visscher, F. J. Couch, J. Shepherd, Y. Chen, B. Fan, F. Wu, L. Ma, A. H. Beck, S. R. Cummings, K. Kerlikowske, and C. M. Vachon, “Dense and nondense mammographic area and risk of breast cancer by age and tumor

characteristics.,” *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2015.

- [25] M. E. Wood, B. L. Sprague, A. Oustimov, M. B. Synnstedt, M. Cuke, E. F. Conant, and D. Kontos, “Aspirin use is associated with lower mammographic density in a large screening cohort,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 162, no. 3, pp. 419–425, 2017.
- [26] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, “Menarche, menopause, and breast cancer risk: Individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies,” *Lancet Oncol.*, vol. 13, no. 11, pp. 1141–1151, 2012.
- [27] A. Manuscript and R. R. Factors, “Reproductive Risk Factors and Breast Cancer Subtypes: A Review of the Literature,” vol. 144, no. 1, pp. 1–10, 2015.
- [28] P. Schedin, “Pregnancy-associated breast cancer and metastasis.,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 281–291, 2006.
- [29] D. T. Janerich and M. B. Hoff, “Evidence for a crossover in breast cancer risk factors,” *J. Epidemiol.*, vol. 116, 1982.
- [30] S. Asztalos, T. Pham, P. Gann, M. Hayes, R. Deaton, E. Wiley, R. Emmadi, A. Kajdacsy-Balla, N. Banerji, W. McDonald, S. Khan, and D. Tonetti, “High incidence of triple negative breast cancers following pregnancy and an associated gene expression signature,” *Springerplus*, vol. 4, no. 1, p. 710, 2015.
- [31] M. Lamb, C.-C. Hsieh, D. Trichopoulos, A. Ekblom, M. Pavia, and H.-O. Adami, “Transient Increase in the Risk of Breast Cancer After Givin Birth,” *N. Engl. J. Med.*, 1994.
- [32] G. Albrektsen, I. Heuch, S. Hansen, and G. Kvåle, “Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects,” *Br. J. Cancer*, vol. 92, no. 1, pp. 167–75, 2005.
- [33] T. R. Lyons, P. J. Schedin, and V. F. Borges, “Pregnancy and breast cancer: When they collide,” *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, vol. 14, no. 2, pp. 87–98, 2009.
- [34] S. Shantakumar, M. B. Terry, A. Paykin, S. L. Teitelbaum, J. A. Britton, P. G. Moorman, S. B. Kritchevsky, A. I. Neugut, and M. D. Gammon, “Age and menopausal effects of hormonal birth control and hormone replacement therapy in relation to breast cancer risk,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 165, no. 10, pp. 1187–1198, 2007.
- [35] M. D. Althuis, D. R. Brogan, R. J. Coates, J. R. Daling, M. D. Gammon, K. E.

- Malone, J. B. Schoenberg, and L. a Brinton, "Hormonal content and potency of oral contraceptives and breast cancer risk among young women.," *Br. J. Cancer*, vol. 88, pp. 50–57, 2003.
- [36] E. F. Braber, D. S. M. Buist, W. E. Barlow, K. E. Malone, S. D. Reed, and C. I. Li, "Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20-49 years of age," 2014.
- [37] W. Y. Chen, B. Rosner, S. E. Hankinson, G. A. Colditz, and W. C. Willett, "Moderate Alcohol Consumption During Adult Life, Drinking Patterns, and Breast Cancer Risk," *Jama*, vol. 306, no. 17, p. 1884, 2011.
- [38] Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer, "Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease.," *Br. J. Cancer*, vol. 87, no. 11, pp. 1234–1245, 2002.
- [39] K. W. Singletary and S. M. Gapstur, "Alcohol and Breast Cancer Review of Epidemiologic and Experimental Evidence and Potential Mechanisms," *J. Am. Med. Assoc.*, 2001.
- [40] C. La Vecchia, S. H. Giordano, G. N. Hortobagyi, and B. Chabner, "Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle.," *Oncologist*, vol. 16, no. 6, pp. 726–729, 2011.
- [41] World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. 2007.
- [42] K. M. J. De Bruijn, L. R. Arends, B. E. Hansen, S. Leeflang, R. Ruiters, and C. H. J. Van Eijck, "Systematic review and meta-analysis of the association between diabetes mellitus and incidence and mortality in breast and colorectal cancer," *Br. J. Surg.*, vol. 100, no. 11, pp. 1421–1429, 2013.
- [43] P. Boyle, M. Boniol, A. Koechlin, C. Robertson, F. Valentini, K. Coppens, L.-L. Fairley, T. Zheng, Y. Zhang, M. Pasterk, M. Smans, M. P. Curado, P. Mullie, S. Gandini, M. Bota, G. B. Bolli, J. Rosenstock, and P. Autier, "Diabetes and breast cancer risk: a meta-analysis.," *Br. J. Cancer*, vol. 107, no. 9, pp. 1608–17, 2012.
- [44] M. A. Kaplan, Z. Pekkolay, M. Kucukoner, A. Inal, Z. Urakci, H. Ertugrul, R. Akdogan, U. Firat, I. Yildiz, and A. Isikdogan, "Type 2 diabetes mellitus and prognosis in early stage breast cancer women.," *Med. Oncol.*, vol. 29, no. 3, pp.

1576–80, 2012.

- [45] H. D. Nelson, B. Zakher, A. Cantor, K. Kerlikowske, N. T. Van Ravesteyn, and A. Trentham-, “Risk Factors for Breast Cancer for Women Age 40 to 49: A Systematic Review and Meta-analysis,” *Ann Intern Med*, vol. 156, no. 9, pp. 635–648, 2012.
- [46] J. S. Hildebrand, S. M. Gapstur, P. T. Campbell, M. M. Gaudet, and A. V. Patel, “Recreational physical activity and leisure-time sitting in relation to postmenopausal breast cancer risk,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 22, no. 10, pp. 1906–1912, 2013.
- [47] M. D. Holmes and W. C. Willett, “Physical activity and risk of breast cancer among postmenopausal women,” *Arch. Intern. Med.*, vol. 170, no. 19, pp. 1758–1764, 2010.
- [48] H. K. Neilson, C. M. Friedenreich, N. T. Brockton, and R. C. Millikan, “Physical activity and postmenopausal breast cancer: Proposed biologic mechanisms and areas for future research,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 18, no. 1, pp. 11–27, 2009.
- [49] D. D. Alexander, L. M. Morimoto, P. J. Mink, and K. A. Lowe, “Summary and meta-analysis of prospective studies of animal fat intake and breast cancer.,” *Nutr. Res. Rev.*, vol. 23, no. 1, pp. 169–79, 2010.
- [50] E. Linos, W. C. Willett, E. Cho, and L. Frazier, “Adolescent diet in relation to breast cancer risk among premenopausal women,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 19, no. 3, pp. 689–696, 2010.
- [51] D. D. Alexander, L. M. Morimoto, P. J. Mink, and C. a Cushing, “A review and meta-analysis of red and processed meat consumption and breast cancer.,” *Nutr. Res. Rev.*, vol. 23, no. 2, pp. 349–365, 2010.
- [52] J.-Y. Dong and L.-Q. Qin, “Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies.,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 125, pp. 315–323, 2011.
- [53] S. Jung, D. Spiegelman, L. Baglietto, L. Bernstein, D. A. Boggs, P. A. Van Den Brandt, J. E. Buring, J. R. Cerhan, M. M. Gaudet, G. G. Giles, G. Goodman, N. Hakansson, S. E. Hankinson, K. Helzlsouer, P. L. Horn-Ross, M. Inoue, V. Krogh, M. Lof, M. L. McCullough, A. B. Miller, M. L. Neuhouser, J. R. Palmer, Y. Park, K. Robien, T. E. Rohan, S. Scarmo, C. Schairer, L. J. Schouten, J. M. Shikany, S. Sieri, S. Tsugane, K. Visvanathan, E. Weiderpass, W. C. Willett, A.

- Wolk, A. Zeleniuch-Jacquotte, S. M. Zhang, X. Zhang, R. G. Ziegler, and S. A. Smith-Warner, "Fruit and vegetable intake and risk of breast cancer by hormone receptor status," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 105, no. 3, pp. 219–236, 2013.
- [54] A. H. Eliassen, X. Liao, B. Rosner, R. M. Tamimi, S. S. Tworoger, and S. E. Hankinson, "Plasma carotenoids and risk of breast cancer over 20 y of follow-up," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 101, no. 6, pp. 1197–1205, 2015.
- [55] Y. Wang, S. M. Gapstur, M. M. Gaudet, J. D. Furtado, H. Campos, and M. L. McCullough, "Plasma carotenoids and breast cancer risk in the Cancer Prevention Study II Nutrition Cohort," *Cancer Causes Control*, vol. 26, no. 9, pp. 1233–1244, 2015.
- [56] A. Reznikov, "Hormonal impact on tumor growth and progression," *Exp. Oncol.*, vol. 37, no. 3, pp. 162–170, 2015.
- [57] C. Petridis, M. N. Brook, V. Shah, K. Kohut, P. Gorman, M. Caneppele, D. Levi, E. Papouli, N. Orr, A. Cox, S. S. Cross, I. Dos-Santos-Silva, J. Peto, A. Swerdlow, M. J. Schoemaker, M. K. Bolla, Q. Wang, J. Dennis, K. Michailidou, J. Benitez, A. González-Neira, D. C. Tessier, D. Vincent, J. Li, J. Figueroa, V. Kristensen, A.-L. Borresen-Dale, P. Soucy, J. Simard, R. L. Milne, G. G. Giles, S. Margolin, A. Lindblom, T. Brüning, H. Brauch, M. C. Southey, J. L. Hopper, T. Dörk, N. V. Bogdanova, M. Kabisch, U. Hamann, R. K. Schmutzler, A. Meindl, H. Brenner, V. Arndt, R. Winqvist, K. Pylkäs, P. A. Fasching, M. W. Beckmann, J. Lubinski, A. Jakubowska, A. M. Mulligan, I. L. Andrulis, R. A. E. M. Tollenaar, P. Devilee, L. Le Marchand, C. A. Haiman, A. Mannermaa, V.-M. Kosma, P. Radice, P. Peterlongo, F. Marme, B. Burwinkel, C. H. M. van Deurzen, A. Hollestelle, N. Miller, M. J. Kerin, D. Lambrechts, G. Floris, J. Wesseling, H. Flyger, S. E. Bojesen, S. Yao, C. B. Ambrosone, G. Chenevix-Trench, T. Truong, P. Guénel, A. Rudolph, J. Chang-Claude, H. Nevanlinna, C. Blomqvist, K. Czene, J. S. Brand, J. E. Olson, F. J. Couch, A. M. Dunning, P. Hall, D. F. Easton, P. D. P. Pharoah, S. E. Pinder, M. K. Schmidt, I. Tomlinson, R. Roylance, M. García-Closas, and E. J. Sawyer, "Genetic predisposition to ductal carcinoma in situ of the breast," *Breast Cancer Res.*, vol. 18, no. 1, p. 22, 2016.
- [58] G. C. Fernandes, R. A. D. Michelli, C. Scapulatempo-Neto, and E. I. Palmero, "Association of polymorphisms with a family history of cancer and the presence of germline mutations in the BRCA1/BRCA2 genes," *Hered. Cancer Clin. Pract.*, vol. 14, no. 1, p. 2, 2016.

- [59] C. Turnbull and N. Rahman, "Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 9, no. 1, pp. 321–345, 2008.
- [60] E. Gabai-Kapara, A. Lahad, B. Kaufman, E. Friedman, S. Segev, P. Renbaum, R. Beerli, M. Gal, J. Grinshpun-Cohen, K. Djemal, J. B. Mandell, M. K. Lee, U. Beller, R. Catane, M.-C. King, and E. Levy-Lahad, "Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 39, pp. 14205–10, 2014.
- [61] N. Mavaddat, S. Peock, D. Frost, S. Ellis, R. Platte, E. Fineberg, D. G. Evans, L. Izatt, R. A. Eeles, J. Adlard, R. Davidson, D. Eccles, T. Cole, J. Cook, C. Brewer, M. Tischkowitz, F. Douglas, S. Hodgson, L. Walker, M. E. Porteous, P. J. Morrison, L. E. Side, M. J. Kennedy, C. Houghton, A. Donaldson, M. T. Rogers, H. Dorkins, Z. Miedzybrodzka, H. Gregory, J. Eason, J. Barwell, E. McCann, A. Murray, A. C. Antoniou, and D. F. Easton, "Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: Results from prospective analysis of EMBRACE," *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 105, no. 11, pp. 812–822, 2013.
- [62] a Antoniou, P. D. P. Pharoah, S. Narod, H. a Risch, J. E. Eyfjord, J. L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, a Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D. M. Eccles, N. Tang, E. Olah, H. Anton-Culver, E. Warner, J. Lubinski, J. Gronwald, B. Gorski, H. Tulinius, S. Thorlacius, H. Eerola, H. Nevanlinna, K. Syrjäkoski, O.-P. Kallioniemi, D. Thompson, C. Evans, J. Peto, F. Lalloo, D. G. Evans, and D. F. Easton, "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies.," *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 72, no. 5, pp. 1117–1130, 2003.
- [63] A. C. Antoniou, S. Casadei, T. Heikkinen, D. Barrowdale, K. Pylkäs, J. Roberts, A. Lee, D. Subramanian, K. De Leeneer, F. Fostira, E. Tomiak, S. L. Neuhausen, Z. L. Teo, S. Khan, K. Aittomäki, J. S. Moilanen, C. Turnbull, S. Seal, A. Mannermaa, A. Kallioniemi, G. J. Lindeman, S. S. Buys, I. L. Andrulis, P. Radice, C. Tondini, S. Manoukian, A. E. Toland, P. Miron, J. N. Weitzel, S. M. Domchek, B. Poppe, K. B. M. Claes, D. Yannoukakos, P. Concannon, J. L. Bernstein, P. A. James, D. F. Easton, D. E. Goldgar, J. L. Hopper, N. Rahman, P. Peterlongo, H. Nevanlinna, M.-C. King, F. J. Couch, M. C. Southey, R. Winqvist, W. D. Foulkes, and M. Tischkowitz, "Breast-cancer risk in families with

- mutations in PALB2.,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 371, no. 6, pp. 497–506, 2014.
- [64] P. Linchtenstein, N. V. Holm, P. K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe, and K. Hemminki, “Environmental and heritable factors in the causation of cancer,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 343, no. 2, pp. 78–85, 2000.
- [65] M. E. Robson, A. R. Bradbury, B. Arun, S. M. Domchek, J. M. Ford, H. L. Hampel, S. M. Lipkin, S. Syngal, D. S. Wollins, and N. M. Lindor, “American society of clinical oncology policy statement update: Genetic and genomic testing for cancer susceptibility,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 33, no. 31, pp. 3660–3667, 2015.
- [66] IARC, “Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14 . 1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed.,” *Int. Agency Res. Cancer, World Heal. Organ.*, no. December, pp. 2012–2014, 2013.
- [67] Inca, *Estimativas 2014 - Incidência de Câncer no brasil*. 2014.
- [68] A. C. Buzaid, F. C. Maluf, and C. M. R. Lima, Eds., *MOC - Manual de Oncologia Clínica do Brasil*, 13^a. São Paulo: Dendrix Edição e Design Ltda., 2015.
- [69] B. Viollet, B. Guigas, N. Sanz Garcia, J. Leclerc, M. Foretz, and F. Andreelli, “Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview.,” *Clin. Sci. (Lond)*., vol. 122, no. 6, pp. 253–70, 2012.
- [70] C.-H. Tseng, “Metformin reduces thyroid cancer risk in taiwanese patients with type 2 diabetes,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10, pp. 1636–1649, 2014.
- [71] H. J. Kim, H. Kwon, J. W. Lee, H. J. Kim, S. B. Lee, H. S. Park, G. Sohn, Y. Lee, B. S. Koh, J. H. Yu, B. H. Son, and S. H. Ahn, “Metformin increases survival in hormone receptor-positive, HER2-positive breast cancer patients with diabetes,” *Breast Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, p. 64, 2015.
- [72] L. Jacob, K. Kostev, W. Rathmann, and M. Kalder, “Impact of metformin on metastases in patients with breast cancer and type 2 diabetes,” *J. Diabetes Complications*, pp. 2–5, 2016.
- [73] R. J. O. Dowling, S. Niraula, M. C. Chang, S. J. Done, M. Ennis, D. R. McCready, W. L. Leong, J. M. Escallon, M. Reedijk, P. J. Goodwin, and V. Stambolic, “Changes in insulin receptor signaling underlie neoadjuvant metformin administration in breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study.,” *Breast Cancer Res.*, vol. 17, no. 1, p. 540, 2015.

- [74] I. C. Lega, P. C. Austin, A. Gruneir, P. J. Goodwin, P. A. Rochon, and L. L. Lipscombe, "Association between metformin therapy and mortality after breast cancer: A population-based study," *Diabetes Care*, vol. 36, no. 10, pp. 3018–3026, 2013.
- [75] D. Zhao, X.-D. Long, T.-F. Lu, T. Wang, W.-W. Zhang, Y.-X. Liu, X.-L. Cui, H.-J. Dai, F. Xue, and Q. Xia, "Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 11, pp. 2556–2565, 2015.
- [76] S. Ling, Y. Tian, H. Zhang, K. Jia, T. Feng, D. Sun, Z. Gao, F. Xu, Z. Hou, Y. Li, and L. Wang, "Metformin reverses multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma Bel-7402/5-fluorouracil cells," *Mol. Med. Rep.*, vol. 10, no. 6, pp. 2891–2897, 2014.
- [77] J. Incio, P. Suboj, S. M. Chin, T. Vardam-Kaur, H. Liu, T. Hato, S. Babykutty, I. Chen, V. Deshpande, R. K. Jain, and D. Fukumura, "Metformin reduces desmoplasia in pancreatic cancer by reprogramming stellate cells and tumor-associated macrophages," *PLoS One*, vol. 10, no. 12, pp. 1–23, 2015.
- [78] M. Rotondi, F. Coperchini, P. Pignatti, F. Magri, and L. Chiovato, "Metformin reverts the secretion of CXCL8 induced by TNF- α in primary cultures of human thyroid cells: An additional indirect anti-tumor effect of the drug," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, no. 3, pp. E427–E432, 2015.
- [79] U. Wokoun, M. Hellriegel, G. Emons, and C. Gr??ndker, "Co-Treatment of breast cancer cells with pharmacologic doses of 2-deoxy-D-glucose and metformin: Starving tumors," *Oncol. Rep.*, vol. 37, no. 4, pp. 2418–2424, 2017.
- [80] A. Obara, Y. Fujita, A. Abudukadier, T. Fukushima, Y. Oguri, M. Ogura, S. Harashima, M. Hosokawa, and N. Inagaki, "DEPTOR-related mTOR suppression is involved in metformin's anti-cancer action in human liver cancer cells," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 460, no. 4, pp. 1047–1052, 2015.
- [81] S. Orecchioni, F. Reggiani, G. Talarico, P. Mancuso, A. Calleri, G. Gregato, V. Labanca, D. M. Noonan, K. Dallaglio, A. Albini, and F. Bertolini, "The biguanides metformin and phenformin inhibit angiogenesis, local and metastatic growth of breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells," *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 6, pp. E534–E544, 2015.
- [82] J. S.-S. Soo, C.-H. Ng, S. H. Tan, R. A. Malik, Y.-C. Teh, B.-S. Tan, G.-F. Ho, M.-H. See, N. A. M. Taib, C.-H. Yip, F. F.-L. Chung, L.-W. Hii, S.-H. Teo, and C.-

- O. Leong, "Metformin synergizes 5-fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide (FEC) combination therapy through impairing intracellular ATP production and DNA repair in breast cancer stem cells," *Apoptosis*, vol. 20, no. 10, pp. 1373–1387, 2015.
- [83] P. Shi, W. Liu, Tala, H. Wang, F. Li, H. Zhang, Y. Wu, Y. Kong, Z. Zhou, C. Wang, W. Chen, R. Liu, and C. Chen, "Metformin suppresses triple-negative breast cancer stem cells by targeting KLF5 for degradation.," *Cell Discov.*, vol. 3, p. 17010, 2017.
- [84] M. Alalem, A. Ray, and B. K. Ray, "Metformin induces degradation of mTOR protein in breast cancer cells," *Cancer Med.*, vol. 5, no. 11, pp. 3194–3204, 2016.
- [85] J. Wang, G. Li, Y. Wang, S. Tang, X. Sun, X. Feng, Y. Li, G. Bao, P. Li, X. Mao, M. Wang, and P. Liu, "Suppression of tumor angiogenesis by metformin treatment via a mechanism linked to targeting of HER2/HIF-1 α /VEGF secretion axis," *Oncotarget*, vol. 6, no. 42, pp. 1–14, 2014.
- [86] S. E. Hong, H. O. Jin, H. A. Kim, M. K. Seong, E. K. Kim, S. K. Ye, T. B. Choe, J. K. Lee, J. Il Kim, I. C. Park, and W. C. Noh, "Targeting HIF-1 α is a prerequisite for cell sensitivity to dichloroacetate (DCA) and metformin," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 469, no. 2, pp. 164–170, 2016.
- [87] R. R. Falah, W. H. Talib, and S. J. Shbailat, "Combination of metformin and curcumin targets breast cancer in mice by angiogenesis inhibition, immune system modulation and induction of p53 independent apoptosis," *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 9, no. 4, pp. 235–252, Apr. 2017.
- [88] X. Chen, F. J. Walther, R. M. a. Sengers, E. H. Laghmani, A. Salam, G. Folkerts, T. Pera, and G. T. M. Wagenaar, "Metformin attenuates hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats by reducing the inflammatory response," *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 309, no. 3, pp. L262–L270, 2015.
- [89] M. Rajh, K. Dolinar, K. Miš, M. Pavlin, and S. Pirkmajer, "Medium Renewal Blocks Anti-Proliferative Effects of Metformin in Cultured MDA-MB-231 Breast Cancer Cells," *PLoS One*, vol. 11, no. 5, pp. 1–18, 2016.
- [90] M. Bizjak, P. Malavašič, K. Dolinar, J. Pohar, S. Pirkmajer, and M. Pavlin, "Combined treatment with Metformin and 2-deoxy glucose induces detachment of viable MDA-MB-231 breast cancer cells in vitro," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, p. 1761, 2017.

- [91] G. Ariaans, M. Jalving, E. Geertruida, E. De Vries, and S. De Jong, "Anti-tumor effects of everolimus and metformin are complementary and glucose-dependent in breast cancer cells," pp. 1–13, 2017.
- [92] "Metformin." [Online]. Available: <http://www.drugs.com/pro/metformin.html>. [Accessed: 01-Jan-2016].
- [93] Y. Geng, S. Chandrasekaran, J. W. Hsu, M. Gidwani, A. D. Hughes, and M. R. King, "Phenotypic Switch in Blood: Effects of Pro-Inflammatory Cytokines on Breast Cancer Cell Aggregation and Adhesion," *PLoS One*, vol. 8, no. 1, pp. 1–10, 2013.
- [94] C. Fan, Y. Wang, Z. Liu, Y. Sun, X. Wang, G. Wei, and J. Wei, "Metformin exerts anticancer effects through the inhibition of the Sonic hedgehog signaling pathway in breast cancer," *Int. J. Mol. Med.*, pp. 204–214, 2015.
- [95] Y. Zhang, S. J. Storr, K. Johnson, A. R. Green, a Emad, I. O. Ellis, D. a L. Morgan, and S. G. Martin, "Involvement of metformin and AMPK in the radioresponse and prognosis of luminal versus basal-like breast cancer treated with radiotherapy," vol. 5, no. 24, 2014.
- [96] I. N. Alimova, B. Liu, Z. Fan, S. M. Edgerton, T. Dillon, S. E. Lind, and A. D. Thor, "Metformin inhibits breast cancer cell growth, colony formation and induces cell cycle arrest in vitro," *Cell Cycle*, vol. 8, no. 6, pp. 909–915, 2009.
- [97] Z.-Y. Gao, Z. Liu, M.-H. Bi, J.-J. Zhang, Z.-Q. Han, X. Han, H.-Y. Wang, G.-P. Sun, and H. Liu, "Metformin induces apoptosis via a mitochondria-mediated pathway in human breast cancer cells in vitro.," *Exp. Ther. Med.*, vol. 11, no. 5, pp. 1700–1706, 2016.
- [98] J. Kim, J. Lee, S. Jang, C. Kim, Y. Choi, and A. Kim, "Anticancer effect of metformin on estrogen receptor-positive and tamoxifen-resistant breast cancer cell lines," *Oncol. Rep.*, pp. 2553–2560, 2016.
- [99] A. M. Scherbakov, D. V. Sorokin, V. V. Tatarskiy, N. S. Prokhorov, S. E. Semina, L. M. Berstein, and M. A. Krasil’nikov, "The phenomenon of acquired resistance to metformin in breast cancer cells: The interaction of growth pathways and estrogen receptor signaling," *IUBMB Life*, vol. 68, no. 4, pp. 281–292, 2016.
- [100] Bayer Corporation, "Aspirin: Comprehensive Prescribing Information Profile." pp. 1–9, 2005.
- [101] R. H. (Rang, HP. Dale, MM. Ritter, JM. Flower, "Rang and Dale’s Pharmacology

(Seventh ed.),” *London: Churchill Livingstone Elsevier*, p. 777, 2011.

- [102] K. Schr??r and B. H. Rauch, “Aspirin and lipid mediators in the cardiovascular system,” *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, vol. 121, pp. 17–23, 2015.
- [103] F. Rauzi, N. S. Kirkby, M. L. Edin, J. Whiteford, D. C. Zeldin, J. A. Mitchell, and T. D. Warner, “Aspirin inhibits the production of proangiogenic 15(S)-HETE by platelet cyclooxygenase-1,” *FASEB J.*, vol. 30, no. 12, pp. 4256–4266, 2016.
- [104] J. van Staalduinen, M. Frouws, M. Reimers, E. Bastiaannet, M. P. P. van Herksukel, V. Lemmens, W. O. de Steur, H. H. Hartgrink, C. J. H. van de Velde, and G.-J. Liefers, “The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use after diagnosis on survival of oesophageal cancer patients.,” *Br. J. Cancer*, vol. 114, no. 9, pp. 1053–9, 2016.
- [105] D. Zhang, B. Bai, Y. Xi, T. Wang, and Y. Zhao, “Is aspirin use associated with a decreased risk of ovarian cancer? A systematic review and meta-analysis of observational studies with dose-response analysis,” *Gynecol. Oncol.*, 2016.
- [106] P. C. Elwood, G. Morgan, J. E. Pickering, J. Galante, A. L. Weightman, D. Morris, M. Kelson, and S. Dolwani, “Aspirin in the Treatment of Cancer: Reductions in Metastatic Spread and in Mortality: A Systematic Review and Meta-Analyses of Published Studies.,” *PLoS One*, vol. 11, no. 4, p. e0152402, 2016.
- [107] M. C. Bradley, A. Black, A. N. Freedman, and T. I. Barron, “Prediagnostic aspirin use and mortality in women with stage I to III breast cancer: A cohort study in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial,” *Cancer*, pp. 1–9, 2016.
- [108] D. P. Cronin-Fenton, U. Heide-Jørgensen, T. P. Ahern, T. L. Lash, P. Christiansen, B. Ejlersen, and H. T. Sørensen, “Low-dose Aspirin, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs, Selective COX-2 Inhibitors and Breast Cancer Recurrence,” *Epidemiology*, vol. 27, no. 4, pp. 586–593, 2016.
- [109] T. Luo, H.-M. Yan, P. He, Y. Luo, Y.-F. Yang, and H. Zheng, “Aspirin use and breast cancer risk: a meta-analysis,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 131, no. 2, pp. 581–587, 2012.
- [110] S. Kim, D. L. Shore, L. E. Wilson, E. I. Sanniez, J. H. Kim, J. A. Taylor, and D. P. Sandler, “Lifetime use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk : results from a prospective study of women with a sister with breast cancer,” *BMC Cancer*, pp. 1–10, 2015.

- [111] L. E. Vaughan, A. Prizment, C. K. Blair, W. Thomas, and K. E. Anderson, "Aspirin use and the incidence of breast, colon, ovarian, and pancreatic cancers in elderly women in the Iowa Women's Health Study," *Cancer Causes Control*, vol. 27, no. 11, pp. 1395–1402, 2016.
- [112] S. A. Khuder and A. B. Mutgi, "Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis.," *Br. J. Cancer*, vol. 84, no. 9, pp. 1188–92, 2001.
- [113] T. Dierssen-Sotos, I. Gómez-Acebo, M. de Pedro, B. Pérez-Gómez, S. Servitja, V. Moreno, P. Amiano, T. Fernandez-Villa, A. Barricarte, A. Tardon, M. Diaz-Santos, R. Peiro-Perez, R. Marcos-Gragera, V. Lope, E. Gracia-Lavedan, M. H. Alonso, M. J. Michelena-Echeveste, A. Garcia-Palomo, M. Guevara, G. Castaño-Vinyals, N. Aragonés, M. Kogevinas, M. Pollán, and J. Llorca, "Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of breast cancer: The Spanish Multi-Case-control (MCC) study," *BMC Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 660, 2016.
- [114] D. Tewari, D. Majumdar, S. Vallabhaneni, and A. K. Bera, "Aspirin induces cell death by directly modulating mitochondrial voltage-dependent anion channel (VDAC)," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. February, p. 45184, 2017.
- [115] Y. Zhang, L. Liu, P. Fan, N. Bauer, J. Gladkich, U. Hinz, W. Gross, F. Fortunato, and I. Herr, "Aspirin counteracts cancer stem cell features , desmoplasia and gemcitabine resistance in pancreatic cancer," *Oncotarget*, vol. 6, no. 12, 2015.
- [116] R. Cheng, Y. Liu, J. Cui, M. Yang, X. Liu, and P. Li, "Aspirin regulation of c-myc and cyclinD1 proteins to overcome tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive breast cancer cells," vol. 8, no. 18, pp. 30252–30264, 2017.
- [117] Y. R. Jung, E. J. Kim, H. J. Choi, J. Park, H. Kim, Y. Lee, M. Park, and M. Lee, "Aspirin Targets SIRT1 and AMPK to Induce Senescence of Colorectal Carcinoma Cells," no. October, pp. 708–719, 2015.
- [118] P. Guillem-Llobat, M. Dovizio, A. Bruno, E. Ricciotti, V. Cufino, A. Sacco, R. Grande, S. Alberti, V. Arena, M. Cirillo, C. Patrono, G. A. FitzGerald, D. Steinhilber, A. Sgambato, and P. Patrignani, "Aspirin prevents colorectal cancer metastasis in mice by splitting the crosstalk between platelets and tumor cells.," *Oncotarget*, vol. 7, no. 22, pp. 32462–77, 2016.
- [119] C. C. Hsieh and Y. S. Huang, "Aspirin breaks the crosstalk between 3T3-L1 adipocytes and 4T1 breast cancer cells by regulating cytokine production," *PLoS One*, vol. 11, no. 1, pp. 1–17, 2016.
- [120] G. Maity, A. De, A. Das, S. Banerjee, S. Sarkar, and S. K. Banerjee, "Aspirin

blocks growth of breast tumor cells and tumor-initiating cells and induces reprogramming factors of mesenchymal to epithelial transition.,” *Lab. Invest.*, vol. 95, no. 7, pp. 702–17, 2015.

- [121] S. B. Turturro, M. S. Najor, C. E. Ruby, M. A. Cobleigh, and A. M. Abukhdeir, “Mutations in PIK3CA sensitize breast cancer cells to physiologic levels of aspirin,” *Breast Cancer Res. Treat.*, vol. 156, no. 1, pp. 33–43, 2016.
- [122] Y. R. Lee, K. M. Kim, B. H. Jeon, and S. Choi, “Extracellularly secreted APE1/Ref-1 triggers apoptosis in triple-negative breast cancer cells via RAGE binding, which is mediated through acetylation,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 27, pp. 23383–23398, 2015.
- [123] W. Yue, X. Zheng, Y. Lin, C. S. Yang, Q. Xu, and D. Carpizo, “Metformin combined with aspirin significantly inhibit pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo by suppressing anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2,” 2015.
- [124] G. Talarico, S. Orecchioni, K. Dallaglio, F. Reggiani, P. Mancuso, A. Calleri, G. Gregato, V. Labanca, T. Rossi, D. M. Noonan, A. Albini, and F. Bertolini, “Aspirin and atenolol enhance metformin activity against breast cancer by targeting both neoplastic and microenvironment cells.,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. November 2015, p. 18673, 2016.
- [125] J. Chandrasekharan and N. Sharma-Walia, “Lipoxins: nature’s way to resolve inflammation,” *J. Inflamm. Res.*, pp. 181–192, 2015.
- [126] J. Clària and C. N. Serhan, “Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 21, pp. 9475–9479, 1995.
- [127] T. Morris, M. Stables, A. Hobbs, P. de Souza, P. Colville-Nash, T. Warner, J. Newson, G. Bellingan, and D. W. Gilroy, “Effects of low-dose aspirin on acute inflammatory responses in humans.,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 3, pp. 2089–96, 2009.
- [128] R. Russell, I. Gori, C. Pellegrini, R. Kumar, C. Achdari, and G. O. Canny, “Lipoxin A 4 is a novel estrogen receptor modulator.”
- [129] H. N. Lee, H. K. Na, and Y. J. Surh, “Resolution of inflammation as a novel chemopreventive strategy,” *Semin. Immunopathol.*, vol. 35, no. 2, pp. 151–161, 2013.
- [130] Z. G. Fridlender, J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G. S. Worthen, and S. M. Albelda, “Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by

- TGF- β : 'N1' versus 'N2' TAN," *Cancer Cell*, vol. 16, no. 3, pp. 183–194, 2009.
- [131] W. Song, C.-R. Yeh, D. He, Y. Wang, H. Xie, S.-T. Pang, L. S.-S. Chang, L. Li, and S. Yeh, "Infiltrating neutrophils promote renal cell carcinoma progression via VEGFa/HIF2 α and estrogen receptor β signals.," *Oncotarget*, vol. 6, no. 22, pp. 19290–304, 2015.
- [132] M. M. Queen, R. E. Ryan, R. G. Holzer, C. R. Keller-Peck, and C. L. Jorcyk, "Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: Potential implications for tumor progression," *Cancer Res.*, vol. 65, no. 19, pp. 8896–8904, 2005.
- [133] G. Vazquez Rodriguez, A. Abrahamsson, L. D. E. Jensen, and C. Dabrosin, "Estradiol Promotes Breast Cancer Cell Migration via Recruitment and Activation of Neutrophils," *Cancer Immunol. Res.*, vol. 5, no. 3, pp. 234–247, 2017.
- [134] L. Benevides, D. M. Da Fonseca, P. B. Donate, D. G. Tiezzi, D. D. De Carvalho, J. M. De Andrade, G. A. Martins, and J. S. Silva, "IL17 promotes mammary tumor progression by changing the behavior of tumor cells and eliciting tumorigenic neutrophils recruitment," *Cancer Res.*, vol. 75, no. 18, pp. 3788–3799, 2015.
- [135] C.-H. Koh, N. Bhoo-Pathy, K.-L. Ng, R. S. Jabir, G.-H. Tan, M.-H. See, S. Jamaris, and N. A. Taib, "Utility of pre-treatment neutrophil-lymphocyte ratio and platelet-lymphocyte ratio as prognostic factors in breast cancer.," *Br. J. Cancer*, vol. 113, no. 1, pp. 150–8, 2015.
- [136] M. G. García-Mendoza, D. R. Inman, S. M. Ponik, J. J. Jeffery, D. S. Sheerar, R. R. Van Doorn, and P. J. Keely, "Neutrophils drive accelerated tumor progression in the collagen-dense mammary tumor microenvironment," *Breast Cancer Res.*, vol. 18, no. 1, p. 49, 2016.
- [137] & A M H Brodie, Q. Lu, B. J. Long, A. Fulton, T. Chen, N. Macpherson, P. C. Dejong, M. A. Blankenstein, J. W. R. Nortier, P. H. T. J. Slee, J. Van De Ven, J. M. H. H. Van Gorp, J. R. J. Elbers, M. E. I. Schipper, G. H. Blijham, and J. H. Thijssen, "Aromatase and COX-2 expression in human breast cancers," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 79, no. 2001, pp. 41–47, 2001.
- [138] W. K. K. Wu, J. J. Yiu Sung, C. W. Lee, J. Yu, and C. H. Cho, "Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: An update on the molecular mechanisms," *Cancer Lett.*, vol. 295, no. 1, pp. 7–16, 2010.

- [139] A. Marginean and N. Sharma-Walia, "Lipoxins exert antiangiogenic and anti-inflammatory effects on Kaposi's sarcoma cells," *Transl. Res.*, vol. 166, no. 2, pp. 111–133, 2015.
- [140] S. Tury, V. Becette, F. Assayag, S. Vacher, C. Benoist, M. Kamal, E. Marangoni, I. Bieche, F. Lerebours, and C. Callens, "Combination of COX-2 expression and PIK3CA mutation as prognostic and predictive markers for celecoxib treatment in breast cancer," *Oncotarget*, vol. 7, no. 51, pp. 85124–85141, 2016.
- [141] T. Tramm, J.-Y. Kim, S. Leibl, F. Moinfar, and F. A. Tavassoli, "Expression of C-KIT, CD24, CD44s, and COX2 in benign and non-invasive apocrine lesions of the breast," *Virchows Arch.*, vol. 469, no. 3, pp. 285–295, 2016.
- [142] K. Wu, K. Fukuda, F. Xing, Y. Zhang, S. Sharma, Y. Liu, M. D. Chan, X. Zhou, S. A. Qasem, R. Pochampally, Y. Y. Mo, and K. Watabe, "Roles of the cyclooxygenase 2 matrix metalloproteinase 1 pathway in brain metastasis of breast cancer," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 15, pp. 9842–9854, 2015.
- [143] Y. E. Du, A. Shi, B. Han, S. Li, D. I. Wu, H. Jia, C. Zheng, L. Ren, and Z. Fan, "COX-2 silencing enhances tamoxifen antitumor activity in breast cancer in vivo and in vitro," pp. 1385–1393, 2014.
- [144] J. Karavitis, L. M. Hix, Y. H. Shi, R. F. Schultz, and K. Khazaie, "Regulation of COX2 Expression in Mouse Mammary Tumor Cells Controls Bone Metastasis and PGE2- Induction of Regulatory T Cell Migration," vol. 7, no. 9, pp. 1–11, 2012.
- [145] Z. Wang, Q. Cheng, K. Tang, Y. Sun, K. Zhang, Y. Zhang, S. Luo, H. Zhang, D. Ye, and B. Huang, "Lipid mediator lipoxin A4 inhibits tumor growth by targeting IL-10-producing regulatory B (Breg) cells," *Cancer Lett.*, vol. 364, no. 2, pp. 118–124, 2015.
- [146] H. Hao, M. Liu, P. Wu, L. Cai, K. Tang, P. Yi, Y. Li, Y. Chen, and D. Ye, "Lipoxin A4 and its analog suppress hepatocellular carcinoma via remodeling tumor microenvironment," *Cancer Lett.*, vol. 309, no. 1, pp. 85–94, 2011.
- [147] L. Zong, J. Li, X. Chen, K. Chen, W. Li, X. Li, L. Zhang, W. Duan, J. Lei, Q. Xu, T. Shan, Q. Ma, and H. Sun, "Lipoxin A4 Attenuates Cell Invasion by Inhibiting ROS/ERK/MMP Pathway in Pancreatic Cancer," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2016, 2016.
- [148] S. A. Glynn, R. L. Prueitt, L. A. Ridnour, B. J. Boersma, T. M. Dorsey, D. A.

Wink, J. E. Goodman, H. G. Yfantis, D. H. Lee, and S. Ambs, "COX-2 activation is associated with Akt phosphorylation and poor survival in ER-negative, HER2-positive breast cancer.," *BMC Cancer*, vol. 10, no. 1, p. 626, 2010.

[149] Q. Liu, W. Yuan, D. Tong, G. Liu, and W. Lan, "Metformin represses bladder cancer progression by inhibiting stem cell repopulation via COX2 / PGE2 / STAT3 axis," *Oncotarget*, vol. 7, no. 19, 2016.

[150] D. Tong, Q. Liu, G. Liu, J. Xu, W. Lan, Y. Jiang, H. Xiao, D. Zhang, and J. Jiang, "Metformin inhibits castration-induced EMT in prostate cancer by repressing COX2 / PGE2 / STAT3 axis," *Cancer Lett.*, vol. 389, pp. 23–32, 2017.