

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

VÂNIA MARISIA SANTOS FORTES DOS REIS

**EFEITO DA METFORMINA NO POTENCIAL METASTÁTICO DE CÉLULAS EPITELIAIS ENDOMETRIAIS
PRIMÁRIAS EM UM AMBIENTE HIPERINSULINÊMICO.**

PORTO ALEGRE
MAIO/2015

VÂNIA MARISIA SANTOS FORTES DOS REIS

**EFEITO DA METFORMINA NO POTENCIAL METASTÁTICO DE CÉLULAS EPITELIAIS ENDOMETRIAIS
PRIMÁRIAS EM UM AMBIENTE HIPERINSULINÊMICO.**

Trabalho de conclusão de curso de graduação
apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da
Saúde da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul como requisito parcial para a obtenção
do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp
Coorientadora: MSc. Amanda de Barros
Machado

PORTO ALEGRE

MAIO/2015

“Si ka badu, ka ta biradu.”

– Eugénio Tavares

Agradecimentos

A Deus, por ter-me acompanhado sempre, mas principalmente desde que parti do meu país e vim ao Brasil. Me transmitiu luz, segurança e certeza na minha caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Capp, pela disponibilidade e auxílio proporcionados ao longo do trabalho. Obrigada pela oportunidade de fazer parte deste projeto.

À Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum, por me acolher no laboratório desde a iniciação científica, o que contribuiu muito para a minha realização e conhecimento. Obrigada pelos ensinamentos transmitidos e pela confiança depositada no trabalho. À Prof^a. Dr^a. Helena Corleta, pelo apoio intelectual e disposição em ajudar sempre que necessário.

À minha coorientadora, Amanda de Barros Machado, sou muito grata por ter tido a oportunidade de trabalhar contigo, não poderia ter melhor exemplo na minha vida acadêmica. Obrigada pelo companheirismo, ensinamentos, pela amizade construída e dedicação ao longo do trabalho. Contigo aprendi a pensar de forma crítica, a encarar a ciência, mesmo com todos os obstáculos que ela apresenta, e a ter mais confiança em mim.

Aos meus colegas de laboratório, Diego Alcoba e Patrícia Martiny, por sempre se mostrarem disponíveis a ajudar, pelos momentos de descontração e risos no laboratório. Com certeza me incentivaram e ajudaram a ultrapassar momentos de desespero. Aos demais colegas, Júlia Schneider, Caetana, Gabriela, Lolita, Vanessa e principalmente Júlia Zilles, pela convivência e pelo apoio durante a realização do trabalho.

Às pessoas mais especiais e importantes para mim, meus pais Dilma Fortes e José dos Reis, não tenho como agradecer o amor incondicional e dedicação por mim. Acreditaram na minha capacidade desde sempre, depositaram confiança na minha responsabilidade e força de vontade para concluir esta etapa da minha vida sozinha e longe. Sei que apoiam todas as minhas escolhas pensando sempre no meu melhor e,

apesar do medo e incertezas, me deixaram caminhar com os meus próprios pés. A vocês dedico este trabalho e todas as minhas vitórias. Amo-vos muito.

Às minhas avós, Maria Honória e Guiomar, por todo o carinho e mimos, assim como toda a minha família. Obrigada pelo apoio e por acreditarem em mim.

À minha melhor amiga, Vanda Medina, pela amizade, paciência e pelo companheirismo. És essencial na minha vida e agradeço por te ter nela, sei que posso contar contigo em todos os momentos. Obrigada por estares sempre ao meu lado dando força, escutando meus desabafos e rindo muito, com certeza tornou tudo mais fácil. Amadurecemos juntas, partilhando experiências e sendo o porto seguro uma da outra.

À minha família brasileira, Laura Lago, Bruna, Larry e Elaine. Me acolheram neste país e se mostraram sempre disponíveis para auxiliar no que fosse necessário, agradeço muito pela amizade e atenção que sempre tiveram comigo. Foram essenciais na minha caminhada e vão estar sempre presentes na minha vida.

Por fim, aos meus amigos Tânia, Jalice, Fredy, Sara, Zélia e Wilson pelos incentivos, diversão e bons momentos que sempre me proporcionam, mesmo quando estão longe.

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	6
Lista de abreviaturas.....	7
Resumo.....	9
1 – Introdução geral.....	11
1.1 – Endométrio.....	11
1.2 – Câncer Endometrial.....	13
1.3 – Metástases e Grau de Invasão.....	15
1.3.1 – Transição epitelial-mesenquimal.....	17
1.4 – Hiperinsulinemia.....	18
1.5 – Metformina.....	21
2 – Objetivos.....	24
3 – Artigo Científico.....	25
4 – Conclusão e perspectivas.....	57
5 – Bibliografia complementar.....	58
6 – Anexos.....	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ciclo menstrual do endométrio durante cada fase..... 12
- Figura 2:** Migração e adaptação de células metastáticas..... 16
- Figura 3:** Transição Epitelial-mesenquimal em câncer de mama..... 18
- Figura 4:** Papel central que a resistência à insulina apresenta no desenvolvimento do câncer de endométrio..... 20
- Figura 5:** Prováveis vias de ação da metformina em células hepáticas e musculares..... 22

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
CDH1	E-caderinas
CSC	Células-tronco cancerígenas
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DHEA	Desidroepiandrosterona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> High Glucose
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E ₂	Estradiol
ECM	Matriz Extracelular
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EMT	Transição Epitelial-mesenquimal
ER	Receptor de Estrogênio
F12	Ham's F12 Coon's modificado
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluorescência
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1
IGFBP-1	Proteína ligadora do Fator de Crescimento Insulina-símile tipo 1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
FSH	Hormônio folículo-estimulante
hCG	Gonadotrofina coriônica humana

LH	Hormônio luteinizante
miRNA	micro-RNA
MMPs	Metaloproteinases
TGF α	Fator de Transformação do Crescimento α
SBF	Soro bovino fetal
SHBG	Globulina carreadora de esteróides sexuais
SOP	Síndrome dos ovários policísticos

RESUMO

O endométrio é a camada mucosa que reveste o útero internamente. Este tecido sofre alterações cíclicas em mulheres ainda na idade reprodutiva, decorrente da estimulação por hormônios. Os principais hormônios neste tecido são a progesterona e o estrogênio que modulam a proliferação e diferenciação das células endometriais, processos importantes na regeneração após o ciclo menstrual. O endométrio pode ser alvo de patologias como o câncer, endometriose e cistos, que afetam a sua função fisiológica. O câncer de endométrio tem se tornado cada vez mais prevalente devido ao estilo de vida moderno, aumento de casos de obesidade e consequentemente hiperglicemia e hiperinsulinemia. A faixa etária mais acometida com esta patologia são mulheres após os 50 anos, na menopausa. Neste período elas se tornam mais predispostas ao acúmulo de gordura abdominal e atrofia endometrial devido à ausência do hormônio estrogênio. Este estado se agrava com o desenvolvimento de metástases, que conferem agressividade à doença pela proliferação excessiva das células tumorais e invasividade. A hiperinsulinemia surge principalmente do aumento da resistência à insulina, que faz aumentar os níveis glicêmicos na circulação sanguínea. A hiperglicemia leva a uma superprodução de insulina no pâncreas, sendo que este hormônio é considerado um antiapoptótico e promotor da proliferação celular. O mecanismo provável da proliferação provocada pela insulina está envolvido com a via PI3K/Akt e mTOR diretamente e com a IGF-1 indiretamente. Sabe-se que a insulina e a IGF-1 agem por vias semelhantes. Estudos epidemiológicos mostraram uma associação entre altos níveis de insulina e diversos tipos de câncer, incluindo o câncer endometrial, sendo que mulheres acometidas com a diabetes apresentam alto risco de desenvolver neoplasias. Isto levou à proposta da utilização de agentes insulino-sensibilizantes no tratamento do câncer, sendo o fármaco metformina um dos melhores candidatos na classe. Os mecanismos pela qual a metformina atua ainda não são completamente esclarecidos. Desta forma, avaliamos o efeito da metformina no potencial metastático de células epiteliais endometriais primárias de pacientes saudáveis, quando na presença de excesso de insulina. Os parâmetros avaliados foram a habilidade de invasão, migração e proliferação destas células após um período de

tratamento com a metformina. Para isso as células foram divididas nos grupos G1 (Controle), G2 (Insulina), G3 (Metformina) e G4 (Insulina+Metformina). Foi utilizado o Ensaio de Invasão e Ensaio de Migração para testar a capacidade de invadir e migrar (n=4). No primeiro ensaio, os resultados mostraram uma redução da taxa de migração do grupo G3 em relação aos grupos G1 e G4. A invasão das células tratadas com metformina (G3) também diminuiu quando comparada ao grupo G4, mas não ao Controle. Não se observou um aumento da migração e invasão no grupo tratado com insulina. Para avaliar a capacidade de proliferação foi realizado o Ensaio de Proliferação EdU (n=1) com as células tratadas por 24 horas. Os dados obtidos são demonstrativos e indicaram uma redução acentuada da densidade celular dos grupos G3 e G4 em relação ao grupo tratado com insulina após as 24 horas. No entanto as taxas de proliferação de todos os grupos nas 4 horas subsequentes ao tratamento foram significativamente maiores que o grupo Controle. Estes resultados sugerem que a metformina atua diminuindo a invasão, migração e proliferação das células endometriais primárias, sendo necessários mais estudos para confirmar e melhor elucidar os mecanismos envolvidos.

1 – Introdução geral

1.1 – Endométrio

A parede uterina é formada pelo perimétrio, que se localiza mais externamente, o miométrio, que é a camada de fibras musculares e o endométrio. O endométrio trata-se da camada mucosa que reveste o órgão internamente. É um tecido dinâmico que se remodela por mais de 400 ciclos de regeneração, diferenciação e descamação enquanto a mulher se encontra ainda no período reprodutivo (GARGETT; CHAN; SCHWAB, 2008; GARGETT, 2006; JABBOUR et al., 2006; MCLENNAN CE, 1965) .

O endométrio tem a função de oferecer o suporte necessário à implantação do embrião e, posteriormente, o crescimento do feto. Torna-se receptivo ao blastocisto durante a fase secretora ou também conhecida como “janela de implantação” (BAUVOIS, 2012; BITENCOURT, 2011; INCA, 2014). A espessura deste tecido depende da fase do ciclo menstrual e da idade da mulher. Ocorrem alterações no endométrio adulto a cada 28 dias e isso acontece em resposta a variações hormonais durante o ciclo menstrual, crescendo em média 7mm a cada ciclo (HARPER, 1992).

A atividade do endométrio é controlada pelos hormônios gonadotróficos, nomeadamente o hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG). Esses hormônios têm papéis diferentes sobre o sistema reprodutivo feminino. O LH e o FSH são produzidos pela glândula pituitária anterior e agem sobre os ovários, promovendo a produção de estrógenos e progesterona que estimulam o crescimento e maturação do folículo ovariano, e posteriormente do corpo lúteo. Por sua vez, o hCG é produzido pelo sinciciotrofoblasto assim que o embrião é formado. Ele serve para manter o corpo lúteo e a produção de progesterona no início da gravidez, entre outras funções durante a gestação, incluindo manutenção do suprimento sanguíneo, diferenciação celular da placenta e crescimento do útero (EZCURRA; HUMAIDAN, 2014).

Se não houver a ocorrência de fecundação do óvulo e formação do embrião, sucede-se a menstruação. A menstruação é classificada como o fenômeno de retirada de hormônios estrógenos e progesterona, decorrente da degeneração do corpo lúteo e se caracteriza pelo sangramento vaginal, dando início a um novo ciclo (Figura 1) (JEFFCOATE; ED, 1965).

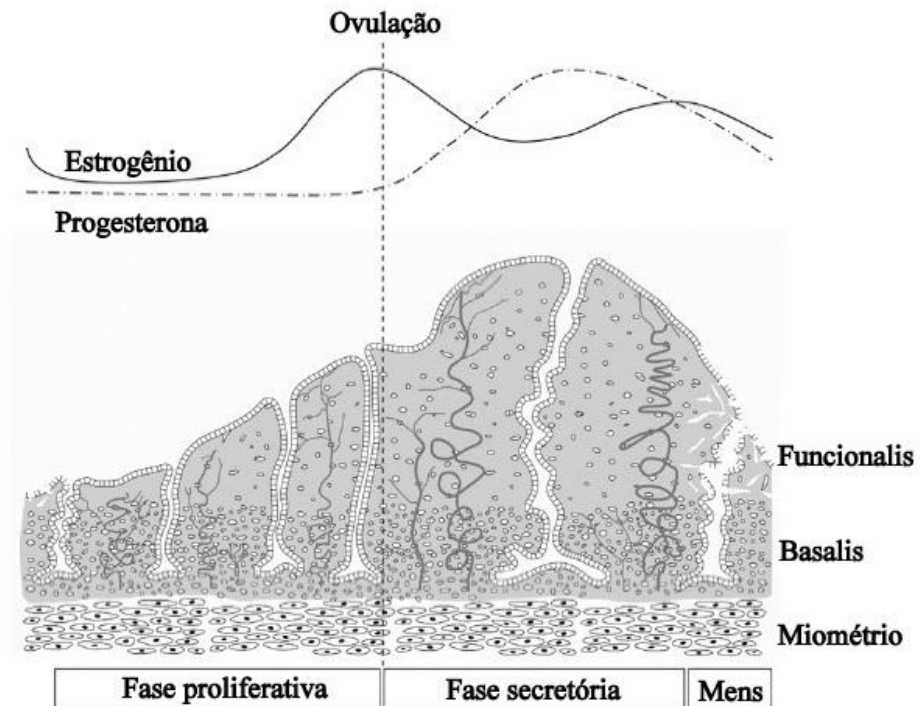


Figura 1. Ciclo menstrual e morfologia do endométrio durante cada fase. Adaptado de Gargett et al, 2008.

O endométrio pode ser dividido em duas camadas: a funcionalis, que contém glândulas desde o epitélio até o estroma; e a basalis, que compreende a base das glândulas, estroma, vasos e tecido linfóide (GIUDICE, 1999). A camada funcional sofre descamação durante a menstruação e se regenera no ciclo seguinte. A regeneração ocorre através da proliferação e diferenciação de células, conseqüente da variação dos esteróides circulantes durante o ciclo, como mencionado acima (HARPER, 1992). A camada basal é permanente e fornece células que atuam na regeneração da camada funcional depois do ciclo, sendo inativado após a menopausa (ALTMÄE et al., 2014;

ATHANAZIO, 2007). A migração das células transitórias da camada basal para a funcional ocorre nas 48 horas após a descamação do endométrio e estas células sofrem pouca influência de hormônios. Para que ocorra a diferenciação das células que migraram, é necessário a indução de um novo padrão de expressão gênica a partir da progesterona e seu receptor. O crescimento do endométrio ocorre também em mulheres após o parto e naquelas que se encontram na pós-menopausa e sendo submetidas a tratamentos de reposição hormonal (HARPER, 1992).

O estrogênio exerce controle sobre a função proliferativa das células epiteliais e estromais do endométrio através da regulação de fatores de crescimento. Estes fatores são o Fator de Transformação do Crescimento α (TGF α), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Fator de Crescimento Insulina-like 1 (IGF-1) (ALTMÄE et al., 2014). Devido aos baixos níveis de estrogênio na menopausa há inatividade das glândulas e pouco estroma, levando a atrofia do endométrio. No entanto, mesmo havendo ausência de estrogênio, ainda há expressão do seu receptor, receptor de estrogênio (ER), responsável pela ação genômica do hormônio (ATHANAZIO, 2007).

Desta forma, podemos afirmar que as células do endométrio apresentam respostas e comportamentos únicos ao efeito de ambientes endócrinos distintos. Isso proporciona mudanças dinâmicas no tecido normal e, ocasionalmente, desordens patológicas (HIROSHI MIZUMOTO, 1972).

O tecido endometrial pode ser alvo de diversas patologias, incluindo desordens ginecológicas como a endometriose, pólipos cervicais e ainda neoplasias. Estas condições podem levar a uma redução da funcionalidade endometrial, como infertilidade e gravidez anormal, e além disso, há risco de comprometimento sistêmico do organismo através de metástases.

1.2 – Câncer endometrial

O câncer endometrial está inserido entre as sete neoplasias malignas mais comuns no mundo, principalmente nos países mais desenvolvidos. No trato genital

feminino é o mais prevalente, o risco de desenvolvimento aumenta com a idade, sendo mais acentuado na pós-menopausa (PAPAEFTHIMIOU et al., 2005). A maior parte das mulheres diagnosticadas se encontram entre os 50 e 60 anos de idade e somente 5% das pacientes são diagnosticadas antes dos 40 anos (SOROSKY, 2012).

Nas últimas duas décadas a taxa de mortalidade a cada 100.000 indivíduos devido a esta patologia aumentou em 100%. Mulheres da raça branca são duas vezes mais afetadas do que aquelas da raça negra, porém o prognóstico é melhor no primeiro caso (SOROSKY, 2012). Estas estatísticas são devido ao aumento da incidência da obesidade, da expectativa média de vida, mudanças no estilo de vida e coexistência de outras comorbidades com o câncer (LUSTOSA et al., 2014). Além disso, outros fatores de risco incluem a administração de estrogênio exógeno, diabetes, nuliparidade e demais fatores genéticos (SOROSKY, 2008).

No Brasil, foi estimado o aparecimento de 5.900 novos casos de câncer do corpo do útero em 2014. A mortalidade no país atingiu cerca de 1,33% no período entre 2008 e 2012 (INCA, 2014).

O câncer de endométrio pode ser dividido em tipo I e tipo II. O tipo I, adenocarcinoma endometrióide, é dependente de estrogênio, apresenta maior prevalência em mulheres obesas, representando 70% das afetadas. Mulheres com predisposição genética a este quadro de obesidade tendem a ser mais propensas a desenvolver câncer de endométrio tipo I. O câncer de endométrio tipo II não está relacionado ao estímulo estrogênico, é seroso e de células claras, mais agressivo, apresentando alto grau de recidiva e incidência de metástases (LIN et al., 2014).

Estima-se que 80% dos cânceres de endométrio são adenocarcinomas que surgiram a partir da hiperplasia, principalmente aquela que apresenta atipia. Esta hiperplasia é decorrente da hiperestimulação do tecido por estrogênio. O aumento do hormônio na corrente sanguínea está relacionado com a obesidade, dieta hiperlipídica e sedentarismo (ATHANAZIO, 2007).

O tecido adiposo é um tecido dinâmico pelo seu papel no metabolismo de lipídeos e glicose. Ele é o sítio principal de síntese de hormônios esteróides, sendo

então muito ativo do ponto de vista endócrino. Ocorre um aumento da gordura visceral e adipócitos após a menopausa, aumentando consequentemente o risco de aparecimento de doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (SUBA, 2013). Células adiposas expressam os dois tipos de receptores de estrogênio, ER- α e ER- β . Isto sugere que o hormônio pode ter ações distintas no tecido, dependendo da fase de diferenciação e localização do mesmo. Por outro lado, ocorre uma estimulação contínua do endométrio por estrógenos gerados por adipócitos na obesidade, visto que as suas células são altamente responsivas a este hormônio (NIEMAN et al., 2013).

Apesar dos avanços cirúrgicos no tratamento do carcinoma endometrial, em casos avançados da doença ele pode não ser efetivo. Pacientes que apresentam metástases são tratadas também com quimioterapia combinada e terapia endócrina de forma sistêmica. Estas estratégias apresentam resposta de curta duração e estão associadas a uma sobrevida de 8 a 16 meses. Alguns exemplos são os progestágenos em tumores receptores-positivos para esteróides; rapamicina e seus análogos (temsirolimus, ridaforolimus e everolimus) para inibir a via do mTOR; antineoplásicos como o paclitaxel e carboplatina, entre outros (DEDES et al., 2011).

1.3 – Metástases e grau de invasão

Avalia-se a agressividade e extensão de uma lesão cancerígena pela observação de metástases à distância e o grau de invasão. Metástase é o processo caracterizado pelo abandono de células da massa tumoral primária e a migração para o resto do corpo (YESILKANAL; ROSNER, 2014).

As metástases são responsáveis por 90% das mortes associadas ao câncer, apresentando prognóstico pobre independentemente do tipo de câncer. O processo ocorre da seguinte forma: o tumor invade o tecido circundante, células entram na microvasculatura, são transportadas pela corrente sanguínea até outros tecidos e fazem extravasão da corrente ao chegar no novo foco; de seguida elas passam por um período de adaptação ao novo ambiente e iniciam a proliferação, criando uma massa

secundária (Figura 2) (CHAFFER; WEINBERG, 2011). O tratamento e a reincidência do câncer estão relacionados ao fenótipo metastático, que pode fornecer ao tumor a capacidade de voltar ao sítio primário mesmo após a remoção cirúrgica deste (YESILKANAL; ROSNER, 2014).

Como já mencionado, as metástases envolvem migração e invasão de células, intravasão e extravasão dos vasos linfáticos e sanguíneos para adaptação em novo tecido (YESILKANAL; ROSNER, 2014). Existe uma dificuldade na contenção e tratamento destas massas secundárias mesmo com inibidores da disseminação e proliferação. Isto devido ao fato de que o diagnóstico ocorre geralmente após a formação desses novos focos. A ineficiência destas terapias pode ser também devido à heterogeneidade e diferenças biológicas que as células adquirem da massa inicial (SOSA; BRAGADO; AGUIRRE-GHISO, 2014).

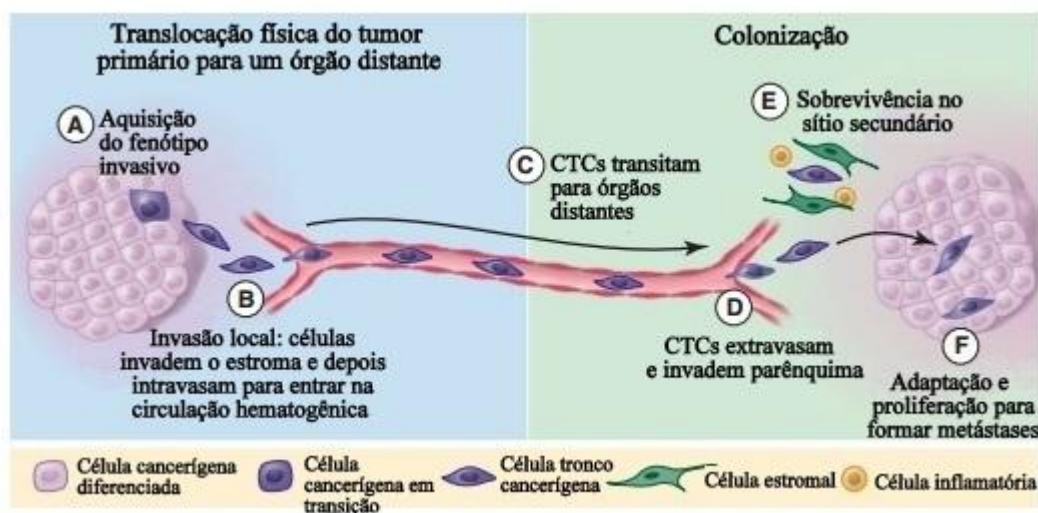


Figura 2. Migração e adaptação de células metastáticas. Adaptado de Chaffer et al., 2011.

As células epiteliais, que dão origem a carcinomas, são fortemente ligadas umas às outras por junções aderentes e oclusivas, desmossomos e hemi-desmossomos para formar o tecido (CHAFFER; WEINBERG, 2011). Na transformação ocorre uma mudança na capacidade de adesão entre as células tumorais e a matriz extracelular (ECM). A degradação da ECM é mediada por enzimas proteolíticas, incluindo a serina proteinase

e as metaloproteinases (MMPs), como MMP-2 e MMP-9 (BREM S., 1976; FOLKMAN, 2002; VALEJO, 2010). Um mecanismo importante recentemente descrito é a Transição Epitelial-mesenquimal (EMT) e seu processo reverso (Transição Mesenquimal-epitelial), que impulsionam a transformação das células epiteliais (THIERY et al., 2009).

1.3.1 – Transição epitelial-mesenquimal

A metástase tumoral depende da Transição Epitelial-mesenquimal (EMT), onde há inativação da adesão célula-célula e ganho de motilidade (Figura 3). Para que se torne possível a transformação de célula endotelial para célula mesenquimal, além de mudanças na aderência, é necessário alterar a morfologia e arquitetura das células (GHIABI et al., 2014).

Este processo é fundamental para a morfogênese celular no desenvolvimento embrionário e implica um conjunto de mudanças fenotípicas (THIERY et al., 2009). As mudanças são induzidas por fatores de transcrição, que incluem repressores das E-caderinas (CDH1) (MOYRET-LALLE; RUIZ; PUISIEUX, 2014). Os repressores são, fundamentalmente, os complexos Snail, Zeb e Twist (CHAFFER; WEINBERG, 2011). A rede de fatores que induzem o início da EMT inclui as vias da superfamília TGF- β e do complexo Notch, assim como miRNAs envolvidos na plasticidade celular (MOYRET-LALLE; RUIZ; PUISIEUX, 2014).

Estudos demonstraram que as células epiteliais adquirem características de células-tronco cancerígenas (CSC) ou fenótipo mesenquimal (MOYRET-LALLE; RUIZ; PUISIEUX, 2014). Supõe-se que o estado CSC-like atribuí às células resistência à apoptose e habilidade de sobreviver à migração do sítio primário para o secundário (CHAFFER; WEINBERG, 2011). Ao sair dos vasos elas induzem o processo de Transição Mesenquimal-epitelial, retornando ao estado inicial de células epiteliais (Figura 3). O propósito é facilitar a sobrevivência e proliferação no novo local (MIRANTES; ESPINOSA; FERRER, 2013).

1.5 – Hiperinsulinemia

A hiperinsulinemia se refere ao excesso de insulina na corrente sanguínea, provocado pela resistência à insulina. A resistência à insulina leva a uma diminuição da captação de glicose pelas células, principalmente musculares. Isto causa o aumento dos níveis de glicose na circulação, denominado hiperglicemia. Como tentativa de compensação, o pâncreas endócrino aumenta a sua produção de insulina, levando à hiperinsulinemia (LIVINGSTONE; COLLISON, 2002a).

Estudos epidemiológicos constataram que a obesidade esta relacionada a diversos tipos de câncer. Isso ocorre não só por causa do hiperestrogenismo, mas também da resistência à insulina e hiperinsulinemia, que modulam a proliferação das células (ARCIDIACONO et al., 2012; ZHANG et al., 2014).

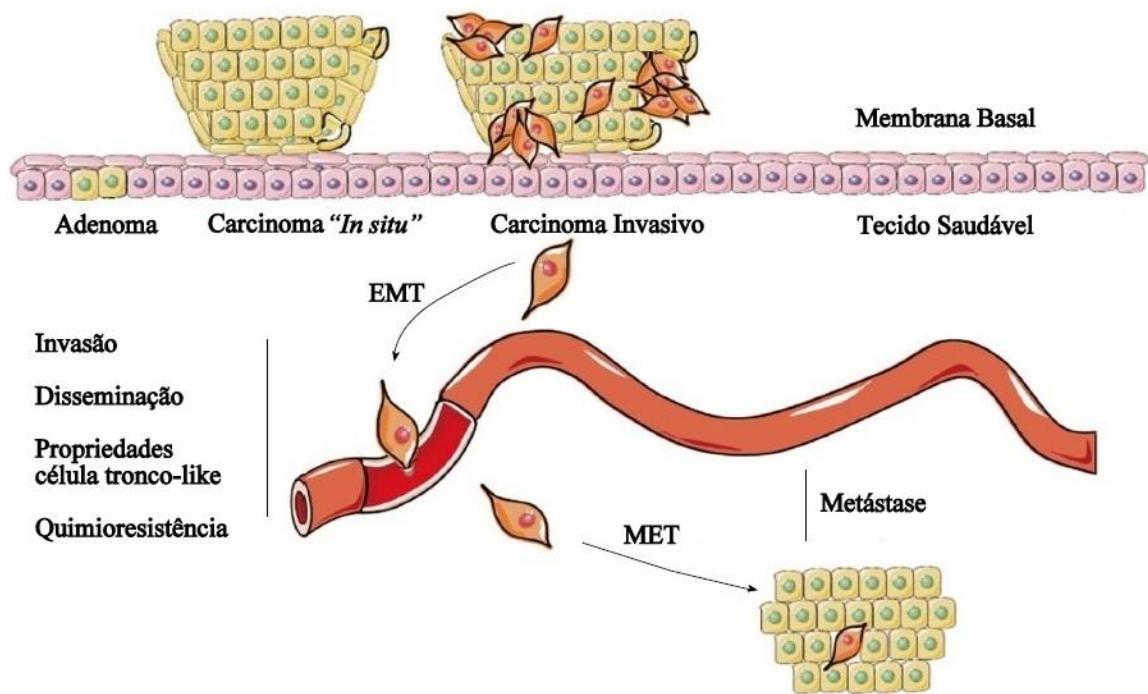


Figura 3. Transição Epitelial-mesenquimal em câncer de mama. Adaptado de Moyret-Lalle et al., 2014.

A Síndrome Metabólica trata-se do *cluster* que inclui a obesidade abdominal e fatores de risco para doenças cardiovasculares e desordens metabólicas. Ela envolve a hiperglicemia, hipertensão e dislipidemia, sendo um fator de risco importante para a diabetes. Podemos aplicar a hiperinsulinemia na caracterização da diabetes. A doença se desenvolve fundamentalmente por causa da produção defeituosa da insulina, disfunção na sua ação ou pela junção dos dois eventos (KIM; HALTHER, 2015).

Os hormônios esteróides mais relacionados à hiperinsulinemia em estudos são os andrógenos desidroepiandrosterona (DHEA) e testosterona, e o estrógeno estradiol (E₂) (KIM; HALTHER, 2015). Entende-se que há uma interação dos esteróides e a insulina nos tecidos, de forma que esses hormônios sexuais em grandes concentrações séricas contribuem para o desenvolvimento da resistência à insulina. Uma das observações que levaram ao esclarecimento do mecanismo é a diabetes gestacional que ocorre na gravidez normal. Durante este período a gestante contém elevados níveis de estrógenos e progesterona circulantes, isso provoca uma diminuição considerável da sensibilidade à insulina no organismo. Um fenômeno semelhante ocorre em mulheres na idade reprodutiva, durante a fase lútea do ciclo menstrual (LIVINGSTONE; COLLISON, 2002).

Em 1991, Nestler et al. demonstraram que a hiperinsulinemia reduz diretamente os níveis séricos da Globulina Ligadora de Hormônio Sexual (SHBG), que modula a atividade biológica de estrógenos, aumentando a sua biodisponibilidade (NESTLER, 2008).

A insulina é considerada como um mitogênico e antiapoptótico, pois aumenta a secreção de IGF e diminui os níveis das IGF binding proteins (IGFBP) (NIEMAN et al., 2013). Foi demonstrado que as vias de sinalização da insulina e do IGF são similares e estimuladas pelo estrogênio (GREER et al., 2013; POLLAK, 2008). Sugere-se que as ações proliferativas da insulina sejam através da via do PI3K, AKT e mTOR, que medeiam efeitos metabólicos e de sobrevivência celular (NESTLER, 2008; PERNICOVA; KORBONITS, 2014; SHAO et al., 2014). Têm sido estudados os efeitos da modulação da insulina por inibidores de células β pancreáticas e sensibilizantes de receptores de insulina como estratégia de prevenção da proliferação não-fisiológica (ARCIDIACONO et al., 2012).

Estudos clínicos e epidemiológicos apontam uma ligação entre a resistência à insulina e o câncer de endométrio (MULHOLLAND et al., 2008; PAPAIOANNOU; LECTURER, 2010). Os mecanismos para esta associação não estão bem esclarecidos, mas acredita-se que ocorra de duas formas. De forma indireta, onde os altos níveis de insulina e o aumento da biodisponibilidade do IGF-1 inibem a síntese hepática da SHBG. Ambos os hormônios atuam estimulando a síntese ovariana de esteróides sexuais, os quais promovem a proliferação celular no epitélio endometrial e inibem a apoptose (ARCIDIACONO et al., 2012). De forma direta, promovendo a proliferação e a sobrevivência celular através das vias da PI3K/Akt e Ras/MAPK (Figura 4) (MU et al., 2012).

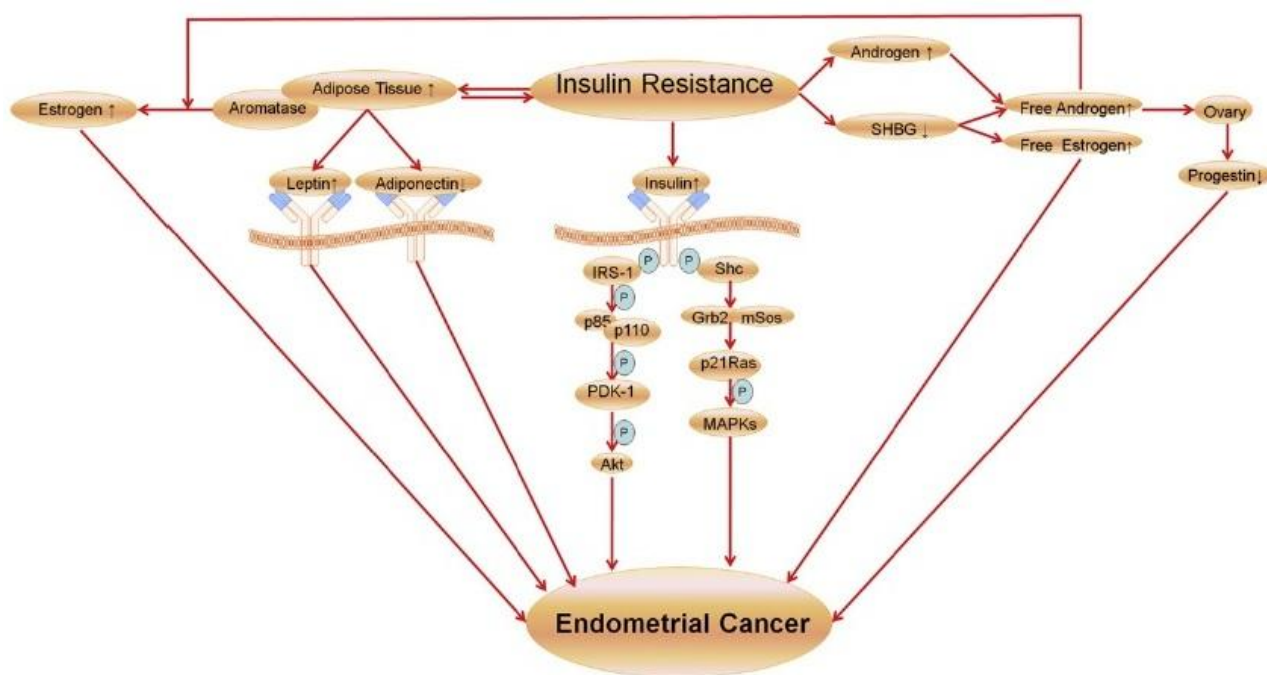


Figura 4: Papel central que a resistência à insulina apresenta no desenvolvimento do câncer de endométrio. Mu et al., 2012.

No entanto, a primeira opção de tratamento para mulheres hiperinsulinêmicas são modificações no estilo de vida, com dietas e exercícios físicos. Nos casos em que somente mudança no estilo de vida não apresenta êxito, uma das opções terapêuticas

seria o uso de agentes insulino-sensibilizantes, sendo a metformina a principal medicação deste grupo, com sua atuação no tratamento da infertilidade amplamente discutida e pesquisada nos últimos anos (COSTELLO; CHAPMAN; CONWAY, 2006; SANTANA, 2004; VELASKEZ, 1994; ZHANG; LIAO, 2010).

1.6 – Metformina

A metformina (N,N-dimethylbiguanide) é uma biguadina oral e age como sensibilizante da insulina. É indicada para o tratamento da diabetes tipo 2 pois aumenta a captação de glicose em tecidos periféricos e diminui a gliconeogênese hepática (NESTLER, 2008; PERNICOVA; KORBONITS, 2014; SHAO et al., 2014). É uma droga já considerada segura, eficaz e é aprovada pela Food and Drug Administration (FDA).

Em cerca de 35% dos pacientes tratados somente com a metformina não se observa diminuição da glicemia e, ao longo do tempo, pacientes submetidos ao tratamento vão se tornando menos responsivos. Supõe-se que a diferença na resposta observada se deve à variação genética no transporte e na via de ação da metformina (PAWLYK et al., 2014).

Acredita-se que a metformina age na redução da gliconeogênese via inibição do Complexo 1 da mitocôndria, diminuindo os níveis de ATP e aumentando os de AMPK (Figura 5). Nas células musculares ela é captada por transportadores OCT3, provocando a translocação do transportador de glicose SLC2A4 para a membrana celular e aumentando a captação da molécula (PAWLYK et al., 2014). Este fármaco já é reconhecido pela sua eficácia na Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS), ao passo que aumenta a sensibilidade à insulina e permite a diminuição de esteróides circulantes. Os efeitos sistêmicos observados são a normalização do ciclo menstrual das pacientes, aumento da fertilidade e melhora da Síndrome Metabólica (LIVINGSTONE; COLLISON, 2002).

Em 2005, foi sugerido por Evans et al. que o uso da metformina por pacientes com diabetes tipo 2 diminui o risco de desenvolvimento de câncer ou as chances de

óbito devido a esta patologia (EVANS et al., 2005). Este medicamento atua especificamente no metabolismo das células, sendo que uma das peculiaridades das células atípicas se encontra na utilização da glicose. O efeito de Warburg já é estabelecido como sendo o fenótipo metabólico de células cancerígenas. Elas fazem uso da glicólise aeróbica para produção de energia e assim tornam-se independentes do ambiente extracelular (OTTO; GARBER, 2004). Esta característica promove a rápida proliferação das células, mas elas se tornam mais suscetíveis a mudanças metabólicas provocadas por fármacos. As células normais que fazem uso da glicólise, ciclo do ácido tricarbóxico ou fosforilação oxidativa na mitocôndria são menos afetadas.

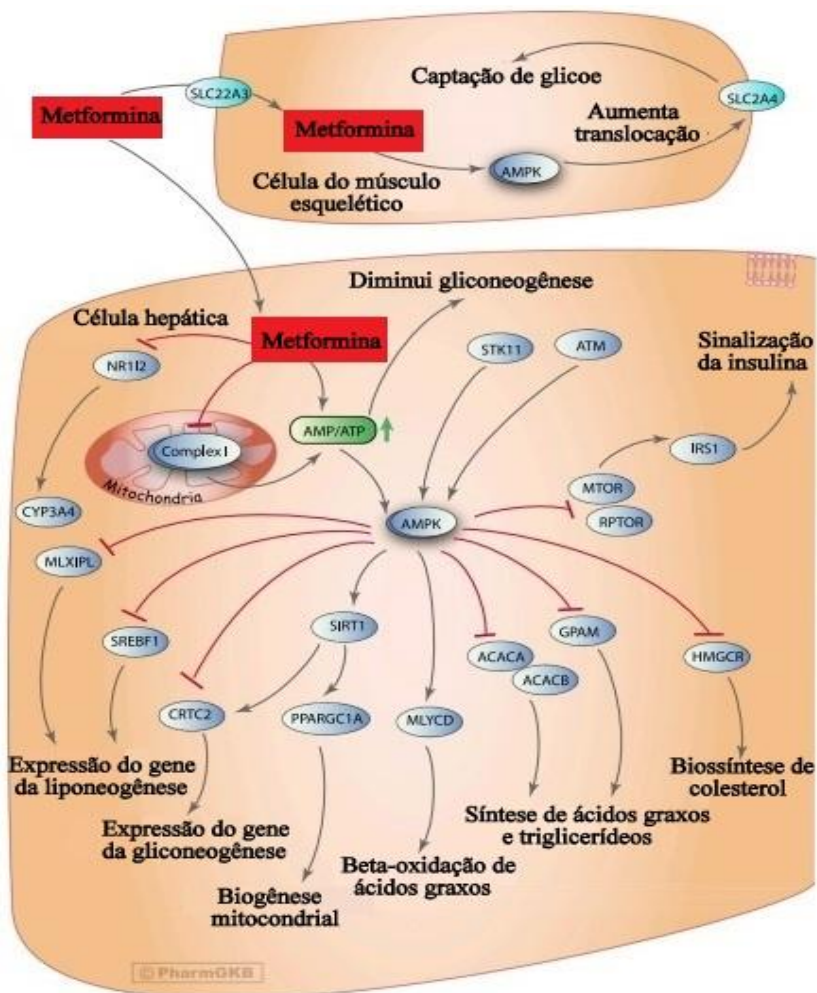


Figura 5. Prováveis vias de ação da metformina em células hepáticas e musculares. Adaptado de Pawlyk et al., 2014.

Um estudo feito por Zhang et al. avaliou as propriedades antiproliferativas da metformina no câncer endometrial em um modelo animal de hiperinsulinemia e obesidade, na presença e ausência de estrogênio. Os resultados indicaram que o medicamento inibe a proliferação celular pela ativação da via da AMPK, que interfere com a via PI3K/Akt e MAPK na via da insulina e IGF1R (ZHANG et al., 2015). Outras hipóteses sugerem que a metformina também modula miRNAs que inibem a expressão gênica e mecanismos pós-translacionais e que ela afeta células-tronco que dão origem ao câncer (FEBBRARO; LENGYEL; ROMERO, 2014). No entanto, ainda nem todos estes mecanismos pelo qual ela é capaz de reduzir o risco de desenvolvimento e tratamento do câncer endometrial são esclarecidos.

Vários fatores relacionados à hiperinsulinemia, como SOP, síndrome metabólica, diabetes, podem influenciar a proliferação endometrial por meio de ações diretas ou indiretas. Dessa forma, Campagnoli e colaboradores (2013) chegam a propor o uso de metformina como um agente preventivo de carcinoma endometrial. Pois a metformina juntamente com mudança no estilo de vida diminui esses fatores, inibindo a proliferação celular endometrial (CAMPAGNOLI et al., 2013).

Embora tenha sido utilizada clinicamente por mais de 40 anos, seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado. Diversos estudos foram ou ainda estão sendo conduzidos no sentido de esclarecer os efeitos, vias de ação e consequências do tratamento a longo prazo com o fármaco em diversos tipos de câncer, incluindo o endometrial (FEBBRARO; LENGYEL; ROMERO, 2014).

2 – Objetivos

Objetivos gerais

Analisar o potencial metastático de células epiteliais endometriais primárias em um ambiente hiperinsulinêmico após o tratamento com metformina.

Objetivos específicos

- Observar o efeito da metformina sobre a capacidade de invasão e migração de células epiteliais endometriais primárias em um ambiente hiperinsulinêmico;
- Verificar a habilidade de proliferação, pelo ensaio do EdU, de células epiteliais endometriais primárias em um ambiente hiperinsulinêmico após tratamento com metformina;
- Fazer uma comparação descritiva dos resultados das células epiteliais endometriais primárias com resultados obtidos com a linhagem de células de câncer endometrial Ishikawa (realizado no projeto no qual se encontra inserido este sub-projeto).

3 – Artigo Científico

Periódico: Gynecologic Oncology

Título: Metformina reduz a habilidade de invasão, migração e proliferação de células primárias do endométrio e diminui o potencial metastático de células de carcinoma endometrial

Título reduzido: Redução do potencial metastático de células primárias endometriais e de carcinoma endometrial pela Metformina

Normas do periódico: Anexo 1

Título: Metformina reduz a habilidade de invasão, migração e proliferação de células primárias do endométrio e diminui o potencial metastático de células de carcinoma endometrial

Vânia Fortes dos Reis ^{1,2,}, Amanda de Barros Machado, MSc ^{1,2,4,}, Sebastian Weber^{4,}, Thomas Strowintzki^{4,}, Ilma Simoni Brum, PhD ^{1,2,}, Helena Von Eye Corleta, PhD ^{2,3,}, Ariane Germeyer, PhD ^{4,} *Edison Capp, PhD ^{1,2,3,4.}

¹ Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

² Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas Porto Alegre, Brasil

³ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia Molecular – Hospital de Clínicas Porto Alegre, Brasil

⁴ Labor Endokrinologie Endometrium & Implantation, Universidade de Heidelberg, Alemanha

* Autor correspondente:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina,
Departamento de Ginecologia e Obstetrícia.

Rua Ramiro Barcelos, 2400/4º andar, Santana

90035003 - Porto Alegre, RS – Brasil

Telefone: (51) 33085153; E-mail: edcapp@ufrgs.br

Palavras-chave: metformina; metástases; endométrio; hiperinsulinemia; invasão; migração; proliferação.

ABSTRACT

Background: Endometrial cancer is one of the most frequent malignancies that affect women, mainly in postmenopausal age. Among the risk factors we can mention obesity, diabetes and hyperinsulinemia. Metformin is an oral antidiabetic in the biguanide class that has been proved to reduce the ability of proliferation in cancer cells. It is proposed that metformin can play an important role as a therapeutic target in endometrial cancer. Therefore, we access metformin's ability to decrease the metastatic potential in endometrial carcinoma, as well as the migration and proliferation of primary endometrial epithelial cells when conditioned to a hyperinsulinemic environment.

Methods: Endometrial tissue was collected from patients undergoing biopsies in Hospital de Clínicas de Porto Alegre. This material was used for cell culture and treated with metformin in a hyperinsulinemic condition. The ability to invade/migrate was accessed using Invasion/Migration Assays. We used EdU Proliferation Assay to test the cell's ability to proliferate.

Results: We found that metformin can reduce the endometrial epithelial cells ability to invade and migrate after 16 hours of treatment. The results also show that the cell's density reduce drastically after 24 hours treatment with metformin, thus it's proliferation tend to increase after this period. Additional data were obtained simultaneously with *Ishikawa* carcinoma cells that show reduction in these parameters after treatment with metformin.

Conclusion: Metformin has the ability to decrease the invasion, migration and proliferation in normal endometrial cells, as well as in carcinoma cells.

Keywords: endometrial cancer; metformin; invasion; migration; proliferation; hyperinsulinemia; carcinoma.

INTRODUÇÃO

O câncer endometrial é uma malignidade ginecológica muito prevalente, sendo aquela que mais acomete o trato genital feminino. A taxa de mortalidade atribuída ao câncer endometrial tem aumentado nos últimos anos (LIN et al., 2013; SOROSKY, 2008). O câncer de endométrio é dividido em tipo I e tipo II. O tipo I, adenocarcinoma endometrióide, é dependente de estrogênio e apresenta maior prevalência em mulheres obesas. O tipo II não está relacionado ao estímulo estrogênico, é seroso e de células claras, mais agressivo, apresentando alto grau de recidiva e incidência de metástases (BITENCOURT, 2011). Os fatores de risco envolvidos na patologia incluem administração de estrogênio exógeno, obesidade, nuliparidade, diabetes e predisposição genética (SOROSKY, 2008).

Um fator que confere pior prognóstico a pacientes com neoplasias é o desenvolvimento de metástases em outros órgãos, tornando o câncer invasivo e agressivo. Para que células individuais ou em grupos iniciem o processo metastático, elas adquirem a habilidade de migrar e invadir (CHAFFER; WEINBERG, 2011). Ocorre uma mudança na capacidade de adesão entre as células tumorais e a matriz extracelular (ECM), que acontece através da degradação por enzimas proteolíticas (BAUVOIS, 2012; LIN et al., 2014; LUSTOSA et al., 2014). Metástases dependem da Transição Epitelial-mesenquimal (EMT), em que há inativação da adesão célula-célula e ganho de motilidade (migração), sendo necessário alterar a morfologia e arquitetura das células (VALEJO, 2010). A EMT tem sido reconhecida como um evento crucial na formação de tecidos e órgãos durante a embriogênese, ocorrendo o mecanismo reverso (Transição Mesenquimal-epitelial) ao final do processo (NIETO, 2011).

A maior parte dos casos de câncer de endométrio são fundamentalmente por causa da obesidade, hiperestrogenismo, resistência à insulina e hiperinsulinemia, que modulam a proliferação das células por mecanismos metabólicos e antiapoptóticos (CALLE; KAAKS, 2004; ZHANG et al., 2013). É sabido que as vias de sinalização da insulina e Fator de Crescimento Semelhante a Insulina (IGF) são estimuladas pelo estrogênio (WESTIN et al., 2009; ZHANG et al., 2014). Vários autores sugerem que a hiperinsulinemia

exerce ações proliferativas através da via do PI3K/Akt e mTOR (ARCIDIACONO et al., 2012; GREER et al., 2013).

Tendo conhecimento da ação proliferativa da insulinemia, vários autores sugerem o uso de medicamentos insulino-sensibilizantes para reverter este processo. A metformina é uma biguanida oral, indicada para o tratamento da diabetes tipo 2 pois modula a captação de glicose em tecidos periféricos e a produção hepática de glicose (NESTLER, 2008; PERNICOVA; KORBONITS, 2014; SHAO et al., 2014). Sugere-se que a metformina inibe a proliferação celular pela ativação da via da AMPK, que interfere com a via PI3K/Akt e MAPK (ZHANG et al., 2013). Se propõe que a metformina seja capaz de agir como quimiopreventivo e como terapia do câncer de endométrio, quando associado às outras terapias convencionais (ZHANG et al., 2014).

Neste estudo, submetemos células epiteliais endometriais primárias a um meio considerado hiperinsulinêmico e avaliamos o efeito da metformina nas capacidades de migração, invasão e proliferação dessas células. Também apresentamos e discutimos resultados obtidos em células de carcinoma endometrial *Ishikawa* nas mesmas condições. O objetivo é a avaliação do potencial metastático das células endometriais quando tratadas com o fármaco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de amostras

As amostras de endométrio (n=4) foram provenientes de cirurgias de histerectomia ou biópsias por curetagem, feitas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e com indicação independente deste estudo. Todas as pacientes seguiram critérios de exclusão definidos como: estar na pós-menopausa, ter câncer ou endometriose e estar em tratamento com reposição hormonal nos três meses que precederam a cirurgia.

Aspectos éticos

Este estudo faz parte de um projeto maior desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET) - Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Labor Endokrinologie Endometrium & Implantation - Universidade de Heidelberg, que tem por objetivo a análise do efeito da metformina no potencial metastático e vias de sobrevivência celular em um modelo de cultura tridimensional de carcinoma endometrial, já aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, sob número 14-0267.

As pacientes incluídas no estudo assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2), autorizando a utilização do material coletado para a pesquisa.

Cultura de células

As amostras foram transportadas ao laboratório, acondicionadas em frasco estéril a baixa temperatura, com solução de sais de Hank's (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e 1% de kanamicina. Em capela de fluxo laminar, o excesso de sangue foi retirado e o tecido foi cortado em fragmentos menores. Em seguida o tecido foi submetido a dissociação enzimática em um Erlenmeyer com colagenase do tipo IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) (7,5 mg/g de tecido) diluído em solução de Hank's. A dissociação foi feita com o frasco em constante agitação e temperatura

mantida em 37°C. Após 2 horas, a enzima foi inibida dobrando o volume do frasco com solução de Hank's. Para obter a fração das células epiteliais, baseou-se na modificação do trabalho de Satyaswaroop e colaboradores (Satyaswaroop, Bressler et al.,1979). O material dissociado é centrifugado a 800xg por 10 minutos, o sobrenadante é desprezado e o precipitado suspenso em meio (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* High glucose – Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Para promover a separação das células epiteliais das estromais as células são submetidas a uma filtração em um separador celular de 40 µm (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA) onde as células estromais passaram pela membrana e as epiteliais ficaram retidas. As células epiteliais foram retiradas do separador com solução de Hank's e o material foi centrifugado a 800 xg por 10 minutos. Essas células foram suspensas em meio DMEM/F12 (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) suplementado com 1% de antibiótico (kanamicina), 5% de soro fetal bovino (SBF – Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e estradiol 10^{-8} M. Por fim, as células foram semeadas em garrafa de cultura (75 cm² – Greiner Bio-One GmbH Maybachstrasse Frickenhausen, Germany).

Manutenção das células em cultura

As células foram mantidas nas condições adequadas, em estufa (NuAire Inc., Minesota, USA) úmida e a 37°C, com injeção constante de 5% de CO₂. Elas foram observadas em microscópio invertido a cada 24 horas e quando atingiram 80% de confluência, foram tripsinizadas, contadas em hemocitômetro com coloração de azul de Tripán e divididas em diferentes grupos para os ensaios.

Foram estabelecidos quatro grupos experimentais, listados a seguir:

- G1: Meio + 10^{-8} M E₂
- G2: Meio + 10^{-8} M E₂ + Insulina (100 ng/mL)
- G3: Meio + 10^{-8} M E₂ + Metformina (10^{-4} M)
- G4: Meio + 10^{-8} M E₂ + Insulina (100 ng/mL) + Metformina (10^{-4} M)

Através de uma revisão da literatura e trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa, as concentrações de estradiol, insulina e metformina utilizadas no cultivo celular foram estabelecidas (Tabela 1). O uso de estradiol 10^{-8} M (17 β -estradiol; Sigma) foi estipulado por Apparao, Lovely et al. em 2002, como sendo a concentração necessária para a diferenciação e sobrevivência das células endometriais *in vitro*. As concentrações utilizadas para a insulina e metformina, foram 100 ng/ml e 10^{-4} M respectivamente, com o intuito de promover um ambiente hiperinsulinêmico e o efeito do fármaco nas células. Estas concentrações foram descritas por Germeyer et al. em 2010.

Tabela 1: Concentração de estradio (E_2), Insulina e Metformina nos diferentes grupos.

Grupos	E_2	Insulina	Metformina
G1	10^{-8} mol/L		
G2	10^{-8} mol/L	100 ng/mL	
G3	10^{-8} mol/L		10^{-4} mol/L
G4	10^{-8} mol/L	100 ng/mL	10^{-4} mol/L

Ensaio de Invasão e Migração por *transwells*

A capacidade de invasão e migração das células epiteliais endometriais foi avaliada através do método desenvolvido por Boyden, com modificações. Os ensaios de Migração e Invasão, baseados no princípio de quimiotaxia, foram feitos através de *transwells* com fundo constituído por uma membrana com poros de $5\mu\text{m}$, colocados em uma placa de 24 poços (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA). Foram semeadas 200 μL de células na densidade de 2×10^4 células/mL nos respectivos grupos, em meio

DMEM/F12 sem soro, diretamente sobre a membrana para o ensaio de Migração. Para o ensaio de Invasão, a mesma quantidade de células foi semeada sobre uma camada de 100 μ L de matrigel (354230, BD Biosciences Franklin Lakes, N.J, USA) na concentração de 50%. Em cada poço foram colocados 750 μ L de meio DMEM/F12 suplementado com soro. Após um período de 16 horas de incubação em estufa a 37°C, os *transwells* foram lavados duas vezes em PBS. Em seguida as células foram fixadas com formaldeído (3,7% em PBS) por dois minutos, permeabilizadas com metanol 100% por 20 minutos e coradas com solução de Giemsa (1mg/mL de metanol) por 15 minutos. As células que não migraram ou invadiram foram coletadas com um *suabe* de algodão, e então, as células presentes nos *transwells* (que migraram e invadiram) foram contadas em microscópio invertido. Este ensaio foi realizado de forma cega, foram contados 4 campos aleatórios de cada *transwell* utilizando o aumento de 600x.

Ensaio de proliferação (EdU)

Para avaliar a proliferação das células, foi utilizado o Click-iT[®] EdU Alexa Fluor[®]488 Imaging Kit (Invitrogen[™], Califórnia, USA) que permite a detecção direta do DNA recentemente sintetizado através de um análogo da timina que se intercala na fita. Após o preparo das soluções conforme as instruções do Kit (Catálogo #C10337), 1×10^4 células/mL nos diferentes grupos foram incubadas *overnight* em lamínulas colocadas numa placa de 6 poços, com 2 mL de meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 5% de SBF e 1% de antibiótico. Depois deste período, foram diluídos 10 μ L da solução de armazenagem 10 mM em 5 mL de meio de cultura para formar a Solução de Rotulagem 20 μ M. Metade do volume do meio das células foi retirado e substituído com a Solução de Rotulagem, seguido de uma incubação de 4 horas. As células foram fixadas com formaldeído 3,7% por 15 minutos e permeabilizadas com Triton 0,5% por 20 minutos. Para a detecção, o 10X Click-iT[®] EdU buffer additive foi diluído 1:10 em água deionizada para formar o 1X Click-iT[®] EdU buffer additive. Esta solução foi utilizada para preparar um cocktail segundo o quadro abaixo (retirado do catálogo do produto):

Componentes da Reacção	Número de lamínulas						
	1	2	4	5	10	25	50
1X Click-iT® EdU reaction buffer	430 µL	860 µL	1.8 mL	2.2 mL	4.3 mL	10.7 mL	21.4 mL
CuSO ₄ (Component E)	20 µL	40 µL	80 µL	100 µL	200 µL	500 µL	1 mL
Alexa Fluor® azide	1.2 µL	2.5 µL	5 µL	6 µL	12.5 µL	31 µL	62 µL
1X Click-iT® EdU buffer additive	50 µL	100 µL	200 µL	250 µL	500 µL	1.25 mL	2.5 mL
Total volume	500 µL	1 mL	2 mL	2.5 mL	5 mL	12.5 mL	25 mL

Ao remover a solução de permeabilização dos poços, as células foram lavadas com BSA 3% e adicionados 0,5 mL do cocktail. Seguiu-se um período de incubação de 30 minutos, protegidas da luz. Para detecção do núcleo, foi utilizado 1 mL da sonda Hoechst em cada poço, incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e abrigada da luz. Após, as células foram lavadas com PBS e analisadas em microscópio de fluorescência, com o filtro DAPI para o Hoechst e filtro FITC para o Alexa Fluor 488. Foram tiradas fotos de 4 campos de cada grupo, com o aumento de 200x. Por fim, as imagens obtidas foram avaliadas de modo cego, foram contadas as células que se dividiram e o número total de células, para obtenção da taxa de proliferação de cada grupo.

Análise estatística

A análise dos dados de Invasão e Migração das células epiteliais endometriais foi feita através do teste de Equações de Estimação Generalizada (*Generalized Estimating Equations – GEE*), modelo proposto por Zeger e Liang em 1986. Este teste avalia a relação entre a variável resposta e as variáveis preditoras em uma população. O modelo pode ser utilizado para distribuições amostrais normais e não normais. Ele avalia efeitos únicos e interações e ainda, variáveis independentes categóricas ou contínuas.

Neste trabalho foram utilizadas células de um tipo de tecido (endométrie), provenientes de pacientes diferentes. Durante as culturas, as células epiteliais endometriais de cada paciente foram submetidas a 4 diferentes grupos de tratamento, ou seja, 4 grupos por indivíduo. Desta forma, cada grupo não pode ser considerado de forma independente pois as variáveis dependem entre si.

Para todos os testes, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando o processador de dados SPSS 22.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

RESULTADOS

Estabelecimento da cultura de células epiteliais endometriais primárias

A fração de células epiteliais foi obtida através da modificação do trabalho de Satyaswaroop e colaboradores (Satyaswaroop, Bressler et al., 1979). Em 2 horas a adesão das células foi avaliada e em 24-48 horas foi possível observar a diferenciação das mesmas. As células epiteliais endometriais formam ilhotas a partir de pequenos aglomerados de células ou de uma célula única, normalmente apresentando confluência de 50% ao fim de 5 dias de cultivo, pois é característico desse tipo celular uma taxa de crescimento e viabilidade reduzidas.

Das 10 amostras coletadas, 40% tiveram sucesso em cultura, 30% não aderiram ou diferenciaram por variáveis na técnica da coleta (através de Cureta de Novak) e do cultivo, e 30% contaminaram com bactérias ou fungos característicos da amostra. Somente as culturas com características morfológicas bem evidenciadas e sem contaminação por microrganismos foram utilizadas para os ensaios.

Para os Ensaios de Invasão e Migração (n=4), as células foram tratadas por 16 horas conforme os diferentes grupos, que se caracteriza como o tempo padrão para o método utilizado. Enquanto que para o Ensaio de Proliferação (n=1) o tratamento foi de 24 horas, após a adesão e diferenciação das células.

Avaliação da capacidade de invasão e migração de células epiteliais endometriais primárias tratadas com metformina em um ambiente hiperinsulinêmico

A habilidade das células epiteliais de invadir e migrar foi avaliada através da modificação do método de Boyden (*Transwell Chamber Assay*). Em 1987, Albini et al. descreveram este método como sendo o melhor para avaliar a invasividade de células tumorais através de um material sintético *in vitro* (ALBINI et al., 1987). Este método permite a comparação da invasividade entre tumores, o estudo de fatores envolvidos no processo e a avaliação do efeito de diferentes variáveis.

Os resultados são apresentados em porcentagem em relação ao controle (considerado 100%) e estão representados nas figuras 2 e 3.

No Ensaio de Migração se pode observar uma diminuição da capacidade de migração nas células do grupo Metformina (G3) em relação ao grupo Controle (G1) e ao grupo Metformina + Insulina (G4). O tratamento com metformina diminuiu a taxa de migração das células epiteliais primárias em aproximadamente 9% quando comparado ao controle e 8,22% quando comparado ao grupo G4. Não houve diferença significativa entre os restantes grupos.

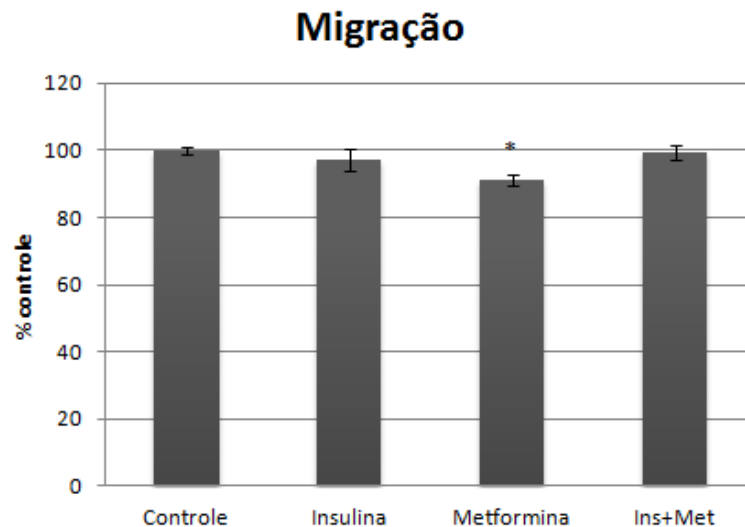


Figura 2: Resultados obtidos no Ensaio de Migração das células epiteliais endometriais primárias (média da porcentagem em relação ao controle \pm erro padrão). Diferença estatisticamente significativa do grupo G3 (Metformina) em relação ao grupo G1 (controle) ($p < 0.01$) e grupo G4 (Insulina+Metformina) ($p < 0,05$) $n=4$.

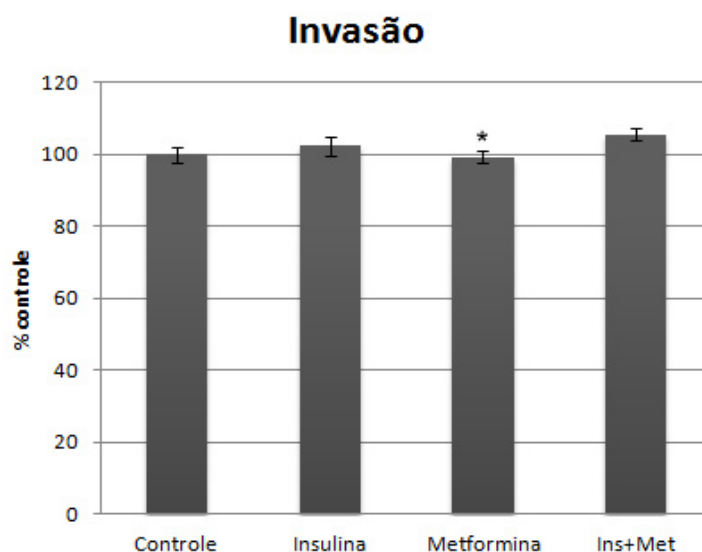


Figura 3: Resultados obtidos no Ensaio de Invasão das células epiteliais endometriais primárias (média da porcentagem em relação ao controle \pm erro padrão). Diferença estatisticamente significativa do grupo G3 (Metformina) em relação ao grupo G4 (Insulina+Metformina) ($p=0,05$) $n=4$.

Quando avaliamos a habilidade de invasão das células epiteliais primárias podemos observar uma diferença significativa do grupo Metformina (G3) em relação ao grupo Insulina + Metformina (G4), sendo que as células tratadas isoladamente com metformina tiveram uma habilidade menor de invadir em 6,25%. Não foi encontrado diferença significativa entre o grupo Controle (G1) e os restantes grupos.

Análise da proliferação de células epiteliais endometriais primárias submetidas ao tratamento com metformina em um ambiente hiperinsulinêmico

O efeito da metformina sobre a proliferação das células epiteliais endometriais primárias foi avaliado por imagens capturadas utilizando microscópio de fluorescência e aumento de 200x (figura 4). A densidade celular em cada grupo foi calculada pelo número total de núcleos corados e a taxa de proliferação pela relação do número de núcleos marcados pelo EdU pelo número total de núcleos. Estes resultados são demonstrativos ($n=1$) e estão representados nas figuras 5 e 6.

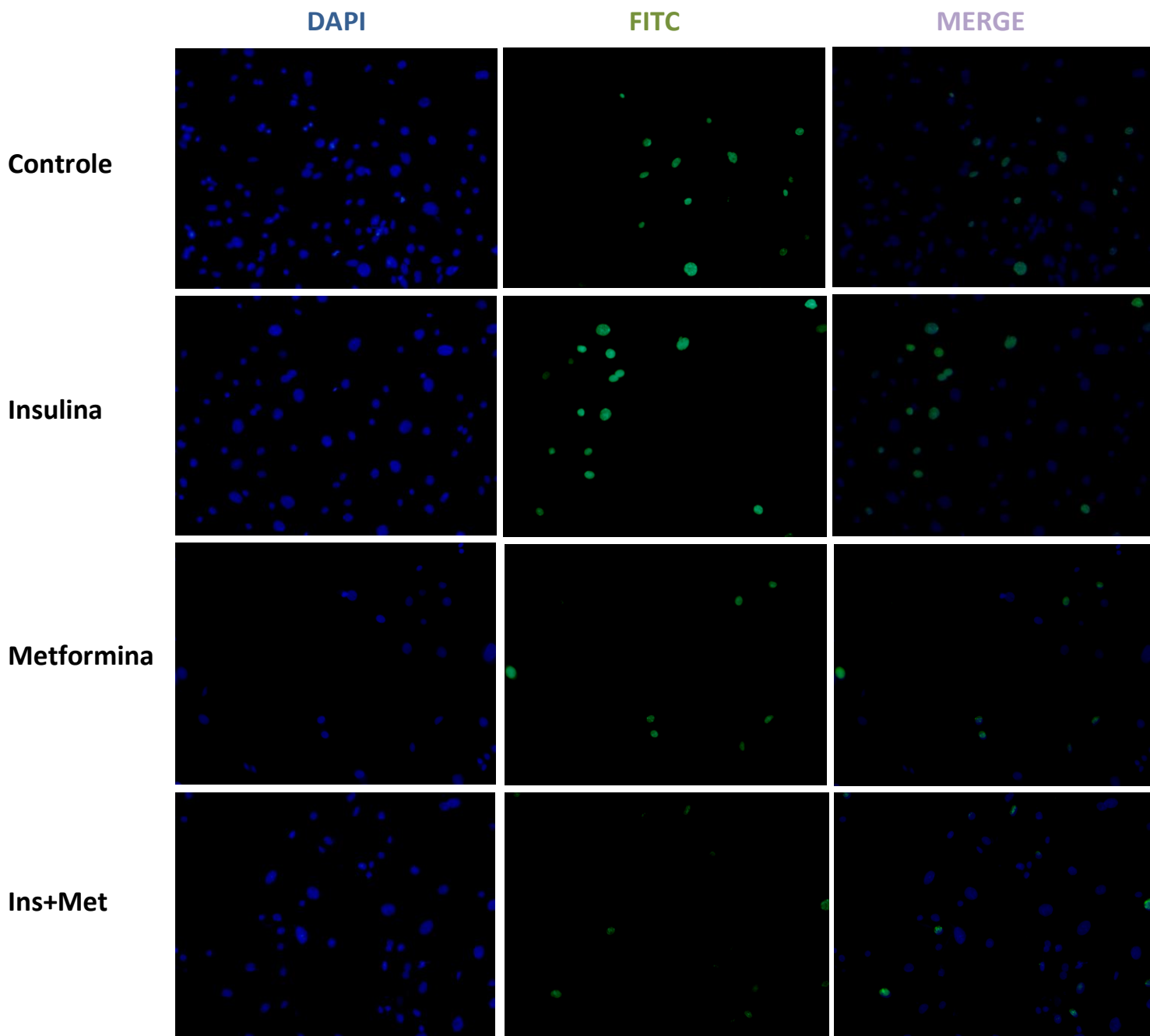


Figura 4: Ensaio de proliferação EdU. Núcleo de células epiteliais endometriais primárias coradas com Hoechst e Alexa Fluor 488, utilizando os filtros DAPI (azul) e FITC (verde) após 24 horas de tratamento nos diferentes grupos e incubação com um intercalante de DNA por 4 horas (n=1); dados demonstrativos.

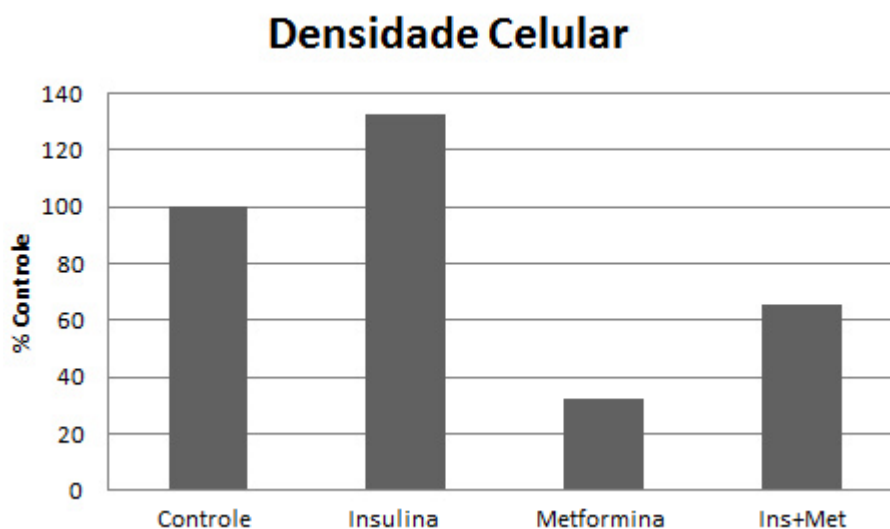


Figura 5: Densidade celular (porcentagem em relação ao controle) das células epiteliais endometriais após exposição aos diferentes tratamentos durante 24 horas (n=1); dados demonstrativos.

Avaliando a densidade celular após 24 horas de tratamento, podemos dizer que há uma tendência do grupo Insulina (G2) em apresentar maior número de células, sendo neste caso 32,6% maior quando comparado ao grupo Controle. Entretanto, no grupo em que as células são tratadas somente com metformina (G3), podemos perceber uma drástica tendência à redução da densidade celular comparado ao controle (67,8%) e ao grupo Insulina (100,4%). Quando as células recebem o tratamento com insulina e metformina (G4), observamos uma redução do número celular em 34,8% em relação ao grupo Controle e em 67,4% em relação ao grupo Insulina. Porém, quando avaliamos este grupo (G4) em relação ao grupo Metformina, a densidade celular está levemente (33%) aumentada.

Em relação à taxa de proliferação, avaliada durante 4 horas de incubação com o intercalante de DNA após as células serem cultivadas por 24 horas nos diferentes grupos, observamos que os grupos tratados com insulina (G2), metformina (G3) e a combinação de ambos (G4) apresentaram, neste caso, uma maior taxa de proliferação quando comparados ao grupo Controle (Figura 6).

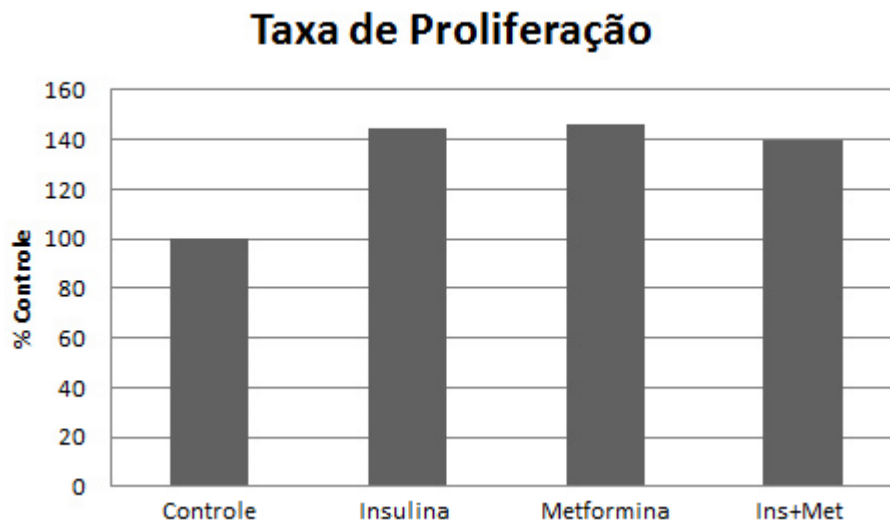


Figura 6: Taxa de proliferação (porcentagem em relação ao controle) das células epiteliais endometriais após exposição aos diferentes grupos de tratamento durante o período de 4 horas (n=1); dados demonstrativos.

RESULTADOS COMPLEMENTARES

Efeito da metformina sobre a invasão, migração e proliferação das células de câncer epitelial endometrial *Ishikawa*

Este resultado foi obtido simultaneamente pelo nosso grupo de pesquisa no Labor Endokrinologie Endometrium & Implantation, Universidade de Heidelberg na Alemanha. Foi avaliado o efeito da metformina no potencial metastático das células da linhagem de câncer epitelial endometrial *Ishikawa*. A linhagem celular *Ishikawa* é de células de adenocarcinoma endometrial, contendo receptores para estrogênio e progesterona. Esta linhagem é utilizada frequentemente para fins de pesquisa em biologia reprodutiva e para estudos moleculares.

A capacidade de invasão e migração das células da linhagem *Ishikawa* foi avaliada pelo mesmo método que as células primárias, através de *transwells*. A análise estatística foi feita através do teste de Kruskal-Wallis pois os resultados não

apresentaram distribuição normal, sendo portanto considerados não-paramétricos e os grupos não podem ser considerados de forma independente.

Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Eles estão representados em porcentagem em relação ao Controle, sendo o grupo controle considerado 100% (Figuras 7 e 8).

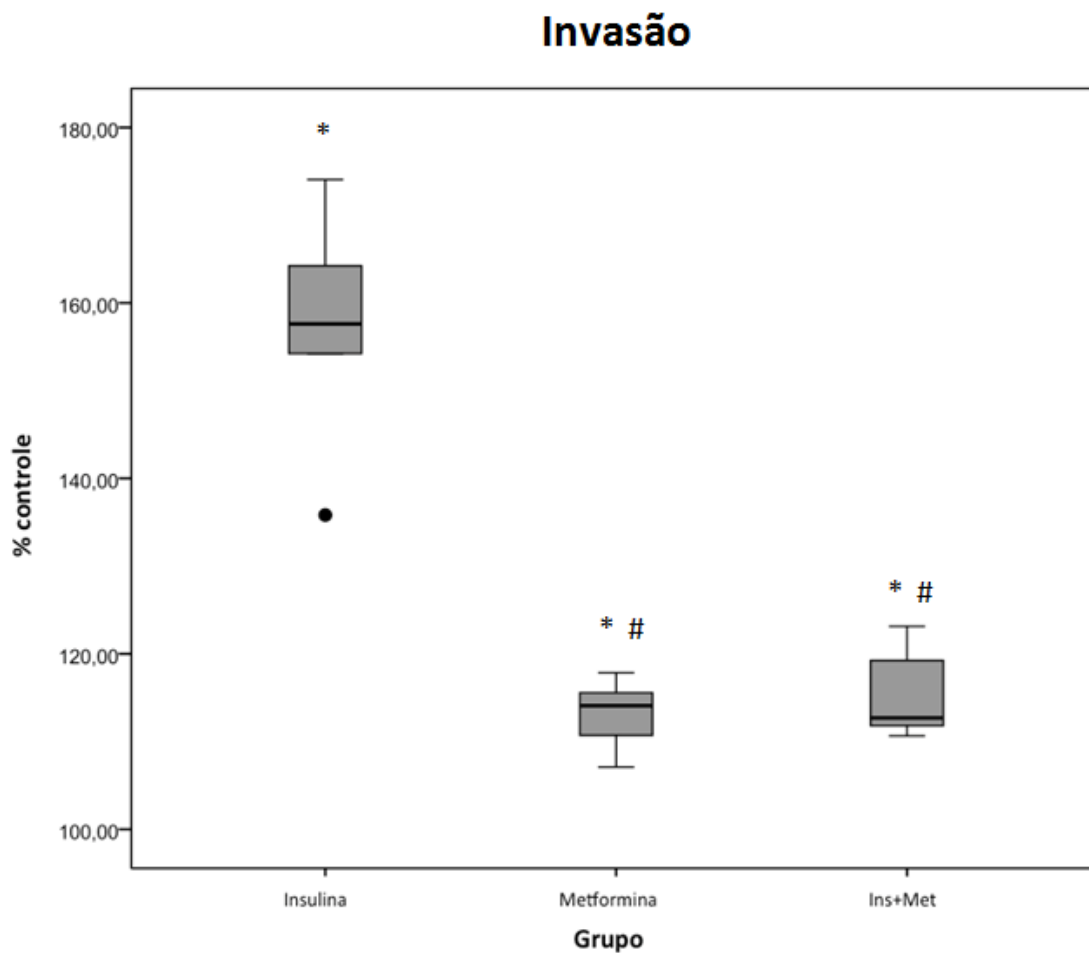


Figura 7: Invasão das células da linhagem de câncer *Ishikawa*. Todos os grupos apresentam diferença estatística em relação ao Controle ($*p < 0,05$). O grupo Metformina e Insulina + Metformina apresentam menor taxa de invasão comparados ao grupo Insulina ($\#p < 0,01$). Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis; $n=5$.

Quando avaliamos a capacidade de invasão das células de câncer, observamos que o grupo G2, tratado com insulina, apresenta uma maior habilidade de invasão (57%) quando comparado ao grupo Controle. Entretanto, quando estas células são tratadas com metformina, conseguimos verificar uma significativa diminuição da taxa de invasão (44,1% do grupo Metformina em relação ao grupo Insulina), e uma inibição ao efeito invasivo da insulina (41,6% do grupo Insulina + Metformina em relação ao grupo Insulina).

Migração

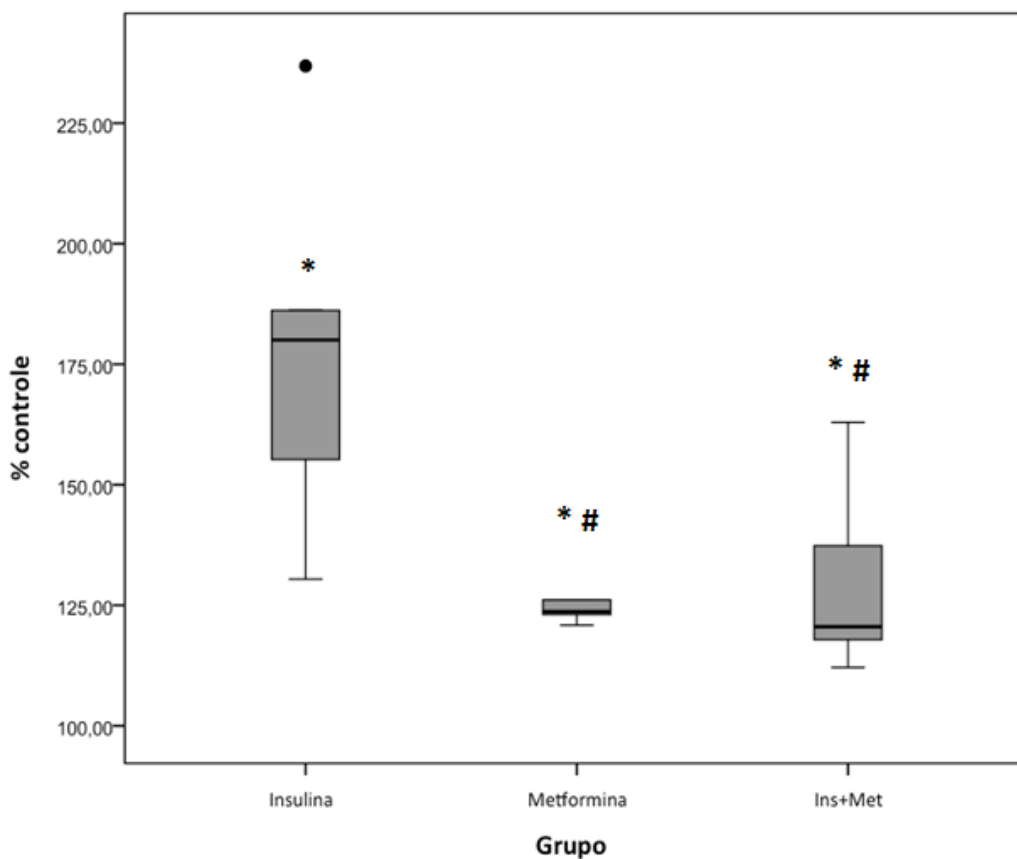


Figura 8: Migração das células da linhagem de câncer *Ishikawa* quando tratadas nos diferentes grupos. Todos os grupos apresentam diferença estatística em relação ao Controle (* $p < 0,05$). O grupo Metformina e Insulina + Metformina apresentam menor taxa de migração comparados ao grupo Insulina (# $p = 0,01$ e $p = 0,04$ respectivamente). Dados apresentados como mediana e intervalos interquartis; $n = 5$.

Analisando a taxa de migração das células de câncer de endométrio nos diferentes grupos, verificamos um comportamento semelhante à taxa de invasão encontrada. O grupo tratado com insulina (G2) em relação ao controle, apresenta um aumento de aproximadamente 77% na capacidade de migrar. Os grupos tratados com metformina, Metformina (G3) e Insulina + Metformina (G4), demonstraram uma redução de 49% e 47%, respectivamente, quando comparados ao grupo exposto à insulina. No entanto, em ambos os ensaios, os grupos Metformina e Insulina + Metformina não alcançaram os valores do grupo Controle.

A proliferação das células de carcinoma endometrial foi analisada através de contagem das células com o corante azul de Tripán. As células foram semeadas em triplicata e cultivadas com meio comum a todas *overnight* para uma adesão e diferenciação apropriada nos diferentes grupos. Em seguida, foram incubadas com os respectivos tratamentos por 72 horas. Após este período, as células foram tripsinizadas e contadas. Estes resultados são demonstrativos (n=2) e estão representados em média e desvio padrão na figura 9.

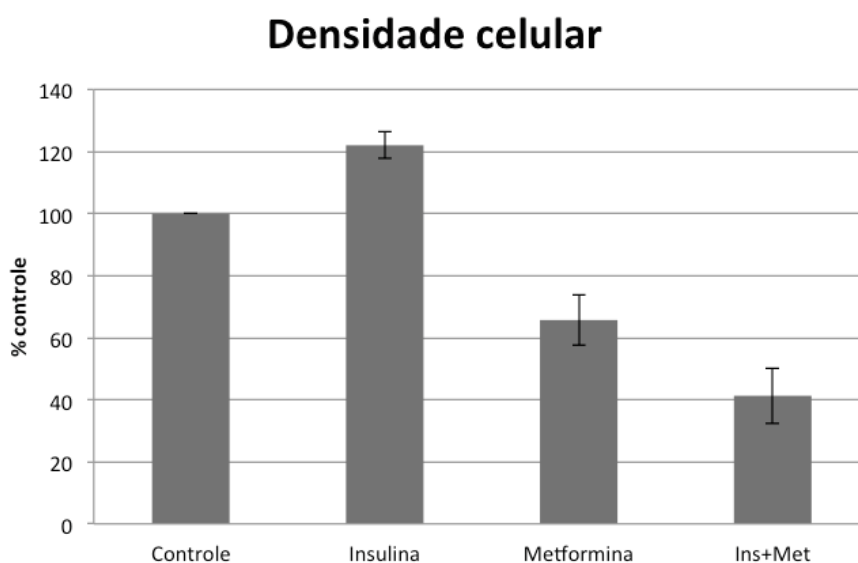


Figura 9: Densidade celular (porcentagem em relação ao controle) das células de câncer *Ishikawa*, após exposição aos diferentes tratamentos durante 72 horas (n=2); dados demonstrativos representados em média \pm desvio padrão.

Na linhagem celular de câncer podemos observar que a insulina aumentou a densidade celular cerca de 22% em relação ao controle. Entretanto, a metformina atuou de maneira oposta, diminuindo a densidade celular 34% em relação ao Controle e 56% em relação ao grupo Insulina. Quando a metformina é utilizada em conjunto com a insulina seu efeito antiproliferativo é acentuado, podemos observar uma diminuição da densidade celular em 81% quando comparado ao grupo Insulina.

DISCUSSÃO

No presente estudo, demonstramos que a metformina detém a capacidade de reduzir o potencial metastático de células de carcinoma endometrial, assim como a habilidade de proliferação, migração e invasão de células epiteliais endometriais primárias.

O carcinoma endometrial caracteriza-se como uma patologia frequente no trato genital feminino. Um número considerável de pacientes sofre recorrência da neoplasia e formação de metástases, piorando o prognóstico (BING et al., 2014). Cerca de 30% dos casos de câncer endometrial não são diagnosticados até que surjam metástases locais ou distais (BING et al., 2014). A invasão e migração de células cancerígenas são pontos importantes na formação de metástases e dependem de interações celulares com a Matriz Extracelular, mediados por fatores produzidos pelas células tumorais e o estroma circundante (ZHANG et al., 2015). A proliferação anormal de células neoplásicas também é um evento metabólico que desempenha papel fundamental na progressão da doença metastática. É mediada principalmente por fatores de crescimento, entre eles o Fator de Crescimento Insulina-like 1 (IGF-1), correlacionado com a via de sinalização PI3K/Akt/mTOR (ZHANG et al., 2015). Desta forma, a invasão, migração e proliferação conferem um fenótipo maligno ao câncer de endométrio.

Um conceito bem estabelecido se refere ao papel da diabetes e resistência à insulina no câncer endometrial, sendo fatores de risco importantes. Também a obesidade associada à hiperinsulinemia confere um risco maior para o desenvolvimento da patologia (PAPAIOANNOU; LECTURER, 2010). A metformina, uma biguanida oral aplicada no tratamento da Diabetes Mellitus tipo II (DM2), é utilizada no controle da glicemia e hiperinsulinemia (NATHAN et al., 2009; NEVADUNSKY et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Já se conhecem as propriedades anti-proliferativas que a metformina exerce sobre células tumorais no câncer de mama, próstata, ovário e endométrio em estudos realizados *in vitro* (WU et al., 2012). Esta hipótese partiu da observação de que existe uma redução da malignidade do câncer e do risco de óbito em pacientes diabéticos tratados com a metformina (EVANS et al., 2005). Sendo assim, Campagnoli e colaboradores sugeriram, em 2013, que este fármaco fosse utilizado como agente preventivo para

carcinomas endometriais por mulheres apresentando fatores de risco a esta condição, juntamente com outras abordagens (CAMPAGNOLI et al., 2013).

Neste trabalho, células epiteliais endometriais primárias e células de carcinoma endometrial *Ishikawa* foram submetidas a um ambiente considerado hiperinsulinêmico *in vitro* e tratadas com a metformina. O objetivo foi observar como estas células se comportam em relação a proliferação, migração e invasão nestas condições.

A melhor forma de tentar mimetizar processos que acontecem *in vivo* de forma a esclarecer diversos mecanismos é através de culturas celulares primárias. Esta abordagem permite o desenvolvimento de novas terapias ou o redirecionamento de terapias já existentes. No entanto cada tecido e tipo celular são característicos e apresentam peculiaridades, assim como cada indivíduo dispõe de características intrínsecas que conferem variabilidade entre populações. Por causa disto e diversas outras variáveis, a taxa de insucesso de culturas primárias é alta, em especial quando se trabalha com células epiteliais. Neste trabalho, as coletas foram realizadas através de curetas de Novak. Este método providencia pouco material e alta contaminação da amostra com hemácias por se tratar de uma raspagem ao útero. Uma densidade muito baixa de células semeadas tendem a não formar colônias no meio em que estão dispostas. Desta forma, das 10 amostras coletadas, cerca de 60% não tiveram sucesso em cultura devido a contaminações provenientes da amostra ou do processamento dela, pouca contagem de células no momento da cultura ou variações na técnica de cultivo.

Este tipo de célula manifesta melhor adesão e crescimento quando utilizado o meio DMEM/F12 suplementado com 5% de SFB, o que também minimiza o crescimento e proliferação de possíveis células estromais retidas no filtro utilizado para separação celular. As concentrações de E_2 foram estipuladas a partir do estudo de Apparao e colaboradores (APPARAO et al., 2002). Já as concentrações de insulina e metformina foram determinadas pela análise do trabalho de Germeyer e colaboradores (GERMEYER et al., 2011). As concentrações foram adotadas no sentido de proporcionar o melhor modelo para avaliar o efeito da metformina em células epiteliais submetidas à hiperinsulinemia.

Os resultados demonstraram que as células endometriais tiveram a taxa de migração e invasão diminuídas pela metformina. A habilidade de migração das células primárias do grupo Metformina diminuiu 9% e 8% em relação aos grupos Controle e Insulina + Metformina, respectivamente. Nas células da linhagem de carcinoma endometrial, a metformina e metformina e insulina diminuíram a migração celular facultada pela insulina em 49% e 47%, respectivamente. Quanto à capacidade de invasão, não se constatou diferença na invasão das células epiteliais endometriais primárias em relação ao controle, mas houve uma redução quando comparadas às células tratadas com metformina e insulina. As células de carcinoma tratadas com metformina e metformina/insulina tiveram o caráter invasivo diminuído em 44% e 41%, respectivamente, em relação ao grupo Insulina. Podemos observar que a redução conferida pela metformina se dá de forma mais acentuada nas células da linhagem *Ishikawa* do que nas células endometriais primárias. Isto torna-se válido à medida que partimos do preceito de que células primárias não possuem a mesma capacidade de migração e invasão que as células com fenótipo neoplásico apresentam, ou seja, elas não têm essa habilidade considerada como metastática. No entanto, sendo o ensaio por *tranwells* um ensaio baseado no princípio de quimiotaxia, as células invadiram/migraram para a câmara contendo soro. Desta forma, a metformina atuou inibindo o processo de forma significativa.

Tan e colaboradores em 2011 avaliaram a invasividade e fatores inflamatórios relacionados a metástases em células de pacientes com Síndrome dos Ovários Policísticos e linhagem celular de carcinoma ECC-1 quando tratadas com metformina. Os ensaios utilizados para acessar a invasividade foram o *Wound-healing motility* (24 horas) e ensaios de migração por *transwells*. Os resultados obtidos corroboram com os resultados do presente trabalho, a metformina atua reduzindo a capacidade de invasão e migração de células de carcinoma endometrial (TAN et al., 2011).

Sabe-se que a insulina atua hiperestimulando células do endométrio, podendo levar a hiperplasia e transformações neoplásicas ao ativar vias que promovem sobrevivência à apoptose e variações metabólicas (ARCIDIACONO et al., 2012). Estas transformações favorecem metástases, malignidade e a progressão tumoral no tecido

endometrial, sendo que o receptor da IGF-1 (IGF-1R) é considerado como fator indicador de prognóstico (HIRANO, 2004; ZHANG et al., 2015).

É esperado observar um aumento na migração e invasão de células epiteliais endometriais quando submetidas a um ambiente hiperinsulinêmico, porém este comportamento só foi observado nas células de carcinoma. As células primárias não apresentaram diferença significativa na capacidade de migração e invasão no grupo tratado com insulina quando comparado aos restantes grupos. Ao passo que as células de linhagem de câncer endometrial revelaram um aumento de 77% na migração e 57% na invasão em relação ao controle. Este cenário pode ser explicado levando em conta o tempo padrão dos ensaios, que é de 16 horas. Este período pode não se qualificar como sendo suficiente para ativar as vias de sinalização que são alvo do hormônio e que conferem proliferação não-fisiológica ou agressividade às células primárias.

Tendo em vista ainda a caracterização do efeito da metformina no potencial metastático de células endometriais, realizamos o Ensaio de Proliferação EdU com as células primárias. Com este ensaio pudemos analisar a densidade celular após 24 horas de tratamento com os diferentes grupos, contabilizando o número total de células, e a taxa de proliferação nas 4 horas subsequentes. Este tempo foi utilizado por serem células sensíveis durante o cultivo e manipulação, perdendo viabilidade pouco tempo após o plaqueamento. Só foi possível avaliar este parâmetro em uma (1) amostra e não foram aplicados testes estatísticos, tornando os dados demonstrativos. Observamos que, como esperado, o grupo tratado somente com insulina apresentou tendência em aumentar o número de células em 32,6% em relação ao controle. A metformina demonstrou uma tendência em reduzir a densidade impulsionada pela insulina em 110,4% quando atuou sozinha e 67,4% quando esteve em presença da insulina. Após as 4 horas de incubação com o intercalante de DNA, a análise revelou que todos os grupos tiveram a proliferação aumentada em relação ao controle. Esta taxa leva em conta o número restante de células após as 24 horas de tratamento, sendo que apenas 32% das células tratadas com Metformina resistiram ao efeito do fármaco, mas no entanto tiveram taxa de proliferação correspondente a 146% (em relação ao controle). Este fenômeno pode estar envolvido com um mecanismo de

compensação da baixa densidade celular provocada pelo fármaco. Estes resultados sugerem que a metformina possui propriedades anti-proliferativas em células epiteliais endometriais primárias, independente do ambiente hiperinsulinêmico.

A proliferação das células de câncer *Ishikawa* foi testada em um tempo maior que as células primárias, por um período de 72 horas. Isto porque já existem dados relativos ao comportamento destas células para o tempo 24 horas. Os resultados são demonstrativos (n=2), porém em células de linhagem, quando se obtém baixo desvio padrão, já se pode inferir o provável efeito pois as populações variam muito pouco entre si. O que observamos através destes dados foi um aumento na densidade celular quando as células foram tratadas com insulina, em relação ao grupo Controle, conforme o esperado. No entanto, houve uma diminuição no número de células do grupo Metformina (G3) e Insulina + Metformina (G4), em 34% e 59%, respectivamente. Isto indica que, em células de carcinoma endometrial, a metformina tem o seu efeito anti-proliferativo potencializado quando está em um ambiente hiperinsulinêmico.

Um estudo de revisão feito por Febbraro e colaboradores (2014) aborda a questão do uso da metformina para além do fim inicialmente proposto (tratamento da DM2). Ele avalia os diversos estudos feitos com intuito de provar a eficácia da metformina em cânceres ginecológicos e a vantagem que ela apresenta por ser uma droga aprovada pela FDA e com efeitos sistêmicos considerados seguros (FEBBRARO; LENGYEL; ROMERO, 2014). A premissa de que fármacos que alteram o metabolismo em células de câncer, que são considerados mais sensíveis por apresentar metabolismo diferenciado, torna a metformina um candidato adequado no tratamento de neoplasias.

Hanna e colaboradores (2012) examinaram os efeitos da combinação da metformina e um antineoplásico conhecido, o paclitaxel, em linhagens de câncer endometrial ECC-1 e *Ishikawa*. Observaram que a metformina potencializa o efeito do fármaco através da modulação da via de sinalização do mTOR, inibindo a proliferação (HANNA et al., 2012). Campagnoli et al. (2013) sugeriram a perda de peso, restrição calórica e atividade física, juntamente com a administração do insulino-sensibilizante metformina, como proposta de tratamento preventivo do câncer endometrial em mulheres pós-menopausicas (CAMPAGNOLI et al., 2013). De maneira geral, vários estudos

propõe o uso da metformina como terapia adjuvante e preventivo para pacientes predispostas à patologia ou no tratamento da doença já estabelecida.

Alguns estudos clínicos têm vindo a ser conduzidos neste sentido, como exemplo o trabalho de Laskov e colaboradores (2014) que viram o efeito da metformina em pacientes com câncer de endométrio operável. O estudo foi feito em mulheres não-tratadas e sem diabetes que receberam doses de metformina desde o diagnóstico até a cirurgia de remoção da massa tumoral, avaliaram fatores como a IGF-1, IGFBP, Ki-67, pAMPK e pS6. Observaram que todos sofreram redução após uso da metformina, proporcionando evidências da ação anti-proliferativa da droga (LASKOV et al., 2014).

Ainda, se postulam hipóteses das causas da variação na resposta de pacientes à metformina tanto para a diabetes como para o câncer. Um estudo desenvolvido por Berstein e colaboradores (2013) avaliou 12 polimorfismos genéticos, entre eles polimorfismos “standart” que já têm papel conhecido no mecanismo de ação da metformina e polimorfismos que se supõe fazerem parte da via. As pacientes eram mulheres na pós menopausa, incluindo saudáveis, acometidas pela DM2 e câncer, acometidas pela DM2 mas sem câncer e ainda mulheres com câncer mas com tolerância adequada a glicose. Os polimorfismos relacionados à variabilidade foram principalmente aqueles ligados ao transportador da metformina (OCT) e ao SHBG (BERSTEIN et al., 2013).

Este é o primeiro trabalho que avalia o uso da metformina em células epiteliais endometriais primárias até a presente data. Isto se mostra necessário para preencher a lacuna deixada por outros estudos, referente a como este medicamento atua diretamente em células saudáveis de mulheres predispostas à patologia. Também nos dá uma perspectiva do mecanismo celular de ação da metformina ao compararmos estes resultados àqueles obtidos com o carcinoma endometrial no que se refere ao potencial metastático.

No entanto estes resultados são preliminares e precisam ser analisados em um número amostral maior, onde será possível a realização de uma correlação entre os

dados obtidos de células primárias e neoplásicas, juntamente com a análise dos fatores de sinalização envolvidos a nível transcricional e pós-transducional.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que o aumento na invasão, migração e proliferação das células primárias do epitélio endometrial na condição hiperinsulinêmica é atenuada com o uso da metformina, assim como das células de carcinoma endometrial. A proliferação dessas células é reduzida por meio do efeito sobre a densidade celular. De modo geral, vale inferir que este fármaco pode ter a capacidade de modular o potencial metastático do carcinoma endometrial e que, após estudos que elucidem melhor os seus mecanismos, ele possa ser redirecionado para o tratamento clínico e prevenção da doença.

REFERÊNCIAS

- ALBINI, A. et al. A Rapid in Vitro Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells. **Cancer Research**, v. 47, p. 3239–3246, 1987.
- APPARAO, K. B. C. et al. Elevated Endometrial Androgen Receptor Expression in Women with Polycystic. **Biology of Reproduction**, v. 304, n. 66, p. 297–304, 2002.
- ARCIDIACONO, B. et al. Insulin resistance and cancer risk: An overview of the pathogenetic mechanisms. **Experimental Diabetes Research**, v. 2012, 2012.
- BAUVOIS, B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1825, p. 26–39, 2012.
- BERSTEIN, L. M. et al. Genetic polymorphisms potentially associated with response to metformin in postmenopausal diabetics suffering and not suffering with cancer. **Cell Cycle**, v. 12, n. 23, p. 3681–3688, 2013.
- BING, L. et al. MicroRNA-543 suppresses endometrial cancer oncogenicity via targeting FAK and TWIST1 expression. **Gynecologic Oncology**, v. 290, n. 251, p. 533–541, 2014.
- BITENCOURT, L. “**Câncer de endométrio: mortalidade populacional e sobrevida de uma coorte hospitalar, no Rio de Janeiro, Brasil**”. [s.l.] FIOCRUZ, 2011.
- CALLE, E.; KAAKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 579–591, 2004.
- CAMPAGNOLI, C. et al. Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women. **Gynecological Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 119–124, 2013.
- CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011.
- EVANS, J. M. M. et al. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 330, n. 7503, p. 1304–1305, 2005.
- FEBBRARO, T.; LENGYEL, E.; ROMERO, I. L. Gynecologic Oncology Old drug , new trick : Repurposing metformin for gynecologic cancers ? **Gynecologic Oncology**, v. 135, n. 3, p. 614–621, 2014.
- GERMEYER, A. et al. Metformin modulates IL-8, IL-1 β , ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 22, n. 4, p. 327–334, 2011.
- GREER, K. B. et al. Insulin / Insulin-Like Growth Factor-1 Pathway in Barrett ' s Carcinogenesis. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 4, n. 31, p. 1–5, 2013.
- HANNA, R. K. et al. **Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway**Gynecologic Oncology. **Anais...**2012

HIRANO, S. Clinical implications of insulin-like growth factors through the presence of their binding proteins and receptors expressed in gynecological cancers. **Eur J Gynaecol Oncol**, v. 25, p. 187–191, 2004.

INCA. **Estimativa INCA**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>.

LASKOV, I. et al. Anti-diabetic doses of metformin decrease proliferation markers in tumors of patients with endometrial cancer. **Gynecologic Oncology**, 2014.

LIN, G. et al. Contribution of catechol- O -methyltransferase Val158Met polymorphism to endometrial cancer risk in postmenopausal women : a meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6442–6453, 2013.

LIN, J. et al. 11-epi-Sinulariolide Acetate Reduces Cell Migration and Invasion of Human Hepatocellular Carcinoma by Reducing the Activation of ERK1/2, p38MAPK and FAK/PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathways. **Marine Drugs**, p. 4783–4798, 2014.

LUSTOSA, S. A. S. et al. Expression Profiling Using a cDNA Array and Immunohistochemistry for the Extracellular Matrix Genes FN-1, ITGA-3, ITGB-5, MMP-2, and MMP-9 in Colorectal Carcinoma Progression and Dissemination. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–27, 2014.

NATHAN, D. M. et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: A consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. **Diabetes Care**, v. 32, n. 1, p. 193–203, 2009.

NESTLER, J. E. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 1, p. 47–54, 2008.

NEVADUNSKY, N. S. et al. Metformin use and endometrial cancer survival. **Gynecologic Oncology**, v. 132, n. 1, p. 236–240, 2014.

NIETO, M. A. The Ins and Outs of the Epithelial to Mesenchymal Transition in Health and Disease. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 27, p. 347–376, 2011.

PAPAIOANNOU, S.; LECTURER, H. S. Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. **Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 24, n. 1, p. 19–27, 2010.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 143–156, 2014.

SANTANA, L. Effect of metformin on the clinical and metabolic assessment of women with polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol**, v. 19, p. 88–96, 2004.

SHAO, R. et al. Direct effects of metformin in the endometrium : a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 33, n. 41, p. 1–11, 2014.

SOROSKY, J. I. Endometrial cancer. **Obstetrics and gynecology**, v. 111, n. 2 Pt 1, p. 436–447, 2008.

SOROSKY, J. I. **Endometrial Cancer** **Obstetrics & Gynecology**, 2012.

TAN, B. K. et al. Metformin treatment exerts antiinvasive and antimetastatic effects in human endometrial carcinoma cells. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 96, n. 3, p. 808–816, 2011.

VALEJO, F. A. M. **Transição epitélio-mesenquimal e presença de células CD44+/CD24- como fator de predição de metástase axilar no câncer de mama inicial.** [s.l.] USP, 2010.

WESTIN, S. et al. Molecular clustering of endometrial carcinoma based on estrogen-induced gene expression. **Cancer Biology**, v. 8, 2009.

WU, B. et al. Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. **Oncology Reports**, v. 28, p. 903–908, 2012.

ZHANG, L.; LIAO, Q. Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 7, p. 2295–2298, 2010.

ZHANG, Q. et al. Chemopreventive effects of metformin on obesity-associated endometrial proliferation. **The American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 209, p. 1–12, 2013.

ZHANG, Q. et al. CGRRF1 as a novel biomarker of tissue response to metformin in the context of obesity. **Gynecologic Oncology**, v. 133, n. 1, p. 83–89, 2014.

ZHANG, Y. et al. Metformin Down-regulates Endometrial Carcinoma Cell Secretion of IGF-1 and Expression of IGF-1R. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 1, p. 221–225, 2015.

4 – Conclusão e perspectivas

O presente trabalho forneceu evidências de que a metformina tem o potencial de diminuir a taxa de invasão, migração e proliferação, por meio da redução da densidade celular, de células epiteliais endometriais primárias quando estas são submetidas a um ambiente hiperinsulinêmico. No entanto os mecanismos pela qual a droga tem este efeito não estão bem esclarecidos.

Como perspectivas, pretendemos aumentar o número amostral dos ensaios para uma análise mais fidedigna. Também torna-se necessário uma análise das vias de sinalização envolvidas na modulação da metformina e marcadores de proliferação.

5 – Bibliografia complementar

ALTMÄE, S. et al. Guidelines for the design, analysis and interpretation of “omics” data: Focus on human endometrium. **Human Reproduction Update**, v. 20, n. 1, p. 12–28, 2014.

ATHANAZIO, D. A. Hormone replacement therapy and endometrial cancer. **Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 23, n. 11, p. 2613–2622, 2007.

BREM S., ET AL. Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. **Cancer Research**, v. Aug, n. 36, p. 2807–2812, 1976.

COSTELLO, M. F.; CHAPMAN, M.; CONWAY, U. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 21, n. 6, p. 1387–1399, 2006.

DEDES, K. J. et al. Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. **Nature Publishing Group - Clinical Oncology**, v. 8, n. 5, p. 261–271, 2011.

EZCURRA, D.; HUMAIDAN, P. A review of luteinising hormone and human chorionic gonadotropin when used in assisted reproductive technology. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 95, p. 1–12, 2014.

FOLKMAN, J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. **Semin Oncol**, v. Dec, n. 29, p. 15–18, 2002.

GARGETT, C. E. Uterine stem cells: what is the evidence? **Human reproduction update**, v. 13, n. 1, p. 87–101, 2006.

GARGETT, C. E.; CHAN, R. W. S.; SCHWAB, K. E. **Hormone and growth factor signaling in endometrial renewal: Role of stem/progenitor cells** **Molecular and Cellular Endocrinology**, 2008.

GHIABI, P. et al. Endothelial Cells Provide a Notch-Dependent Pro-Tumoral Niche for Enhancing Breast Cancer Survival , Stemness and Pro-Metastatic Properties. **PLOS ONE**, v. 9, n. 11, p. 1–13, 2014.

GIUDICE, L. C. Potential biochemical markers of uterine receptivity. **Hum Reprod**, v. 14, p. 3–16, 1999.

HARPER, M. The implantation window. **Baillieres Clin Obstet Gynaecol**, v. Jun, n. 6, p. 351–371, 1992.

HIROSHI MIZUMOTO. THE BEHAVIOURS OF HUMAN ENDOMETRIAL IN VARIOUS ENDOCRINOLOGICAL CONDITIONS. **Keio Journal of Medicine**, v. 22, n. 1968, p. 57–71, 1972.

JABBOUR, H. N. et al. **Endocrine regulation of menstruation****Endocrine Reviews**, 2006.

JEFFCOATE, T. N. A.; ED, F. R. C. S. Amenorrhoea. **British Medical Journal**, v. 2, n. October 1964, p. 383–388, 1965.

KIM, C.; HALTHER, J. Endogenous Sex Hormones, Metabolic Syndrome, and Diabetes in Men and Women. **Current Cardiology Report**, v. 16, n. 4, p. 1–20, 2015.

LIVINGSTONE, C.; COLLISON, M. Sex steroids and insulin resistance. **Clinical Science**, v. 102, p. 151–166, 2002a.

MCLENNAN CE, R. A. Extent of endometrial shedding during normal menstruation. **Obstetrics & Gynecology**, v. Nov, n. 26, p. 605–621, 1965.

MIRANTES, C.; ESPINOSA, I.; FERRER, I. Epithelial-to-mesenchymal transition and stem cells in endometrial cancer ☆. **Human Pathology**, v. 44, n. 10, p. 1973–1981, 2013.

MOYRET-LALLE, C.; RUIZ, E.; PUISIEUX, A. Epithelial-mesenchymal transition transcription factors and miRNAs: “Plastic surgeons” of breast cancer. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 311–322, 2014.

MU, N. et al. **Insulin resistance: A significant risk factor of endometrial cancer**Gynecologic Oncology. **Anais...2012**

MULHOLLAND, H. G. et al. Dietary glycaemic index, glycaemic load and endometrial and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 99, n. 3, p. 434–441, 2008.

NESTLER, J. E. Metformin for the treatment of the polycystic ovary syndrome. **The New England journal of medicine**, v. 358, n. 1, p. 47–54, 2008.

NIEMAN, K. M. et al. **Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis****Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, 2013.

OTTO, G.; GARBER, K. Energy Boost : The Warburg Effect. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 24, p. 1805–1806, 2004.

PAPAEFTHIMIOU, M. et al. Study on the Morphology and Reproducibility of the Diagnosis of Endometrial Lesions Utilizing Liquid-Based Cytology. **Cancer Cytopathology**, n. March, p. 56–64, 2005.

PAWLYK, A. C. et al. Metformin Pharmacogenomics : Current Status and Future Directions. **Diabetes**, v. 63, n. August, p. 2590–2599, 2014.

POLLAK, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. **Nature reviews. Cancer**, v. 8, n. 12, p. 915–928, 2008.

SANTANA, L. Effect of metformin on the clinical and metabolic assessment of women with polycystic ovary syndrome. **Gynecol Endocrinol**, v. 19, p. 88–96, 2004.

SOROSKY, J. I. Endometrial cancer. **Obstetrics and gynecology**, v. 111, n. 2 Pt 1, p. 436–447, 2008.

SOROSKY, J. I. **Endometrial Cancer** *Obstetrics & Gynecology*, 2012.

SOSA, M. S.; BRAGADO, P.; AGUIRRE-GHISO, J. A. Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. **Nature reviews. Cancer**, v. 14, n. 9, p. 611–622, 2014.

SUBA, Z. Circulatory estrogen level protects against breast cancer in obese women. **Recent patents on anti-cancer drug discovery**, v. 8, n. 2, p. 154–67, 2013.

THIERY, J. P. et al. **Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease** *Cell*, 2009.

VELASKEZ, E. Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy. **Metabolism**, v. 43, p. 647–654, 1994.

YESILKANAL, A. E.; ROSNER, M. R. Raf Kinase Inhibitory Protein (RKIP) as a Metastasis Suppressor : Regulation of Signaling Networks in Cancer. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 19, n. 6, p. 447–454, 2014.

6 – Anexos

1. Orientações do Gynecologic Oncology

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Gynecologic Oncology, an international journal, is devoted to the publication of clinical and investigative articles that concern tumors of the female reproductive tract. We welcome the submission of investigations relating to the etiology, diagnosis, treatment, and prevention of female cancers, as well as research from any of the disciplines related to this field of interest. Research areas include: cell and molecular biology, chemotherapy, clinical trials, epidemiology, genetics, immunology and vaccines, 'omics', pathology and cytology, quality of life, radiation therapy, surgery, and translational research. All aspects of scholarship related to tumors of this region are welcome, with originality, quality, and clarity the chief criteria of acceptance.

Types of articles

Original Research Report: Full-length report of an original basic or clinical investigation.

Review Article: A comprehensive and scholarly review of the literature relating to an important basic or clinical subject, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions.

Editorial: Commentary on an original article published in the same issue or an opinion or perspective on a specific topic.

Clinical Commentary: Offers perspective or opinion of clinical relevance.

Surgical Films: Gynecologic Oncology has begun accepting video submissions. Authors who have video or animation files that they wish to submit are strongly encouraged to adhere to the guidelines detailed below. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure

that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 100 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your file: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Please note that Gynecologic Oncology will no longer consider Letters to the Editor for publication. Correspondence, including letters which comment upon work published in Gynecologic Oncology, will be considered for publication in the journal's companion title, Gynecologic Oncology Reports. Gynecologic Oncology Reports is an open access journal and all correspondence which is accepted for publication will be published free of charge. More information about the journal can be found [here](#).

Surgical Film publications

The journal of Gynecologic Oncology now welcomes: Surgical Films The maximum file size is 100 MB (after conversion to mp4). Videos will be published in mp4 format only Formats accepted for conversion include: mpg, avi, mov, wma, wmv, swf, rm, fla. Please provide a video still image file as well. This is the placeholder online and in print. A still photograph (formatted as described for the video) must be included with your submission (it can be any frame from the video or may be a separate image) - this will be used as an "icon" for the video link A 250 word structured abstract must accompany the video Highlights (similar to that required for a manuscript) must be included with the video submission The maximum number of authors is four The maximum number of references that can accompany the video submission is four

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Clinical trial guidelines

We invite submission of all clinical trials, whether phase I, II, or III. For phase I trials, we especially encourage those of a novel substance for a novel indication, if there is a strong or unexpected beneficial or adverse response, or a novel mechanism of action. Systematic reviews of randomised trials also might warrant rapid peer review and publication. We encourage the registration of all interventional trials, whether early or late phase, in a primary register that participates in WHO's International Clinical Trial Registry Platform. We also encourage full public disclosure of the minimum 20-item trial registration dataset at the time of registration and before recruitment of the first participant (<http://www.who.int/ictrp/en/>). The registry must be independent of for-profit interest. Reports of randomised trials must conform to revised CONSORT guidelines, and should be submitted with their protocols. All reports of clinical trials must include a summary of previous research findings, and explain how this trial contributes to the sum of knowledge. The relation between existing and new evidence should be shown by direct reference to an existing systematic review and meta-analysis; if neither exists, authors are encouraged to do their own, or to describe the qualitative association between their research and previous findings.

- Cluster randomised trials must be reported according to CONSORT extended guidelines.
- Randomised trials that report harms must be described according to extended to extended CONSORT guidelines.
- Studies of diagnostic accuracy must be reported according to STARD guidelines.

- Systematic reviews must be written according to the Cochrane Collaboration guidelines.
- Observational studies (cohort, case-control, or cross-sectional designs) must be reported according to the STROBE statement.

Conflict of Interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within two years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

All authors must complete the conflict of interest form developed by the International Committee of Medical Journal Editors, which may be found here. The form is designed to be completed online and each and every author must complete a form. The conflict of interest form(s) must be uploaded to EES by the corresponding author with the manuscript.

If conflict of interest forms are not provided upon submission, your submission will be returned to you with a request that you provide forms for all authors. Your manuscript will not be considered for publication by editors or reviewers until all conflict of interest forms have been received. Please contact the Editorial Office at GYN@elsevier.com if you have any difficulty completing the form.

Role of medical writer or editor

If a medical writer or editor was involved in the creation of your manuscript, we need a signed statement from the corresponding author to include their name and information about funding of this person. This information should be added to the Acknowledgement section. We also require signed statements from any medical writers or editors declaring that they have given permission to be names as an author; or in the Acknowledgments section.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts: Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed. After the accepted manuscript is published in an online issue: any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <http://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <http://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<http://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 2200, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and postsubmission please visit <http://www.elsevier.com/languagepolishing> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information. Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these).

Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions: <http://www.elsevier.com/termsandconditions>

Submission

Submission to this journal proceeds totally online. Use the following guidelines to prepare your article. Via the homepage of this journal (<http://www.elsevier.com/journals>)

you will be guided stepwise through the creation and uploading of the various files. The system automatically converts source files to a single Adobe Acrobat PDF version of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail and via the author's homepage, removing the need for a hard-copy paper trail.

It is a condition of publication that all manuscripts must be written in clear, grammatical English and be submitted to the Gynecologic Oncology Web site at <http://ees.elsevier.com/ygyno>. Authors are requested to transmit the text and art of the manuscript in electronic form to this address. Each manuscript must also be accompanied by a cover letter. (Please see Preparation of Manuscript below.) If you are unable to provide an electronic version, please contact the editorial office prior to submission by e-mail (gyn@elsevier.com), telephone +1 619 699 6767, or fax +1 (619) 699 6211.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that no substantial portion of the study has been published or is under consideration for publication elsewhere and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Authors must disclose prior presentation at a public scientific meeting as a footnote on the title page.

Manuscripts that do not meet the general criteria or standards for publication in Gynecologic Oncology will be immediately returned to the authors, without detailed review.

CHECKLIST FOR AUTHORS

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article: [Check List for Authors](#)

Essential title page information

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article: Check List for Authors

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- Author names and affiliations. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.

- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Artwork

Electronic artwork

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article:

Check List for Authors General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the

resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings.

Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When

copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/gynecologic-oncology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted

at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples: Reference to a journal publication: [1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.
Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000. Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at

<http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

Please follow this link for a detailed list of the submission requirements and how to structure your article: Check List for Authors.

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers All necessary files have been uploaded
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at support.elsevier.com.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <http://www.elsevier.com/track-submission>.
You can track your accepted article at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also
welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: **EFEITO DA METFORMINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E NÍVEIS EXPRESSÃO DA IL-8 E IL-1 β EM UM MODELO DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL**

Prezada paciente,

Estamos realizando um estudo com células endometriais (camada interna do útero) para avaliar o efeito do uso de um medicamento, a fim de caracterizar proteínas que auxiliam na implantação do embrião no útero materno. O medicamento que será usado se chama METFORMINA e ele atua diminuindo a resistência dos tecidos à insulina. Como a senhora irá realizar a cirurgia de histerectomia (retirada do útero), gostaria de convidá-la para participar do estudo. Caso aceite, sua participação no estudo consistirá em permitir que após o término da cirurgia sejam coletadas células do útero removido. Cabe salientar que as células endometriais são sempre descartadas após a cirurgia, então, este estudo **não** trará nenhum malefício à sua saúde. Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para a senhora. Porém, no futuro, essas avaliações poderão auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas à infertilidade.

O seu nome será mantido em sigilo, sendo divulgado os resultados em conjunto com outros participante utilizando códigos. A divulgação será apenas para fins científicos.

Você poderá interromper a participação neste estudo a qualquer momento, sem que haja prejuízo no seu atendimento médico. Você não terá custos com sua participação.

Qualquer dúvida que surja ao longo do estudo basta entrar em contato com o pesquisador responsável Edison Capp (Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, telefone 3359 7625), ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone 3359 8304 (Segunda a Sexta das 8 às 17 hrs).

Este termo contém duas vias, ficando uma com a senhora e a outra com o pesquisador.

Eu, _____, concordo em participar do estudo acima nomeado, e afirmo que fui adequadamente informada sobre o protocolo em questão, podendo me retirar do estudo quando assim desejar, sem prejuízo qualquer do tratamento de minha doença.

Paciente: _____

Assinatura do pesquisador: _____

Nome do pesquisador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de _____

3. Carta de Aprovação do Comitê de Ética



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140267

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

EDISON GAPP

HELENA VON EYE CORLETA

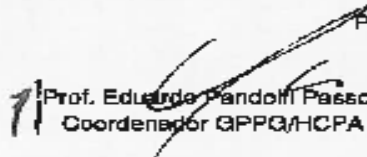
AMANDA DE BARROS MACHADO

**Título: EFEITO DA METFORMINA SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR E NÍVEIS
EXPRESSÃO DA IL-8 E IL-1beta EM UM MODELO DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS
BIDIMENSIONAL E TRIDIMENSIONAL**

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 22 de maio de 2014.


Prof. Eduardo Pandolfi Passos
Coordenador GPPG/HCPA