



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Efeito anti-tumoral da metformina: caracterização da morte celular por piroptose e da modulação de parâmetros carcinogênicos em células de hepatocarcinoma (HCC)

Gabriel Henrique da Mota Araujo

Orientadora:

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília
Março, 2021



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Gabriel Henrique da Mota Araujo

Efeito anti-tumoral da metformina: caracterização da morte celular por piroptose e da modulação de parâmetros carcinogênicos em células de hepatocarcinoma (HCC)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular,
para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Orientadora:

Profa. Dra. Kelly Grace Magalhães

Brasília
Março, 2021

Gabriel Henrique da Mota Araujo

Efeito anti-tumoral da metformina: caracterização da morte celular por piroptose e da modulação de parâmetros carcinogênicos em células de hepatocarcinoma (HCC)

Data: 05 de Março de 2021

Banca Examinadora

Prof.^a Dra. Kelly Grace Magalhães (Presidente)

Programa de Pós-graduação de Biologia Molecular- Universidade de Brasília

Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araujo (Membro)

Programa de Pós-graduação de Patologia Molecular- Universidade de Brasília

Prof. Dra. Letícia Batista Azevedo Rangel (Membro Ext.)

Programa de Pós-graduação de Bioquímica e Farmacologia - Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dra. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato (Suplente)

Programa de Pós-graduação de Nutrição - Universidade de Brasília

Agradecimentos

Antes de tudo, gostaria de agradecer a Deus por todas as bênçãos concedidas e oportunidades dadas como a de realização deste projeto.

Agradeço imensamente à Professora Kelly, seja por sua paciência, por sua dedicação e pelos conselhos dados, bem como por ser uma brilhante cientista, que sem dúvida é uma grande referência para mim e para todos que a conhecem como pessoa e pela profissional que é. Sua orientação foi fundamental para que eu pudesse desenvolver e finalizar esse projeto. Obrigado por toda confiança depositada, pelos momentos de apoio e por todo carinho. Todos os elogios e críticas dadas, foram e serão para sempre pilares em minha construção como indivíduo e como profissional.

Agradeço aos meus pais, Nilson e Dunalva, por me apoiarem incondicionalmente em todas as escolhas que faço, por sempre estarem ao meu lado e por toda a ajuda que me deram durante todos esses anos. Sem vocês, o caminho que escolhi nunca poderia ter sido trilhado, amo vocês de todo meu coração. Obrigado por embarcarem comigo nesta jornada. Agradeço também a minha caçula Júlia por todo carinho e amor.

Estendo meus agradecimentos a toda minha família, ao meu primo Matheus por sempre ser um companheiro e amigo ao longo desses anos, aos meus tios Amarildo, Alcy, Elza, Orlando, obrigado Angélica, Andréia, aos meus avós, Marly, Nilson, Pedro e Carolina por trazerem conselhos, amor e alegria. Obrigado a todos que estiveram sempre ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos Arthur, Matheus, Filipe, Lucas, Gabrielle e Bruna por fazerem parte da minha vida. Aos meus amigos desde a época de graduação Alexandre, Nathasha, Giovanna e Joyce, por todos os momentos vividos, agradeço também a minha grande amiga Letícia que esteve sempre ao meu lado em bons e ruins momentos. E a todos aqueles que passaram e que de alguma forma, fizeram parte de minha vida.

Agradeço de forma especial a Nathalia por ter se tornado minha grande companheira, por sempre estar ao meu lado e por me apoiar, a agradeço pelos conselhos dados e por me permitir estar ao seu lado sempre me trazendo alegrias, por não me deixar abalar pelos problemas e a não desanimar, trazendo palavras de conforto e carinho.

Obrigado Dalila e Luís por toda a ajuda, conselhos, por todo apoio que tive e pela amizade que sempre encontrei em vocês. Agradeço imensamente ao Igor, Pasquarelli, Raquel e também a todos os demais os integrantes do LIMI, Rafael, Gabriella, Heloísa, Gabriel Ribeiro, Sabrina, Milena, Débora, Luana, Ana e aos ex-integrantes, Tiago e Lívia. Gostaria de agradecer também aos colegas do GPRO, do LIA e do LAMP e aos integrantes da microscopia e da Biofísica pelo apoio e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Agraço ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular por ter possibilitado que realizasse esse trabalho, a todos professores, a todos os funcionários do Programa de Patologia Molecular, bem como a todos os demais funcionários que permitem com que a Universidade funcione devidamente, à Universidade de Brasília e às agências de fomento CNPq e FAPDF pelo suporte financeiro prestado.

Sumário

1.	
1.1.	Câncer 16
1.2.	Hepatocarcinoma 19
1.3.	Inflamação e Câncer 20
1.4.	Morte Celular 21
1.5.	Piroptose..... 22
1.6.	Metformina 25
2.	Justificativa 27
3.	Objetivos 28
3.1.	Objetivo geral 28
3.2.	Objetivos específicos 28
4.	Metodologia 29
4.1.	Cultivo Celular e Estímulos..... 29
4.2.	Viabilidade Celular 29
4.3.	Perfil de Morte Celular 30
4.4.	Proliferação Celular 30
4.5.	Ciclo Celular 31
4.6.	Clonogênico..... 32
4.7.	Biogênese de corpúsculos lipídicos..... 32
4.8.	Acidificação Lisossomal..... 32

4.9. Detecção de Pro caspase-1 e caspase-3	33
4.10. Ativação de caspase-1	34
4.11. Detecção de Gasdermina D.....	35
4.12. Detecção de LDH.....	36
4.13. Formação de poros na membrana plasmática	36
4.14. Análise da translocação de HMGB1.....	37
4.15. Secreção de Citocinas.....	37
4.16. Análises Estatísticas.....	38
5. Resultados.....	39
5.1. Análise de viabilidade celular.....	39
5.2. Análise do perfil de morte celular.....	42
5.3. Proliferação celular.....	44
5.4. Análise do Ciclo Celular	46
5.5. Clonogênico.....	48
5.6. Biogênese de corpúsculo lipídico	50
5.7. Acidificação lisossomal	52
5.8. Detecção de Pro-caspase-1, Caspase-3 e ativação de caspase-1	54
5.9. Detecção de Gasdermina D	56
5.10. Secreção de LDH	58
5.11. Formação de poros	60
5.12. Translocação de HMGB1.....	62
5.13. Análise da secreção de citocinas.....	64

6. Discussão.....	67
7. Conclusão.....	73
8. Referências.....	75

Efeito anti-tumoral da metformina: caracterização da morte celular por piroptose e da modulação de parâmetros carcinogênicos em células de hepatocarcinoma (HCC)

Resumo

Dissertação de Mestrado

Gabriel Henrique da Mota Araujo

A metformina é uma biguanida, que atua como hipoglicemiante oral e é o fármaco de primeira escolha usada principalmente para tratar a diabetes tipo 2. No entanto, o uso deste medicamento está associado à diminuição do risco no desenvolvimento de muitas patologias, incluindo vários tipos de câncer. Além das suas ações inibitórias sobre a proliferação, essa biguanida também pode favorecer a morte celular de muitos tipos de câncer. O carcinoma hepatocelular (HCC) é um dos tipos de tumor mais comuns e mortais e está altamente associado a outras doenças crônicas. No entanto, pouco se sabe sobre a ação da metformina no carcinoma hepatocelular. Para esse fim, o objetivo deste estudo foi investigar se a metformina induz a morte celular piroptótica em hepatócitos tumorais (Hepa 1c1c7) e se modula parâmetros carcinogênicos *in vitro*. Nossos resultados indicaram que a metformina induz citotoxicidade sobre células de câncer de fígado murino (Hepa), favorecendo a ocorrência de morte lítica sobre essas células, a formação de poros na membrana, liberação de lactato desidrogenase (LDH), ativação de caspase-1 e caspase-3, ativação de HMGB1, bem como a clivagem de Gasdermina D (GSDMD). Além disso, observamos que a metformina inibe a progressão do ciclo celular, a proliferação destas células e a formação de colônias em células Hepa 1c1c7. A metformina também aumentou os níveis de acidificação lisossomal e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α . A biguanida não alterou os níveis de corpúsculos lipídicos (CL). Portanto, conclui-se que a biguanida metformina induz morte celular piroptótica, modulando também diversos parâmetros celulares e carcinogênicos em células de hepatocarcinoma.

The anti-tumoral effect of metformin:
Characterization of cell death by pyroptosis and modulation of carcinogenic parameters in
hepatocarcinoma cells (HCC)

Abstract

Dissertação de Mestrado

Gabriel Henrique da Mota Araujo

Metformin is a biguanide, which acts as an oral hypoglycemic and is the drug of choice used primarily to treat type 2 diabetes. However, the use of this medication is associated with a decreased risk of developing many pathologies, including various types of cancer. Due to its inhibitory actions on proliferation, angiogenesis, metastasis and metformin can favor cell death in many models of cancer. Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common and deadly types of tumor, and is highly associated with other chronic diseases. However, little is known about the action of metformin in hepatocellular carcinoma. To that end, the aim of this study was to investigate whether metformin induces pyroptotic cell death in tumor hepatocyte lines (Hepa 1c1c7) and modulates carcinogenic parameters in vitro. Our results indicated that Metformin induces cytotoxicity in murine liver cancer cells (Hepa), favoring the occurrence of lytic death in these cells, the formation of pores in the cell membrane, release of Lactate Dehydrogenase (LDH), activation of caspase-1 and caspase-3, activation of HMGB1, as well as the cleavage of Gasdermin D (GSDMD). In addition, we observed that metformin inhibits the progression of the cell cycle, proliferation of these cells and formation of colonies in Hepa 1c1c7 cells. Metformin also increased the levels of lysosomal acidification and the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α . This biguanide did not change the levels of lipid droplets (LD) biogenesis. Therefore, it is concluded that the biguanide metformin induces pyroptotic cell death, also modulating several cellular and carcinogenic parameters in hepatocarcinoma cells.

Lista de abreviaturas, acrônimos, siglas e símbolos

μL	Microlitros
μM	Micromolar
AGL	Ácidos graxos livres
AML-12	Hepatócito murino não tumoral
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Kinase dependente de AMP
B16F10	Células de câncer de pele
BCA	Ácido bicinchonínico
CARD	Domínio de recrutamento de caspases
CA074	Inibidor de catepsina B
CFSE	Carboxifluoresceína succinimidil ester
DAMP	Padrão Molecular associado a dano
DAPI	4',6'-diamino-2-fenil-indol
dH ₂ O	Água destilada
DHGNA	Doenças hepáticas gordurosas não alcóolicas
DMEM	Meio <i>Dulbecco's Modified Eagle's</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E2H2	Potencializador de zeste homólogo 2
F12	Meio <i>Ham's Nutrient Mixture</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gli	Gliburídeo
GSDMD	Gasdermina D
H	Hora
H3K27	Metiltransferase de histona 3 lisina 27
HCC	Carcinoma hepatocelular
Hepa 1c1c7	Hepatócito murino tumoral
HIF1α	Fator induzido por hipoxia 1α
HMGB1	Proteína do grupo de alta mobilidade B1
JSH-23	Inibidor de NF-κB
IL-18	Interleucina 18
IL-1β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
LDH	Lactato Desidrogenase
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	Morte celular programada
MEM-α	Meio <i>Minimal Essential Medium</i>
MFI	Média de intensidade de fluorescência
mM	Milimolar
mTOR	Alvo de mamíferos da rapamicina
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio
NAC	Acetilcisteína (N-Acetil-L-cisteína)
NFκB	Fator nuclear κB

nm	Nanômetro
PAMP	Padrão Molecular associado a patógeno
PBS	Tampão fosfato-salino
PFA	Paraformaldeído
PRR	Receptor de reconhecimento padrão
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SLC22A1	Transportador hepático de metformina
SFB	Soro fetal bovino
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
UNS	Não estimulado
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHO	Organização mundial da Saúde
Y-VAD	Inibidor de caspase-1
Z-VAD	Inibidor Pan caspase

Lista de Figuras e Legendas

1. Figuras.....
1.1.Figura 1: Diagrama esquemático que ilustra a formação de poros GSDMD-N dependente de PI (4,5) P2 na membrana plasmática que permite a liberação de IL-1 β no espaço extracelular.....	23
1.2.Figura 2: Modelo de ativação do inflamassoma canônico e morte celular inflamatória.....	24
1.3.Figura 3: Mecanismo de ação da metformina sobre o hepatócito.....	27
1.4.Figura 4: Metformina diminui viabilidade de células de câncer de fígado	41
1.5.Figura 5: A Metformina induz morte com perda de integridade de membrana em células Hepa.....	43
1.6.Figura 6: A Metformina inibe a proliferação de células tumorais.....	45
1.7.Figura 7: A Metformina inibe a progressão do ciclo celular em células Hepa.....	47
1.8.Figura 8: Metformina inibe a formação de colônias nas células tumorais.....	49
1.9. Figura 9: Metformina não induz biogênese de corpúsculos lipídicos em células hepáticas.....	51
1.10. Figura 10: Metformina induz acidificação lisossomal.....	53
1.11. Figura 11: Metformina induz a ativação de caspase-1 em células de câncer de fígado.....	55
1.12. Figura 12: Metformina induz a clivagem de Gasdermina D em células de câncer.....	57
1.13. Figura 13: Metformina induz a secreção de Lactato Desidrogenase em células de câncer de fígado.....	59

1.14. Figura 14: Metformina induz formação de poros na membrana plasmática de células Hepa.....	61
1.15. Figura 15: Metformina induz a translocação de HMGB1 em células de câncer de fígado.....	63
1.16. Figuras 16-17: A metformina induz secreção de citocinas pró-inflamatórias.....	65-66
1.17. Figura 18: Proposta de mecanismo de ação da metformina sobre hepatócitos tumorais.....	74

Lista de Tabelas

1. Tabela

1.1 Tabela 1.: Incidência, mortalidade e prevalência de câncer no mundo em 2018.....16

1. Introdução

1.1 Câncer

O câncer, comumente chamado de neoplasia maligna, é a denominação dita para um vasto grupo de doenças, as quais podem se iniciar em qualquer tecido ou órgão do corpo, a partir do crescimento anormal e desordenado das células, não somente proliferação desordenada, mas também sob a viabilidade celular de subclones de células na massa tumoral, que podem possuir a habilidade de invasão para demais tecidos adjacentes. As células tumorais podem alcançar a circulação e invadir outros órgãos, num processo denominado de metástase, a qual é uma das principais causas de morte por câncer, segundo a Organização Mundial da Saúde (do inglês World Health Organization – WHO, 2018).

Apenas no ano de 2020, ocorreram cerca de 830 mil mortes em decorrência de neoplasias malignas no fígado, sendo o câncer a segunda principal causa de morte em todo o mundo, ficando atrás apenas das mortes por doenças coronarianas (Sung et al., 2021). Cerca de 9,6 milhões de pessoas padeceram em 2018 em decorrência de complicações pela doença. Dentre os tipos mais comuns de câncer, os de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os mais comuns em homens, enquanto que os de mama, câncer colorretal, pulmonar, cervical e tireoide são os mais frequentes entre as mulheres (Ferlay et al., 2015).

Tabela 1. Incidência, mortalidade e prevalência de câncer no mundo em 2018.

Cancer	New cases				Deaths				5-year prevalence (all ages)	
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Prop.
Lung	2 093 876	1	11.6	2.75	1 761 007	1	18.4	2.22	2 129 964	27.91
Breast	2 088 849	2	11.6	5.03	626 679	4	6.6	1.41	6 875 099	181.78
Prostate	1 276 106	3	7.1	3.73	358 989	8	3.8	0.60	3 724 658	96.73
Colon	1 096 601	4	6.1	1.31	551 269	5	5.8	0.54	2 785 583	36.49
Stomach	1 033 701	5	5.7	1.31	782 685	2	8.2	0.95	1 589 752	20.83
Liver	841 080	6	4.7	1.08	781 631	3	8.2	0.98	675 210	8.85
Rectum	704 376	7	3.9	0.91	310 394	10	3.2	0.35	1 876 453	24.58
Oesophagus	572 034	8	3.2	0.78	508 585	6	5.3	0.67	547 104	7.17
Cervix uteri	569 847	9	3.2	1.36	311 365	9	3.3	0.77	1 474 265	38.98
Thyroid	567 233	10	3.1	0.68	41 071	25	0.43	0.05	1 997 846	26.17
Bladder	549 393	11	3.0	0.65	199 922	14	2.1	0.18	1 648 482	21.60
Non-Hodgkin lymphoma	509 590	12	2.8	0.61	248 724	12	2.6	0.27	1 353 273	17.73
Pancreas	458 918	13	2.5	0.55	432 242	7	4.5	0.50	282 574	3.70
Leukaemia	437 033	14	2.4	0.48	309 006	11	3.2	0.33	1 174 433	15.39
Kidney	403 262	15	2.2	0.52	175 098	17	1.8	0.20	1 025 730	13.44
Corpus uteri	382 069	16	2.1	1.01	89 929	21	0.94	0.21	1 283 348	33.93
Lip, oral cavity	354 864	17	2.0	0.46	177 384	16	1.9	0.23	913 514	11.97
Brain, nervous system	296 851	18	1.6	0.36	241 037	13	2.5	0.30	771 110	10.10
Ovary	295 414	19	1.6	0.72	184 799	15	1.9	0.45	762 663	20.17
Melanoma of skin	287 723	20	1.6	0.35	60 712	23	0.64	0.07	965 623	12.65
Gallbladder	219 420	21	1.2	0.25	165 087	18	1.7	0.18	233 820	3.06
Larynx	177 422	22	0.98	0.25	94 771	20	0.99	0.13	488 900	6.41
Multiple myeloma	159 985	23	0.88	0.20	106 105	19	1.1	0.12	376 005	4.93
Nasopharynx	129 079	24	0.71	0.16	72 987	22	0.76	0.10	362 219	4.75
Oropharynx	92 887	25	0.51	0.13	51 005	24	0.53	0.07	280 508	3.68
Hypopharynx	80 608	26	0.45	0.11	34 984	26	0.37	0.05	119 130	1.56
Hodgkin lymphoma	79 990	27	0.44	0.08	26 167	27	0.27	0.03	275 947	3.62
Testis	71 105	28	0.39	0.14	9 507	34	0.10	0.02	284 073	7.38
Salivary glands	52 799	29	0.29	0.06	22 176	29	0.23	0.03	123 460	1.62
Anus	48 541	30	0.27	0.06	19 129	31	0.20	0.02	127 599	1.67
Vulva	44 235	31	0.24	0.09	15 222	32	0.16	0.03	132 269	3.50
Kaposi sarcoma	41 799	32	0.23	0.04	19 902	30	0.21	0.02	88 379	1.16
Penis	34 475	33	0.19	0.09	15 138	33	0.16	0.04	93 850	2.44
Mesothelioma	30 443	34	0.17	0.04	25 576	28	0.27	0.03	31 250	0.41
Vagina	17 600	35	0.10	0.04	8 062	35	0.08	0.02	43 877	1.16
All cancer sites	18 078 957	-	-	20.20	9 555 027	-	-	10.63	43 841 302	574.38

Taxas de mortalidade por tipos de câncer no ano de 2018 mostram o câncer de fígado como o 6º tipo com maior prevalência e o 30º no índice de mortalidade. Fonte: WHO – Organização Mundial da Saúde.

O câncer continua a ter sua incidência aumentada globalmente, assim como os gastos financeiros sobre os indivíduos acometidos, além de causar diversas complicações emocionais e familiares aos envolvidos (Woźniak and Izycki, 2014). Estima-se que cerca de 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa renda, onde há carência de acesso aos exames, diagnóstico e também a escassez de recursos para tratamento. Além dos impactos emocionais e físicos que o câncer gera, interfere também na escala financeira global. Estudos realizados em 2010 referentes às movimentações financeiras decorrentes do câncer, apontaram gastos com tratamento e diagnósticos de aproximadamente US \$ 1,16 trilhões (WHO, 2018).

Evidências epidemiológicas indicam que diversos fatores podem estar associados ao aumento na incidência de neoplasias malignas, tais como o hábito de uso de tabaco, falta de atividades físicas, consumo exagerado de bebidas alcoólicas, má alimentação, obesidade, infecções virais, bem como outros fatores como exposição solar excessiva e outros. Embora fatores externos ao organismo sejam fatores de risco para o desenvolvimento da doença, alguns processos internos como envelhecimento e mutações contribuem significativamente para o número de casos de neoplasias malignas (Pereira, 2016). Mutações se referem a modificação na sequência de nucleotídeos que compõe um gene (Hanahan and Weinberg, 2011). É fundamental também a taxa de divisão celular que é influenciada por hormônios, crescimento celular e inflamação, fatores que podem determinar lesões no DNA e mutações possivelmente resultando em alterações genéticas que podem promover o estabelecimento tumoral (Blackadar, 2016).

Os principais pontos pelos quais se desencadeiam o desenvolvimento das neoplasias malignas estão na perda da regulação da divisão celular e no descontrole da morte celular, o que pode ocasionar uma produção de massas celulares e posteriormente a metástase (Chaffer, 2011). Nas neoplasias, o processo metastático das células tumorais se caracteriza como a principal causa de óbito entre as pessoas que o desenvolvem (Pikala and Maniecka-Bryła, 2014). As alterações durante o processo de manutenção da angiogênese, a invasão e a capacidade de migração desses tumores favorecem o processo de metástase. Uma vez essas células mutadas dispersas para demais órgãos, via corrente sanguínea ou vasos linfáticos, sua disseminação pelo corpo pode comprometer a homeostase funcional dos órgãos e tecidos invadidos, acarretando na perda funcional e potencialmente ao óbito (Chambers et al., 2002).

As mutações associadas às neoplasias ou ao recrutamento de fatores aberrantes representam oportunidades emergentes para a terapia de câncer. Por exemplo, os

inibidores da EZH2 - uma metiltransferase de histona 3 lisina 27 (H3K27), a qual é super expressa em vários tumores sólidos e é o local de mutações recorrentes de ganho de função no linfoma, estão despertando considerável interesse como potenciais agentes anti-câncer e foram avançados recentemente para testes clínicos (Shah et al., 2014).

O motivo pelo qual essas modificações fenotípicas ocorrem nas células tumorais, residem no fato do acarretamento de mutações ou alterações epigenéticas que podem modificar a expressão, amplificação, e a função dos mesmos, que podem alterar a expressão de genes somáticos. As principais razões que influenciam no processo de alteração das células normais em células neoplásicas são os de divisão e morte celular, e erros nos mecanismos de reparo do DNA que se tornam inoperantes ou ineficientes nas células tumorais, bem como modificações de proto-oncogenes, responsáveis pelo crescimento celular, que levam ao aparecimento de oncogenes, que podem vir a exercer um papel no aumento da produção de fatores de crescimento (Weinstein and Joe, 2006). Mutações em genes supressores de tumor, que diferente dos proto-oncogenes, são encontrados em todas as células do corpo, também podem ocasionar alterações nesses pontos de controle de crescimento e morte celular, como no gene p53, que é encontrado de forma modificada em cerca de 50% dos cânceres em humanos, e é responsável por funções como parada na divisão celular realizando reparos em possíveis erros no DNA, bem como induz morte em células através do processo apoptótico. Logo alterações nesse gene podem ocasionar mutações que levam ao processo neoplásico (Sun and Yang, 2010).

Atualmente as principais abordagens terapêuticas contra o câncer mais utilizadas são a quimioterapia, a radioterapia, a imunoterapia e combinações destas. Porém, em muitos casos, essas abordagens se mostram ineficientes ou mesmo tóxicas aos pacientes (Luo et al., 2019). Contudo, um fato que tem se tornado preocupante aos profissionais da área de saúde, é a alta recorrência de algumas neoplasias malignas, relacionada a micrometástases, como é observado em alguns pacientes com HCC (Simard et al., 2013). E além disso, também observa-se a crescente resistência às drogas convencionais utilizadas nos tratamentos anti-câncer que diversas neoplasias tem adquirido, e tal fato tem como resultado o favorecimento do processo metastático (Valastyan and Weinberg, 2011).

Estudos recentes, também mostram que a ineficiência das terapias convencionais atualmente empregadas na busca pelo tratamento do câncer, relacionadas a resistência tumoral, pode ser mediada por mecanismos de inibição de morte celular, modificações

no metabolismo da droga, alterações epigenéticas e no alvo da droga, aumento no processo de reparo de DNA e amplificação gênica (Mansoori et al., 2017).

1.2 Hepatocarcinoma

O câncer de fígado está entre os cinco subtipos mais agressivos do mundo e apresenta uma alta taxa de mortalidade já em seu primeiro ano de desenvolvimento. Estudos mostram que o câncer de fígado já foi a segunda maior causa de morte nos homens (Ferlay et al., 2015). Os carcinomas hepatocelulares (HCC) abrangem entre 70-80% dos cânceres no fígado. Embora os recentes avanços clínicos para o tratamento do câncer, o HCC continua sendo um dos cânceres mais difíceis de tratar. A cirurgia, terapias destrutivas locais e transplante de fígado continuam sendo as indicações mais utilizadas para o enfrentamento da doença. No entanto, a recorrência do HCC continua a ser um empecilho para a completa resolução da doença, atingindo uma incidência de mais de 70% em 5 anos (Llovet et al. 2005). O tratamento para esse tipo de tumor ainda não é completamente efetivo, apresentando alto quimioresistência e há um alto índice de metástase, do fígado para outros órgãos, tendo uma maior taxa de metástase para órgãos adjacentes, como pâncreas, estômago, cólon e reto (Llovet et al., 2008).

A distribuição geográfica e as taxas de mortalidade do HCC são heterogeneamente distribuídas bem como existe uma maior incidência deste tipo de câncer na população masculina. Este fato é observado em quase todas as regiões, como na Europa Central, que apresenta registros de incidência de quatro a cinco vezes maiores entre a população masculina em relação às mulheres (Bosetti et al., 2014). A discrepante diferença de gênero nas taxas ainda não são bem compreendidas, mas especula-se que estejam relacionadas aos fatores de risco mais prevalentes entre os comportamentos masculinos, bem como as diferenças nos hormônios esteroides sexuais e a exposição a hepatites virais (He et al., 2010).

O desenvolvimento do HCC usualmente ocorre em ambientes onde já existem sinais de doenças crônicas, muitas vezes relacionadas a infecções pelo vírus da hepatite ou ao abuso de álcool (Marengo et al., 2016). Entretanto, tem crescido o número de casos onde doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (DHGNA) se apresentam como gatilho para o desenvolvimento de HCC não relacionados a vírus (Marrero et al., 2002). Outro tipo de câncer de fígado, o colangiocarcinoma, é raro na maioria das partes do

mundo, mas apresenta altas taxas na Tailândia e em outras partes da Ásia devido às infecções no fígado (Shin et al., 2010).

Estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes países mostraram o desenvolvimento de HCC também está relacionado à DHGNA em um terço dos pacientes analisados (Tokushige et al., 2011). Os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de HCC associado à cirrose já estão bem descritos. Porém, os mecanismos que relacionam como DHGNA favorecem o aparecimento de HCC ainda estão sendo elucidados e apontam para fatores que envolvem a resistência a insulina, esteatose hepática e inflamação do tecido adiposo presente no microambiente hepático (Vanni and Bugianesi, 2014).

1.3 Inflamação e Câncer

Para o estabelecimento do câncer de fígado moléculas como leptina, adiponectina, TNF- α e IL-6 exercem um importante papel (Jiang et al., 2014). A leptina pode regular o crescimento de HCC agindo em células endoteliais, promovendo a proliferação celular e a angiogênese. Aumentos nos níveis de leptina induzem também uma maior migração e invasividade tumoral (Saxena et al., 2007). O tratamento com adiponectina diminuiu o crescimento tumoral de HCC e a infiltração de macrófagos, e portanto, baixos níveis de adiponectina são mais favoráveis ao desenvolvimento tumoral (Man et al., 2010). Camundongos com elevados níveis de IL-6 apresentaram uma maior progressão tumoral (Maione et al., 1998), assim como diferentes níveis de TNF- α influenciam diretamente a viabilidade e proliferação de hepatócitos, através da ativação do fator de transcrição NF κ B (Jiang et al., 2014). Portanto, a inflamação possui um papel crucial para o estabelecimento e a progressão tumoral.

A inflamação pode ser iniciada pelos inflamassomas e a ativação dos inflamassomas dependente de caspase-1 está intimamente relacionada à progressão de vários tumores (Kolb et al., 2014). O inflamassoma NLRP3 apresenta um importante e complexo papel no contexto imunológico, atuando na linha de frente no combate a infecções pela imunidade inata (He et al., 2016). O inflamassoma NLRP3 compreende três bases funcionais, a primeira, a região NOD de regulação, localizada na posição central, a segunda seria uma região N-terminal efetora envolvida no processo de sinalização, e esta presente nessa região um domínio pirina (PYD), um domínio responsável pelo recrutamento de caspase (CARD), ou um domínio inibidor de

baculovírus (BIR); e por último, a região C-terminal que é composta por repetições ricas em leucina (LRRs).

Para que haja a montagem e ativação correta do inflamassoma, dois sinais são necessários para a eficiente maturação de IL-1 β e IL-18. O primeiro sinal consiste da sinalização por PRRs que induzam à ativação do fator de transcrição NF- κ B, promovendo a transcrição de pró-IL-1 β e pró-IL-18; o segundo sinal, consiste no processamento proteolítico desses precursores em suas formas biologicamente ativa via caspase-1, a qual é ativada pelo inflamassoma. Após a ativação, a proteína NLRP3 interage com ASC via PYD, e o domínio CARD da proteína adaptadora ASC recruta o domínio CARD da pró-caspase-1 para formar o complexo NLRP3-ASC-pró-caspase-1, também chamado de inflamassoma NLRP3, e caracterizado como a via canônica de montagem do inflamassoma NLRP3 (Latz et al., 2013).

Essa resposta mediada por caspase-1 pode atrair e ativar outras células imunológicas, aumentar a inflamação no microambiente tumoral e por consequência, afetar a progressão tumoral bem como a indução de metástases. Em linhagens de HCC, foi mostrado que a ativação de caspase-1 induzida por HMGB1, um clássico sinal de perigo celular, estava relacionado ao aumento da capacidade de invasão celular das linhagens tumorais (Yan et al., 2012).

1.4 Morte Celular

Diversos estudos evidenciaram experimentalmente que a morte celular não é apenas um processo inevitável ao final da vida de cada célula, mas também atua como um conjunto de mecanismos geneticamente codificados para a eliminação direcionada de fluidos, moléculas irreversivelmente danificados ou potencialmente prejudiciais, bem como a resolução contra patógenos e células tumorais (Miao et al., 2010; Fuchs and Steller, 2015; Bebbber et al., 2020)

Os processos de morte celular podem ocorrer de duas maneiras: morte celular programada e morte celular acidental. A morte celular programada necessita da ativação do maquinário celular e de moléculas codificadas geneticamente, para que algum dos tipos de morte programa possam ocorrer. Temos por exemplo de morte celular programada a apoptose, a necroptose e piroptose. Em contraste, a morte acidental ocorre como consequência de injúrias, sejam elas químicas ou físicas, e ocorrem de forma

independente as vias de sinalização, como a necrose (Fearhead et al., 2017). A morte celular pode ser induzida em resposta a diferentes estresses, principalmente ao estresse oxidativo e à perda do controle sobre um único ou mais de um tipo de morte celular e pode contribuir para o estabelecimento de doenças humanas como câncer, neurodegeneração, doenças autoimunes e doenças infecciosas (Linkermann et al., 2014).

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que muitas novas formas de morte celular programa (MCP) foram identificadas, dentre eles estão incluídos a necroptose, piroptose, ferroptose, morte celular entótica, morte celular netótica, partanatos, morte celular dependente de lisossomo, autofagia, alcaliptose e a oxeiptose são as diversas mortes programadas descritas até o momento (Tang et al., 2019). Dentre as MCP's, sabe-se que elas podem ser consideradas líticas ou não-líticas, a depender da via de sinalização ativada (Jorgensen et al., 2017). As mortes líticas estão associadas a uma alteração na membrana celular, ao extravasamento e/ou à liberação de diversas proteínas e compostos químicos do citosol e núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria e citosol celulares. Essas moléculas são chamadas de cDAMPs (*cell death-associated molecular-patterns*) DAMPs (*Damage-associated molecular patterns*) e alarminas (Sangiuliano et al., 2014). Compostos estes, que podem ser secretados a partir da formação dos poros, e se ligarem a receptores adjacentes (LaRock and Cookson, 2013).

1.5 Piroptose

A piroptose é uma morte celular programada mediada pelas caspases inflamatórias (Caspases-1, -4, -5 em humanos e -11 em camundongos) ativadas pelos complexos de inflamassomas, que levam à formação de poros na membrana (Sborgi et al., 2016). Os poros característicos da piroptose são formados na membrana celular pela proteína efetora da piroptose, conhecida como Gasdermina D (GSDMD), a qual é o substrato mais importante na piroptose, validado experimentalmente, dentre todas as cascatas inflamatórias (Shi et al., 2015). A GSDMD, ao se clivar, oligomeriza-se na membrana celular e leva à geração de poros característicos da piroptose (Ding et al., 2016).

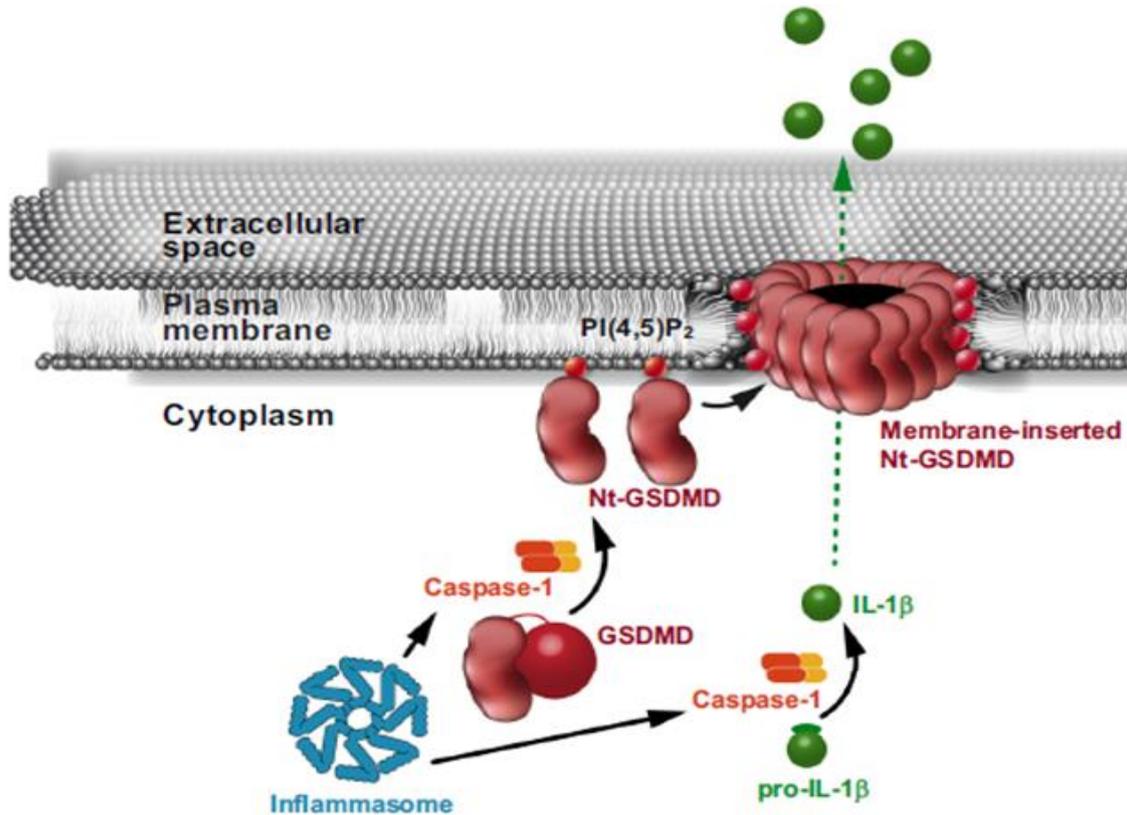


Figura 1: Diagrama esquemático que ilustra a formação de poros GSDMD-N dependente de PI (4,5) P2 na membrana plasmática que permite a liberação de IL-1 β no espaço extracelular. Brough, D., Pelegrin, P. & Nickel, W., 2017. An emerging case for membrane pore formation as a common mechanism for the unconventional secretion of FGF2 and IL-1 β . Journal of Cell Science, p.jcs.204206

Sabe-se também que a piroptose pode ser induzida de duas maneiras distintas, por sua via canônica e pela via não-canônica. A via canônica é ativada a partir do reconhecimento de DAMP's e PAMP's (padrões moleculares associados a patógenos) pelos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) que então induzem à formação dos complexos multiprotéicos, inflamassomas, responsáveis por formarem uma plataforma que permite o recrutamento e ativação das moléculas de caspase-1 (Elliott and Sutterwala, 2015). A caspase-1 é responsável pela clivagem e ativação de IL- β e IL-18 as quais são secretadas para o citosol assim como pela clivagem e pela ativação da porção efetora N-terminal da GSDMD que se oligomeriza na membrana da célula Fig 1. Essa interação ocorre a partir da interação da GSDMD com cardiolipinas e fosfatidilinosídeos, e permite a formação do poro de cerca de 15 nm de diâmetro (Aglietti et al., 2016).

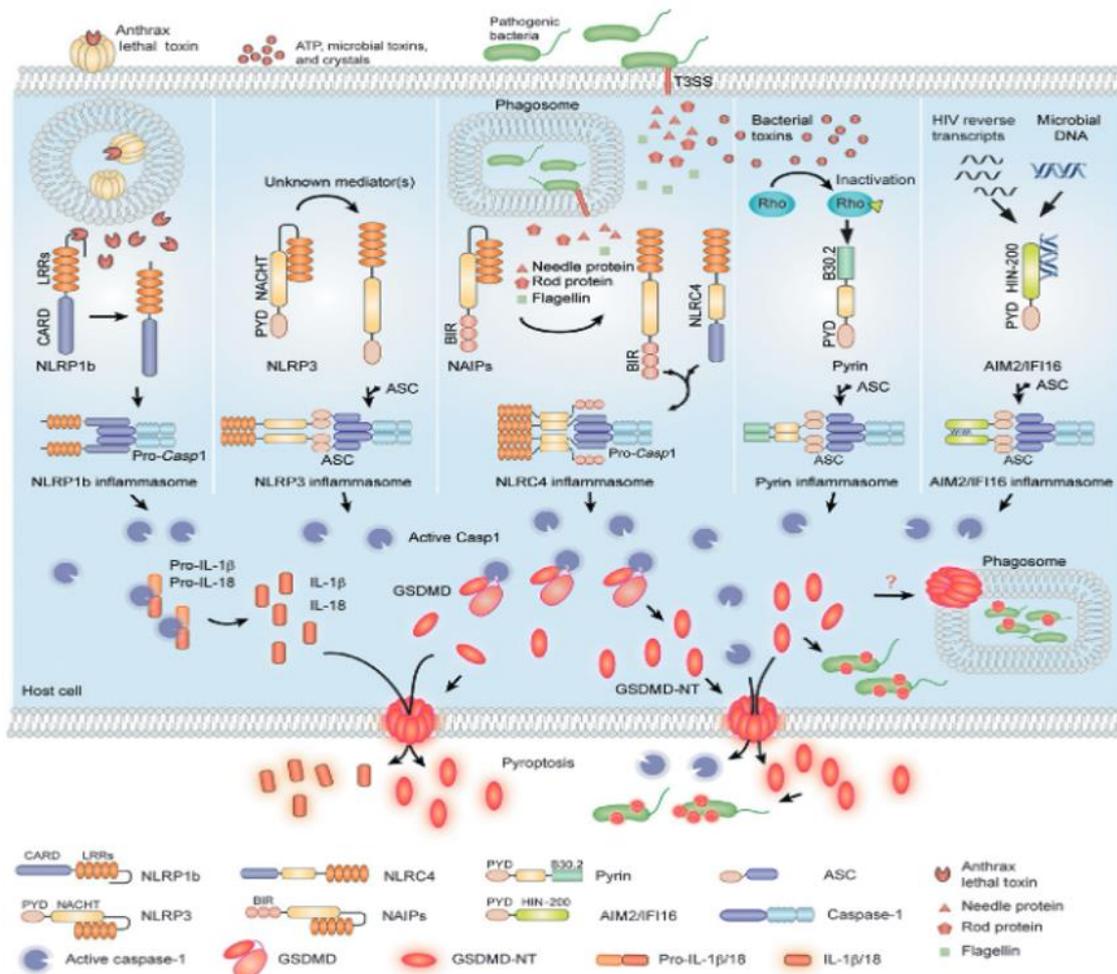


Figura 2: Modelo de ativação do inflamassoma canônico e morte celular inflamatória. Xing Liu, Judy Lieberman, 2011, A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection, Program in Cellular and Molecular Medicine, Boston Children’s Hospital, Harvard Medical School, pp. 82-110.

Em contrapartida, a via não-canônica é mediada a partir da interação do lipossacarídeo (LPS) citoplasmático e a caspase-11 em murinos, tendo como seus ortólogos as caspase-4 e caspase-5 em humanos. Uma vez que ocorre a detecção do LPS pela caspase-11, através do domínio CARD da caspase, esta cliva e ativa a porção efetora da GSDMD, dando progressão ao processo pirotótico, bem como é responsável pela ativação e secreção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e IL-18 (Shi et al., 2014).

Atualmente, alguns inflamassomas já estão bem caracterizados no tocante a apresentarem a capacidade de induzirem a piroptose, Fig. 2, podendo-se citar os inflamassomas NLRP1b, o NLRP3, NLRC4, Inflamassoma de Pirina e o AIM2 (Liu and Lieberman, 2017). Também se sabe que a piroptose pode ser ativada mediante o dano e a ruptura lisossomal. Essa ruptura pode ser causada por diversos estressores, incluindo compostos químicos que promovem a liberação de catepsina B e o efluxo de potássio,

levando à ativação do inflamassoma NLRP3 que resulta na ativação direta de caspase-1 (Lamkanfi and Dixit, 2014). A ativação da piroptose mediante dano lisossomal pode ser modulada através da inibição da acidificação ou da atividade de catepsinas, como pelo uso de inibidores de CatB, como Ca074, cistatina C endógena ou nocaute genético de CatB (Alu et al., 2020).

Sabe-se também que a piroptose desenvolve diversas funções em processos celulares, relacionados à resolução de infecções virais e bacterianas (Liu and Lieberman, 2017). Bem como também já foi observado a morte por piroptose em células de câncer de esôfago humano induzida por metformina (Wang et al., 2019). Porém, até o presente momento não foi avaliado se a ação anti-tumoral induzida por metformina pode ocorrer através da modulação da morte celular piroptótica em células tumorais de hepatocarcinoma.

1.6 Metformina

O uso da metformina como um fármaco que apresenta atividade anti-tumoral já é explorada em diversos casos de pacientes não diabéticos para a prevenção de tumores bem como utilizada como tratamento auxiliar de tumores malignos. Além disso é conhecido o efeito sistêmico da metformina, sendo responsável por promover alterações a nível circulatório, diminuindo a inflamação, através da supressão de diferenciação de monócitos, a nível hepático, diminuindo níveis de gliconeogênese e lipogênese, além de nível muscular e do trato intestinal, aumento da utilização de glicose (Rena et al., 2017) .

A metformina foi capaz de suprimir a incidência de focos de criptas aberrantes colorretais em casos de câncer cólon (Hosono et al., 2010). Outro estudo realizado no Japão foi capaz de demonstrar uma significativa redução na formação de pólipos colorretais após 1 ano de administração de baixas doses de metformina (Higurashi et al., 2016). A metformina também é capaz de induzir a parada na fase G1 do ciclo celular e o desencadeamento da apoptose em HCC (Chen et al., 2013) além de induzir autofagia por meio da inibição da via mTOR (Shi et al., 2012). Estudos anteriores indicaram a ação da metformina induzindo autofagia, desempenhando um papel pró-apoptótico em melanoma e em linfoma (Tomic et al., 2011).

A metformina é um uma droga antidiabética, e vários estudos já comprovaram sua atuação no controle e prevenção do desenvolvimento de diversos tipos de câncer, entre

eles o HCC (Donadon et al., 2010). Recentemente, estudos com a metformina sobre sua avaliação clínica, devido às suas características antineoplásicas e preventivas, passaram por avaliações tradicionais de fase I, para ensaios clínicos do tipo II/III para vários tipos de câncer, justamente por seu histórico de alta segurança em pacientes diabéticos (Hada et al., 2015). Metformina é um sensibilizador de insulina de ação em múltiplos órgãos, atuando na diminuição dos níveis sanguíneos de glicose e de ácidos graxos livres (AGL). É capaz de reduzir a produção de glicose pelo fígado através da supressão de gliconeogênese, bem como levar ao aumento na oxidação de alguns ácidos graxos, e inibe a lipólise e subsequentemente a liberação de AGL do tecido adiposo (Foretz et al., 2014). Sua ação anti-tumoral no contexto do HCC foi recentemente avaliada em um grande número de pacientes tailandeses diabéticos, onde foi demonstrado uma redução de 7% no risco de HCC por ano com o uso de metformina (Chen et al., 2013).

Uma das alterações que a metformina é capaz de fazer é a de alterar a expressão da enzima proteína-quinase dependente de AMP (AMPK) em células hepáticas por meio da qual a proteína alvo (mTOR) é inibida (Shackelford, 2013). Uma vez a via do mTOR inibida, também são inibidas as vias do fator de hipóxia induzida por 1-alpha (HIF1 α), que por sua vez inibe a atuação do fator de crescimento endotelial (VEGF), importante fator associado à angiogênese (Zhou et al., 2006).

A metformina é capaz de entrar na célula através de transportadores como o SLC22A1, também chamados de transportadores OCT1. A família de transportadores SLC22 são encontrados majoritariamente em tecidos epiteliais do fígado e dos rins, sendo responsáveis pela translocação para o meio intracelular de diversos compostos endógenos, drogas e toxinas (Rizwan and Burckhardt, 2007). A partir da entrada da metformina pelo seu transportador ela inibe o complexo I mitocondrial. A inibição deste complexo leva a uma diminuição de ATP e ao acúmulo de AMP que se liga a enzima adenilato ciclase e inibe sua atividade, levando à redução de cAMP mediante estimulação do receptor de glucagon, assim como observado na Fig.3. Desta forma, têm-se uma diminuição na atividade de PKA e de todas vias dependentes, levando a supressão da gliconeogênese e à ativação da via glicolítica. Além disso, a metformina também leva à ativação a AMPK, que contribui para a redução de síntese lipídica, transporte de glicose e eficiência dos receptores de insulina (Pernicova and Korbonits, 2014).

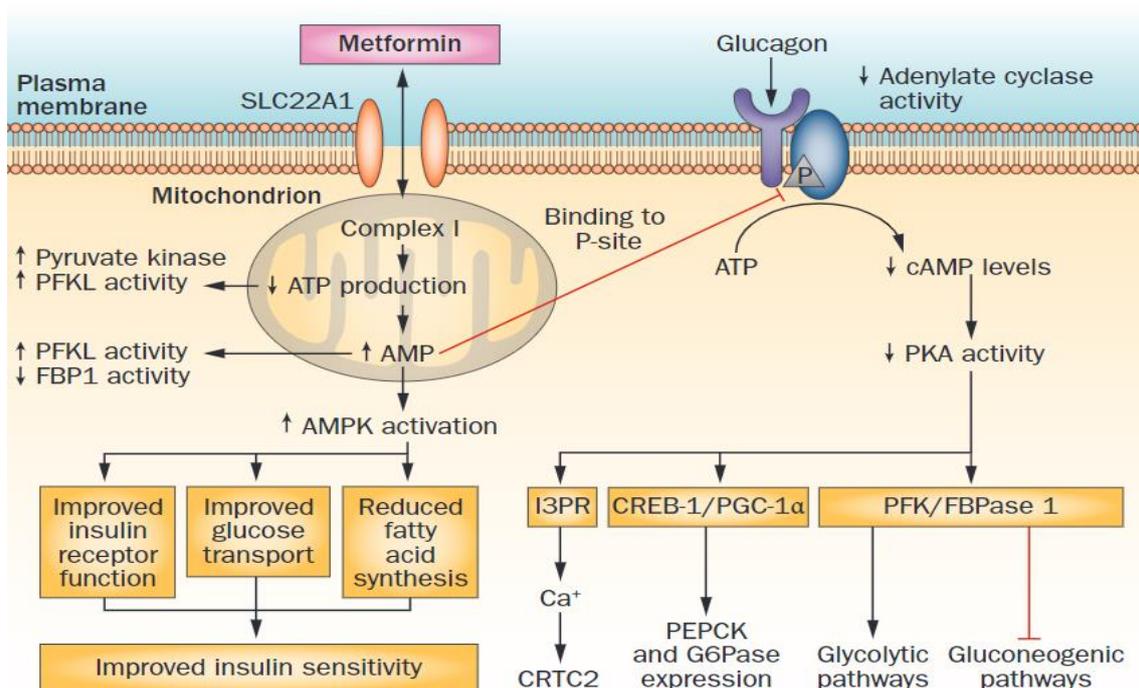


Figura 3: Modelo de ação de metformina no hepatócito. Pernicova, I. & Korbonits, M. Nat. Rev. Endocrinol.10, 143–156 (2014); published online 7 January 2014.

2. Justificativa

A metformina apresenta-se como um composto de primeira escolha na ação no controle glicêmico, sem afetar a liberação de insulina. Além disso, apresenta diversas ações benéficas, incluindo atividades anti-tumorais. Estudos prévios mostraram que a morte por piroptose em células tumorais de esôfago humano induzida por metformina, (Wang et al., 2019). Entretanto, pouco se sabe sobre a ação da metformina especificamente sobre parâmetros celulares e sobre a caracterização da morte lítica em células de câncer de fígado. Desta forma, este trabalho visou analisar se a metformina modula parâmetros celulares de células de câncer de fígado murino (Hepa) e se ocorre morte por piroptose também nessas células *in vitro*.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral:

Avaliar se a metformina induz a morte celular por piroptose e à modulação de parâmetros carcinogênicos em células de hepatocarcinoma murino *in vitro*.

3.1 Objetivos específicos:

- Caracterizar o efeito da metformina em células de hepatocarcinoma *in vitro*, buscando avaliar seu potencial sobre parâmetros carcinogênicos e indução da piroptose, analisando;

- a) a viabilidade e o perfil de morte celular;
- b) a proliferação celular, ciclo celular e a formação de colônias;
- c) a modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos;
- d) a modulação da atividade e acidificação lisossomal;
- e) a ativação de caspase-1 e caspase-3
- f) a clivagem de Gasdermina D;
- g) a liberação de LDH;
- h) a formação de poros na membrana plasmática e seus mecanismos;
- i) a translocação de HMGB1;
- j) a secreção de citocinas pró-inflamatórias e seus mecanismos.

4. Metodologia

4.1. Cultivo Celular e Estímulos

Buscando testar os efeitos da metformina sobre células de câncer de fígado murino, foram utilizadas as células derivadas de hepatocarcinoma murino hepa 1c1c7. As células AML-12, derivadas de hepatócitos murinos não tumorais foram utilizadas como controle.

Hepa 1c1c7: Hepatócitos tumorais derivados de camundongos foram mantidas em meio MEM- α (GIBCO) suplementado com 10 % de Soro Fetal Bovino (SFB) (GIBCO) e 1 % Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) e mantidas em estufa úmida a 37 °C e 5 % de CO₂;

AML-12: Hepatócitos murinos não tumorais, foram mantidos em meio DMEM: F12 e suplementado com os seguintes componentes: 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 10 μ g/ml de insulina, 0,5 μ g/ml de transferrina, 5ng/ml de Selênio e 40ng/ml de dexametasona e 1% Penicilina/Estreptomicina (GIBCO) e mantidas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂;

A metformina em pó (Sigma) foi diluída no meio respectivo a cada tipo celular, antes da realização de cada ensaio realizado. A fim de se realizar o estímulo das células, os volumes adequados de solução de metformina sofram diluídos em meio de cultura e foram transferidos para poços contendo células aderidas. As concentrações de metformina utilizadas foram 0.39, 3, 6, 25, 50 e 100 mM (Pereira et al., 2018; Hu et al., 2019).

4.2. Viabilidade celular

A fim de se verificar o efeito da metformina sobre a viabilidade celular metabólica de células de HCC Hepa 1c1c7 e células não tumorais AML-12, foi realizado um ensaio com MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolio brometo). A solução de MTT tem coloração amarela, porém quando reduzido por enzimas mitocondriais, apresenta-se com coloração roxeada na forma de cristais de formazan. 4x10³, 2x10³, 1x10³ células foram semeadas em placa de 96 poços e estimuladas com crescentes concentrações de metformina, que variaram de 0.39mM até 100mM, por 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Após o tempo de estímulo, as células foram expostas à uma solução de 5mg/ml de MTT (Life Technologies). O sobrenadante foi descartado e os cristais de

formazan foram dissolvidos utilizando-se 100 µL de DMSO. A leitura da absorbância foi realizada em 570 nm utilizando o espectrofotômetro *Spectramax M3*. A análise dos dados de viabilidade celular metabólica foi feita utilizando o software *GraphPad Prism*, considerando a média do valor de absorbância do não-estimulado como 100% de viabilidade e analisando os outros grupos de forma relativa.

4.3. Perfil de morte celular

A análise de perfil de morte celular foi realizada por citometria de fluxo utilizando os agentes fluorescentes Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo e baseou-se nos fatos de que Anexina V interage com a fosfatidilserina, que é exposta à face externa da membrana de células, pelas enzimas flipases, uma vez que essas células entram no processo apoptótico e o Iodeto de propídeo que interage com ácidos nucleicos de células mortas em vias não-apoptóticas, e é impermeável à célula com membranas plasmáticas íntegras. 2×10^5 , 1×10^5 e 5×10^4 células foram semeadas em placas de 24 poços e após adesão foram estimuladas por 24, 48 e 72 horas, respectivamente com 0.39mM, 6mM e 25mM de metformina. Após os tempos de estímulo, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com PBS 1X em centrifugação à 300 g. As células foram então ressuspensas em 100 µL de tampão de ligação 1 X (10 mM de HEPES/NaOH pH 7,4 140 mM de NaCl e 2,5 mM de CaCl₂), 2 µL de Anexina V-FITC (quatroG) e 2 µL de iodeto de propídeo (quatroG) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo de luz. Após essa etapa, as células foram lavadas uma vez com PBS 1 X, ressuspensas em 400 µL de tampão de ligação 1 X e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando os canais FL-1 e FL-3, ambos em escala exponencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc). Como controle experimental foram utilizadas células aquecidas a 100 °C por 10 minutos.

4.4. Proliferação celular

Tendo-se como objetivo analisar o efeito de diferentes concentrações de metformina sobre a proliferação de células Hepa, foi realizado um ensaio utilizando o CFSE. Esse composto fluorescente e permeável à membrana caracteriza-se por interagir

com aminas citoplasmáticas. Uma vez que a célula realiza o processo de divisão celular, as moléculas de CFSE são igualmente divididas entre as células filhas, diluindo assim a fluorescência presente em cada célula gerada. 5×10^4 células foram introduzidas em placas de 24 poços, após completa adesão foram lavadas uma vez com PBS 1 X e expostas à 5 μM de CFSE (eBioscience) diluído em PBS 1 X por 15 minutos à temperatura ambiente. Após incubação com o agente fluorescente, as células foram expostas a SFB à 4°C a fim de se eliminar o CFSE extracelular, lavadas uma vez com PBS 1X e estimuladas por 48 horas com metformina. As células foram então coletadas, lavadas uma vez com PBS 1 X em centrifugação à 300 g e fixadas em 400 μL de paraformaldeído 1 X. As células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) em canal FL-1 em escala exponencial e os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc). O controle negativo experimental foi obtido expondo células marcadas com CFSE a 5 μM de colchicina por 24 horas.

4.5. Ciclo celular

O efeito de diferentes concentrações de metformina sobre ciclo foi investigado utilizando o agente fluorescente intercalante de nucleotídeos Iodeto de propídeo e a interpretação dessas análises baseou-se no fato de que a intensidade de fluorescência do Iodeto de propídeo é diretamente proporcional à quantidade de DNA no interior da célula. 1×10^5 células foram introduzidas em placas de 24 poços e estimuladas por 48 horas. As células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1 X e expostas a etanol 70% por 2 horas a 4°C para fixação. As células foram então lavadas uma vez com PBS 1X em centrifugação à 500 g por 5 minutos e lavadas novamente. Seguinte foram expostas à solução de Iodeto de propídeo (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Iodeto de propídeo, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RNase, 0,1 % Triton) por 10 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação, as células foram ressuspendidas em 1mL de PBS 1X e centrifugadas a 500 g por 10 minutos. As células foram então ressuspendidas em 400 μL de PBS 1X e analisadas em citômetro de fluxo (FACS CALIBUR, BD Biosciences) em canal FL-3 em escala linear. Os picos relativos às células em G0/G1 e G2/M e o platô associado à fase S foram obtidos e os valores de porcentagem foram analisados. Dados foram analisados utilizando os softwares *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.6. Formação de colônias

Visando investigar se diferentes concentrações de metformina sobre as células de camundongo Hepa, 10^3 células foram plaqueadas em placas de 6 poços, em sequência as células foram estimuladas com concentrações crescentes de metformina (6, 25 e 50 mM) por 48 horas. Após o tratamento, as células foram mantidas em cultura por 6 dias, mudança do meio de cultura em intervalos de 3 dias. As células foram então lavadas uma vez com PBS 1X e fixadas com 10% (v / v) de formalina por 1 hora. O próximo passo após a fixação foi 1 h de coloração com solução diluída em dH₂O de cristal violeta a 0,05% (p / v). Análises de colônias foram realizadas usando o software Image J investigando 25% de cada área do poço. Somente estruturas que poderiam ser individualizadas foram consideradas colônias para contagens e medidas.

4.7. Biogênese de corpúsculos lipídicos

A fim de se analisar por citometria se os tratamentos com diferentes concentrações de metformina afetam a biogênese de corpúsculo lipídico em células de hepatocarcinoma, utilizou-se a sonda fluorescente lipofílica BODIPY 493/503 (Life technologies), a qual interage com lipídeos neutros abundantes no interior de corpúsculo lipídico. 5×10^4 células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 48 horas. Após tempo de estímulo, as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS 1X e incubadas numa solução de Bodipy/PBS em uma proporção de 1/5000 a 4 °C ao abrigo de luz. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e ressuspensas para fixação em 400 μ L de paraformaldeído 1 X. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences) utilizando o canal FL-1 em escala exponencial. Os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.8. Acidificação lisossomal

Para se analisar a ação da metformina sobre a acidificação lisossomal nas células de câncer de fígado, foi utilizada a sonda de detecção lisossomal LysoTracker (Life Technologies) e seguindo as recomendações do fabricante de forma a otimizar o ensaio para ser analisado por citometria de fluxo. As sondas LysoTracker são sondas acidotrópicas fluorescentes capazes de rastrear organelas ácidas em células vivas que

consistem em um fluoróforo ligado a uma base fraca que é apenas parcialmente protonada em pH neutro e são livremente permeáveis às membranas celulares. Em placas de 48 poços, 10^5 células foram plaqueadas, após aderidas, foram estimuladas por 48h em diferentes concentrações, de 6mM a 50mM de metformina. Após o período de estímulo as células foram lavadas com solução salina, e incubadas com a solução de 75nm de LysoTracker por 1h a 37°C ao abrigo da luz. As células foram então lavadas e ressuspensas em 400 μ L de PBX 1X e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FACS CALIBUR, BD Biosciences) utilizando o canal FL-4 em escala exponencial. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *FlowJo V10* (Tree Star Inc).

4.9. Detecção de pro-caspase-1 e caspase-3

Visando investigar se ocorre produção de pró-caspase-1 e caspase 3 sob estímulo com metformina, foi avaliada a expressão protéica por Western Blotting destas proteínas. Para esse ensaio, 10^6 células foram plaqueadas em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio de cultura por poço. Após adesão, células foram tratadas por 48 horas com diferentes concentrações de metformina (6mM, 25mM e 50mM), sendo que cada poço representou uma condição experimental. As células foram então lavadas uma vez com PBS 1X e as proteínas foram extraídas utilizando tampão de lise celular (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e 1 % de Triton X -100 – pH 7,4) contendo inibidor de protease, com o auxílio de raspador de células. Buscando se manter a integridade das proteínas contidas no lisado, este foi mantido em gelo e intensamente homogeneizado por 30 minutos em intervalos de 5 minutos entre cada agitação. Ao fim do processo de extração de proteínas totais, as amostras foram submetidas à centrifugação a 2300 g por 10 minutos em um processo de clarificação. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e distribuído em dois tubos de microcentrífuga por condição experimental.

Para quantificação de proteínas, foi utilizado o método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). 50 μ g de proteína total foram expostos à solução precipitadora (Acetona 8:1 metanol) *overnight* a 4 °C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas à 10000 g por 10 minutos e deixadas para secar completamente em capela de exaustão. As proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra 1X (Tris 125 mM, 20 % glicerol, 5 % 2-mercaptoetanol, 4 % de SDS e 0,004 % azul de bromofenol). As amostras foram então fervidas por 5 minutos à 100 °C e logo em seguida aplicadas em

géis de poliacrilamida com concentração de 12 %. As amostras correram em tampão Tris-Glicina (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 1% SDS – pH 8,3) a 120 V por 2 horas à temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose utilizando sistema *semi-dry* em tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % metanol – pH 8,3) por 15 minutos a 15 V. A seguir, as membranas foram bloqueadas por 1 hora utilizando solução de bloqueio (5 % leite desnatado em 50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4, 0.05% Tween 20). As membranas foram incubadas com os respectivos anticorpos primários anti-Casp-1 (Abcam) e anti-Casp-3 (Abcam) diluídos 1/1000 em solução TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4) *overnight* em agitação a 4 °C. Em seguida, as membranas foram lavadas em solução TBS/T (50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4, 0.05% (v/v) Tween 20) por três vezes em agitação de 10 minutos entre cada lavagem a 4°C, e então foram incubadas com anticorpo anti-rabbit (GE Healthcare) diluído 1/10000 em solução TBS por 1 hora a 4 °C . Após novas lavagens, as membranas foram incubadas com proporções iguais de solução para revelação por quimioluminescência.

4.10. Ativação de caspase-1

Buscando verificar se ocorre ativação de caspase-1 em células Hepa 1c1c7 em resposta ao tratamento com crescentes concentrações de metformina, de 6mM a 50mM foi realizado ensaio utilizando um kit específico contendo uma sonda fluorescente FLICA FAM-YVAD-FMK (Immunochemistry) e seguindo as instruções do fabricante. Essa análise baseia-se no fato de que esse fluoróforo se liga aos quatro resíduos de aminoácidos expostos pela caspase-1 quando ativa (YVAD) e fluoresce durante essa interação. 10⁵ células foram semeadas em placas de 24 poços e estimuladas por 48 horas. Após o tempo de estímulo com metformina, as células foram coletadas, lavadas duas vezes em PBS 1X, submetidas à incubação com o fluoróforo e analisadas em citômetro de fluxo (FACS VERSE, BD Biosciences). Os dados obtidos foram analisados utilizando o software FlowJo V10 (Tree Star Inc).

4.11. Detecção de Gasdermina D

Visando investigar se ocorre produção e clivagem do marcador de piroptose GSDMD, foi realizada a avaliação da expressão protéica por Western Blotting. Para esse ensaio, 106 células foram introduzidas em placas de 6 poços contendo 2 mL de meio de cultura por poço. Após aderência, células foram tratadas por 3 e 6 horas com diferentes concentrações de metformina, sendo que cada poço representou uma condição experimental. As células foram então lavadas uma vez com PBS 1X e as proteínas foram extraídas utilizando tampão de lise celular (Tris 50 mM, NaCl 150 mM e 1 % de Triton X -100 – pH 7,4) contendo inibidor de protease, com o auxílio de raspador de células. Buscando se manter a integridade das proteínas contidas no lisado, este foi mantido em gelo e intensamente homogeneizado por 30 minutos em intervalos de 5 minutos entre cada agitação. Ao fim do processo de extração de proteínas totais, as amostras foram submetidas à centrifugação à 14000 rpm por 10 minutos em um processo de clarificação. O sobrenadante resultante da centrifugação foi coletado e distribuído em dois tubos de microcentrífuga por condição experimental.

Para quantificação de proteínas, foi utilizado o método BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit). 50 µg de proteína total foram expostos à solução precipitadora (Acetona 8:1 metanol) overnight a 4 °C. Após esse tempo, as amostras foram centrifugadas à 10000 G por 10 minutos e deixadas para secar completamente em capela de exaustão. As proteínas foram ressuspendidas em tampão de amostra 1X (Tris 125 mM, 20 % glicerol, 5 % 2-mercaptoetanol, 4 % de SDS e 0,004 % azul de bromofenol). As amostras foram então fervidas por 5 minutos à 100 °C e logo em seguida aplicadas em géis de poliacrilamida com concentração de 12 %. As amostras correram em tampão Tris-Glicina (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 1% SDS – pH 8,3) a 120 V por 2 horas à temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi transferido para membrana de nitrocelulose utilizando sistema semi-dry em tampão de transferência (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20 % metanol – pH 8,3) por 15 minutos a 15 V. A seguir, as membranas foram bloqueadas por 1 hora utilizando solução de bloqueio (5 % leite desnatado em 50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4, 0.05% Tween 20). As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-Gasdermina-D (Abcam) diluído 1/1000 em solução TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4) overnight em agitação a 4 °C. Em seguida as membranas foram lavadas em solução TBS/T (50 mM Tris, 150 mM NaCl – pH 7,4,

0.05% (v/v) Tween 20) por três vezes em agitação de 10 minutos entre cada lavagem a 4°C, e então foram incubadas com anticorpo anti-rabbit (GE Healthcare) diluído 1/10000 em solução TBS por 1 hora a 4 °C . Após novas lavagens, as membranas foram incubadas com proporções iguais de solução para revelação.

4.12. Liberação de Lactato Desidrogenase

A fim de se verificar o efeito da metformina sobre a liberação de LDH pelas células de HCC Hepa 1c1c7, foi realizado um ensaio utilizando um kit específico fluorescente CytoTox-ONE (Promega) e seguindo as instruções do fabricante. O ensaio consiste na mudança colorimétrica em decorrência da formação do produto final fluorescente Resofurina de modo proporcional as concentrações presentes de LDH. 5×10^4 células foram semeadas em placa de 96 poços. Após as células aderirem, foram estimuladas com crescentes concentrações de 6mM, 25mM e 50mM de metformina e mantidas a 22°C por 20 minutos. Após o tempo de estímulo, as células foram expostas a uma solução de CytoTox-ONE e encubadas por mais 10 minutos a 22°C. Por fim, foi adicionada uma solução para parada do ensaio. A leitura de excitação foi de 560 nm, e a absorvância foi realizada em 590 nm utilizando o espectrofotômetro Spectramax M3. A análise dos dados de viabilidade foi feita utilizando o percentual de citotoxicidade recomendado pelo fabricante. O controle experimental foi obtido expondo as células ao agente citotóxico do mesmo Kit.

4.13. Formação de poros na membrana plasmática

A investigação do efeito da metformina sobre a formação de poros na membrana plasmática das células tratadas foi realizada por meio de um ensaio de poros, que consiste na análise de emissão de fluorescência de forma cinética pelo Iodeto de propídeo, um composto que fluoresce quando interage fisicamente com ácidos nucleicos e é impermeável à membrana. 3×10^4 células foram plaqueadas em placas de 96 poços de paredes escuras, então foram expostas ao Iodeto de propídeo 3 µg/mL e diferentes concentrações de metformina de 6mM, 25mM e de 50mM em RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 5 % de soro fetal bovino e 1 % de Penicilina/Estreptomicina. O uso de inibidores da via piroptótica também foram utilizados, tais como liberação de

cathepsina B, de ROS, efluxo de potássio, bem como ativação de caspase-1, a partir do uso de inibidores como Ca074, NAC, Gliburídeo, e Y-VAD nas concentrações de, (50 μ M), (5mM), (150 μ M) (100 μ M), de forma respectiva. Logo após o estabelecimento do estímulo, os valores de fluorescência do iodeto de propídeo foram detectados em espectrofotômetro Spectramax durante 6 horas em intervalos de 5 minutos entre as leituras utilizando comprimentos onda de excitação de 538 nm e de emissão de 617 nm. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *GraphPad Prism*.

4.14. Imunomarcação de HMGB1

Para a visualização de HMGB1 por microscopia foram plaqueadas 10⁵ células em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro estéreis e estimuladas sobre a concentração de 50mM de metformina. Após período de estímulo as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton 0,2% por 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram em seguida bloqueadas com uma solução de PBS + 2% BSA por 20 minutos. Após o bloqueio, a solução foi descartada e as células foram incubadas pela solução do anticorpo primário anti-HMGB1 (Abcam) 1.10000 a 4°C *overnight*. Em seguida os poços foram lavados e incubados com o anticorpo secundário por 1h a temperatura ambiente e seguidamente as células foram lavadas e incubadas com 500 μ L de DAPI (1/5000 em PBS) por 5 minutos, foram então novamente lavadas e montadas sobre solução *anti-fading* e lidas no microscópio de fluorescência Evos.

4.15. Dosagens de Citocinas

Para se verificar se o tratamento com 50mM metformina sobre a Hepa 1c1c7 alterava o perfil de citocinas secretadas por essas células, foram realizadas dosagens de IL-1 β e TNF- α nos tempos de 24 e 48 horas a partir dos sobrenadantes resultantes da cultura, pelo método de ELISA, utilizando-se kits comerciais (BD). As instruções do fabricante foram seguidas e os níveis de citocinas foram apresentados em níveis absolutos (pg/mL). Foram utilizados diversos inibidores da via de IL-1 β durante o processo da piroptose, como os inibidores de caspase-1 (Y-VAD) e pan caspase (Z-VAD), bem como

NAC, inibidor de espécies reativas de oxigênio (ROS), CA074 inibidor de catepsina B, além dos inibidores de efluxo de K^+ e de NF- κ B, Gliburídeo e JSH-23, respectivamente.

Os ensaios de ELISA, foram todos conduzidos em triplicatas em ambos os tempos avaliados de 24 e 48 horas, e a análise estatística realizada foi de, ANOVA e pós-teste de Turkey com exceção do dado de 50mM Y-VAD que foi detectado um valor outlier por meio do GraphPad QuickCals.

4.16. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada com GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, EUA). Testes ANOVA unilateral ou bidirecional foram usados seguidos do pós-teste de Tukey. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Todos os métodos foram realizados de acordo com as diretrizes e regulamentos pertinentes da Universidade de Brasília (Brasil) onde este trabalho foi realizado.

5. Resultados

5.1. Análise de viabilidade celular

Para se analisar o efeito da metformina sobre a viabilidade metabólica de células de câncer de fígado murino Hepa 1c1c7 e das células não tumorais AML-12, foi realizado o ensaio de MTT por 24, 48 e 72 horas após estímulos que variaram de 0,39mM a 100mM. Percebe-se que a metformina diminui a viabilidade de células de câncer de fígado murino Hepa 1c1c7 em todas as horas após tratamento com todas as concentrações testadas de forma dose-dependente (figura 4A). É também possível se verificar que a viabilidade metabólica celular, após tratamentos por 48 e 72 horas é menor comparado com os valores de viabilidade apresentados pelos mesmos grupos tratados por 24 horas, indicando ação citotóxica especialmente nas concentrações de 25mM, 50mM e 100mM, que aumentam de acordo com o tempo de tratamento. No tempo de estímulo, 48 e 72h é possível se notar que o tratamento com 50 e 100 mM, as quais são as maiores concentrações testadas, induziram diminuição de viabilidade em Hepa 1c1c7 de forma similar ao tratamento com DMSO, indicando que após esse tempo de tratamento essas concentrações são extremamente citotóxicas para a célula tumoral.

Também foi observado que a metformina induziu diminuição da viabilidade de células de câncer não tumorais AML-12 *in vitro* apenas 72 horas após tratamento em todas concentrações de forma dose-dependente (fig. 4B). Verifica-se também que a viabilidade de células AML-12 tratadas com 100 mM de metformina, a maior concentração utilizada, é inferior a metade da viabilidade do grupo de células tumorais Hepa tratadas com metformina durante mesmo período de estímulo, sugerindo que essa concentração apresenta menos citotoxicidade as células não tumorais.

De forma semelhante, como demonstrado pelas figuras 4A e 4B, a metformina apresenta citotoxicidade a ambas células, porém como observado, a metformina diminui viabilidade de células de câncer de fígado Hepa *in vitro* drasticamente após tratamento com todas as concentrações testadas de forma dose-dependente, enquanto o efeito sobre as células não tumorais é brando e apenas sobre as maiores

concentrações utilizadas. Esse fato confirma a ação tóxica tempo-dependente da metformina sobre células Hepa. Portanto, a metformina diminui viabilidade de células de câncer de fígado Hepa 1c1c7 *in vitro* de forma tempo- e dose-dependente.

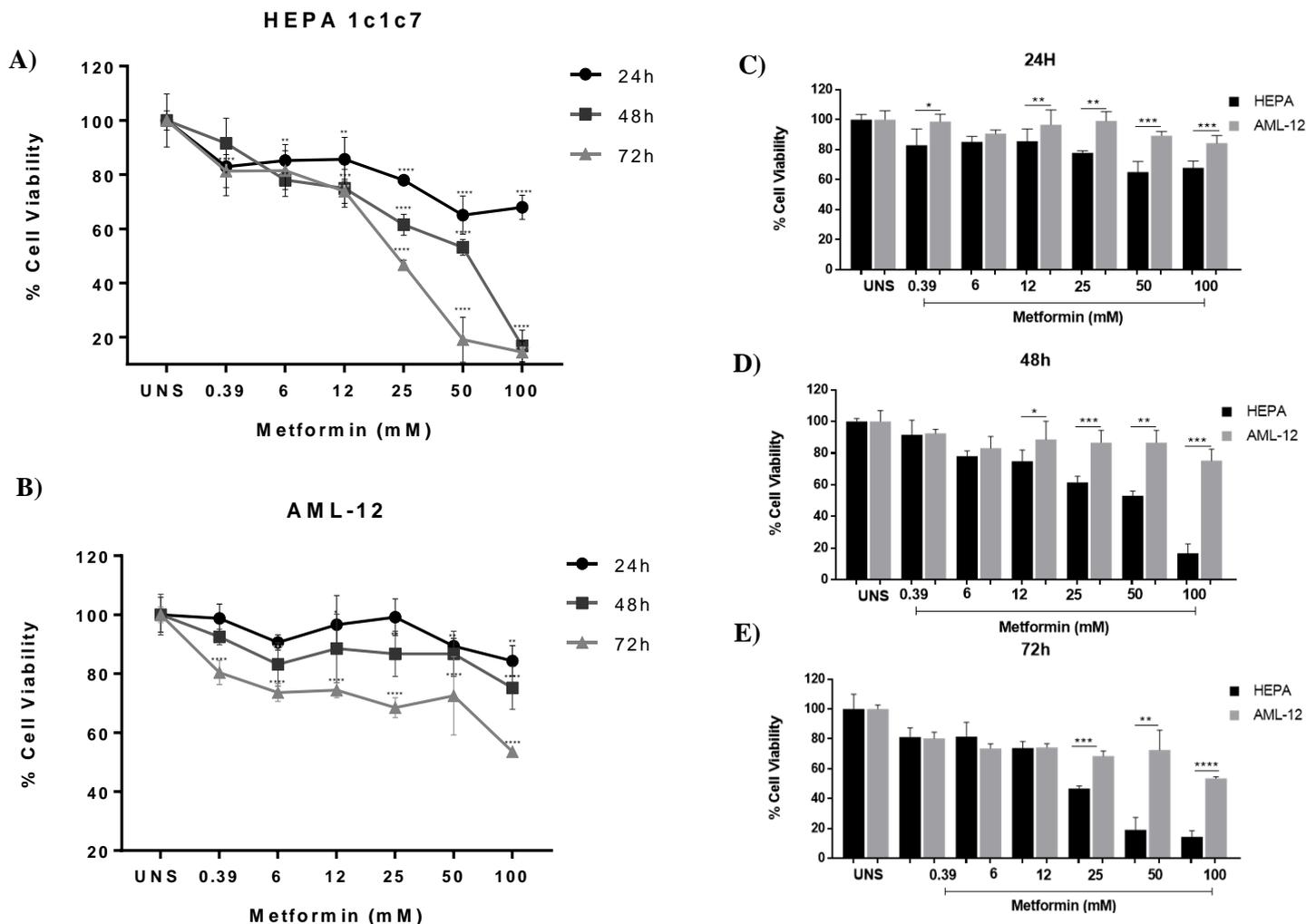


Figura 4: Metformina diminui viabilidade de células de câncer de fígado Hepa. A) Hepa 1c1c7 foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 0.39 mM, 6 mM, 12 mM, 25 mM, 50mM e 100 mM por 24 horas, 48 horas e 72 horas. B) AML-12, foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 0.39 mM, 6 mM, 12 mM, 25 mM, 50mM e 100 mM por 24 horas, 48 horas e 72 horas. C-E) Análise estatística entre as duas linhagens celulares entre as concentrações de 25mM, 50mM e de 100mM, nos 3 tempos analisados. Após os estímulos, as células foram expostas ao MTT e a citotoxicidade foi calculada a partir das médias dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), a quais foram consideradas 100 % vivas. Cada linha representa a média do percentual \pm DP (n=5). Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=5), e quatro asteriscos (****), três (***), dois (**) e um (*) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,0001$, $0,001$, $0,01$, $0,05$ respectivamente) em relação a cada concentração em comparação.

5.2. Análise do perfil de morte celular

Buscando avaliar o efeito da metformina sobre o perfil de morte de células de câncer de fígado murino e das células não tumorais, foi realizada uma dupla marcação com Anexina-V e Iodeto de propídeo. Foi observado por citometria de fluxo, que a metformina induziu morte celular associada a perda da integridade de membrana em células de câncer de fígado Hepa 1c1c7 *in vitro* 48 e 72 horas após tratamento de forma dose-dependente. Enquanto foi observado de forma mais branda uma morte celular sem perda de integridade da membrana celular nas células hepáticas não tumorais.

É observado na figura 5, que a partir de 48h a porcentagem de células mortas com a perda de integridade de membrana, ou seja, as células marcadas tanto com Anexina-V fluorescente (FL-1) como com Iodeto de propídeo (FL-3), aumenta de 11,8% na condição não-estimulada para 60,0% em células tratadas com 25 mM de metformina. O aumento de porcentagem de células com dupla- marcação também é visualizado em 72h comparando o não-estimulado de 2,38%, com células estimuladas com 25 mM de metformina, mostrando uma porcentagem de 65,3% de células mortas duplo marcadas. A maior concentração utilizada para o ensaio, 25 mM apresentou alto grau de citotoxicidade, sendo responsável pelos valores de 74,97 % de células mortas com alteração de permeabilidade de membrana após 72h de estímulo, mostrando ser uma concentração extremamente tóxica para as células tumorais.

Em contraponto, o efeito citotóxico da metformina também é encontrado em células tratadas não tumorais, porém de forma mais branda e sem perda de integridade de membrana, tendo apresentado 19,28% de células duplo marcadas, deste, 16,6% marcado apenas por Anexina-V após 72 horas de estímulo. Nesse ensaio foi observado um perfil distinto e de intensidades diferentes entre as células utilizadas. Quase a totalidade das células tumorais expostas 25 mM de metformina morreram como consequência desse estímulo, com alteração na permeabilidade de membrana plasmática enquanto menos de um quarto das células não tumorais morreram em consequência do estímulo e sem perda de integridade de membrana.

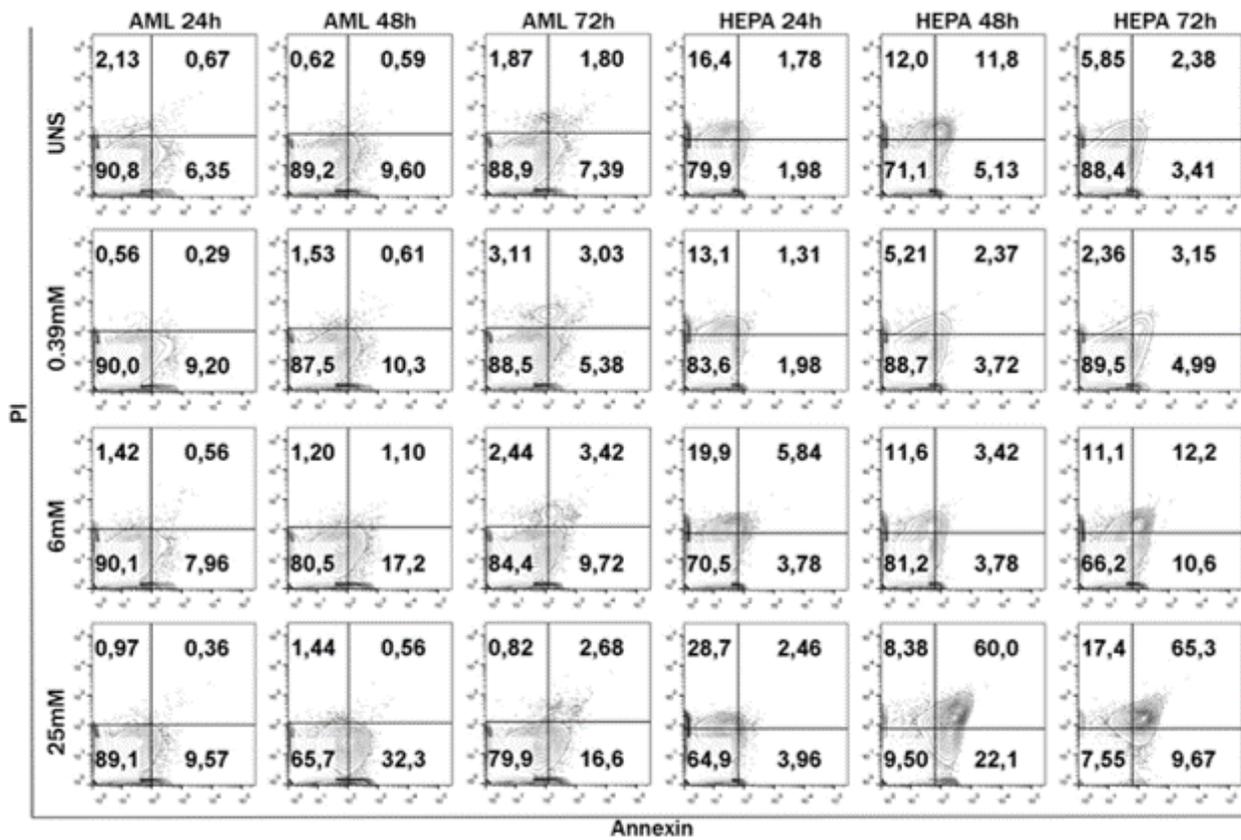


Figura 5: A metformina induz morte com perda de integridade de membrana em células Hepa 1c1c7. As células tumorais Hepa e não tumorais AML-12, foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 0.39 mM, 6 mM e 25mM por 24, 48 e 72 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com Anexina-V fluorescente (FL-1) e Iodeto de propídeo (FL-3) e analisadas em citômetro FACS Verse.

5.3. Análise de proliferação celular

Foi investigado o efeito da metformina sobre a proliferação celular utilizando o agente fluorescente permeável a membrana, que apresenta afinidade a aminas citoplasmáticas neutras, CFSE. Como apresentado pelas figuras 6A-C, a metformina inibe proliferação de células de câncer de fígado Hepa 1c1c7 *in vitro* 48 horas após tratamento nas concentrações de 6, 25 e 50 mM, como fica demonstrado pelos valores de fluorescência (*MFI*), superiores em comparação às células não-estimuladas.

A influência da metformina sobre a proliferação das células, foi observada a partir do aumento dos valores de fluorescência em todas as condições experimentais tratadas, o que sugere que a metformina inibiu a proliferação de forma dose-dependente sobre as células de câncer de fígado murino Hepa 1c1c7 *in vitro* 48 horas após tratamento.

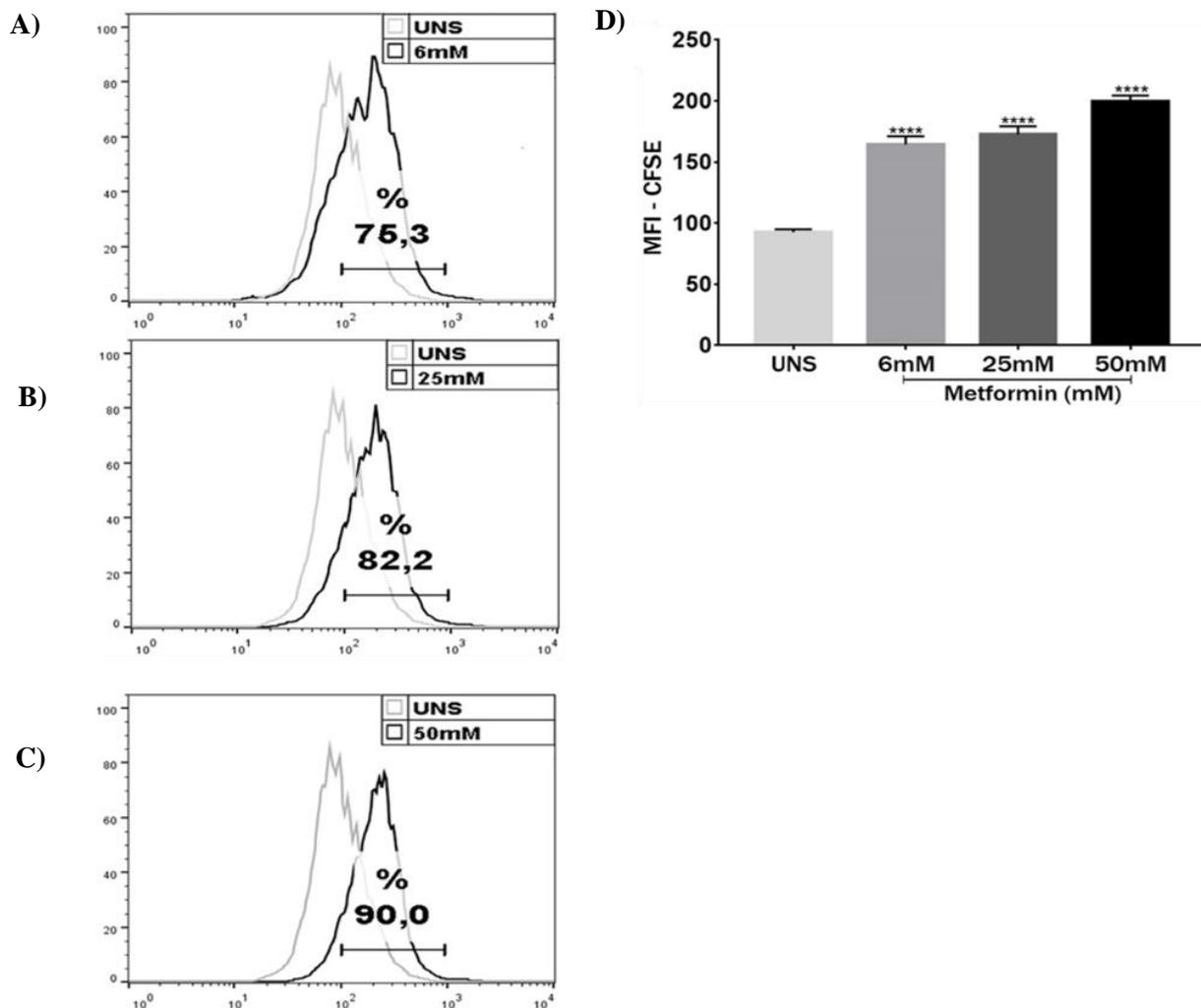


Figura 6: A metformina inibe a proliferação de células tumorais Hepa 1c1c7. As células tumorais Hepa, foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 6 mM (A), 25 mM (B) e 50 mM (C) por 48 horas. Antes dos estímulos, as células foram marcadas com CFSE (FL-1) e analisadas em citômetro FACS Verse. D) Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), quatro asteriscos (****) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) em relação ao Não-estimulado (UNS).

5.4.Ciclo celular

Objetivando-se analisar se a metformina altera a progressão do ciclo celular em células tumorais de fígado murino, as células hepa foram expostas ao marcador Iodeto de propídeo para aquisição em citômetro de fluxo. Como ilustrado pela figura 7, as maiores concentrações de 6 e 25mM de metformina inibiram progressão do ciclo celular em células Hepa 1c1c7, retendo significativamente mais células na fase G1. Essa conclusão pode ser tomada por ocorrer diminuição no número de células em fase G2/M e aumento na fase G1.

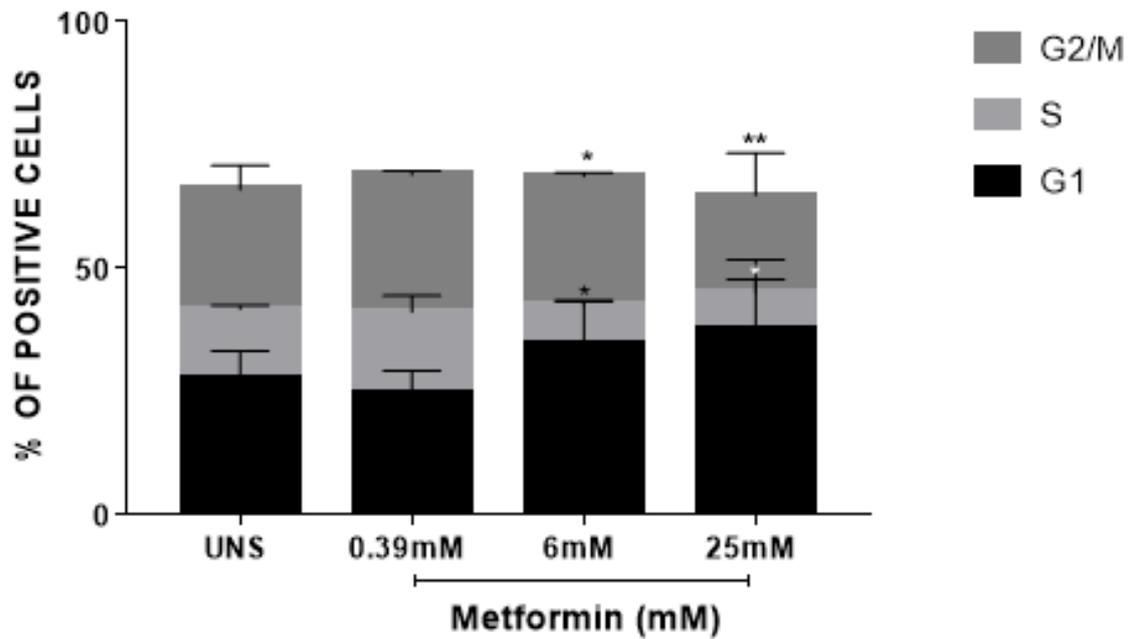


Figura 7: A metformina inibe a progressão do ciclo celular em células Hepa 1c1c7. As células tumorais foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 0.39mM, 6mM e 250Mm por 48 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com Iodeto de propídeo (FL-3) e analisadas em citômetro FACS Calibur. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*) e dois asteriscos (**) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,05$, $p < 0,01$, respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS).

5.5. Formação de colônias

Buscando analisar o efeito do tratamento com metformina sobre a capacidade de formação de colônias em células Hepa 1c1c7, foi conduzido um ensaio clonogênico, o qual consiste na avaliação de formação de colônia a partir da marcação com o corante cristal violeta. O efeito da metformina sobre as células de câncer de fígado em estudo foi investigado após 48 horas de estímulo com a biguanida.

Como ilustrado pela figura 8A e 8B, as células tratadas com todas as concentrações utilizadas de metformina, apresentaram números inferiores de colônias em relação às células não-estimuladas. O número de colônias formadas nas condições analisadas mostram-se drasticamente inferior à condição não-estimulada. Além de alterar o número de colônias formadas pelas células Hepa 1c1c7, o tratamento com metformina também impacta no diâmetro médio dessas colônias em relação às células não-estimuladas, como apresentado na figura 8C.

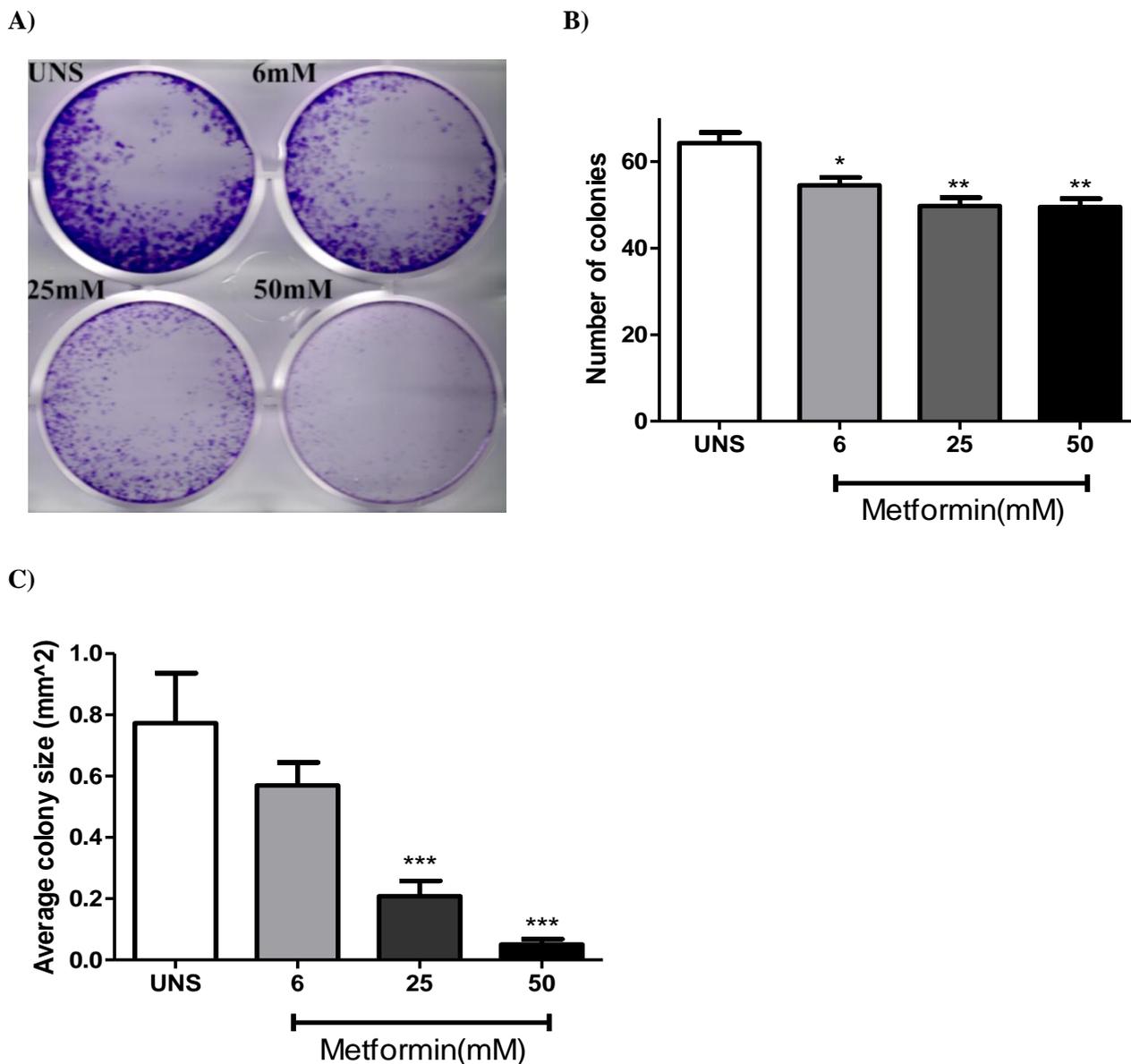


Figura 8: metformina inibe a formação de colônias nas células tumorais Hepa 1c1c17. A) As células tumorais de fígado murinas foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 6 mM, 25 μ M e 50 mM 48h. Após 6 dias em meio na ausência de metformina, as células foram coradas com cristal violeta. B) Análises de colônias foram realizadas usando o software Image J investigando 25% de cada área do poço. Somente estruturas que poderiam ser individualizadas foram consideradas colônias para contagens e medidas. C) Análise de área em mm² de 25% da área de cada poço. Aonde três asteriscos (***), dois (**) e um (*) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,001$, 0,01, 0,05 respectivamente) em relação a cada concentração em comparação

5.6. Análise de biogênese de corpúsculo lipídico

Foi analisado também a respostas das células hepáticas não tumorais e tumorais Figura 9 (A e B), em resposta ao estímulo com a biguanida em estudo no processo de biogênese de corpúsculo lipídico, através do uso de uma sonda, permeável a membrana celular que possui grande afeição por lipídeos neutros, ricos no interior de corpúsculos lipídicos. Após 24 horas de tratamento, o não-estimulado apresentou valor de intensidade média de fluorescência (*MFI*) próximo as células expostas as diversas concentrações de metformina utilizadas, não apresentando diferença estatística comparado ao grupo não tratado com os grupos tratados em estudo.

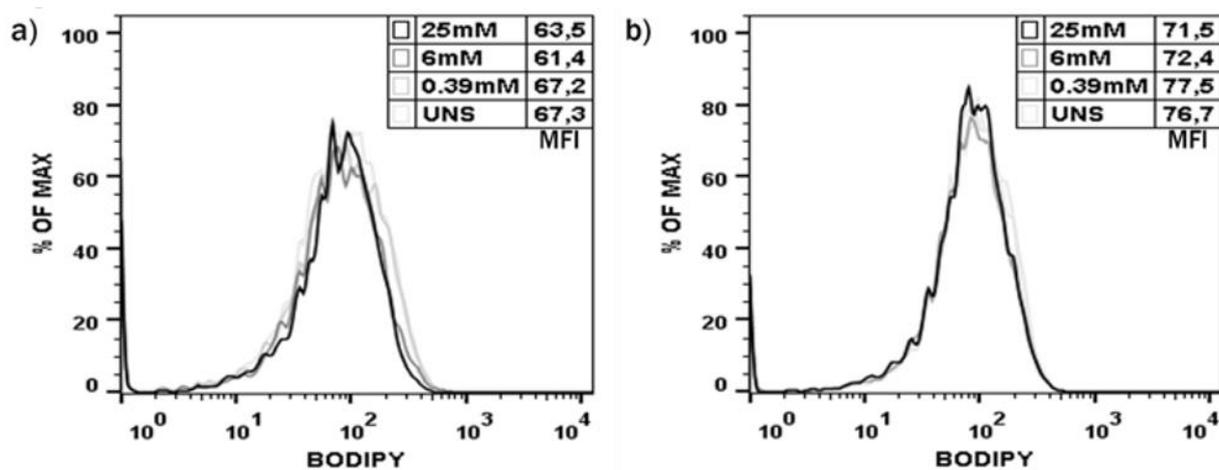


Figura 9: Metformina não induz biogênese de corpúsculo lipídico em células hepáticas murinas. A) As células murinas hepáticas não tumorais AML-12 foram plaqueadas e estimuladas por 24 horas com metformina na concentração de 0.39mM, 6mM e 25 mM. B) As células tumorais Hepa, foram submetidas as mesmas condições e foram marcadas com a sonda lipofílica Bodipy (FL-1) e adquirida em citômetro FACS Verse.

5.7. Ensaio de Acidificação Lisossomal

A fim de se avaliar se a metformina modula a acidificação lisossomal, foi avaliado após 48 horas após estímulo com metformina, através da citometria de fluxo, e observou-se nos valores de fluorescência obtidos a partir da aquisição de células Hepa 1c1c7 tratadas com as maiores concentrações utilizadas de 25mM e de 50mM aumentaram a acidificação lisossomal após as 48 horas de estímulo em relação às células não-estimuladas (fig 10A e 10B). Esse resultado sugere que as maiores concentrações investigadas de metformina aumentaram a acidificação lisossomal em células de câncer de fígado Hepa 1c1c7 após 48 horas de tratamento.

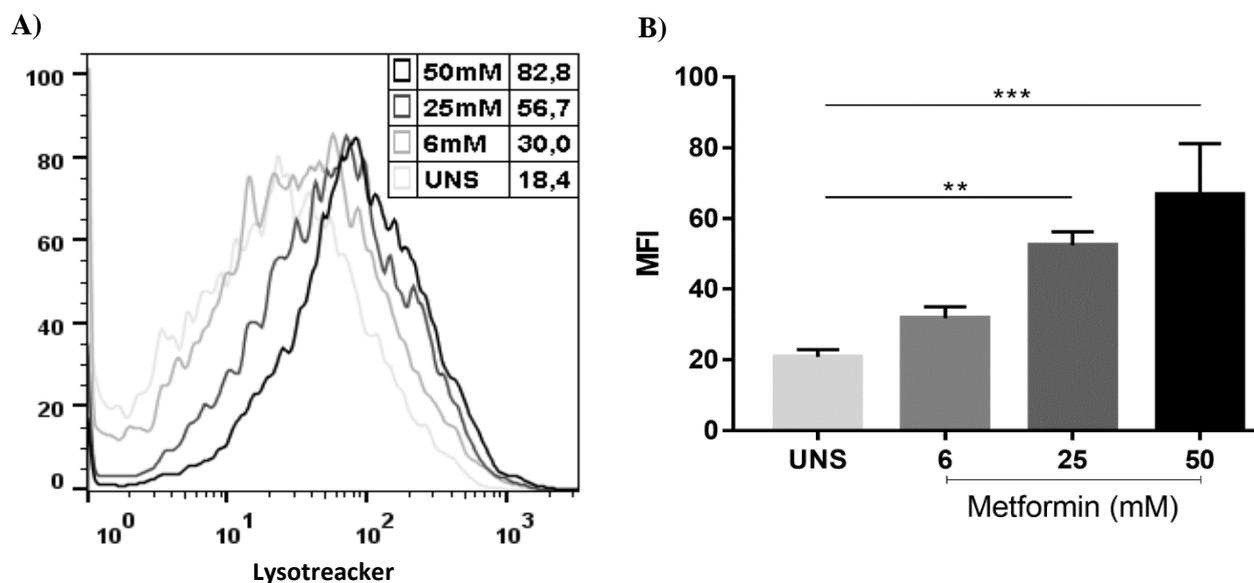


Figura 10: Metformina induz acidificação lisossomal em células de câncer de fígado de Hepa 1c1c7. (A-B) As células tumorais de fígado murinas Hepa foram plaqueadas, e após os estímulos de 48 horas nas concentrações de 6mM, 25mM e 50mM, as células foram tratadas com 75nm da solução fluorescente de LysoTracker. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), três asteriscos (***) e dois (**) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,001$, 0,01 respectivamente) em relação a cada concentração em comparação representam a diferença estatística significativa em relação ao Não-estimulado (UNS).

5.8. Detecção e Ativação de pró-caspase-1 e caspase-3

A fim de se analisar se a metformina induz a produção de pró-caspase-1 e caspase-3 em células de câncer de fígado tumorais hepa *in vitro*, foi feita uma análise por Imunomarcção do sobrenadante e lisado celular, respectivamente após 48 horas de estímulo. Como apresentado pela figura 11A e 11B, foi observado que a metformina induz de forma concentração-dependente a maior produção de pró-caspase-1 e caspase-3 em células de câncer de fígado murino Hepa 1c1c7. E para se verificar a ativação da caspase-1 foi realizada, após 48h de estímulo um ensaio de dupla marcação utilizando o agente fluorescente FAM-FLICA e iodeto de propídeo. A análise de ativação de caspase-1 foi realizada após 48 horas de tratamento com a biguanida (figuras 11C e 11D). Os grupos tratados com 6, 25 e 50mM, apresentaram respectivamente os valores de 11,74%, 9,49% e 9,94% fluorescência em FL-1. A porcentagem de células Hepa que possuíam caspase-1 ativa aumentaram significativamente em resposta ao tratamento com todas as concentrações utilizadas de metformina.

Verifica-se também nas figuras 11E e 11F, que nas duas maiores concentrações utilizadas de 25mM e de 50mM apresentaram um valor de MFI superior de emissão em FL-1 observando-se que o aumento da ativação de caspase-1 é maior nestas concentrações e detectou-se um efeito dose-dependente. Portanto, esses resultados indicam que todas as concentrações utilizadas induzem ativação de caspase-1 em células de câncer de fígado Hepa 1c1c7 após 48 horas de tratamento de forma dose-dependente.

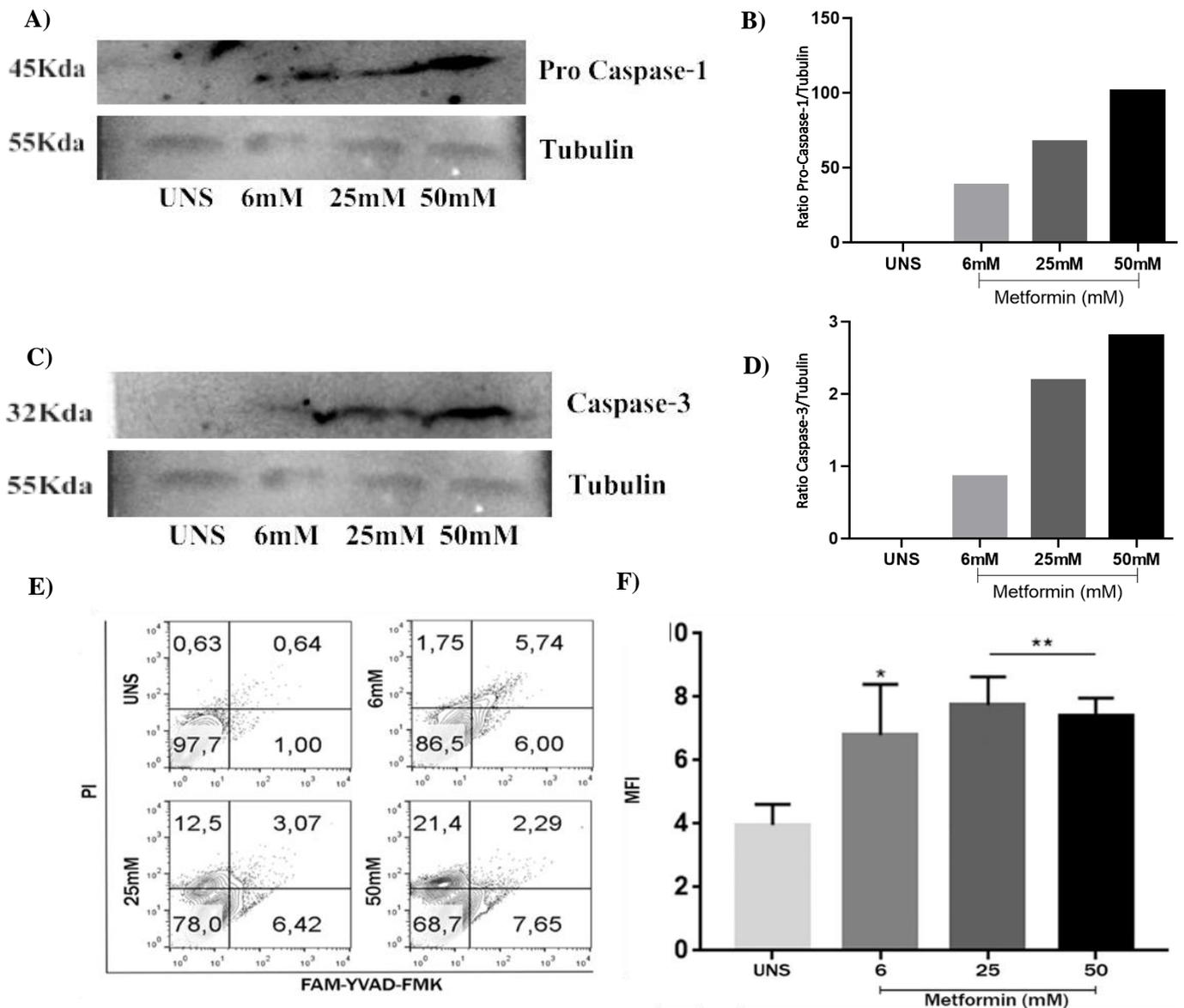


Figura 11: A metformina induz ativação de caspase-1 e caspase-3 em células de câncer de fígado Hepa 1c1c7. (A-B) Após os estímulos, as células foram lisadas com tampão Triton, as proteínas foram quantificadas, separadas em gel de poli-acrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e marcadas com anti-casp-1. (C-D) Após os estímulos, as células foram lisadas com tampão Triton, as proteínas foram quantificadas, separadas em gel de poli-acrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e marcadas com anti-casp-3. (E-F) As células tumorais Hepa foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 6 mM, 25 mM e 50 mM por 48 horas. Após os estímulos, as células foram marcadas com a sonda FAM-FLICA (FL-1) e analisadas em citômetro FACS Calibur. Aonde dois asteriscos (**) e um (*) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,01$, $0,05$ respectivamente) em relação a cada concentração em comparação

5.9. Clivagem de Gasdermina-D

Com o objetivo de se verificar se ocorre a modulação da proteína efetora da via da piroptose, a partir do tratamento de metformina sobre as células hepáticas tumorais, avaliou-se indução de clivagem de GSMDD em células Hepa 1c1c7 em resposta ao estímulo à biguanida. Foi realizada análise por imunomarcção do lisado celular. Como apresentado pela figura 12, e verificou-se que a metformina induz clivagem de GSDMD em células de câncer de fígado murino 48 horas após início do estímulo, nas duas maiores concentrações utilizadas de 25mM e de 50mM.

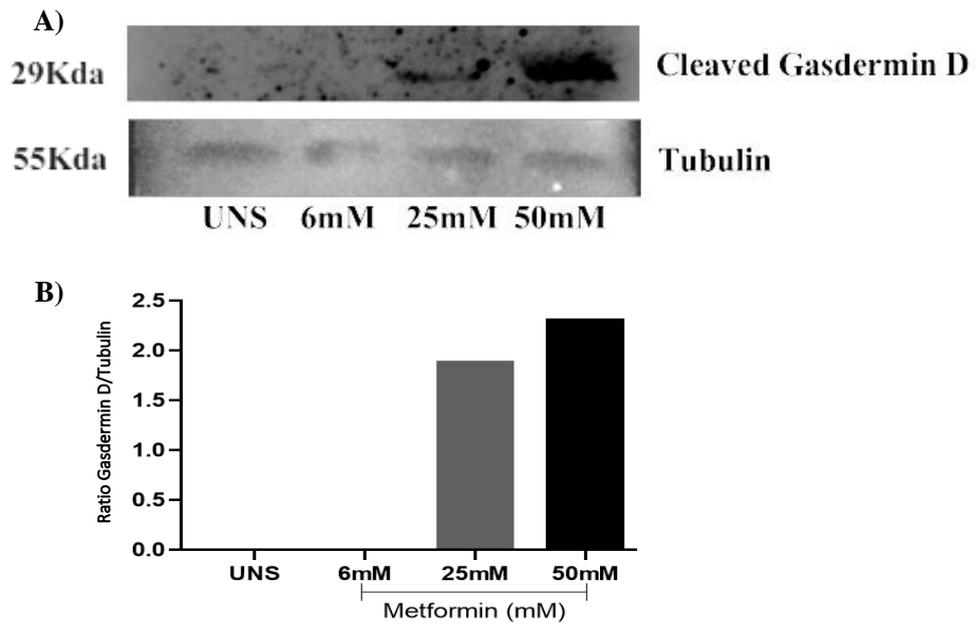


Figura 12: Metformina induz clivagem de Gasdermina D em células de câncer de fígado Hepa 1c1c7. (A-B) As células Hepa 1c1c7 foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 6mM, 25mM e 50mM por 48 horas. Após os estímulos, as células foram lisadas com tampão Triton, as proteínas foram quantificadas, separadas em gel de poliacrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose, bloqueadas e marcadas com anticorpos correspondentes.

5.10. Liberação de LDH

A fim de se avaliar se a metformina modula a secreção de Lactato Desidrogenase, foi avaliado após 24 e 48 horas após estímulo, por uma leitura de espectrofotometria. Os valores de fluorescência obtidos a partir da aquisição de células Hepa 1c1c7 tratadas com estímulos com a maior concentração utilizada de 50mM foi a única que modulou a secreção de LHD após 24 horas de estímulo (Fig 13A). Enquanto após a análise de 48 horas, observou-se que as duas maiores concentrações utilizadas de 25 e 50mM apresentaram alta modulação na secreção de Lactato Desidrogenase em relação às células não- estimuladas, e as menores concentrações (Fig 13B). Esse resultado sugere que as maiores concentrações investigadas de metformina alteram a produção a secreção de LDH em células de câncer de fígado Hepa 1c1c7 após 24 e 48 horas, horas de tratamento de forma tempo dependente.

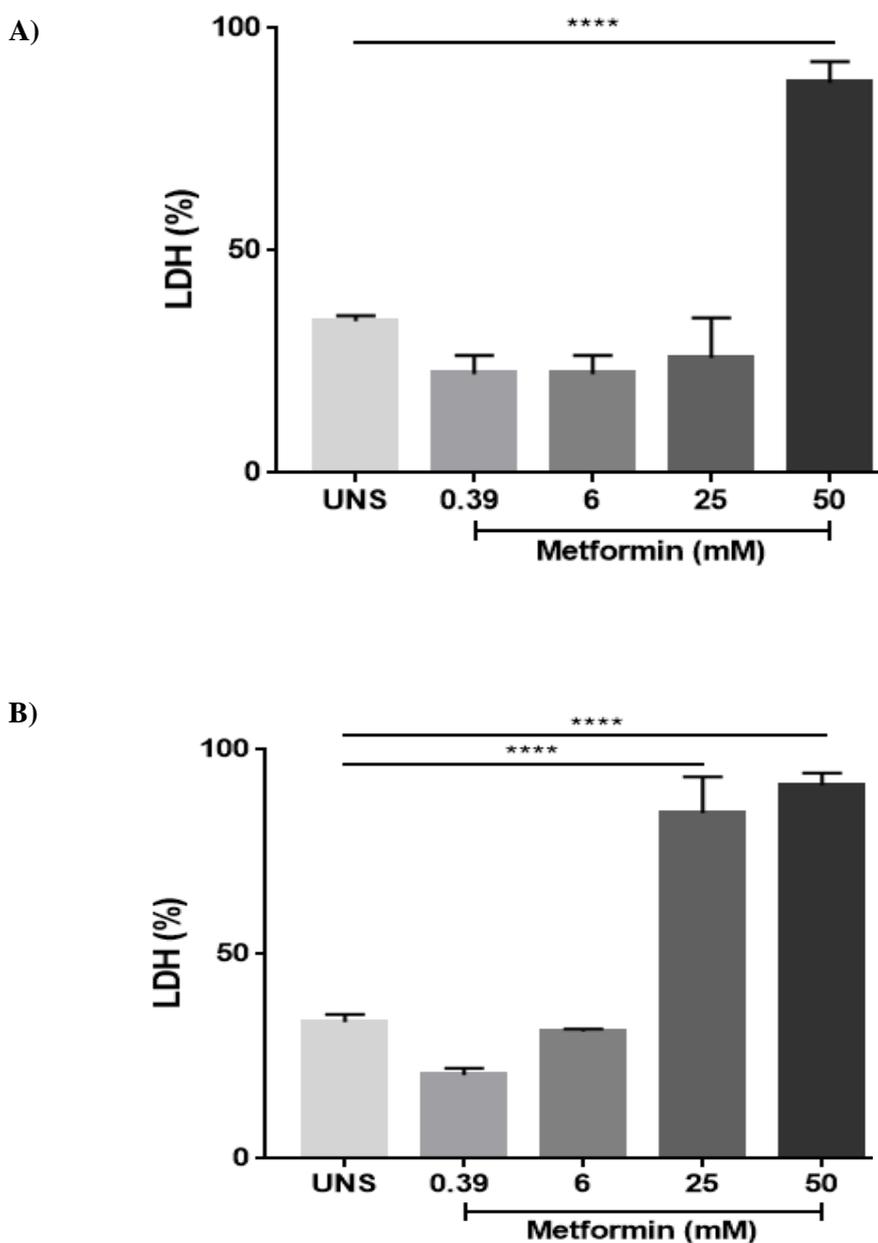


Figura 13: Metformina induz a secreção de Lactato Desidrogenase em células de câncer de fígado de Hepa 1c1c7. As células tumorais de fígado murinas Hepa foram plaqueadas, e após os estímulos de 24 e 48 horas (A-B) nas concentrações de 0.39mM, 6mM, 25mM e 50mM, as células foram tratadas com a solução fluorescente de Cyto Tox-ONE. Os valores de liberação de LDH foram calculados conforme orientação do fabricante a partir dos percentuais de células vivas em relação às células não-estimuladas (UNS), a quais foram consideradas 100 % vivas. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e quatro asteriscos (****), representam a diferença estatística significativa ($p < 0,0001$) em relação ao Não-estimulado (UNS).

5.11. Ensaio de formação de poros

Para se analisar o efeito da metformina sobre a integridade de membrana em célula de câncer de fígado Hepa 1c1c7, em tempos iniciais de estímulo, foi realizado um ensaio de formação de poro, utilizando o fluoróforo intercalante de DNA não permeável a membrana celular, iodeto de propídeo. O ensaio, baseia-se no fato de que caso célula apresente alguma alteração na permeabilidade de membrana plasmática ou qualquer outro tipo de modificação na integridade da mesma, o intercalante ultrapassa a membrana e interage com os ácidos nucleicos no interior das células e fluoresce.

A figura 14 mostra que a metformina é capaz de induzir alteração de integridade de membrana em células de câncer de fígado murino *in vitro* em tempos iniciais de tratamento nas maiores concentrações utilizadas de 6mM, 25mM e 50mM. É possível se verificar que os valores de fluorescência apresentados no ponto inicial do ensaio em resposta a todas as concentrações citadas de metformina foram maiores comparado ao não-estimulado, sendo que os estímulos de 25 e 50 mM foram os que apresentaram os maiores valores de fluorescência durante todo o ensaio (Fig. 14). Outro ponto observado foi que o dano a membrana celular ocorre de forma dose- dependente, já em tempos 12 horas de estímulo. Ressalta-se também que a metformina foi capaz de promover a indução de poro de forma independente aos mecanismos de ativação do inflamassoma NLRP3, tais como liberação de catepsina B (Fig. 14 B), liberação de ROS (Fig. 14 C), efluxo de potássio (Fig. 14 D), bem como ativação de caspase-1 (Fig. 14 E), a partir do uso de inibidores como Ca074, NAC, Gliburídeo, e Y-VAD, de forma respectiva, no tempo e concentrações analisados.

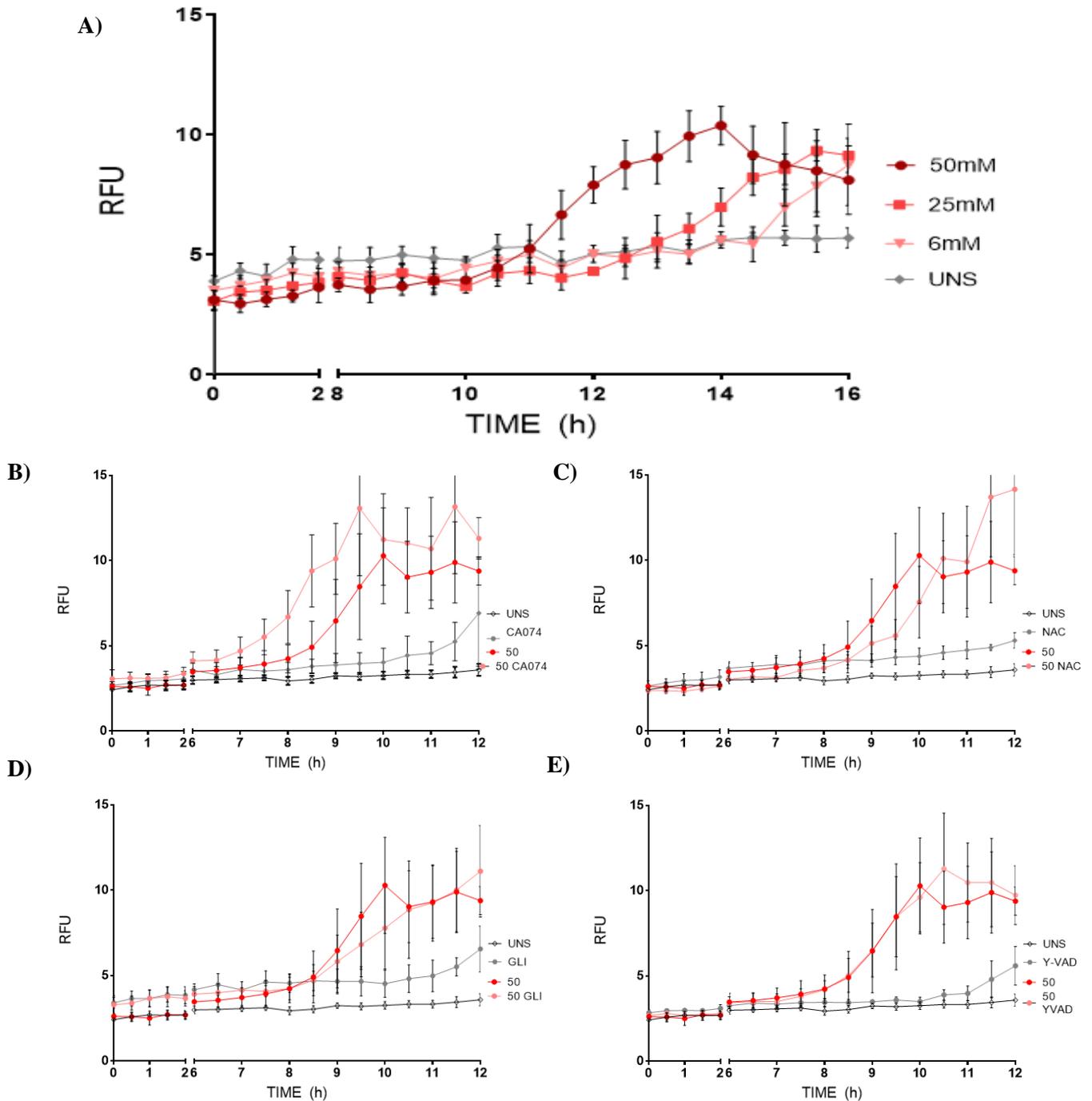


Figura 14: Metformina induz formação de poros na membrana plasmática de células Hepa 1c1c7. A) As células hepáticas murinas tumorais foram plaqueadas e estimuladas com diferentes concentrações de metformina e expostas a iodeto de propídeo por até 16 horas. B-D) As células foram plaqueadas e estimuladas com 50mM de metformina e tratadas 1 hora antes do estímulo com os inibidores Ca074, NAC, Gliburídeo e Y-VAD. Valores de fluorescência foram adquiridos em espectrofotômetro por até 12 horas.

5.12. Detecção de HMGB1

Buscando-se analisar o papel da metformina sobre a modulação de HMGB1 em células hepáticas murinas Hepa 1c1c7, foi realizada análise por imunomarcação das células para microscopia de fluorescência. Como apresentado pela figura 15, a concentração de 50mM de metformina induz uma maior concentração e migração de HMGB1 do núcleo para o citosol em células de câncer de fígado murino Hepa em comparação ao não-estimulado, 48 horas após início do estímulo.

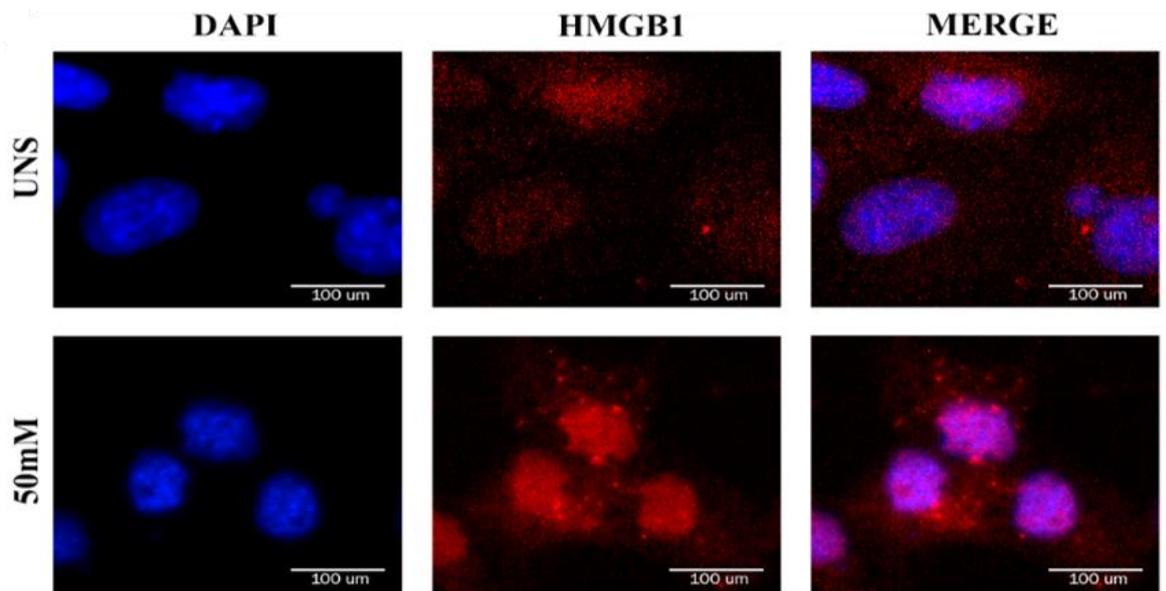


Figura 15: Metformina induz a translocação de HMGB1 em células de câncer de fígado Hepa 1c1c7. As células Hepa 1c1c7 foram plaqueadas e estimuladas com metformina na concentração de 50mM por 48 horas. Após os estímulos, as células foram fixadas com PFA 4X, bloqueadas e marcadas com DAPI e com o anticorpo correspondente.

5.13. Análise de detecção de citocinas

Tendo como objetivo investigar o efeito da metformina sobre secreção das citocinas IL-1 β (Fig 16 A-F) e TNF- α (Fig 17 A-F), foi realizada análise de sobrenadante de cultura utilizando a técnica do ELISA. A coleta dos sobrenadantes ocorreu 24 e 48 horas após o início do estímulo.

A quantificação da citocina IL-1 β e de TNF- α mostrou que as células Hepa ao serem estimuladas com 50mM de metformina secretam concentrações maiores dessas proteínas. Ao passo que as concentrações de secreção das mesmas citocinas foram consideravelmente menores quando tratadas com os diversos inibidores utilizados. A figura sugere que os diversos inibidores da via, como CA074, NAC, JSH-23, Gliburídeo, Y-VAD e Z-ZAD, de forma geral, foram capazes de inibir a produção das citocinas analisadas após 48 horas de estímulo com metformina.

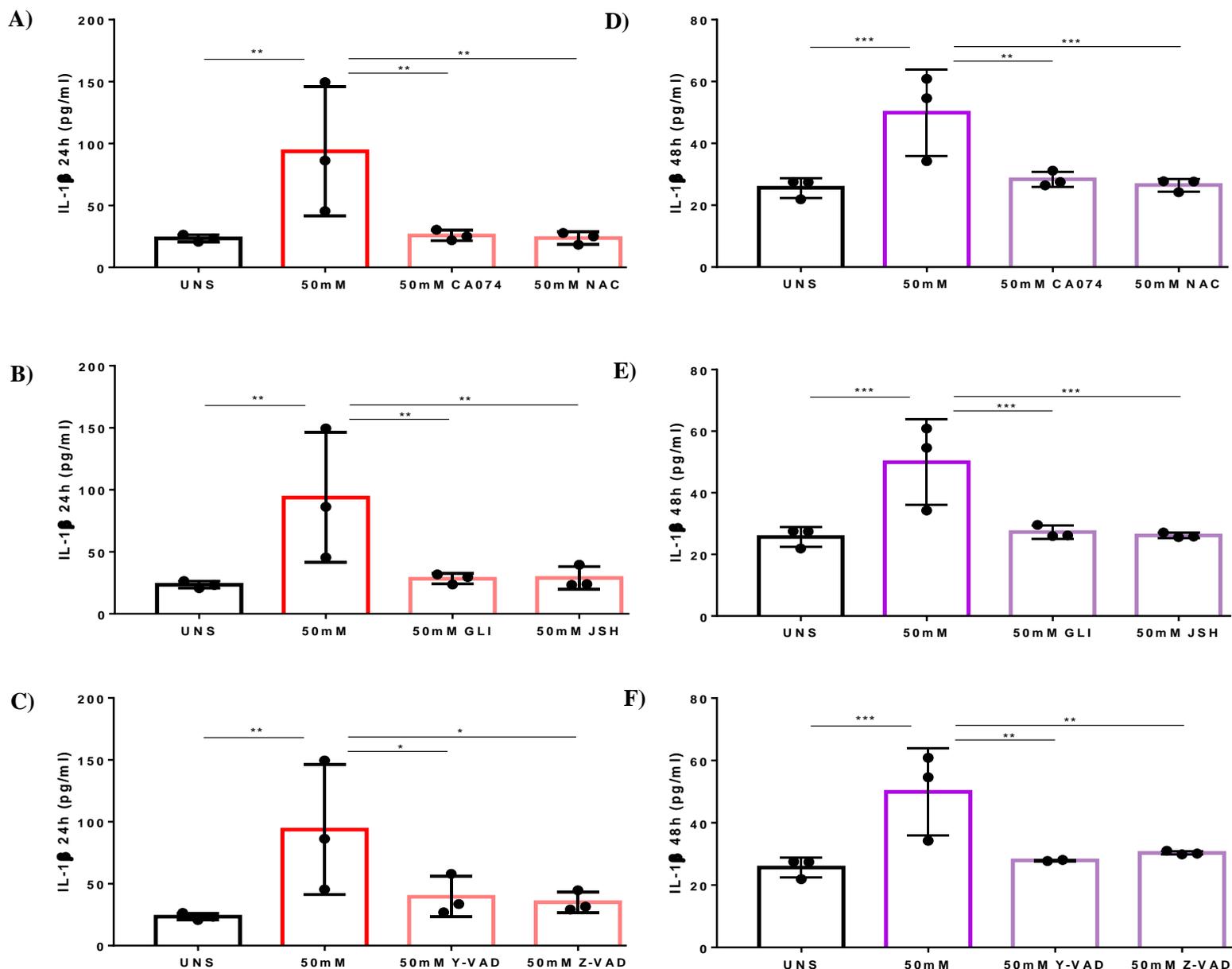


Figura 16: Metformina aumenta a secreção de IL-1β em células Hepa após 24 e 48 horas de estímulo.

Hepa 1c1c7 foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 50mM por 24 horas (A-C), 48 horas (D-F). Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de IL-1β foi dosada por ELISA. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**) e três asteriscos (***) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS) indicada por ANOVA e pós-teste de Turkey com exceção do dado de 50mM Y-VAD que foi detectado um valor outlier por meio do GraphPad QuickCalcs.

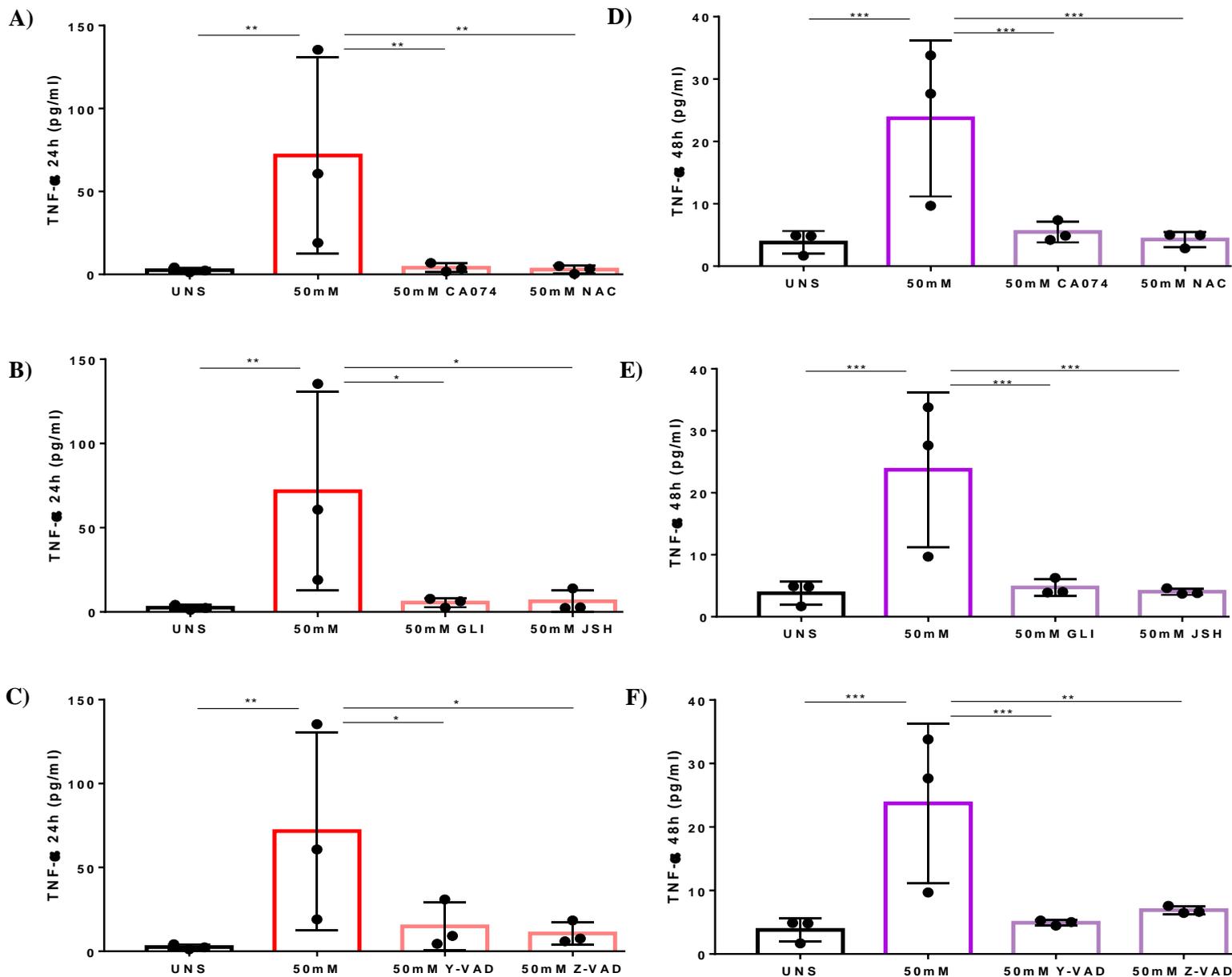


Figura 17. Metformina aumenta a secreção de TNF- α em células Hepa após 24 e 48 horas de estímulo.

Hepa 1c1c7 foram plaqueadas e estimuladas com metformina nas concentrações de 50mM por 24 horas (A-C), 48 horas (D-F). Após os estímulos, os sobrenadantes de cultura foram coletados e a quantidade de TNF- α foi dosada por ELISA. Cada barra representa a média do percentual \pm DP (n=3), e um asterisco (*), dois asteriscos (**), e três asteriscos (***) representam a diferença estatística significativa ($p < 0,001$, $p < 0,01$, $p < 0,05$, respectivamente) em relação ao Não-estimulado (UNS), ANOVA e pós-teste de Tukey.

6. Discussão

O presente trabalho, buscou avaliar os efeitos da metformina sobre células de câncer de fígado murino Hepa 1c1c7, analisando parâmetros celulares e investigando a morte celular induzida pela biguanida e mecanismos relacionados a via da piroptose. Foi demonstrado que a metformina pode induzir a morte por piroptose em células de fígado, Hepa 1c1c7. Os resultados obtidos mostraram a ação da biguanida sobre a ativação das caspases 1 e caspase 3, bem como de GSDMD, a translocação de HMGB1 do núcleo para o citosol, sobre a acidificação lisossomal, a indução de poros na membrana, a secreção de LDH e de citocinas como IL-1 β e TNF- α (de Vasconcelos et al., 2019) todos estes eventos estão de acordo com a literatura como indicadores de piroptose e corroboram a hipótese inicial do trabalho de que a metformina pode majoritariamente induzir morte celular por piroptose em células de HCC *in vitro*.

É conhecido o papel da inflamação como resposta a alterações na homeostase, como primeira linha de defesa do hospedeiro, seja uma alteração causada por patógenos ou por células em processos de morte. Este processo se inicia a partir do reconhecimento de características exclusivas de PAMP's e DAMPs por receptores de reconhecimento padrão PRRs. Esses receptores que reconhecem esses padrões distinguem os agentes infecciosos das próprias proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e açúcares do organismo por suas características moleculares e localização intracelular (Liu and Lieberman, 2017) e funciona como preparo do tecido para a ativação de respostas imune adaptativas para o controle da causa estressora que inicia este processo, seja ela por patógenos ou por demais células deterioradas e modulam diversos mediadores pró-inflamatórios e moléculas de ação citotóxica, além de migração intensa de células da resposta imune (Kotas, 2015).

Por razão da alta migração de células com potencial inflamatório, a perda do controle da inflamação, pode ser prejudicial para o tecido, podendo levar a perda de função tecidual, e progressão e estabelecimento de doenças crônicas, possibilitando e favorecendo uma série de patologias, como o câncer (Sugimoto et al., 2016). Também é estimado que mais de 22% dos casos de HCC em países ocidentais são atribuídos a casos relacionados a NAFLD, caracterizado por uma inflamação crônica no fígado (Makarova-rusher et al., 2017).

Sabendo que o processo inflamatório pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer, incluindo o HCC (Balkwill and Mantovani,

2001). A ação anti-inflamatória e anti-tumoral da metformina, sobre vários tipos de tumores, demonstra a versatilidade dessa biguanida no controle além dos níveis glicêmicos, como sobre na diminuição da progressão, desenvolvimento e alterações no prognóstico de diversos tipos de tumores (Hosono et al., 2010; Shi et al., 2012).

Além disso, estudos recentes demonstraram que a atividade da metformina também pode regular o crescimento das células e a proliferação das células T por meio de mecanismos dependentes de AMPK (Pernicova and Korbonits, 2014). A metformina afeta diversas células do sistema imune, como linfócitos, macrófagos e neutrófilos (Zarrouk et al., 2014). Essa capacidade anti-inflamatória está relacionada ao controle bioquímico que a biguanida exerce sobre as células diminuindo a expressão de ROS, modulando a via mTOR, a diminuição na síntese de ácidos graxos e demais controles de vias bioquímicas que acarretam na diminuição de atividades pro inflamatórias, resultando no processo de resolução de situações de inflamatórias (Pernicova and Korbonits, 2014).

Estudos recentes tem reportado, que além da função de controle glicêmico pelo qual foi desenvolvida, existem também atividades anti-tumorais da metformina, diminuindo a viabilidade e progressão das células tumoral (Tomic et al., 2011; Wang et al., 2019). Além disso foi demonstrado que em células de mielomas, a atividade anti-tumoral da metformina atuou de forma tempo e dose dependente *in vitro*, diminuindo a viabilidade dessas células e desencadeando mais de um tipo de morte ao mesmo tempo, bem como mostrou o controle da progressão tumoral em modelos *in vivo* (Pereira et al., 2018). O papel da metformina sobre os hepatócitos tumorais na redução da viabilidade e do perfil de morte, pelos ensaios de MTT e de Anexina V/PI também foi analisado neste trabalho, mostrando o efeito dose e tempo dependente da ação da biguanida, e potencialmente indicando uma morte multifacetada apresentada pelos hepatócitos. Porém, ficou evidenciado que a via de morte mais presente das células tumorais é a piroptose, enquanto as populações de células não tumorais sofreram mortes apoptóticas.

A ação dessa biguanida sobre os hepatócitos, ocorrem principalmente em função da ação da metformina sobre as vias dos complexos do mTOR, a inibição de síntese de ácidos graxos, ativação de p53 e via PI3K, processos os quais estão intrinsecamente relacionados com o desenvolvimento e progressão tumoral (Pernicova and Korbonits, 2014). O efeito exacerbado da metformina sobre os hepatócitos tumorais e o efeito mais modesto observado nos hepatócitos não tumorais, pode se dá pelo fato da maior expressão da família de transportadores SLC22A1, responsáveis pelo transporte de biguanidas para

o meio intracelular ser maior em células tumorais, conferindo assim uma maior suscetibilidade a ação da metformina (Pernicova and Korbonits, 2014).

O papel da metformina sobre a proliferação e o ciclo celular em neoplasmas mieloproliferativos, mostraram uma ação inibitória sobre a proliferação destas células, inibindo seu ciclo celular (Machado-Neto et al., 2018). Assim como foi demonstrado pelos ensaios de proliferação por CFSE, pelo ensaio de clonogênico, que possibilita a avaliação da capacidade reprodutiva de uma célula mediante um tratamento e pelo ensaio de ciclo celular, a metformina exerceu um papel retardando o ciclo celular e inibindo a proliferação em células de câncer de fígado murino *in vitro* verificamos que a metformina não afetou apenas o número de colônias formadas, mas também seu tamanho. Enquanto a condição não estimulada apresentou colônias com tamanho médio de 0,7725 mm², as células tratadas com 6, 25 e 50 µM de metformina foram associadas com tamanho médio de colônia de 0,57 mm², 0,2075 mm² e 0,05 mm². Portanto, o tratamento com metformina diminuiu o tamanho das colônias de células Hepa de maneira dependente da dose. Machado-Neto e colaboradores demonstraram que a ação inibitória da metformina sobre o ciclo celular, ocorre em decorrência de alterações de proteínas como ciclina D e p27, associadas à regulação do ciclo celular, ocasionando a parada da proliferação das células tumorais tratadas com metformina.

Sabe-se que a caspase-1 tem um papel efetor na maturação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1β e IL-18, bem como exerce importante papel propagatório da piroptose num sítio inflamatório, além de ser responsável pela maturação de GSDMD, uma das principais proteínas efetoras da piroptose (Miao, 2011). Também é conhecido o papel da caspase-3 sobre a indução da piroptose. Porém, neste caso, a piroptose é mediada pela proteína efectora GSDME (Hu et al., 2020). O mesmo efeito de ativação dessa enzima foi verificado no presente trabalho, ocorrendo ativação de caspase-1 em células de câncer de fígado de forma dose-dependente 48 horas após início do estímulo com metformina. Bem como também foi observado de forma dose-dependente a produção de caspase-3. Essa ativação de caspase-1 corrobora com a literatura, e indica que há indução de morte celular por piroptose nas células tumorais investigadas.

A clivagem da porção efectora N-terminal da GSDMD, se dá pela atividade da caspase-1, e esta região é responsável por se ligar a resíduos lipídicos como fosfatidil inositol, ácido fosfatídico, bem como fosfatidilserina, os quais são encontrados exclusivamente nas porções internas das membranas plasmáticas celulares em condições fisiológicas, bem como pode se ligar a cardiolipina, lipídeo encontrado em membranas

mitocondriais e bacterianas. As interações das regiões terminais GSDMD-N com componentes lipídicos da membrana plasmática promovem a formação de poros característicos da piroptose (Liu and Lieberman, 2017). A indução de clivagem de GSDMD em resposta ao tratamento com metformina, também foi verificado em células de câncer fígado murino, apresentando uma resposta de forma dose-dependente.

A piroptose é comumente avaliada a partir do ensaio de detecção de liberação do complexo tetramérico citosólico lactato desidrogenase (LDH) no meio extracelular, agindo com um indicador de lise celular, e é frequentemente interpretada como uma medida de morte celular (Rayamajhi et al., 2013). Além disso, também tem sido reportado o papel lisossomal sobre a piroptose. Indica-se que danos e rupturas na membrana lisossomal, causada por agentes estressores, podem levar a uma acidificação lisossomal, gerando liberação de catepsina B que leva a ativação do inflamassoma NLRP3 que está ligado diretamente com a morte celular lítica pela ativação de caspase-1 bem como formação de poros na membrana plasmática e clivagem de GSDMD (Alu et al., 2020). Outro parâmetro avaliado durante o processo da piroptose, é a detecção de poros característicos na membrana plasmática (Aglietti et al., 2016). A indução da acidificação lisossomal, a liberação de lactato desidrogenase bem como indução de poros induzidos pelo tratamento com metformina, também foram avaliadas no presente trabalho, indicando de forma tempo- e dose-dependente a ação da metformina nestes parâmetros analisados sobre os hepatócitos tumorais.

A expressão de HMGB1 é aumentada em diversos tipos de tumores, bem como seu receptor de membrana RAGE, responsável por reconhecer HMGB1 extracelular e iniciar uma cascata de sinalização intracelular ativando a inflamação (Sims et al., 2010), tendo papel central na ativação de caspase-1 durante a progressão de HCC (Yan et al., 2012). Sabe-se também de seu papel durante a piroptose, atuando durante a morte piroptótica, de forma parácrina as células adjacente, amplificando o processo inflamatório (LaRock and Cookson, 2013). Nesse contexto, também foi avaliado por microscopia de fluorescência a capacidade da metformina de induzir o aumento de expressão de HMGB1 e sua translocação do núcleo para o citoplasma. Foi observado sob as condições de maior concentração utilizada, de 50mM, que a metformina induz a translocação de HMGB1 do núcleo para o meio citoplasmático, indicando assim seu provável papel durante a piroptose induzida por metformina, em células tumorais hepáticas.

Segundo (Bozza and Viola, 2010), o corpúsculo lipídico é considerado uma organela que desempenha importante papel nos processos de sinalização celular e inflamatórios, bem como tem importante papel em todo o processo de armazenamento de lipídeos, enzimas, kinases e outras proteínas que conferem a essa organela, seu papel regulatório em diversos processos celulares. Os corpúsculos lipídicos estão presentes em diversos modelos celulares, como leucócitos, células epiteliais e hepatócitos, e podem favorecer o estabelecimento e progressão tumoral, funcionando como fonte energética a uma série de tumores como carcinomas, e câncer de mama, próstata e cólon (Swinnen et al., 2006). Para avaliar o possível efeito que a metformina poderia exercer sob a biogênese de corpúsculos lipídicos nos hepatócitos murinos, foi observado que não houve modulação, independente da concentração de metformina utilizada, em nenhum dos modelos hepáticos analisados.

O papel das citocinas TNF- α e IL-1 β como um dos principais meios de comunicação entre o micro ambiente inflamatório e as células, através de suas secreções, atua de modo a aumentar a propagação da inflamação e da capacidade invasiva de tumores (Balkwill and Mantovani, 2005). Sabe-se também que a IL-1 β é uma das principais citocinas produzidas e secretadas durante o processo piroptótico (Liu et al., 2014). A maturação de IL-1 β é dependente da clivagem de caspase-1 e de NLRP3, logo após a priming do inflamassoma, que leva a formação da forma madura da citocina. O priming dependente de TLR do inflamassoma e envolve a transcrição aumentada dependente de NF- κ B de pro-IL-1 β e o aumento da expressão de NLRP3 (Gupta and Barthwal, 2018).

Embora as vias de sinalização e de síntese das citocinas avaliadas sejam distintas, já existem evidências que indicaram que IL-1 β sensibiliza hepatócitos primários de camundongos à citotoxicidade induzida por TNF- α e que poderia induzir um aumento significativo na produção de TNF- α , sugerindo que essas citocinas estão funcionalmente relacionadas (Petrasek et al., 2012). Ressalta-se que apesar das vias de biogênese e de sinalização de IL-1 β e de TNF- α serem distintas, sabe-se que o TNF- α pode aumentar a síntese de ROS além de aumentar a expressão de caspase-1 (Jain et al., 2007; Kim et al., 2010), bem como é sugerido que a liberação de catepsina B dos lisossomas aumenta a liberação mitocondrial do citocromo c e subsequente ativação da caspase-1 em hepatócitos tratados com TNF- α (Guicciardi et al., 2000). Além disso a toxicidade induzida pela metformina, observada no trabalho, leva os hepatócitos tumorais a lise por piroptose, o que induz a produção de diversos fatores que podem agir como DAMP's,

como HMGB1, LDH e a própria IL-1 β , e essa percepção de DAMP's pelas células adjacentes, pode levar a uma maior produção de TNF- α . Desta forma diversos inibidores relacionados a via de síntese de IL-1 β , que também podem se relacionar de forma indireta com a via de TNF- α , durante a piroptose foram utilizados, como os inibidores de caspases Y-VAD e Z-VAD, além de inibidores de catepsina B e de ROS, Ca074 e NAC respectivamente. Também como foi utilizado inibidores em comum das vias das duas citocinas analisadas, gliburídeo e JSH-23, inibidores de efluxo de K⁺ e de NF- κ B.

Também foi observado que a capacidade da metformina em promover a indução de poros na membrana plasmática ocorre de forma independente do efluxo de potássio, de catepsina B, de ROS e de caspase-1 nas concentrações e tempos analisados. Desta forma, são necessários estudos adicionais utilizando concentrações e tempos mais precoces de análise para se verificar mais precisamente este fenômeno, como descrito por (McKenzie et al., 2020) e por (Lin et al., 2020). Ressalta-se também que a secreção das citocinas analisadas, após o tratamento com a biguanida, pode acontecer por mecanismos distintos da via da piroptose e do poro na membrana plasmática induzido pela metformina, como mecanismos de secreção via vesícula e exocitose (Lopez-Castejon and Brough, 2011).

Após as análises das citocinas, pôde-se afirmar que a metformina, induziu o aumento de secreção de IL-1 β e de TNF- α , e de efeito semelhante entre as duas citocinas, foi visto mediante o tratamento concomitante de metformina, com o uso de inibidores de diversos pontos da via piroptótica, a redução da secreção de citocinas foi inibida a nível de não estimulado, sugerindo o papel que a biguanida tem sobre a via da piroptose e de secreção das citocinas analisadas.

Em síntese, foi demonstrado no trabalho, o papel da metformina sobre as células de câncer de fígado Hepa 1c1c7, atuando sobre a viabilidade, sobrevivência e proliferação das células tumorais. Mostramos também a modulação dos níveis de mecanismos chaves para o estabelecimento e progressão da piroptose, como a ativação de caspase-1, a formação de poros na membrana celular, a liberação de LDH, a acidificação lisossomal, a translocação de HMGB1 e a clivagem de GSDMD, bem como a liberação de IL-1 β . Nossos resultados sugerem que a metformina pode induzir a piroptose por meio da ativação de algumas vias dependentes de inflamassoma, a medida que a liberação de IL-1 β pôde ser observada, o que foi confirmado pelo uso de diversos inibidores da via da piroptose.

7. Conclusão

Pode-se concluir a partir desse trabalho que a metformina apresenta características anti-tumorais em células de câncer de fígado murino *in vitro* por induzir a perda de viabilidade e morte das células tumorais, além de ter sido descrito pela primeira vez o perfil de morte por piroptose através da ativação de caspase-1, detecção de GSDMD clivada, além da translocação de HMGB1, a indução de poros bem como da secreção de IL-1 β em células de hepatocarcinoma murino.

De forma mais objetiva o trabalho mostrou que:

- A) A metformina atua na diminuição da viabilidade, sobrevivência, e retardando do ciclo celular em G2/M bem como na proliferação de células de câncer de fígado;
- B) A metformina é capaz de induzir morte celular por piroptose em células Hepa 1c1c7;
- C) A metformina não alterou os níveis de biogênese de corpúsculos lipídicos nos hepatócitos analisados;
- D) A metformina é capaz de aumentar a acidificação lisossomal nas células tratadas;
- E) A metformina foi capaz de induzir a produção de pro-caspase-1, caspase-3 e de GSDMD clivada;
- F) A metformina foi capaz de induzir a secreção de LDH nos hepatócitos analisados;
- G) A metformina foi capaz de induzir a formação de poros na membrana plasmática de forma tempo e dose-dependente;
- H) A metformina foi capaz de induzir a translocação de HMGB1 a partir do núcleo para o citoplasma;
- I) A metformina é capaz de aumentar a secreção de IL-1b e TNF-a, de forma dependente de mecanismos inibitórios da via da piroptose como ROS, Catepsina B, NF- κ B e NLRP3.

Modelo proposto de ação da metformina sobre células de câncer de hepatocarcinoma (HCC)

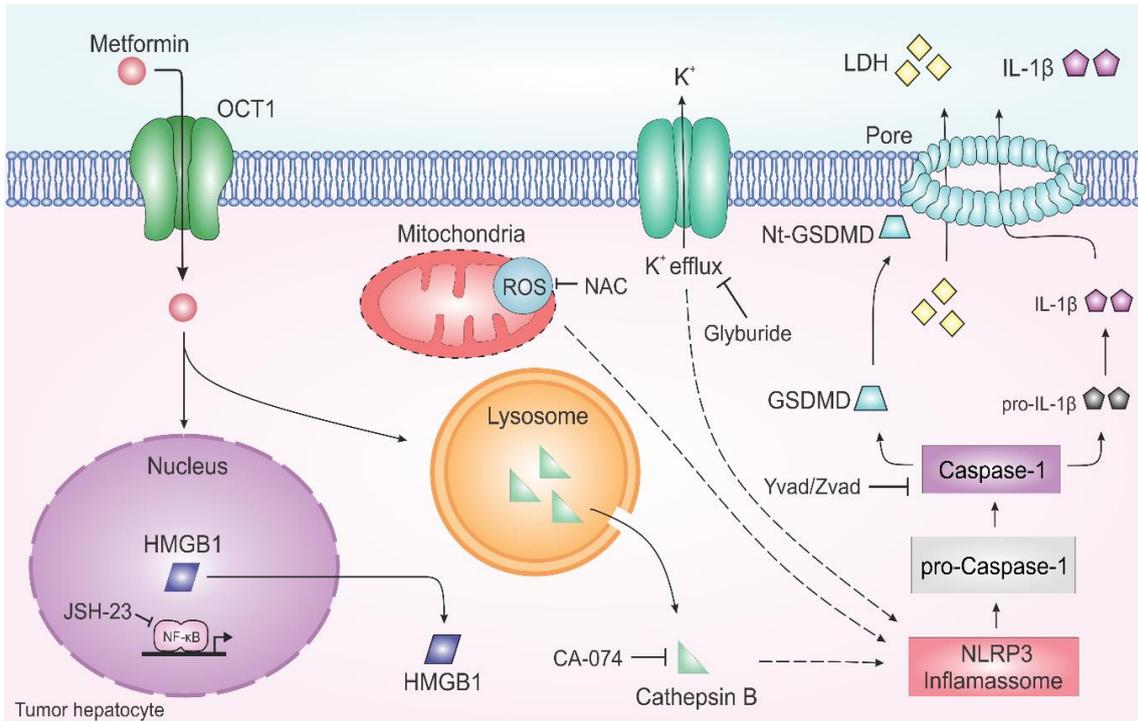


Figura 18: Proposta de mecanismo de ação da metformina sobre o hepatócito tumoral. A entrada da metformina, através de seu transportador OCT1/SLC22A1, promove a translocação de HMGB1 para o citosol, alterações mitocondriais e lisossômicas, que levam a alterações nos níveis de ROS e a liberação de CatB. A liberação subsequente de CatB, que pode ser inibida por Ca074, ativa o inflamassoma NLRP3 estimulando a caspase-1, que quando ativada conduzem a clivagem de pro-IL-1b e GSDMD, coordenando a lise da membrana, liberação de IL-1b madura, LDH e piroptose final.

8. Referências

Aglietti, R. A., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, M. G., Liu, P. S., Kayagaki, N., et al. (2016). GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 7858–7863. doi:10.1073/pnas.1607769113.

Alu, A., Han, X., Ma, X., Wu, M., Wei, Y., and Wei, X. (2020). The role of lysosome in regulated necrosis. *Acta Pharm. Sin. B* 10, 1880–1903. doi:10.1016/j.apsb.2020.07.003.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545. doi:10.1016/S0140-6736(00)04046-0.

Bebber, C. M., Müller, F., Clemente, L. P., Weber, J., and von Karstedt, S. (2020). Ferroptosis in cancer cell biology. *Cancers (Basel)*. 12. doi:10.3390/cancers12010164.

Blackadar, C. B. (2016). Historical review of the causes of cancer. *World J. Clin. Oncol.* 7, 54–86. doi:10.5306/wjco.v7.i1.54.

Bosetti, C., Turati, F., and La Vecchia, C. (2014). Hepatocellular carcinoma epidemiology. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 28, 753–770. doi:10.1016/j.bpg.2014.08.007.

Bozza, P. T., and Viola, J. P. B. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 82, 243–250. doi:10.1016/j.plefa.2010.02.005.

Chambers, A. F., Groom, A. C., and Macdonald, I. C. (2002). DISSEMINATION AND GROWTH OF. 2. doi:10.1038/nrc865.

Chen, H. P., Shieh, J. J., Chang, C. C., Chen, T. T., Lin, J. T., Wu, M. S., et al. (2013). Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: Population-based and in vitro studies. *Gut* 62, 606–615. doi:10.1136/gutjnl-2011-301708.

de Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N., Van Gorp, H., Parthoens, E., and Lamkanfi, M. (2019). Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death Differ.* 26, 146–161. doi:10.1038/s41418-018-0106-7.

Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., et al. (2016). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 535, 111–116. doi:10.1038/nature18590.

Donadon, V., Balbi, M., Mas, M. D., Casarin, P., and Zanette, G. (2010). Metformin and reduced risk of hepatocellular carcinoma in diabetic patients with chronic liver

disease. *Liver Int.* 30, 750–758. doi:10.1111/j.1478-3231.2010.02223.x.

Elliott, E. I., and Sutterwala, F. S. (2015). Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol. Rev.* 265, 35–52. doi:10.1111/imr.12286.

Fearnhead, H. O., Vandenabeele, P., and Berghe, T. Vanden (2017). How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death? *Cell Death Differ.* 24, 1991–1998. doi:10.1038/cdd.2017.149.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, E359–E386. doi:10.1002/ijc.29210.

Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M., and Viollet, B. (2014). Metformin: From mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.* 20, 953–966. doi:10.1016/j.cmet.2014.09.018.

Fuchs, Y., and Steller, H. (2015). Live to die another way: Modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 329–344. doi:10.1038/nrm3999.

Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S. F., Svingen, P. A., Peters, C., et al. (2000). Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J. Clin. Invest.* 106, 1127–1137. doi:10.1172/JCI9914.

Gupta, P., and Barthwal, M. K. (2018). IL-1 β genesis: the art of regulating the regulator. *Cell. Mol. Immunol.* 15, 998–1000. doi:10.1038/s41423-018-0054-7.

Hadad, S. M., Coates, P., Jordan, L. B., Dowling, R. J. O., Chang, M. C., Done, S. J., et al. (2015). Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: biomarker analysis in a pre-operative window of opportunity randomized trial. *Breast Cancer Res. Treat.* 150, 149–155. doi:10.1007/s10549-015-3307-5.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

He, Q., Zou, Q., and Guan, Y. S. (2010). Viral hepatitis and liver cancer. *Nose Viral Cancer Etiol. Pathog. Treat.*, 291–307. doi:10.1055/s-0028-1104016.

He, Y., Hara, H., and Núñez, G. (2016). Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem. Sci.* 41, 1012–1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002.

Higurashi, T., Hosono, K., Takahashi, H., Komiya, Y., Umezawa, S., Sakai, E., et

al. (2016). Metformin for chemoprevention of metachronous colorectal adenoma or polyps in post-polypectomy patients without diabetes: a multicentre double-blind, placebo-controlled, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 17, 475–483. doi:10.1016/S1470-2045(15)00565-3.

Hosono, K., Endo, H., Takahashi, H., Sugiyama, M., Sakai, E., Uchiyama, T., et al. (2010). Metformin suppresses colorectal aberrant crypt foci in a short-term clinical trial. *Cancer Prev. Res.* 3, 1077–1083. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0186.

Hu, L., Chen, M., Chen, X., Zhao, C., Fang, Z., Wang, H., et al. (2020). Chemotherapy-induced pyroptosis is mediated by BAK/BAX-caspase-3-GSDME pathway and inhibited by 2-bromopalmitate. *Cell Death Dis.* 11. doi:10.1038/s41419-020-2476-2.

Hu, L., Zeng, Z., Xia, Q., Liu, Z., Feng, X., Chen, J., et al. (2019). Metformin attenuates hepatoma cell proliferation by decreasing glycolytic flux through the HIF-1 α /PFKFB3/PFK1 pathway. *Life Sci.* 239. doi:10.1016/j.lfs.2019.116966.

Jain, N., Sudhakar, C., and Swarup, G. (2007). Tumor necrosis factor- α -induced caspase-1 gene expression: Role of p73. *FEBS J.* 274, 4396–4407. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05969.x.

Jiang, C. M., Pu, C. W., Hou, Y. H., Chen, Z., Alanazy, M., and Hebbard, L. (2014). Non alcoholic steatohepatitis a precursor for hepatocellular carcinoma development. *World J. Gastroenterol.* 20, 16464–16473. doi:10.3748/wjg.v20.i44.16464.

Jorgensen, I., Rayamajhi, M., and Miao, E. A. (2017). Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* 17, 151–164. doi:10.1038/nri.2016.147.

Kim, J. J., Lee, S. B., Park, J. K., and Yoo, Y. D. (2010). TNF- α -induced ROS production triggering apoptosis is directly linked to Romo1 and Bcl-XL. *Cell Death Differ.* 17, 1420–1434. doi:10.1038/cdd.2010.19.

Kolb, R., Liu, G. H., Janowski, A. M., Sutterwala, F. S., and Zhang, W. (2014). Inflammasomes in cancer: A double-edged sword. *Protein Cell* 5, 12–20. doi:10.1007/s13238-013-0001-4.

Kotas, M. E., and Medzhitov, R. (2015). Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. *Cell* 160, 816–827. doi:10.1016/j.cell.2015.02.010.

Lamkanfi, M., and Dixit, V. M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell* 157, 1013–1022. doi:10.1016/j.cell.2014.04.007.

LaRock, C. N., and Cookson, B. T. (2013). Burning Down the House: Cellular Actions during Pyroptosis. *PLoS Pathog.* 9, 1–3. doi:10.1371/journal.ppat.1003793.

Latz, E., Xiao, T. S., and Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 397–411. doi:10.1038/nri3452.

Lin, J., Cheng, A., Cheng, K., Deng, Q., Zhang, S., Lan, Z., et al. (2020). New insights into the mechanisms of pyroptosis and implications for diabetic kidney disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 1–23. doi:10.3390/ijms21197057.

Linkermann, A., Stockwell, B. R., Krautwald, S., and Anders, H. J. (2014). Regulated cell death and inflammation: An auto-amplification loop causes organ failure. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 759–767. doi:10.1038/nri3743.

Liu, T., Yamaguchi, Y., Shirasaki, Y., Shikada, K., Yamagishi, M., Hoshino, K., et al. (2014). Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response. *Cell Rep.* 8, 974–982. doi:10.1016/j.celrep.2014.07.012.

Liu, X., and Lieberman, J. (2017). *A Mechanistic Understanding of Pyroptosis: The Fiery Death Triggered by Invasive Infection*. 1st ed. Elsevier Inc. doi:10.1016/bs.ai.2017.02.002.

Llovet, J. M., Di Bisceglie, A. M., Bruix, J., Kramer, B. S., Lencioni, R., Zhu, A. X., et al. (2008). Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 100, 698–711. doi:10.1093/jnci/djn134.

Lopez-Castejon, G., and Brough, D. (2011). Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine Growth Factor Rev.* 22, 189–195. doi:10.1016/j.cytogfr.2011.10.001.

Luo, Q., Zhang, L., Luo, C., and Jiang, M. (2019). Emerging strategies in cancer therapy combining chemotherapy with immunotherapy. *Cancer Lett.* 454, 191–203. doi:10.1016/j.canlet.2019.04.017.

MacHado-Neto, J. A., Fenerich, B. A., Scopim-Ribeiro, R., Eide, C. A., Coelho-Silva, J. L., Dechandt, C. R. P., et al. (2018). Metformin exerts multitarget antileukemia activity in JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasms. *Cell Death Dis.* 9. doi:10.1038/s41419-017-0256-4.

Maione, D., Di Carlo, E., Li, W., Musiani, P., Modesti, A., Peters, M., et al. (1998). Coexpression of IL-6 and soluble IL-6R causes nodular regenerative hyperplasia and adenomas of the liver. *EMBO J.* 17, 5588–5597. doi:10.1093/emboj/17.19.5588.

Makarova-rusher, O. V., Altekruze, S. F., Mcneel, T. S., Ulahannan, S., Duffy, A. G., Graubard, B. I., et al. (2017). HHS Public Access. 122, 1757–1765. doi:10.1002/cncr.29971.Population.

Man, K., Ng, K. T. P., Xu, A., Cheng, Q., Lo, C. M., Xiao, J. W., et al. (2010).

Suppression of liver tumor growth and metastasis by adiponectin in nude mice through inhibition of tumor angiogenesis and downregulation of rho kinase/IFN-inducible protein 10/matrix metalloproteinase 9 signaling. *Clin. Cancer Res.* 16, 967–977. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1487.

Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., and Baradaran, B. (2017). The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv. Pharm. Bull.* 7, 339–348. doi:10.15171/apb.2017.041.

Marengo, A., Rosso, C., and Bugianesi, E. (2016). Liver cancer: Connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis. *Annu. Rev. Med.* 67, 103–117. doi:10.1146/annurev-med-090514-013832.

Marrero, J. A., Fontana, R. J., Su, G. L., Conjeevaram, H. S., Emick, D. M., and Lok, A. S. (2002). NAFLD may be a common underlying liver disease in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Hepatology* 36, 1349–1354. doi:10.1053/jhep.2002.36939.

McKenzie, B. A., Dixit, V. M., and Power, C. (2020). Fiery Cell Death: Pyroptosis in the Central Nervous System. *Trends Neurosci.* 43, 55–73. doi:10.1016/j.tins.2019.11.005.

Miao, E. A. (2011). Caspase 1 Induced Pyroptosis Cell Death.Pdf. *Immunol. Rev.* 243, 206–214.

Miao, E. A., Leaf, I. A., Treuting, P. M., Mao, D. P., Dors, M., Sarkar, A., et al. (2010). Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat. Immunol.* 11, 1136–1142. doi:10.1038/ni.1960.

PEREIRA, C. M. B. L. (2016). *Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer.* doi:978-85-7318-194-4.

Pereira, F. V., Melo, A. C. L., Low, J. S., de Castro, Í. A., Braga, T. T., Almeida, D. C., et al. (2018). Metformin exerts antitumor activity via induction of multiple death pathways in tumor cells and activation of a protective immune response. *Oncotarget* 9, 25808–25825. doi:10.18632/oncotarget.25380.

Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin-Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* 10, 143–156. doi:10.1038/nrendo.2013.256.

Petrasek, J., Bala, S., Csak, T., Lippai, D., Kody, K., Menashy, V., et al. (2012). IL-1 receptor antagonist ameliorates inflammasome-dependent alcoholic steatohepatitis in mice. *J. Clin. Invest.* 122, 3476–3489. doi:10.1172/JCI60777.

Pikala, M., and Maniecka-Bryla, I. (2014). Years of life lost due to malignant neoplasms characterized by the highest mortality rate. *Arch. Med. Sci.* 10, 999–1006. doi:10.5114/aoms.2013.36237.

Rayamajhi, M., Zhang, Y., and Miao, E. A. (2013). Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol. Biol.* 1040, 85–90. doi:10.1007/978-1-62703-523-1-7.

Rena, G., Hardie, D. G., and Pearson, E. R. (2017). The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia* 60, 1577–1585. doi:10.1007/s00125-017-4342-z.

Rizwan, A. N., and Burckhardt, G. (2007). Organic anion transporters of the SLC22 family: Biopharmaceutical, physiological, and pathological roles. *Pharm. Res.* 24, 450–470. doi:10.1007/s11095-006-9181-4.

Sangiuliano, B., Pérez, N. M., Moreira, D. F., and Belizário, J. E. (2014). Cell death-associated molecular-pattern molecules: Inflammatory signaling and control. *Mediators Inflamm.* 2014. doi:10.1155/2014/821043.

Saxena, N. K., Sharma, D., Ding, X., Lin, S., Marra, F., Merlin, D., et al. (2007). Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 67, 2497–2507. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3075.

Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., et al. (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *EMBO J.* 35, 1766–1778. doi:10.15252/embj.201694696.

Section, S. (2011). A Perspective on Cancer. 1559–1565.

Shackelford, D. (2013). Unravelling the connection between metabolism and tumorigenesis through studies of the liver kinase B1 tumour suppressor. *J. Carcinog.* 12, 1–10. doi:10.4103/1477-3163.116323.

Shah, M. A., Denton, E. L., Arrowsmith, C. H., Lupien, M., and Schapira, M. (2014). A global assessment of cancer genomic alterations in epigenetic mechanisms. *Epigenetics and Chromatin* 7. doi:10.1186/1756-8935-7-29.

Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., et al. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 526, 660–665. doi:10.1038/nature15514.

Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., et al. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* 514, 187–192. doi:10.1038/nature13683.

Shi, W. Y., Xiao, D., Wang, L., Dong, L. H., Yan, Z. X., Shen, Z. X., et al. (2012). Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis.* 3, e275-9. doi:10.1038/cddis.2012.13.

Shin, H. R., Oh, J. K., Masuyer, E., Curado, M. P., Bouvard, V., Fang, Y. Y., et al. (2010). Epidemiology of cholangiocarcinoma: An update focusing on risk factors. *Cancer Sci.* 101, 579–585. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01458.x.

Simard, S., Thewes, B., Humphris, G., Dixon, M., Hayden, C., Mireskandari, S., et al. (2013). Fear of cancer recurrence in adult cancer survivors: A systematic review of quantitative studies. *J. Cancer Surviv.* 7, 300–322. doi:10.1007/s11764-013-0272-z.

Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R., and Coyle, A. J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 367–388. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132603.

Sugimoto, M. A., Sousa, L. P., Pinho, V., Perretti, M., and Teixeira, M. M. (2016). Resolution of inflammation: What controls its onset? *Front. Immunol.* 7. doi:10.3389/fimmu.2016.00160.

Sun, W., and Yang, J. (2010). Functional mechanisms for human tumor suppressors. *J. Cancer* 1, 136–140. doi:10.7150/jca.1.136.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., et al. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* 0, 1–41. doi:10.3322/caac.21660.

Swinnen, J. V., Brusselmans, K., and Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: New players, novel targets. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 9, 358–365. doi:10.1097/01.mco.0000232894.28674.30.

Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P., and Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* 29, 347–364. doi:10.1038/s41422-019-0164-5.

Tokushige, K., Hashimoto, E., Horie, Y., Tani, M., and Higuchi, S. (2011). Hepatocellular carcinoma in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease, alcoholic liver disease, and chronic liver disease of unknown etiology: report of the nationwide survey. *J. Gastroenterol.* 46, 1230–1237. doi:10.1007/s00535-011-0431-9.

Tomic, T., Botton, T., Cerezo, M., Robert, G., Luciano, F., Puissant, A., et al. (2011). Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis

mechanisms. *Cell Death Dis.* 2, e199-10. doi:10.1038/cddis.2011.86.

Valastyan, S., and Weinberg, R. A. (2011). Tumor metastasis: Molecular insights and evolving paradigms. *Cell* 147, 275–292. doi:10.1016/j.cell.2011.09.024.

Vanni, E., and Bugianesi, E. (2014). Obesity and liver cancer. *Clin. Liver Dis.* 18, 191–203. doi:10.1016/j.cld.2013.09.001.

Wang, L., Li, K., Lin, X., Yao, Z., Wang, S., Xiong, X., et al. (2019). Metformin induces human esophageal carcinoma cell pyroptosis by targeting the miR-497 / PELP1 axis. *Cancer Lett.* 450, 22–31. doi:10.1016/j.canlet.2019.02.014.

Weinstein, I. B., and Joe, A. K. (2006). Mechanisms of Disease: Oncogene addiction - A rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 3, 448–457. doi:10.1038/ncponc0558.

Woźniak, K., and Izycki, D. (2014). Cancer: A family at risk. *Prz. Menopauzalny* 13, 253–261. doi:10.5114/pm.2014.45002.

Yan, W., Chang, Y., Liang, X., Cardinal, J. S., Huang, H., Thorne, S. H., et al. (2012). High-mobility group box 1 activates caspase-1 and promotes hepatocellular carcinoma invasiveness and metastases. *Hepatology* 55, 1863–1875. doi:10.1002/hep.25572.

Zarrouk, M., Finlay, D. K., Foretz, M., Viollet, B., and Cantrell, D. A. (2014). Adenosine-mono-phosphate-activated protein kinase-independent effects of metformin in T cells. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0106710.

Zhou, J., Fan, J., Wang, Z., Wu, Z. Q., Qiu, S. J., Huang, X. W., et al. (2006). Conversion to sirolimus immunosuppression in liver transplantation recipients with hepatocellular carcinoma: Report of an initial experience. *World J. Gastroenterol.* 12, 3114–3118. doi:10.3748/wjg.v12.i19.3114.