



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO, POTENCIAL METASTÁTICO E VIAS DE SINALIZAÇÃO
DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO *IN VITRO***

Aluna: M.Sc. Amanda de Barros Machado

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Porto Alegre, 09 de janeiro de 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA

**EFEITO DO TRATAMENTO COM METFORMINA SOBRE O
DESENVOLVIMENTO, POTENCIAL METASTÁTICO E VIAS DE SINALIZAÇÃO
DO CÂNCER DE ENDOMÉTRIO *IN VITRO***

Aluna: M.Sc. Amanda de Barros Machado

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Porto Alegre, 09 de janeiro de 2017

“Once you stop learning, you start dying.”

Albert Einstein

*“All truths are easy to understand once they are discovered
the point is to discover them.”*

Galileo Galilei

***Dedico este trabalho as pessoas que amo e estão sempre ao meu
lado, proporcionando que eu realize todos meus sonhos.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Capp, pelo voto de confiança depositado desde o início do meu mestrado, por concordar em implantar uma sublinha de pesquisa e principalmente pelas inúmeras oportunidades oferecidas, as quais direcionaram não somente a minha vida profissional como também pessoal.

À Prof^a. Dr^a. Ariane Germeyer, minha supervisora no laboratório na Alemanha, a qual desde o início acreditou e apostou no meu projeto, participando ativamente e contribuindo de forma expressiva para a conclusão deste trabalho. Agradeço não somente por todo conhecimento compartilhado, mas também pelas oportunidades e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Ilma Simoni Brum principalmente pela acolhida como uma de suas alunas, pelos incontáveis ensinamentos, orientação e carinho nos momentos difíceis e delicados. És sem dúvidas o coração do nosso laboratório, sempre aberta e disposta as novas técnicas e protocolos propostos possibilitando que eu aprendesse com meus erros e acertos.

À Prof^a. Dr^a. Helena Corleta pela disponibilidade, atenção e imensas contribuições científicas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, por terem me proporcionado uma excelente formação. Assim como, a todos os funcionários da secretaria, que de forma muito competente sempre me ajudaram nos assuntos burocráticos. As agencias de fomento, CAPES, CNPq, FIPE-HCPA e Excellence Initiative da Universidade de Heidelberg, que financiaram este trabalho.

A todos meus colegas de laboratório, que contribuíram de alguma forma para meu crescimento. Em especial aos colegas Diego Alcoba, Patrícia Martiny, Gustavo Ferreira e Vânia dos Reis pela agradável convivência, pelos grandes ensinamentos, mas acima de tudo pela amizade verdadeira, carinho, compreensão e companheirismo que não tenho dúvidas que permanecerá ao longo de nossas vidas.

A todos alunos, funcionários e professores do Departamento de Ginecologia Endocrinologia e Medicina Reprodutiva, Universidade de Heidelberg, Alemanha por sempre estarem dispostos a me ajudar. Principalmente, ao Prof. Dr. Thomas Strowitzki por todas oportunidades concedidas, e à técnica do laboratório de Endométrio e Implantação, Julia Jaukus, por me receber tão bem sempre disposta a ajudar.

De forma intensa aos meus pais, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, possibilitando que eu trilhasse meu caminho com muita segurança e apoio. Ao amor incondicional, pelos ótimos bons exemplos e por sempre estarem antes, durante e depois entendendo as minhas escolhas e encarando de forma positiva a distância e minha ausência. Às minhas irmãs e sobrinhos por serem pessoas essenciais na minha vida.

À minha filha canina Fiona, por ser minha fiel companheira em todos os momentos e encher a minha vida de amor, me deixando uma pessoa mais forte e feliz.

Às minhas amigas do coração e da vida, Ana Paula Ormaghi, Bianca Peixoto, Carolina Brum, Emily Dietrich, Mariana Germano, Raquel Magalhães e Raquel Mitchell pela amizade verdadeira, desabafos, incentivos e por deixarem a minha vida mais leve.

Por fim, ao meu noivo e companheiro Sebastian Weber, que entrou na minha vida durante esta jornada e esteve presente de forma ativa, contribuindo cientificamente para o desenvolvimento desta tese. Agradeço pela tua ajuda e companheirismo durante as incansáveis horas de trabalho, incluindo finais de semana, feriados e férias. Pela tua paciência e compreensão, mas principalmente pelo teu amor que transformou a minha vida e me torna uma pessoa melhor e mais feliz todos os dias.

RESUMO

O câncer de endométrio é uma das neoplasias ginecológicas com maior incidência, classificado como tipo I, estrógeno dependente, e tipo II, estrógeno não-dependente. O tipo I é a forma mais comum, ocorrendo em torno de 75 – 85 % dos casos de câncer de endométrio. Altos níveis de estrogênio têm sido relacionados ao aumento do risco de desenvolvimento do câncer de endométrio, pois estimula a proliferação celular e inibe a apoptose. A resistência à insulina parece desempenhar um papel central nesta neoplasia, e as doenças associadas à resistência à insulina como obesidade, Diabetes Mellitus (DM) tipo II e Síndrome dos Ovários Policísticos (PCOS) também são consideradas fatores de risco significantes para o desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio tipo I. Adicionalmente, pacientes com PCOS podem apresentar um quadro de resistência à insulina independente de obesidade, permanecendo em um estado glicêmico normal. Neste caso, a hiperinsulinemia isolada seria um fator tanto para a promoção, como também para a progressão do câncer. Entretanto, o aumento de níveis séricos de glicose, a hiperglicemia, também é considerada um fator independente para o desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio sendo um elo crítico entre o aumento do risco do desenvolvimento de câncer observado em pacientes com DM tipo II. Dessa forma, tratamento utilizando agentes insulino-sensibilizantes, que atuam diminuindo a resistência à insulina e conseqüentemente reduzindo seus níveis pode ser uma estratégia interessante para prevenir o câncer e reduzir a disseminação metastática. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da dose de 0,1 mM de metformina sobre o potencial proliferativo e metastático das células de câncer de endométrio, assim como, avaliar o efeito do tratamento a curto e a longo prazo sobre vias de sinalização intracelular relacionadas ao desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio quando exposta a um ambiente com diferentes concentrações de glicose e níveis elevados de insulina. Por fim, a padronização de um modelo tridimensional (3D) de cocultura de células de endométrio que permanecesse viável ao longo de 20 dias de cultivo. O potencial proliferativo foi determinado pelo método luminescente CellTitle Glo, e o potencial metastático pelo o ensaio *transwell* de migração e invasão. Análises de expressão do mRNA dos genes *MKI67*, *mTOR*, *NOTCH1*, *NOTCH3* e *JAG1* foram realizadas a partir da técnica de PCR em tempo real. O índice de duplicação populacional cumulativo das

células determinou o comportamento de replicação da linhagem de câncer de endométrio ao longo do período de tratamento de 20 dias. Em todas os ensaios as células foram cultivadas em meio contendo concentrações normais (5,5 mM) ou altas (17 mM) de glicose, e divididas nos diferentes grupos de tratamento: controle, insulina, metformina e metformina associado a insulina. A padronização do modelo 3D de cocultura de células de endométrio foi realizado utilizando células primárias e células de linhagem de câncer de endométrio, a Matrigel® foi a matriz extracelular temporária utilizada para a construção do modelo. Neste estudo, a concentração de 0,1 mM de metformina inibiu a ação da insulina, diminuindo a habilidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio independente da concentração de glicose presente no meio. Entretanto, este efeito não foi observado sobre o potencial proliferativo, sendo observada uma redução da proliferação das células de câncer de endométrio ao serem utilizadas concentrações maiores de metformina. Em relação aos mecanismos moleculares intracelulares, foi observado que na presença de altas concentrações de glicose as células de câncer de endométrio adquirem um genótipo mais agressivo e apresentam resistência ao efeito da metformina na dose de 0,1 mM durante o tratamento agudo. Além disso, foi possível a padronização de um modelo 3D de cocultura de células de câncer de endométrio que permanecesse viável ao longo dos 20 dias de cultivo. Contudo, apesar das células de câncer de endométrio apresentarem resistência ao efeito da metformina na presença de altas concentrações de glicose, a dose de 0,1 mM foi capaz de inibir o efeito da insulina e diminuir o potencial metastático dessas células, sugerindo que a metformina ao atuar clinicamente em combinação com seus efeitos indiretos e diretos pode ser um potencial agente adjuvante na terapia contra o câncer.

Palavras-chave: adenocarcinoma endometrial tipo I, metformina, hiperinsulinemia, hiperglicemia.

ABSTRACT

Endometrial cancer is one of the most common gynecological malignancies worldwide and is classified into a type I, which is estrogen-dependent, and a type II estrogen-independent form. The type I is the most common, accounting to 75%-85% of all cases of endometrial cancer. Elevated estrogen levels have been shown to increase the risk of endometrial cancer development, as estrogen stimulates endometrial cell proliferation and inhibits apoptosis. The insulin resistance seems to play a central role in endometrial carcinogenesis, furthermore, diseases associate with insulin resistance, as seen in polycystic ovary syndrome (PCOS), and obesity, as well as type II diabetes mellitus (DM) are considered as significant risk factors for the development and progression of type I endometrial cancer. Additionally, PCOS patients may have an insulin resistance independent of obesity remaining in a normoglycemic status. At this case, the hyperinsulinemia seems to be the promoter factor not only for the development but also for the cancer progression. However, also increased blood glucose levels are contributing to the growth and carcinogenesis in endometrial cancer and are acting as a critical link between the observed increased cancer risk in patients with type II DM. Therefore, the treatment with insulin-sensitizing agents that act through reducing insulin levels, could offer a general approach to prevent the development of cancer and reduce metastasis. The aim of this study was to evaluate the effect of 0.1 mM metformin dose on the proliferative and metastatic potential of endometrial cancer cells, as well as, analyze the effects of short and long-term treatment on intracellular signaling pathways related to endometrial cancer development and progression when exposed to an environment with different glucose concentrations and high insulin levels. Additionally, the endometrial three-dimensional (3D) coculture standardization to remain viable over 20 culture days. The proliferative potential was performed by using CellTiter Glo assay, and the metastatic potential was performed by using transwell migration and invasion assay. The mRNA expression of *MKI67*, *mTOR*, *NOTCH1*, *NOTCH3* and *JAG1* genes were measured by real time PCR. The cumulative population doubling rate was evaluated to determine the replication behavior of an endometrial cancer cell line throughout 20 days of treatment period. In all assays the cells were cultured in medium containing normal (5.5 mM) or high (17 mM) glucose concentration, and treated in different groups: control, insulin,

metformin or combined treatment. The 3D coculture model was established by using endometrial primary cells and an endometrium cancer cell line, to the model construction Matrigel® was used as an extracellular matrix. In this study, the 0.1 mM metformin dose potently inhibited the insulin action, decreasing the ability of the endometrial cancer cell line to migrate and invade in a high and normal glucose environment. On the proliferative potential this effect was not observed, however, relative cell proliferation sensitivity to metformin was observed in the range between 1 and 5 mM regardless of the present glucose concentration. In the intracellular molecular mechanisms, it was observed that the high glucose concentration creates an optimal environment for endometrial cancer cells to exhibit a more aggressive genotype and resistance to metformin during a long-term treatment. Moreover, the endometrial 3D coculture model remained viable throughout 20 culture days. Therefore, despite of endometrial cancer cells show resistance to the metformin effect when exposed to high glucose environment, the 0.1 mM metformin dose was able to inhibit the insulin action and decrease the metastatic potential of the cells, suggesting that metformin is acting clinically in combination with indirectly and direct effects could emerge as a potential agent in cancer therapy.

Keywords: endometrial adenocarcinoma type 1, metformin, hyperinsulinemia, hyperglycemia.

ZUSAMMENFASSUNG

Endometriumkrebs ist eine der häufigsten gynäkologischen Malignomen weltweit und wird in einen Typ I eingeteilt, welcher östrogenabhängig ist, und in eine Typ-II-Östrogen-unabhängige Form. Typ I ist der häufigste Fall und kommt in etwa für 75% bis 85% aller diagnostizierten Fälle in Frage. Erhöhte Östrogenspiegel haben gezeigt, das Risiko von Gebärmutterkrebsentwicklung zu erhöhen, genauso wie Östrogen die Proliferation von Endometriumzellen stimuliert und die Apoptose hemmt. Die Insulinresistenz scheint eine zentrale Rolle in der endometrialen Karzinogenese zu spielen und darüber hinaus werden Erkrankungen mit Insulinresistenz, wie zum Beispiel das polyzystische Ovarialsyndrom (PCOS) und Adipositas, sowie Typ II-Diabetes mellitus (DM) als signifikantes Risiko angesehen, Faktoren für die Entwicklung und Progression von Typ-I-Endometrium-Krebs zu sein. Zusätzlich können PCOS-Patienten durch eine Fettleibigkeit in einem normoglykämischen Status eine unabhängige Insulin-Resistenz haben. In diesem Fall scheint die Hyperinsulinämie der fördernde Faktor zu sein, nicht nur für die Entwicklung als auch für die Tumorprogression. Aber auch erhöhte Blutzuckerspiegel tragen zum Wachstum und die Karzinogenese in Endometriumkarzinom bei und dienen als wichtige Verbindung zwischen dem beobachteten erhöhten Krebsrisiko bei Patienten mit Typ-II-DM. Die Behandlung mit einem Anti-Diabetikum, welches den Insulinspiegel senken kann, könnte einen allgemeinen Ansatz bieten gegen die Entwicklung von Krebs und zur Verringerung der Metastasierung. Das Ziel dieser Studie war es, die Wirkung einer 0,1 mM Metformin-Dosis auf das proliferative und metastatische Potential von Endometriumkrebszellen bewerten zu können, sowie die Analyse der Auswirkungen von kurz- und langfristigen Behandlungen auf intrazelluläre Signalwege der Endometriumkrebszellen. Ebenso soll der Zusammenhang der Entwicklung und der Progression von Krebszellen untersucht werden, wenn sie einer Umgebung mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen und hohen Insulinspiegeln ausgesetzt werden. Darüber hinaus ist eine endometriale dreidimensionale (3D) Cokultur zu standardisieren, für eine viabele Kultur bei 20 Tagen Kultivierung. Das proliferative Potential wurde unter Verwendung des CellTitle-Glo-Tests durchgeführt, und das metastatische Potential wurde unter Verwendung von Transwell-Migration und Invasion untersucht. Die mRNA-Expression von *MKI67*, *mTOR*, *NOTCH1*, *NOTCH3* und *JAG1* Gene wurden durch

real-time PCR gemessen. Die kumulative Populationsverdopplungsrate wurde durch das Replikationsverhalten einer Endometriumkrebszelllinie durchgehend von 20 Tagen nach einer Behandlungsdauer bestimmt. In allen Assays wurden die Zellen durch Medien mit normaler (5,5 mM) oder hoher (17 mM) Glucosekonzentration, sowie in verschiedenen Gruppen behandelt: Kontrolle, Insulin, Metformin und Insulin+Metformin. Das 3D-Kokulturmodell wurde unter Verwendung von endometrialen Primärzellen und einer Endometriumkrebszelllinie hergestellt, wobei die Modellkonstruktion durch Matrigel® als extrazelluläre Matrix verwendet wurde. In dieser Studie hemmte die 0,1 mM Metformin-Dosis die Insulinwirkung stark und verringerte die Fähigkeit der endometrialen Krebszelllinie, in einer hohen und normalen Glukoseumgebung zu migrieren und einzudringen. Auf das proliferative Potential wurde dieser Effekt nicht beobachtet, allerdings reagierte die relative Zellproliferation empfindlich auf Metformin im Bereich zwischen 1 und 5 mM, unabhängig von der vorliegenden Glucosekonzentration. In den intrazellulären molekularen Mechanismen wurde beobachtet, dass die hohe Glukosekonzentration eine optimale Umgebung für endometriale Krebszellen schafft, um einen aggressiveren Genotyp und eine Resistenz gegenüber Metformin während einer Langzeitbehandlung zu zeigen. Darüber hinaus blieb das endometriale 3D-Kokulturmodell über 20 Kulturtage lebensfähig. Daher zeigte sich, trotz der Endometriumkrebszellen, eine Resistenz gegenüber dem Metformin-Effekt, wenn sie einer hohen Glukoseumgebung ausgesetzt waren. Die 0,1 mM Metformin-Dosis war in der Lage, die Insulinwirkung zu hemmen und das metastatische Potential der Zellen zu verringern, was darauf hindeutet, dass Metformin klinisch in Verbindung mit Insulin wirkt, sowie die indirekten und direkten Effekte als potentieller Wirkstoff in der Krebstherapie eingesetzt werden könnten.

Schlüsselbegriffe: Endometrisches Adenokarzinom Typ 1, Metformin, Hyperinsulinämie, Hyperglykämie.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
LISTA DE FIGURAS.....	18
LISTA DE TABELAS	20
INTRODUÇÃO	20
Endométrio.....	20
Câncer de endométrio	21
<i>Hiperinsulinemia</i>	23
<i>Hiperglicemia</i>	24
<i>Vias de sinalização intracelular</i>	26
Metformina	32
Cultura de células endometriais.....	34
ORGANIZAÇÃO DA TESE.....	37
CAPÍTULO I.....	38
<u>Objetivo geral</u>	38
<u>Objetivos específicos</u>	38
<u>Hipótese</u>	39
<u>Método</u>	40
Delineamento.....	40
Pacientes	40
Isolamento de células epiteliais primárias endometriais (EPe).....	40
Linhagem de câncer de endométrio	41
Cultivo celular	41
Ensaio de migração e invasão celular	42
Ensaio de viabilidade e proliferação celular.....	43
Análise estatística	44
Locais de realização	44
<u>Resultados</u>	45
<u>Discussão</u>	51
CAPÍTULO II.....	55
<u>Objetivo Geral</u>	55

<u>Objetivos específicos</u>	55
<u>Hipótese</u>	56
<u>Método</u>	57
Delineamento	57
Linhagem de câncer de endométrio	57
Cultivo celular	57
Extração de RNA total	59
Quantificação do RNA	60
Síntese do cDNA	60
qRT-PCR	60
Índice de duplicação populacional (IDP) e índice de duplicação populacional cumulativo (IDPC).....	61
Análise da rede de interação entre vias de sinalização celular	62
Análise estatística	63
Locais de realização	63
<u>Resultados</u>	64
<u>Discussão</u>	77
CAPÍTULO III	83
<u>Objetivo Geral</u>	83
<u>Objetivos específicos</u>	83
<u>Hipótese</u>	84
<u>Método</u>	85
Delineamento	85
Pacientes	85
Isolamento das células endometriais estromais e epiteliais	85
Linhagem de câncer de endométrio	85
Cultivo celular	86
Construção do modelo 3D de cocultura de endométrio	86
Imuno-histoquímica.....	87
Locais de realização	88
<u>Resultados</u>	89
<u>Discussão</u>	94
DISCUSSÃO CONCLUSIVA	97

PERSPECTIVAS.....	99
FONTES DE FINANCIAMENTO	100
REFERÊNCIAS.....	101
ANEXO 1	116
ANEXO 2.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS

2D - Bidimensional

3D - Tridimensional

ACS - *American Cancer Society*

AKT - *Protein Kinase B*

ANOVA - Análise de Variâncias

AMPK - proteína quinase ativada pela AMP

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico Complementar

CO₂ - Dióxido de Carbono

Ct - *Threshold cycle*

DEPC - *Diethylpyrocarbonate*

DLL4 - *Drosophila Delta Homolog 4*

DM - Diabetes Mellitus

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxinucleotídeos trifosfatados

DPs - Duplicações populacionais

DTT - Ditionitrito

EGF - Fator de crescimento epidermal

EGFR - Receptor do fator de crescimento epidermal

EMT - Transcrição epitelial mesenquimal

EPe - Células epiteliais endometriais primárias

ER - Receptor de estrogênio

F12 - *Ham's F12 Medium*

FC - *Fold change*

FSH - Hormônio folículo-estimulante

GEE - Equações de Estimação Generalizadas

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

HER-2 - Receptor 2 do fator epidermal de crescimento

IC₅₀ - *Half maximal inhibitory concentration*

IDP - Índice de duplicação populacional

IDPC - Índice de duplicação populacional cumulativo

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à Insulina 1

IGFBP-1 - Proteína ligadora do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IRS-1 - Substrato 1 do receptor de insulina

JAG1 - Jagger 1

LH - Hormônio luteinizante

MAPK - *Mitogen-activated Protein Kinase*

MEM - *Minimum Essential Medium Eagle*

mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos

mTORC1 - Complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos

NEAA - *Non-Essential Amino Acids*

PBS - Tampão fosfato-salino

PCOS - Síndrome dos Ovários Policísticos

PI3K - *Phosphoinositide 3-kinase*

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PTEN - *Phosphatase and tensin homolog*

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real

RNA - Ácido Ribonucleico

mRNA - Ácido Ribonucleico mensageiro

SHBG - Globulina carreadora de esteroides sexuais

SPSS - *Statistical Package for the Social Sciences*

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TGF α - Fator de transformação do crescimento α

TOR - Alvo da rapamicina

TSC2 - *Tuberous Sclerosis Complex 2*

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência de câncer em mulheres (A) na Alemanha em 2010, dados obtidos <i>Cancer in Germany 2009/2010</i> (FHR 2014); (B) no Brasil em 2016, estimativa a cada 100 mil mulheres, dados obtidos de Estimativa INCA 2016 (Inca, 2016).	22
Figura 2: Papel central que a resistência à insulina apresenta no desenvolvimento do câncer de endométrio. Adaptado de Mu et al., 2012 (Mu et al., 2012).	24
Figura 3: Possíveis alvos moleculares terapêuticos para o câncer de endométrio. Adaptado de Dong e colaboradores, 2013 (Dong et al., 2013).	27
Figura 4: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína Ki67 em tecido endometrial.	28
Figura 5: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína NOTCH1 em tecido endometrial.	30
Figura 6: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína NOTCH3 em tecido endometrial.	31
Figura 7: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína JAG1 em tecido endometrial.	31
Figura 8: Mecanismos de ação antineoplásicos da metformina. Adaptado de Kourelis e Siegem, 2012 (Kourelis et al., 2012).	33
Figura 9: Representação esquemática do (A) cultivo bidimensional (2D); do cultivo tridimensional (3D) (B) de células sobre uma matriz extracelular; (C) de células misturadas com a matriz extracelular; (D) de células em suspensão. Adaptado de Edmondson e colaboradores, 2014 (Edmondson et al., 2014).	35
Figura 10: Habilidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio expostas a um ambiente com altos níveis de glicose.	46
Figura 11: Habilidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio expostas a um ambiente com níveis normais de glicose.	47
Figura 12: Habilidade de migração e invasão das células epiteliais primárias endometriais expostas a um ambiente com altos níveis de glicose.	48
Figura 13: Proliferação relativa celular de células de câncer de endométrio.	49
Figura 14: Sensibilidade das células de câncer de endométrio ao tratamento dose-dependente de metformina.	50
Figura 15: Plano de trabalho do capítulo II.	58
Figura 16: Algoritmo do protocolo de execução do ensaio para determinar o índice de duplicação populacional cumulativa.	62
Figura 17: Expressão relativa do mRNA de <i>MKi67</i> nos diferentes grupos e tempos de tratamento.	65
Figura 18: Índice de duplicação populacional (IDP) representando o número total de vezes em que a população celular duplicou em um espaço determinado de tempo. Contagem realizada a cada 72 horas de tratamento ao longo do período de 20 dias de cultivo. Dados descritivos representados em média \pm erro padrão. N=3. Ins+Met= insulina + metformina.	67

Figura 19: Densidade relativa celular nos diferentes grupos em cada intervalo de tratamento. Dados descritivos representados em média \pm erro padrão. N=3. Ins+Met= insulina + metformina.	67
Figura 20: Índice de duplicação populacional cumulativo (IDPC) representando a soma do número total de vezes em que a população celular duplicou em um espaço determinado de tempo. Contagem realizada a cada 72 horas de tratamento ao longo do período de 20 dias de cultivo. Dados descritivos representados em média \pm erro padrão. N=3. Ins+Met= insulina + metformina.	68
Figura 21: Expressão relativa do mRNA de <i>mTOR</i> nos diferentes grupos e tempos de tratamento.	70
Figura 22: Rede de interação entre as vias de sinalização de Notch e PI3K/AKT/mTOR construída a partir da plataforma online String, (A) utilizando até 10 interações. (B) utilizando interação direta entre NOTCH1, NOTCH3, JAG1 e mTOR.	71
Figura 23: Expressão relativa do mRNA de <i>NOTCH1</i> nos diferentes grupos e tempos de tratamento.	73
Figura 24: Expressão relativa do mRNA de <i>NOTCH3</i> nos diferentes grupos e tempos de tratamento.	75
Figura 25: Expressão relativa do mRNA de <i>JAG1</i> nos diferentes grupos e tempos de tratamento.	76
Figura 26: Representação esquemática da construção do modelo tridimensional de cocultura de endométrio.	87
Figura 27: Morfologia característica das células (A) epiteliais (B) estromais endometriais primárias.	89
Figura 28: Organização morfológica do modelo de co-cultura tridimensional utilizando célula endometriais primárias ao longo de 20 dias de cultivo. (A) Dia 1 de cultivo. (B) Dia 5 de cultivo. (C) Dia 15 de cultivo. (D) Dia 20 de cultivo. Imagem registrada por microscópio invertido.	90
Figura 29: Imunofluorescência do modelo tridimensional de cocultura utilizando célula endometriais primárias no dia 20 de cultivo. Para a marcação das células epiteliais foi utilizado o anticorpo primário anti-citoqueratina e o anticorpo secundário específico marcado com o fluoróforo Cy3 (verde). Para a marcação das células estromais foi utilizado o anticorpo primário anti-vimentina e o anticorpo secundário marcado com o fluoróforo rodamina (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoechst (azul).	92
Figura 30: Organização morfológica do modelo tridimensional de cocultura de câncer de endométrio ao longo de 20 dias de cultivo. (A) Dia 1 de cultivo. (B) Dia 5 de cultivo. (C) Dia 15 de cultivo. (D) Dia 20 de cultivo. Imagem registrada por microscópio invertido.	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de Estradiol (E_2), Insulina e Metformina nos diferentes grupos.	42
Tabela 2: Concentração de Estradiol (E_2), Insulina e Metformina nos diferentes grupos.	59
Tabela 3: <i>Primers</i> para análise da expressão do mRNA dos genes alvos.	61

INTRODUÇÃO

Endométrio

O endométrio é a camada mucosa interna que reveste a cavidade uterina. As oscilações hormonais mensais femininas fazem o endométrio passar por estágios diferentes, remodelando-se por mais de 400 ciclos de regeneração, proliferação, diferenciação, secreção e descamação durante o menacme (Dallenbach *et al.*, 1987; Gargett *et al.*, 2012).

O endométrio é um órgão especializado regulado por hormônios esteroides e peptídicos, que sofre complexas alterações a cada ciclo menstrual, diferencia-se e em um curto período torna-se receptivo ao embrião. Este período de receptividade endometrial é conhecido como janela de implantação. A atividade ovariana é controlada principalmente pelos hormônios gonadotróficos; 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 estrogênio e progesterona. Inicialmente, o estradiol induz a proliferação do tecido endometrial seguido pela progesterona que induz a diferenciação e o estabelecimento, entre o 19º ao 24º dia do ciclo menstrual, de mudanças estruturais e funcionais que permitem a implantação do blastocisto (Wilcox *et al.*, 1999; Revel, 2012; Radwan *et al.*, 2014).

O endométrio pode ser dividido em duas camadas: a funcional e a basal (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, devido a variação dos esteroides circulantes durante o ciclo. A camada basal é permanente e fornece células que atuam na regeneração da camada funcional depois de cada ciclo menstrual, sendo inativada após a menopausa. 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 pode ocorrer também

em mulheres após o parto e na pós-menopausa em tratamentos de reposição hormonal (Harper, 1992; Araujo Jr *et al.*, 2007; Altmae *et al.*, 2014).

O estrogênio exerce controle sobre a função proliferativa das células epiteliais e estromais do endométrio através da regulação de fatores de crescimento como o Fator de Transformação do Crescimento α (TGF α), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Fator de Crescimento semelhante à Insulina-1 (*Insulin like growth factor-1*, IGF-1) (Lessey, 2011). Devido aos baixos níveis de estrogênio, na menopausa há inatividade das glândulas e pouco estroma, levando à atrofia do endométrio. No entanto, mesmo na ausência de estrogênio, ainda há expressão do seu receptor (ER), o qual é responsável pela ação genômica do hormônio (Revel, 2012).

O endométrio apresenta comportamentos únicos em resposta a ambientes endócrinos distintos, podendo originar doenças ginecológicas como endometriose e adenomiose, ou sofrer alterações que resultam em pólipos, proliferação típica, atípica e neoplasias.

Câncer de endométrio

O carcinoma endometrial origina-se nas células epiteliais do endométrio. Dependendo da região geográfica, pode ser considerado o câncer ginecológico com maior incidência em mulheres. Nos países ocidentais, com o aumento da expectativa de vida e mudanças na dieta, observa-se um aumento da incidência dessa neoplasia (Jama, 2013). De acordo com a *American Cancer Society* (ACS), no ano de 2016, 60.050 novos casos foram diagnosticados nos EUA, com aproximadamente 10.470 mortes relacionadas ao câncer de endométrio (Siegel *et al.*, 2016). De 2006 a 2010, as taxas de mortalidade aumentaram 1,5 % para mulheres com menos de 50 anos e 2,6 % entre mulheres com 50 anos ou mais (Acs, 2014). Em países europeus como a Alemanha, aproximadamente 11.550 novos casos são diagnosticados por ano, sendo considerado o câncer ginecológico com maior frequência e a quarta forma mais comum de câncer em mulheres (incidência de 4,8 % em relação a todos os tipos de neoplasias femininas) (Rki, 2015) (Figura 1A). Entretanto, no Brasil, o câncer de endométrio é a segunda forma mais comum de câncer ginecológico (6,74 % dos casos a cada 100 mil mulheres), sendo o câncer

de colo do útero a forma mais frequente. Em 2014, foi estimado o aparecimento de 5.900 novos casos, e a mortalidade no país atingiu cerca de 1,33 % no período entre 2008 e 2012 (Inca, 2014). Segundo os dados de estimativa 2016 do INCA, esperam-se para este ano 6.950 novos casos (Inca, 2016) (Figura 1B).

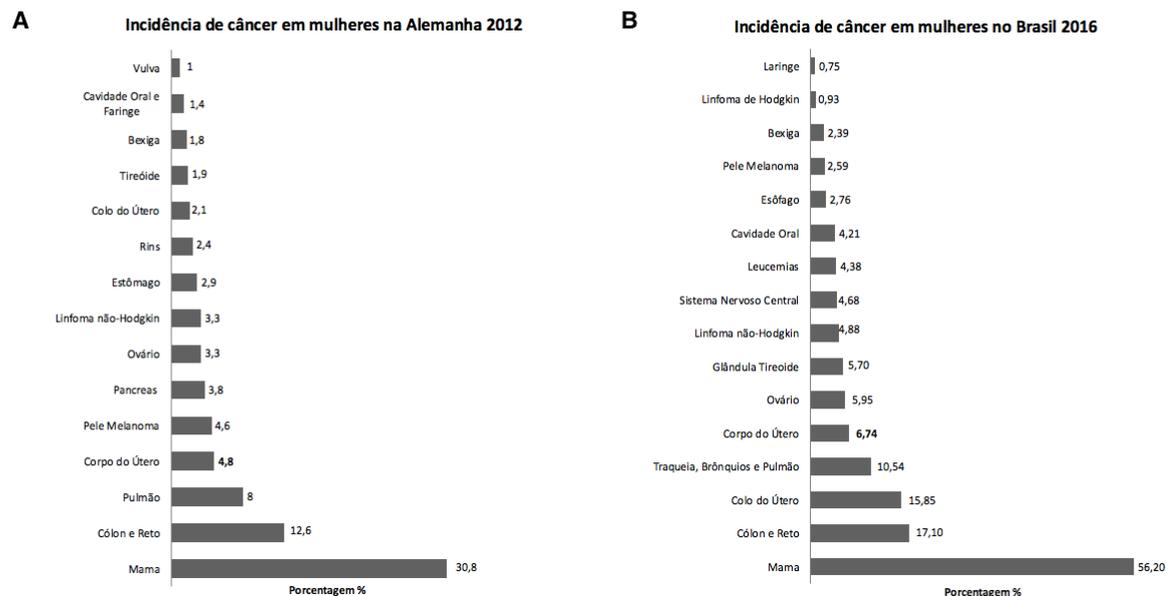


Figura 1: Incidência de câncer em mulheres (A) na Alemanha em 2010, dados obtidos *Cancer in Germany 2011/2012* (Rki, 2015); (B) no Brasil em 2016, estimativa a cada 100 mil mulheres, dados obtidos de Estimativa INCA 2016 (Inca, 2016).

O câncer de endométrio pode ser dividido em tipo I e tipo II. O tipo I, adenocarcinoma endometriode apresenta maior incidência representando 75 - 80 % dos casos, é dependente de estrogênio, e apresenta maior prevalência em mulheres obesas (70 % das mulheres com câncer de endométrio). Mulheres com predisposição genética a 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 (Garg, K. *et al.*, 2014).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado contribuem para uma sobrevivência em torno de 5 anos em aproximadamente 81 % das pacientes (Nicholas, 2014). O tratamento, no entanto, praticamente não sofreu alterações nos últimos 40 anos, restringindo-se, principalmente, à cirurgia, podendo não ser efetivo em casos avançados da doença (Von Gruenigen *et al.*, 2005; Kitchener, 2006; Fader *et al.*,

2009; Arsene *et al.*, 2015). Pacientes que apresentam metástases são tratadas também com quimioterapia combinada e terapia endócrina sistêmica. Estas estratégias apresentam resposta de curta duração e estão associadas a uma sobrevida de 8 a 16 meses (Dedes *et al.*, 2011).

Altos níveis de estrogênio, doenças relacionadas à resistência à insulina, como obesidade, Diabetes Mellitus (DM) tipo II e síndrome dos ovários policísticos (PCOS) são fatores de riscos associados ao desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio, pois estimulam a proliferação celular e inibem a apoptose (Group *et al.*, 2014; Szablewski, 2014; Nead *et al.*, 2015).

Hiperinsulinemia

A resistência periférica à insulina resulta em hiperinsulinemia associada com seus complexos efeitos sobre regulação do metabolismo lipídico e proteico, síntese e modulação da produção de androgênios. As causas são os complexos mecanismos genéticos e ambientais (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2014) e ocorre em cerca de 50 a 80 % das mulheres com PCOS (Traub, 2011; Gacaferri Lumezi *et al.*, 2014).

O aumento da concentração sérica de insulina relaciona-se também a maior síntese hepática do IGF-1, redução da produção hepática de globulina carreadora de esteroides sexuais (SHBG) e da proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGFBP-1), além de alterações clínicas como perfil lipídico aterogênico, hipertensão, DM tipo II, que determinam aumento dos riscos de doenças cardiovasculares (Dunaif *et al.*, 1987; Goudas *et al.*, 1997; Harborne *et al.*, 2003; Azziz *et al.*, 2006; Legro *et al.*, 2010; Agapova *et al.*, 2014).

A obesidade, entre as condições clínicas frequentes, parece ser o fator mais importante para a hiperinsulinemia, estando diretamente relacionada à PCOS e à DM tipo II. A incidência de obesidade em mulheres com PCOS varia de 30 a 75 %, e em DM tipo II de 53 % - 86 %, conforme a população estudada (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2012; Al-Sharafi *et al.*, 2014).

Associação entre a resistência à insulina e o câncer de endométrio já foi relatada (Mulholland *et al.*, 2008; Papaioannou *et al.*, 2010; Wang, C. F. *et al.*, 2013). Os mecanismos para esta associação não estão bem esclarecidos, mas é possível 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 hormônios atuam aumentando os esteroides livres, causando anovulação e ausência do antagonista natural do estrogênio, a progesterona. O estrogênio sem oposição promove a proliferação celular no epitélio endometrial e inibe a apoptose (Arcidiacono *et al.*, 2012). De forma direta, a hiperinsulinemia promove a proliferação e a sobrevivência celular através das vias da PI3K/Akt e Ras/MAPK (Mu *et al.*, 2012) (Figura 2).

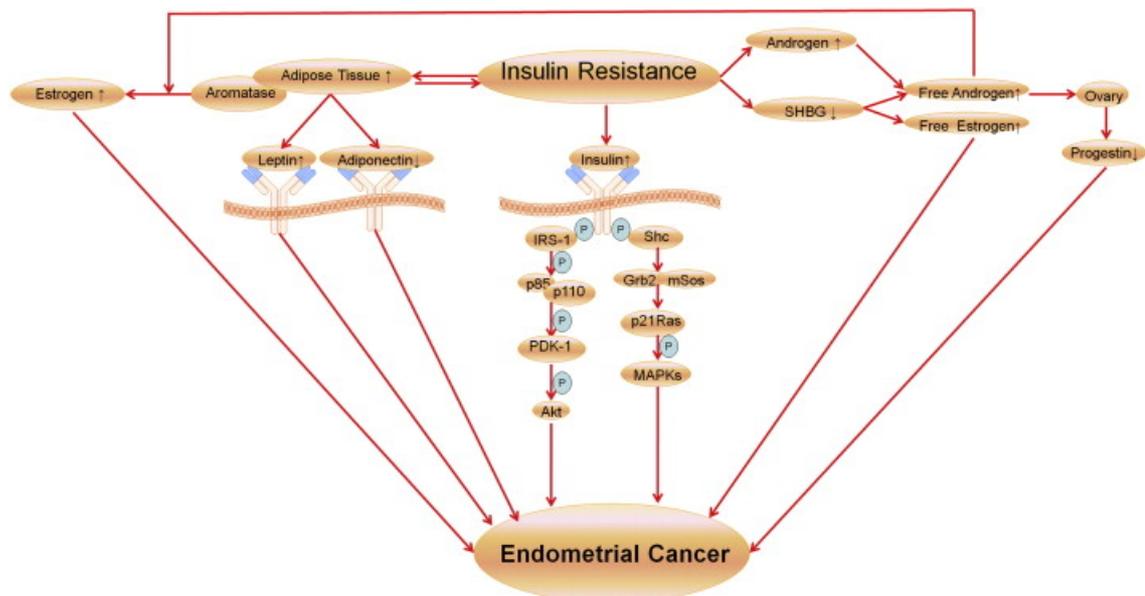


Figura 2: Papel central que a resistência à insulina apresenta no desenvolvimento do câncer de endométrio. Adaptado de Mu *et al.*, 2012 (Mu *et al.*, 2012).

Hiperglicemia

A glicose é um nutriente essencial para manter a homeostase celular. As células de câncer parecem ser mais sensíveis a diferentes concentrações de glicose do que as células normais, devido a sua taxa de consumo de energia mais elevada (Choi *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2015). Uma das mais importantes características do câncer é a capacidade de reprogramação celular da maquinaria energética por oncogenes e genes supressores de tumor para inibir a fosforilação oxidativa e

utilizar a glicólise aeróbica para induzir a degradação da glicose em lactato (Piatkiewicz *et al.*, 2011). A maioria das células neoplásicas utilizam glicólise aeróbica como um meio de produção de energia, independentemente se estão sob condição aeróbica normal ou hipóxica. Alto consumo de glicose e aumento da glicólise são essenciais para gerar precursores tanto catabólicos como anabólicos para a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídios para o crescimento de células de câncer (Piatkiewicz *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2015). A hiperglicemia, normalmente associada com a obesidade, resistência à insulina e hiperinsulinemia, também é considerada um fator independente para o desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio (Becker *et al.*, 2009; Lambe *et al.*, 2011). Transportadores de glicose, enzimas glicolíticas e lipogênicas estão aumentados em endométrio neoplásico quando comparado com endométrio normal (Krzeslak *et al.*, 2012; Byrne *et al.*, 2014).

A hiperglicemia, sinal clínico mais proeminente da DM, apresenta-se, muitas vezes, anos antes da DM clínica ser diagnosticada, sob as formas de glicose em jejum e ou tolerância à glicose diminuída. Estas condições podem durar muitos anos e são normalmente caracterizadas como "pré-diabetes" (Sciacca *et al.*, 2013). Diabetes Mellitus e câncer são condições comuns, sendo o diagnóstico concomitante frequente, sugerindo que essas duas doenças compartilham os mesmos fatores de risco e mecanismos patofisiológicos. Já em 1932, foi descrita uma aparente associação entre a DM tipo II e o aumento do risco de câncer (Wilson *et al.*, 1932), mas foi só na última década que o acúmulo de evidências epidemiológicas significativas sugeriram uma associação causal entre a DM e o câncer (Simon *et al.*, 2010). Alguns tipos de câncer, como por exemplo, fígado, pâncreas, coloretal, mama, renal e endometrial, apresentam maior taxa de prevalência e mortalidade em pacientes diabéticos comparados a pacientes não diabéticos (Szablewski, 2014). A incidência do câncer também aumenta entre os indivíduos com pré-diabetes, e a associação entre hiperglicemia, incidência e mortalidade de vários tipos de câncer aumenta linearmente com o aumento da glicemia (Stattin *et al.*, 2007; Zhou, X. H. *et al.*, 2010; Sieri *et al.*, 2013).

Vias de sinalização intracelular

O conhecimento dos mecanismos intracelulares envolvidos no crescimento e disseminação do câncer de endométrio é necessário para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atuem inibindo alvos moleculares chaves presentes nessas vias de sinalização de desenvolvimento e progressão do câncer.

O câncer de endométrio tipo I frequentemente apresenta alterações na via de sinalização de [PTEN]/Akt/mTOR (Oda *et al.*, 2005; Sarmadi *et al.*, 2009; Slomovitz *et al.*, 2012; Pavlidou *et al.*, 2014), enquanto o câncer de endométrio tipo II apresenta mutações na proteína p53 (Matias-Guiu *et al.*, 2013) e superexpressão do receptor 2 do fator de crescimento epidermal (HER-2) (Acharya *et al.*, 2005). A regulação aumentada do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Niikura *et al.*, 1995; Nishimura *et al.*, 2015), do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Holland *et al.*, 2003), a ativação de células-tronco e de mecanismos envolvidos durante a transição epitelial mesenquimal (EMT) (Hubbard *et al.*, 2009; Kyo *et al.*, 2015; Makker *et al.*, 2016) são processos relacionados com o desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio tipo I e II. Contudo, conforme ilustrado na figura 3, a utilização desses mecanismos como biomarcadores do câncer de endométrio pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de alvos terapêuticos que atuem inibindo a expressão dos mesmos (Dong *et al.*, 2013).

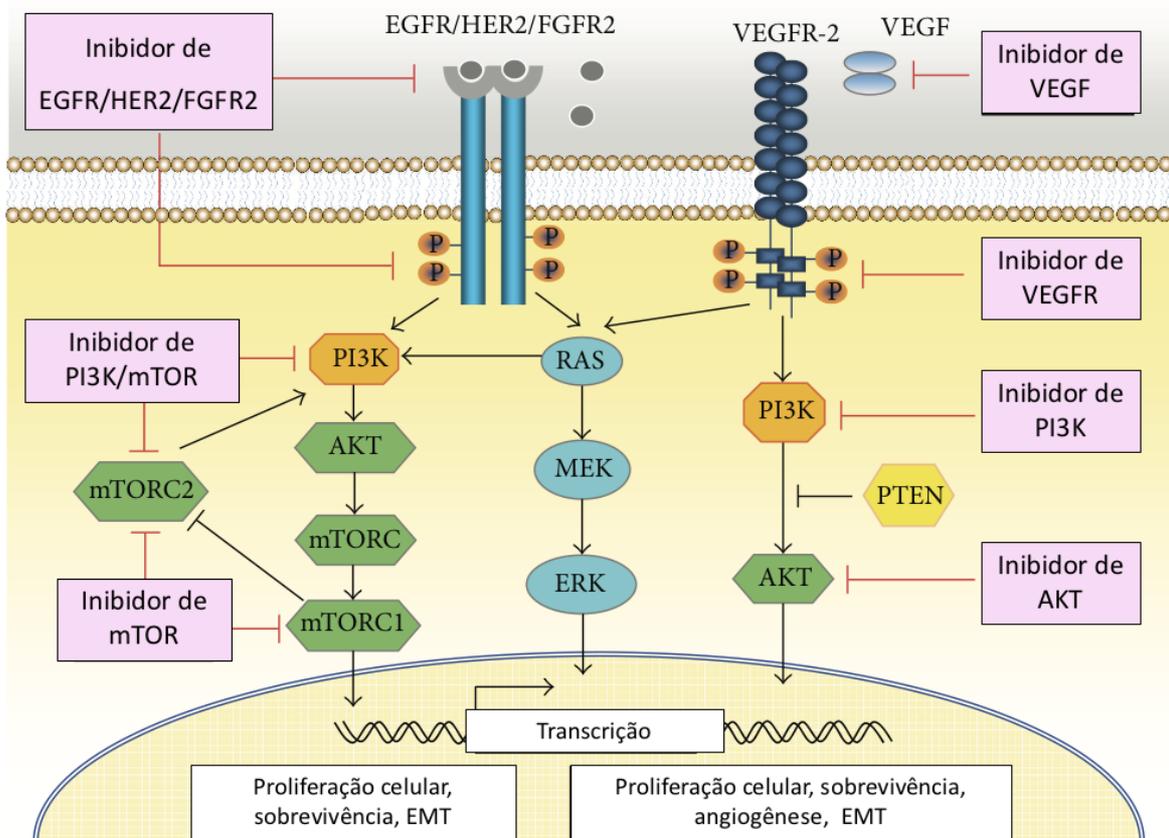


Figura 3: Possíveis alvos moleculares terapêuticos para o câncer de endométrio. Adaptado de Dong e colaboradores, 2013 (Dong *et al.*, 2013).

- Ki67

O antígeno Ki67 que codifica duas isoformas proteicas com pesos moleculares de 345 e 395 kDa foi originalmente identificado por Gerdes e colaboradores, no início dos anos 80 (Gerdes *et al.*, 1983). A proteína Ki67 possui uma meia vida de apenas 1 – 1,5 horas e está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose). Durante as fases tardias da mitose, anáfase e telófase, ocorre uma diminuição acentuada dos níveis de expressão de Ki67 e não se encontra presente durante a fase G0. A expressão da proteína Ki67 está fortemente associada com a atividade proliferativa das populações celulares em tumores, permitindo que seja utilizado como um marcador de agressividade tumoral em diversos tipos de câncer (Brown *et al.*, 2002; Josefsson *et al.*, 2012; Inwald *et al.*, 2013; Li, L. T. *et al.*, 2015). Contudo, apesar de ser utilizado em diversos estudos com câncer de endométrio, o Ki67 ainda não é considerado um fator prognóstico para este tecido (Mitsunashi *et al.*, 2014; Sivalingam *et al.*, 2016). Na figura 4 é

possível observar a marcação imuno-histoquímica da proteína Ki67 em um tecido endometrial normal (Figura 4A) e tumoral (Figura 4B). Estas imagens foram retiradas da plataforma *online The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>).

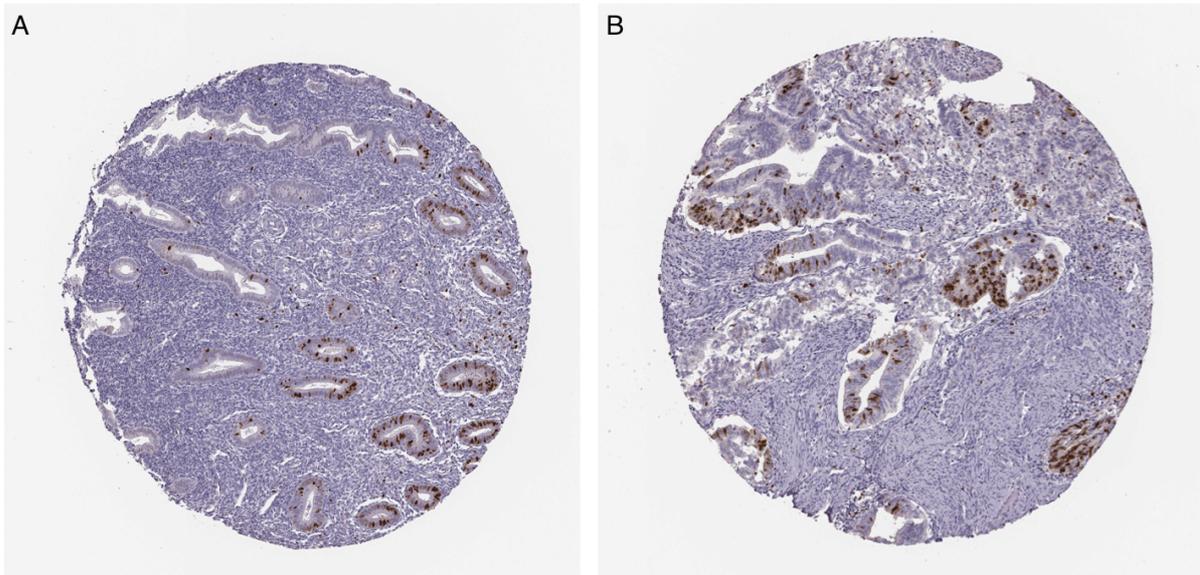


Figura 4: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína Ki67 em tecido endometrial. (A) Tecido normal de paciente com 25 anos (ID: 4876); coloração média positiva nas células glandulares; intensidade alta e quantificação <25 %; localização nuclear. (B) Tecido com adenocarcinoma endometrial de paciente com 65 anos (ID: 4205); coloração forte positiva nas células tumorais; intensidade alta e quantificação entre 25 – 75 %; localização nuclear. Imagens retiradas da plataforma *online The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>).

- **mTOR**

O alvo da rapamicina (TOR) foi inicialmente descoberto em levedura de *Saccharomyces cerevisiae* (Heitman *et al.*, 1991). O homólogo estruturalmente e funcionalmente conservado foi posteriormente descoberto em mamíferos, denominado o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). É uma proteína serina treonina cinase de peso molecular de 289 kDa membro da família PI3K (Brown *et al.*, 1994; Sabatini *et al.*, 1994). O mTOR é um efetor *downstream* da via de sinalização da PI3K/Akt e possui dois complexos multiproteicos distintos, o complexo 1 denominado mTORC1, e o complexo 2 denominado mTORC2. O mTORC1 é sensível à rapamicina, ativa as proteínas subsequentes da via, S6K1 e 4EBP1, que estão envolvidas na tradução do mRNA. É ativado por estímulos diversos, tais como fatores de crescimento, nutrientes, estresse, e por componentes essenciais da via

de sinalização, PI3K, MAPK e AMPK, e atua sobre o crescimento, sobrevivência e proliferação celular. Já o mTORC2 é considerado resistente à rapamicina. O complexo 2 ativa a PKC- α e Akt e atua regulando o citoesqueleto de actina. A desregulação de vários elementos da via mTOR, tais como amplificação ou mutação da PI3K, perda de função do PTEN, superexpressão da Akt, S6K1, 4EBP1 e eIF4E têm sido descrito em diversos tipos de câncer (Zhou, H. *et al.*, 2010; Populo *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016) e está fortemente relacionado ao câncer de endométrio sendo considerado um alvo terapêutico (Chen *et al.*, 2014; Oda *et al.*, 2015).

- Via de sinalização do Notch

O Notch foi descoberto em torno de 100 anos atrás por Mohr, durante a observação do fenótipo denteado nas asas de *Drosophila melanogaster* (Mohr, 1919). Apesar do papel importante da via de sinalização do Notch no desenvolvimento embrionário, somente nos anos 80 que seu sequenciamento foi realizado, determinando sua homologia com o EGF (Wharton *et al.*, 1985; Kidd *et al.*, 1986). Os elementos centrais da via de sinalização Notch em mamíferos consiste em quatro receptores transmembrana (NOTCH1-4) e 5 ligantes transmembrana: proteínas DLL1, 3, 4 e proteínas Jagged (JAG1, 2). O receptor e o ligante estão normalmente situados em células vizinhas, portanto, o contato célula-célula é necessário para desencadear o evento de sinalização. A ligação do ligante ao seu receptor inicia a clivagem proteolítica do receptor por TACE metaloproteinase e g-secretase, provocando a liberação do domínio intracelular. Quando o domínio intracelular transloca para o núcleo, ocorre a ativação transcricional de genes alvos de Notch (Ranganathan *et al.*, 2011; Capaccione *et al.*, 2013).

A via de sinalização do Notch pode atuar como um oncogene ou como supressor de tumor, promovendo ou inibindo o crescimento e progressão da célula tumoral. O resultado da atividade da sinalização do Notch depende da intensidade do sinal, tempo, tipo de tecido e célula (Andersson *et al.*, 2011; Sasnauskiene *et al.*, 2014). A superexpressão de genes Notch tem sido encontrada em muitos tumores, incluindo câncer de mama (Brzozowa-Zasada *et al.*, 2016), colorretal (Vinson *et al.*, 2016) e melanoma (Bedogni, 2014). A sua sinalização e expressão tem sido extensivamente estudada em câncer ginecológico (Jayshree *et al.*, 2009; Rose *et al.*,

2010; Sasnauskiene *et al.*, 2014) , estando mais relacionado a agressividade e progressão em câncer de endométrio (Mitsubishi *et al.*, 2012; Liao *et al.*, 2014; Makker *et al.*, 2016). Nas figuras 5, 6 e 7 é possível observar a marcação imuno-histoquímica das proteínas NOTCH1, NOTCH3 e JAG1 (as quais foram analisadas nesta tese) em um tecido endometrial normal e com câncer. Estas imagens foram retiradas da plataforma *online The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>).

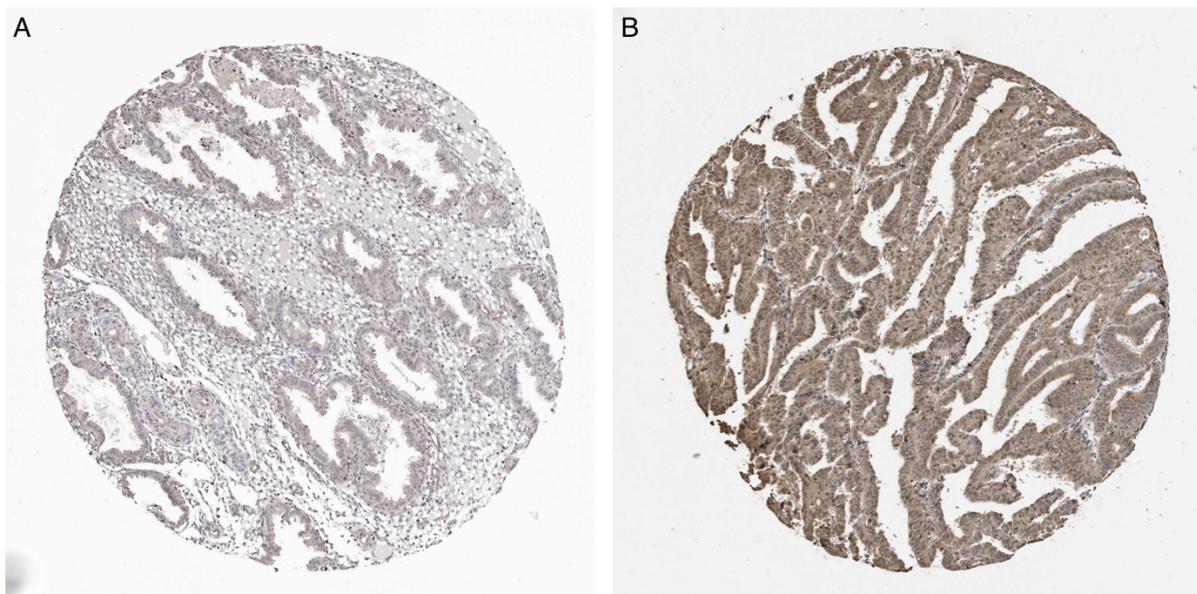


Figura 5: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína NOTCH1 em tecido endometrial. (A) Tecido normal de paciente com 33 anos (ID: 2941); coloração baixa, intensidade fraca, quantificação >75 % e localização citoplasmática nas células estromais; coloração média, intensidade moderada, quantificação entre 25 – 75 % e localização citoplasmática e nuclear nas células glandulares. (B) Tecido com adenocarcinoma endometrial de paciente com 77 anos (ID: 1851); coloração média positiva nas células tumorais; intensidade moderada e quantificação >75 %; localização citoplasmática e nuclear. Imagens retiradas da plataforma *online The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>).

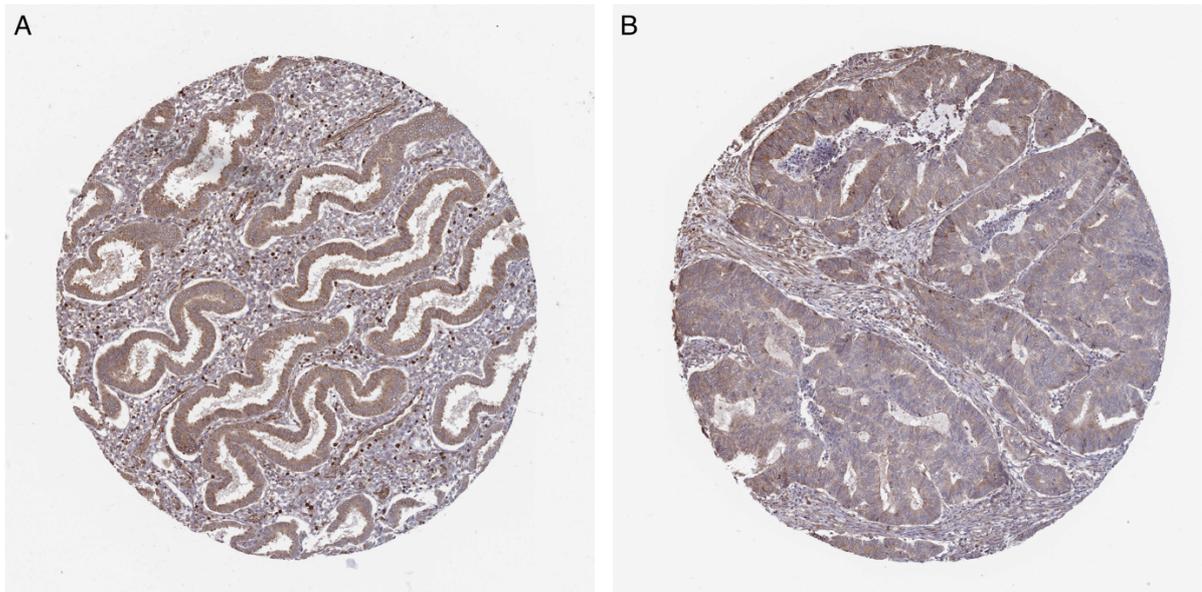


Figura 6: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína NOTCH3 em tecido endometrial. (A) Tecido normal de paciente com 24 anos (ID: 3364); coloração média, intensidade moderada, quantificação entre 25 - 75 % e localização citoplasmática nas células estromais; coloração média, intensidade moderada, quantificação >75 % e localização citoplasmática nas células glandulares. (B) Tecido com adenocarcinoma endometrial de paciente com 70 anos (ID: 2118); coloração média positiva nas células tumorais; intensidade moderada e quantificação >75 %; localização citoplasmática. Imagens retiradas da plataforma online *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>).

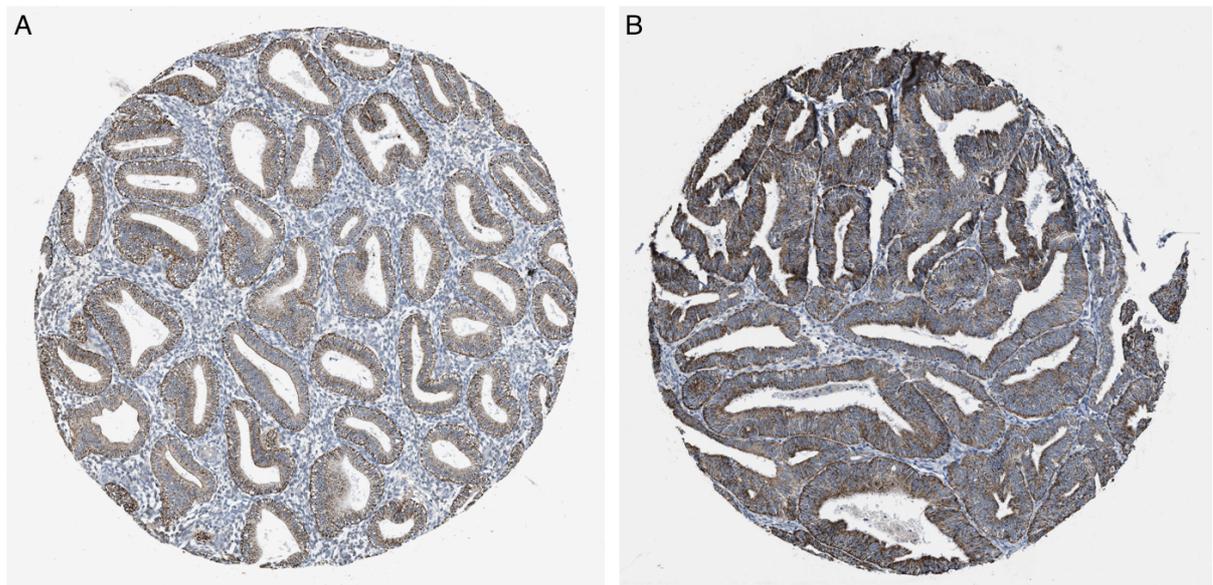


Figura 7: Imagens de imuno-histoquímica com marcação positiva para a proteína JAG1 em tecido endometrial. (A) Tecido normal de paciente com 39 anos (ID: 3313); coloração alta, intensidade forte, quantificação >75 % e localização citoplasmática nas células glandulares. (B) Tecido com adenocarcinoma endometrial de paciente com 58 anos (ID: 2621); coloração alta positiva nas células tumorais; intensidade forte e quantificação >75 %; localização citoplasmática. Imagens retiradas da plataforma online *The Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>).

Metformina

A metformina (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride), juntamente com a fenformina e a buformina, pertence à classe das biguanidas, cujo o composto ativo é originário da erva medicinal *Galega officinallis*, também conhecida como arruda-caprária (Bailey *et al.*, 2004). Esta planta foi utilizada pela primeira vez para o alívio de poliúria, um sintoma de DM, no antigo Egito e na Europa medieval. Os compostos foram desenvolvidos como drogas terapêuticas para o tratamento da DM em países europeus na década de 1950. No entanto, por causa da toxicidade de acidose láctica causada por fenformina e buformina, somente a metformina foi aprovada para o tratamento de DM na Europa em 1958 e, apenas em 1995, nos Estados Unidos. Atualmente, é o medicamento mais prescrito para pacientes com DM tipo II por ser um medicamento barato, seguro e eficiente na restauração dos níveis de glicose e insulina (He *et al.*, 2015).

A metformina é um medicamento anti-hiperglicêmico e insulino-sensibilizante que possui ações pleiotrópicas em vários tecidos afetados pela resistência à insulina e hiperinsulinemia, tais como o fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, endotélio e ovários (Palomba *et al.*, 2009; Johnson, 2014).

Acredita-se que a metformina age a partir de dois mecanismos. Primeiro, agindo na redução da gliconeogênese inibindo o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, conduzindo ao bloqueio da fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, diminuindo os níveis de ATP e aumentando os níveis de proteína quinase ativada pela AMP (AMPK) (Tree *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2007). Em segundo lugar, proposto recentemente, reduzindo a gliconeogênese hepática independente de AMPK (Foretz *et al.*, 2010) via inibição do glicerofosfato desidrogenase mitocondrial, resultando na alteração de estado de óxido-redução celular e diminuição da conversão de lactato e glicerol em glicose (Coughlan *et al.*, 2014).

Em pacientes com DM tipo II que usavam metformina foi demonstrada uma diminuição significativa na incidência de câncer em relação aos pacientes que usavam outros medicamentos anti-hiperglicemia (Evans *et al.*, 2005). Desde então, o número de estudos epidemiológicos e experimentais avaliando o possível efeito da metformina na prevenção e tratamento de câncer primário e metastático aumentaram rapidamente (Evans *et al.*, 2005). Estudos pré-clínicos e *in vitro*

demonstraram que a metformina pode inibir a proliferação celular, reduzir a agressividade celular e interferir no ciclo celular, em linhagem de células de diversos tumores (Li *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2012; Wurth *et al.*, 2013), incluindo linhagem celular de câncer de endométrio (Takemura *et al.*, 2007; Cantrell *et al.*, 2010; Shao *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014). Recentemente, foi sugerido o uso de metformina como um agente preventivo de carcinoma endometrial (Campagnoli *et al.*, 2013). A metformina, juntamente com mudança no estilo de vida, diminui os fatores de risco relacionados ao câncer de endométrio, inibindo a proliferação celular endometrial por meio de ações diretas e indiretas (Campagnoli *et al.*, 2013).

Os possíveis mecanismos antineoplásicos da metformina estão esquematizados na figura 8. Estes incluem: (i) ativação da cascata de sinalização da quinase hepática B1/AMPK, no qual a metformina ativa a cascata da AMPK que suprime o alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) via fosforilação, estabilizando *TSC2* (gene supressor tumoral); (ii) indução da parada do ciclo celular e/ou apoptose; (iii) inibição da síntese de proteína; (iv) redução dos níveis circulantes de insulina; (v) inibição da resposta de dobramento de proteína; (vi) ativação do sistema imunológico; (vii) erradicação de células tronco tumorais (Kourelis *et al.*, 2012; Garg, S. K. *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015).

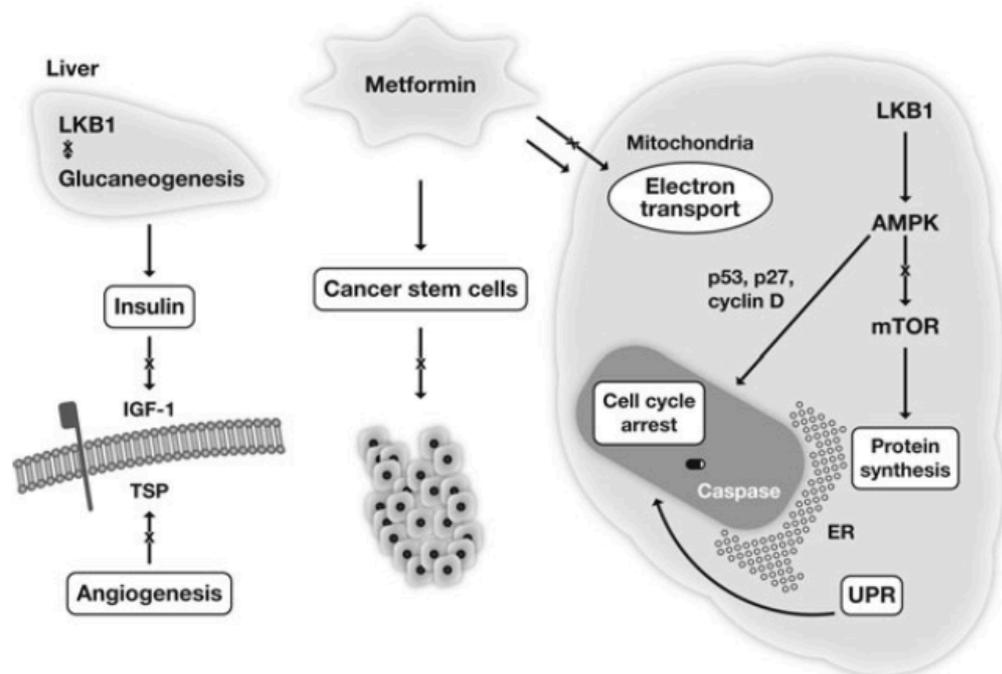


Figura 8: Mecanismos de ação antineoplásicos da metformina. Adaptado de Kourelis e Siegem, 2012 (Kourelis *et al.*, 2012).

Embora tenha sido utilizada clinicamente por mais de 40 anos, o mecanismo de ação da metformina não está totalmente elucidado. Diversos estudos epidemiológicos e experimentais estão sendo conduzidos no sentido de esclarecer os efeitos e vias de ação da metformina em diversos tipos de câncer, porém seus resultados continuam controversos (Wurth *et al.*, 2013; He *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2015; Sivalingam *et al.*, 2016). A metformina é uma terapia conhecida para mulheres com hiperinsulinemia, no entanto, a função que exerce no tecido endometrial não está bem esclarecida, bem como os efeitos do tratamento a longo prazo.

Cultura de células endometriais

Cultura celular é um conjunto de técnicas que permitem cultivar ou manter células isoladas fora do organismo original conservando suas características próprias. O processo de cultura de células foi desenvolvido por Harrison em 1907, com o objetivo de investigar a origem das fibras nervosas (Harrison *et al.*, 1907). O método descrito propôs cultivar o tecido neural pré-diferenciado de rã em uma gota de linfa e manter em uma câmara úmida. O protocolo utilizado permitiu o crescimento e diferenciação do tecido, demonstrando que as células de interesse poderiam ser mantidas fora do corpo e cultivadas *in vitro* (Harrison, 1990). Ao longo dos anos, diversas melhorias foram realizadas na técnica de cultura celular, e ensaios *in vitro* utilizando o cultivo celular têm sido uma importante ferramenta para o entendimento de mecanismos básicos fisiológicos ou patológicos intracelulares, e para o desenvolvimento e avaliação de medicamentos (Harnden, 1977; Breslin *et al.*, 2013; Edmondson *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

Os diferentes tipos de cultivo celular, o cultivo bidimensional (2D) e o cultivo tridimensional (3D), estão representados na figura 9. Conforme proposto por Harrison, no cultivo 2D as células são tipicamente cultivadas em monocamada sobre uma superfície plana (Figura 9A), enquanto no cultivo 3D, as células são cultivadas utilizando uma matriz extracelular temporária ou *scaffolds* (Figura 9B e C), assim como, livre de matriz ou *scaffold*, utilizando o método de flutuação forçada, o método de gota em suspensão, entre outros (Figura 9D) (Edmondson *et al.*, 2014). Embora o cultivo 2D seja consagrado um método valioso para estudos *in vitro* e continue sendo amplamente utilizado, as suas limitações têm sido cada vez mais

reconhecidas. Entretanto, o modelo de cultura 3D permite mimetizar *in vitro* a organização de um tecido *in vivo*, preservando a morfologia celular tridimensional, a interação célula-célula e célula-matriz extracelular (Haycock, 2011; Rimann *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Imamura *et al.*, 2015).

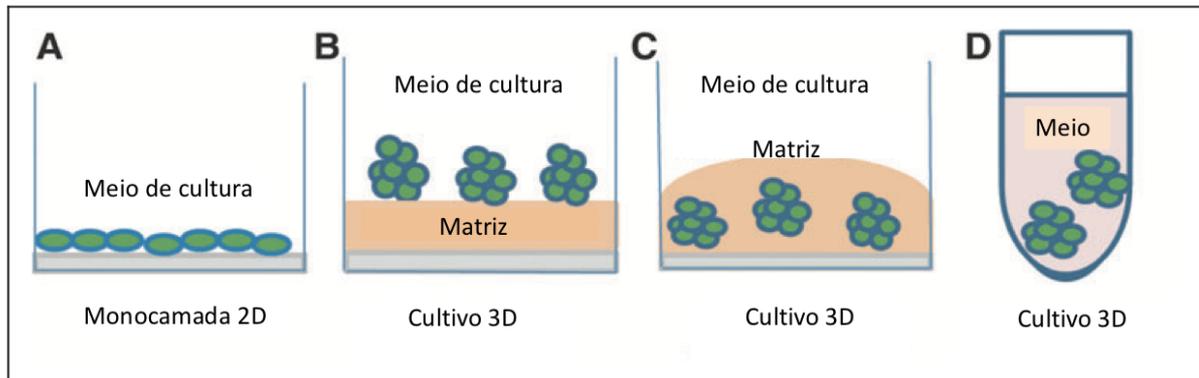


Figura 9: Representação esquemática do (A) cultivo bidimensional (2D); do cultivo tridimensional (3D) (B) de células sobre uma matriz extracelular; (C) de células misturadas com a matriz extracelular; (D) de células em suspensão. Adaptado de Edmondson e colaboradores, 2014 (Edmondson *et al.*, 2014).

A pesquisa utilizando o tecido endometrial acompanhou a evolução das técnicas de cultivo celular. Em 1979, Satyaswaroop e colaboradores descreveram o método de isolamento das células estromais e epiteliais a partir do tecido endometrial (Satyaswaroop *et al.*, 1979). Desde então, diversos estudos foram realizados utilizando cultivo 2D de células endometriais para a compreensão de processos relacionados à implantação, endometriose, PCOS e carcinoma endometrial (Hasty *et al.*, 1994; Cantrell *et al.*, 2010; Germeyer *et al.*, 2011; Gargett *et al.*, 2012; Li, X. *et al.*, 2015). No início dos anos 90, diversos pesquisadores começaram a desenvolver modelos 3D utilizando células epiteliais endometriais, demonstrando a habilidade de diferenciação dessas células em estruturas glandulares (Schatz *et al.*, 1990; Uchima *et al.*, 1991; Bentin-Ley *et al.*, 1994). Em 1994, Bentin-Ley e colaboradores, descreveram pela primeira vez um modelo 3D de cocultura utilizando células estromais e epiteliais de endométrio (Bentin-Ley *et al.*, 1994). Nas últimas décadas diversos estudos têm demonstrado diferentes protocolos de construção do modelo 3D de células de endométrio, assim como,

diferentes estratégias para a arquitetura deste modelo (Park *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Wang, H. *et al.*, 2013; Buck *et al.*, 2015).

ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese foi dividida em três capítulos:

- I. Proliferação e potencial metastático de células de câncer de endométrio expostas a concentrações alta e normal de glicose tratadas com metformina;

- II. Efeito do tratamento com metformina (curto e longo) sobre vias de sinalização de células de câncer de endométrio quando expostas a diferentes concentrações de glicose;

- III. Estabelecimento de um modelo de cocultura de endométrio tridimensional *in vitro*.

CAPÍTULO I

Proliferação e potencial metastático de células de câncer de endométrio expostas a concentrações alta e normal de glicose tratadas com metformina

Objetivo geral

Avaliar o efeito do tratamento com metformina na dose de 0,1 mM sobre a inibição do desenvolvimento e redução do potencial metastático de células de adenocarcinoma endometrial tipo I em um ambiente com elevados níveis de insulina quando expostas a condições de cultivo com concentração alta e normal de glicose.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de 0,1 mM de metformina sobre a habilidade de migração e invasão de células de câncer de endométrio em um ambiente com altos níveis de insulina quando expostas a diferentes concentrações de glicose no meio;
- Determinar o efeito preventivo de 0,1 mM de metformina sobre a migração e invasão de células epiteliais primárias do endométrio em um ambiente com elevados níveis de insulina quando expostas a uma condição com concentração alta de glicose;
- Avaliar o efeito de 0,1 mM de metformina por 72 horas sobre a redução da proliferação relativa de células de adenocarcinoma de endométrio tipo I em ambiente com altos níveis de insulina quando cultivadas com diferentes concentrações de glicose;
- Avaliar o efeito das doses crescentes (0, 0,1, 1 e 5 mM) de metformina por 72 horas sobre a redução da proliferação relativa de células de adenocarcinoma de endométrio tipo I em ambiente com altos níveis de insulina quando cultivadas com diferentes concentrações de glicose.

Hipótese

O tratamento com a metformina na dose de 0,1 mM diminui o desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio.

Método

Delineamento

Foi realizado um estudo experimental *in vitro*.

Pacientes

As células epiteliais primárias de endométrio foram provenientes de pacientes (34,1 ± 3,4 anos) submetidas à biópsia ou histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e na Universidade de Heidelberg, cuja indicação foi independente deste estudo. As pacientes foram informadas que as células endometriais normalmente são descartadas e permitiram, mediante assinatura de consentimento livre e esclarecido (TCLE 14-0267, Anexo 1), a utilização deste material na pesquisa. Foram excluídas do estudo pacientes pós-menopausa; pacientes diabéticas e pacientes com endocrinopatias ou neoplasias.

Isolamento de células epiteliais primárias endometriais (EPE)

O tecido endometrial obtido por biópsia ou de úteros pós-histerectomia foi acondicionado em frasco estéril contendo solução salina de Hank's (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e solução de penicilina/streptomina 0,5 mg/mL (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA). O material foi transportado ao laboratório e acondicionado a 4°C. No laboratório, em capela de fluxo laminar, o material foi reduzido a fragmentos menores, lavado quatro vezes em solução de Hank's. A amostra foi pesada e, a seguir, submetida à dissociação enzimática durante 2 horas a 37°C. O meio de dissociação foi preparado com solução de Hank's e a enzima colagenase tipo IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) (7,5 mg/g de tecido). O volume total de meio de dissociação foi calculado em função do peso do tecido a ser digerido, mantendo-se uma relação de 10 mL de meio para cada 4 g de tecido. O processo de dissociação enzimática foi realizado em frasco de Erlenmeyer sob agitação constante. Após a dissociação enzimática, a ação da colagenase foi inibida pela adição de igual volume de solução de Hank's. O isolamento das células endometriais foi baseado na modificação do trabalho de Satyaswaroop e colaboradores (Satyaswaroop *et al.*, 1979). O material dissociado foi centrifugado a

800xg durante 10 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspendido com meio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – DMEM e *Ham's F12* – Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA), uma nova centrifugação foi feita, e a suspensão celular foi vertida em filtro de nylon 100 micra (Polylabo, Strasbourg, França) para reter porções de tecido não digeridas. Para promover a separação das células epiteliais das estromais o filtrado passou por um separador celular de 40 µm (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA) onde as células estromais passaram e as epiteliais ficaram retidas. Para a obtenção das células epiteliais foi realizada uma lavagem do filtro seguida de uma centrifugação. As células epiteliais endometriais foram suspendidas com meio DMEM/F12 suplementado com 1 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina 0,5 mg/mL) e 5 % de soro bovino fetal.

Linhagem de câncer de endométrio

As células de câncer de endométrio foram provenientes de linhagem celular de adenocarcinoma endometrial tipo I - Ishikawa (Sigma-Aldrich 99040201-1VL, Alemanha). As células foram cultivadas com meio MEM (*Minimum Essential Medium Eagle* – Sigma Aldrich, Alemanha), suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 0,5 mg/mL), 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acid* - Sigma Aldrich, Alemanha).

Cultivo celular

Inicialmente as células foram cultivadas em garrafas de cultura (125 cm² - Greiner Bio-One GmbH, Alemanha) e incubadas em estufa (SANYO, Japan) a 37°C com atmosfera úmida e adição automática de 5% de CO₂. A diferenciação e proliferação celular foi observada a cada 24 horas em microscópio invertido (Axyover, Carl Zeis Jena, Alemanha) até que a monocamada de células atingisse aproximadamente 80 % de confluência.

As células em cultivo foram liberadas das garrafas com o uso da enzima tripsina. As células em suspensão, antes da semeadura, foram submetidas a um teste de viabilidade por coloração com azul de Tripán e contagem em

hemocítômetro. Em seguida, as células foram semeadas nos diferentes grupos (Tabela 1) de acordo com os protocolos dos ensaios a seguir.

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

Grupo	E_2	Insulina	Metformina
Controle	10^{-8} M		
Insulina	10^{-8} M	100 ng/mL	
Metformina	10^{-8} M		0,1 mM
Ins+Met	10^{-8} M	100 ng/mL	0,1 mM

Considerando que a concentração normal de glicose no plasma humano é em torno de 5,5 mM de glicose, para a realização dos experimentos cultivando as células em meios com diferentes concentrações de glicose foi utilizado dois meios de cultivo (DMEM/F12 e MEM), sendo o segundo suplementado para ambos apresentarem os mesmos nutrientes. Neste estudo, para o cultivo em um ambiente com concentração normal de glicose foi utilizado o meio MEM suplementado, o qual apresenta a concentração de 5,5 mM de glicose. Já para o cultivo em um ambiente com concentração alta de glicose foi utilizado o meio DMEM/F12, o qual apresenta a concentração de 17 mM de glicose.

Ensaio de migração e invasão celular

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 realizados através de *transwells* com fundo constituído por uma membrana com poros de 5 μ m, colocados em uma placa de 24 poços (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA). Foram semeados 200 μ L com uma densidade de 1×10^5 células (Ishikawa) e 2×10^4 células (EPe) nos respectivos grupos, em meio sem soro, diretamente sobre a membrana do *transwell* para o ensaio de migração. Para o ensaio de invasão, a

mesma quantidade de células foi semeada sobre uma camada de 100 μL de matrigel® (BD Biosciences Franklin Lakes, N.J, USA) diluída na concentração de 50% com meio sem soro. Em cada poço da placa, foram colocados 750 μL de meio correspondente 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 (1 mg/mL de metanol) por 15 minutos. As células que não migraram ou invadiram foram coletadas com um suabe de algodão, e então, as células que migraram ou invadiram presentes nos *transwells* foram contadas em microscópio invertido utilizando o aumento de 600X. A contagem de 4 campos aleatórios de cada *transwell* foi realizado de forma cega e os dados estão representados em porcentagem em relação ao grupo controle.

Ensaio de viabilidade e proliferação celular

Para avaliar a viabilidade e proliferação relativa das células de câncer de endométrio nos diferentes grupos (Tabela 1) e a sensibilidade das células de câncer de endométrio a doses crescentes de metformina (0 mM, 0,1 mM, 1mM e 5 mM) foi utilizado o ensaio luminescente CellTiter Glo (Promega Corp., Madison, WI, USA). As células foram semeadas em placas *multiwell* de 96 poços em uma densidade de 5×10^3 células em 100 μL de meio de cultura sem tratamento e incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. No dia seguinte, foram adicionados os tratamentos correspondentes a cada grupo e as células foram tratadas durante 72 horas, sendo realizada a troca de meio após 48 horas. Após este período, as placas foram incubadas durante 30 minutos em temperatura ambiente, 100 μL do reagente CellTiter Glo foi adicionado em cada poço, agitado gentilmente por 2 minutos e incubado em temperatura ambiente novamente por 10 minutos. A luminescência foi medida por um leitor de microplacas Centro LB 960 Microplate Luminometer (Berthold Technologies GmbH and Co, BW, Alemanha). Cada experimento foi realizado em sextuplicatas e o efeito dos diferentes tratamentos foi calculado em relação ao grupo controle e apresentado como *fold-change*. Os valores de *fold-change* maiores que 1 indicam um aumento da proliferação, e os valores menores que 1 indicam uma diminuição.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk com Correção de Lilliefors foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas. Os dados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média por terem apresentado distribuição normal. Os dados de migração, invasão e proliferação comparando os diferentes grupos das células de linhagem de câncer de endométrio foram avaliados quantitativamente através da Análise de Variância (ANOVA) unidirecional seguido do teste *post hoc* de Turkey. Para a análise dos dados de sensibilidade das células de câncer de endométrio a diferentes doses de metformina, no qual foi comparado somente a dose em relação ao controle, foi utilizado o teste *t-Student*. Os dados das células EPe foram avaliados quantitativamente através do teste Equações de Estimação Generalizadas (GEE) seguido do teste *post hoc* de Bonferroni.

Para todos os testes, as diferenças encontradas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Todas as análises foram feitas através do programa SPSS 23.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Locais de realização

Os experimentos utilizando células EPe foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS, e os experimentos utilizando células de linhagem de câncer de endométrio e EPe foram realizados no Laboratório de Endométrio e Implantação instalado no Departamento de Ginecologia Endócrina e Medicina Reprodutiva, Hospital de Heidelberg, Alemanha. Ambos laboratórios dispõem da infraestrutura para a execução dos procedimentos utilizados neste estudo.

Resultados

Metformina na dose de 0,1 mM inibe o efeito da insulina sobre a habilidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio

A habilidade das células de invadir e migrar foi avaliada através da modificação do método de Boyden (Boyden, 1962). Em 1987, Albini e colaboradores descreveram este método como sendo o melhor para avaliar o potencial metastático de células tumorais através de um material sintético *in vitro*, pois permite a comparação da habilidade de invasão entre células tumorais e do efeito de medicamentos sobre esta habilidade (Albini *et al.*, 1987). O presente estudo avaliou em condições com diferentes concentrações de glicose, a habilidade de migração e invasão de células de linhagem de câncer de endométrio quando submetidas a um ambiente com níveis elevados de insulina e ao tratamento com a dose de 0,1 mM de metformina.

A figura 10 representa a capacidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio quando expostas a um ambiente com altos níveis de glicose. Em comparação ao grupo controle a exposição à insulina aumentou a capacidade de migração das células de câncer em 77 % ($P < 0,001$) e de invasão em 57 % ($P < 0,001$). O tratamento isolado com a metformina não alterou a migração ou invasão dessas células comparado ao grupo controle. Entretanto, quando a metformina na dose de 0,1 mM foi administrada juntamente com a insulina, foi capaz de inibir a ação da insulina sobre as células, diminuindo a habilidade de migrar em 47 % ($P = 0,023$) e de invadir em 42 % ($P < 0,001$) comparado ao grupo insulina.

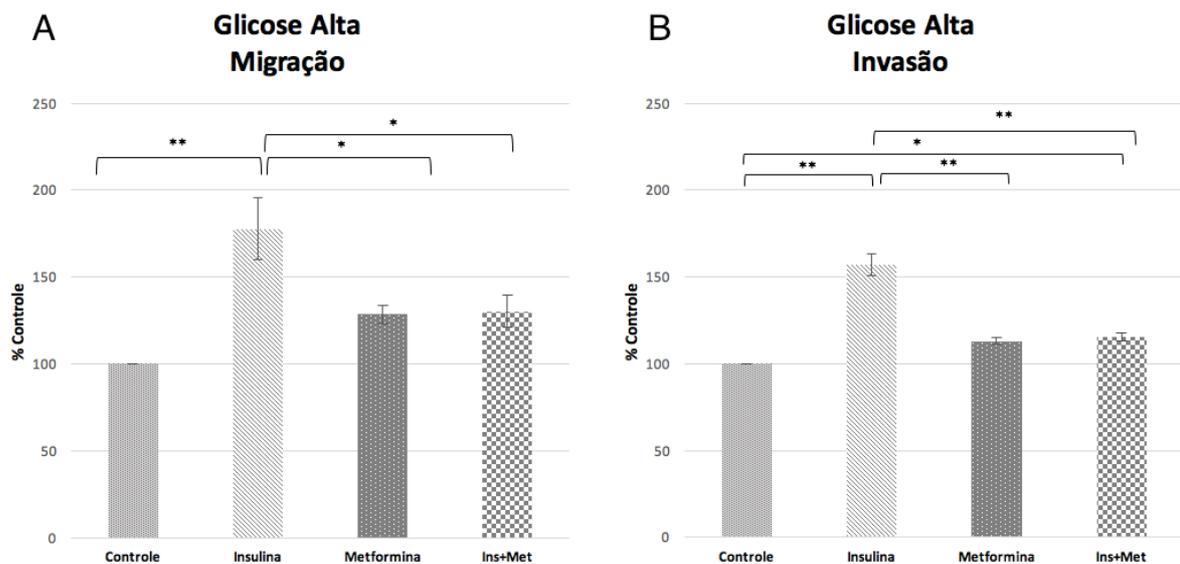


Figura 10: Habilidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio expostas a um ambiente com altos níveis de glicose. (A) Migração; * $P=0,023$ e ** $P<0,001$. (B) Invasão; * $P=0,030$ e ** $P<0,001$. Média \pm erro padrão da média; $N=5$; Ins+Met= insulina + metformina.

Quando as células de câncer de endométrio foram cultivadas em meio com a concentração normal de glicose (Figura 11), o efeito do tratamento com insulina e metformina sobre a habilidade de migrar e invadir foi significativo, embora mais sutil se comparado ao ambiente com altos níveis de glicose (Figura 10). A exposição à insulina também aumentou a capacidade de migração e invasão dessas células, porém com menor efeito, 3 % ($P=0,032$) e 10 % ($P=0,006$) respectivamente, comparado ao grupo controle. Quando adicionada, a metformina inibiu a ação da insulina sobre a capacidade de invasão, suprimindo o efeito do hormônio (11 %) em relação ao grupo insulina ($P=0,007$). Da mesma forma, a metformina administrada isoladamente diminuiu a capacidade de migração em 4 % ($P=0,001$), mas não a capacidade de invasão (3 %, $P=0,069$) dessas células comparado ao grupo controle.

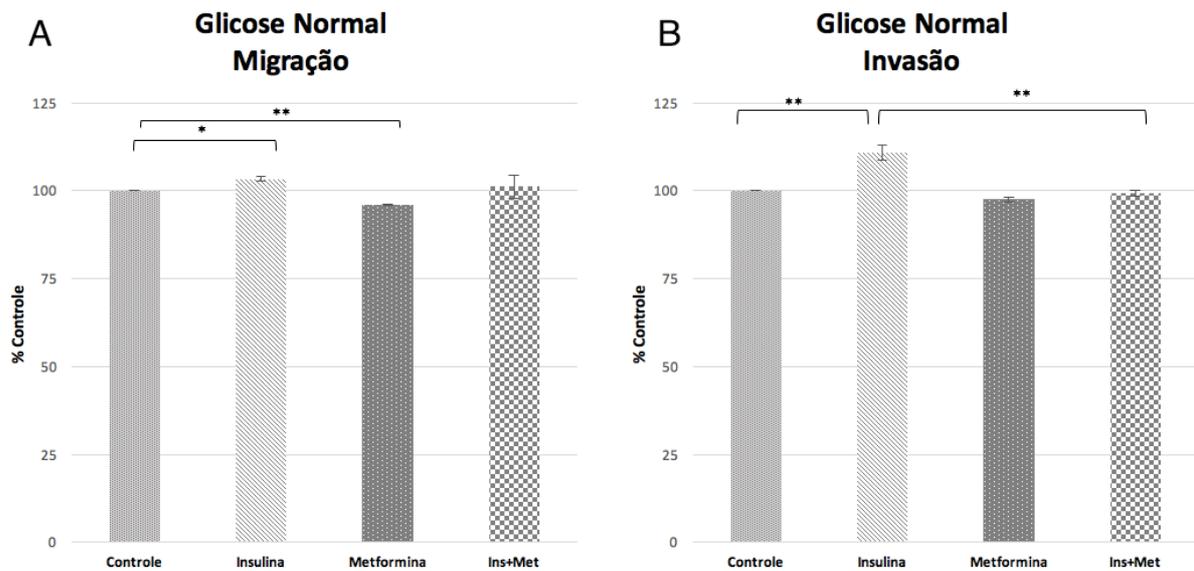


Figura 11: Habilidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio expostas a um ambiente com níveis normais de glicose. (A) Migração; *P=0,032 e **P=0,001. (B) Invasão; **P=0,006. Média \pm erro padrão da média; N=5; Ins+Met=insulina + metformina.

Para determinar o efeito do tratamento com metformina, foi avaliada a habilidade de migração e invasão das células EPe expostas somente a um ambiente com concentração alta de glicose (Figura 12). O tratamento com a insulina isoladamente ou em combinação com a metformina não foi capaz de aumentar a habilidade de migrar ou invadir dessas células, enquanto o tratamento isolado com a metformina diminuiu o potencial migratório em 10 % (P<0,001) dessas células comparado ao grupo controle.

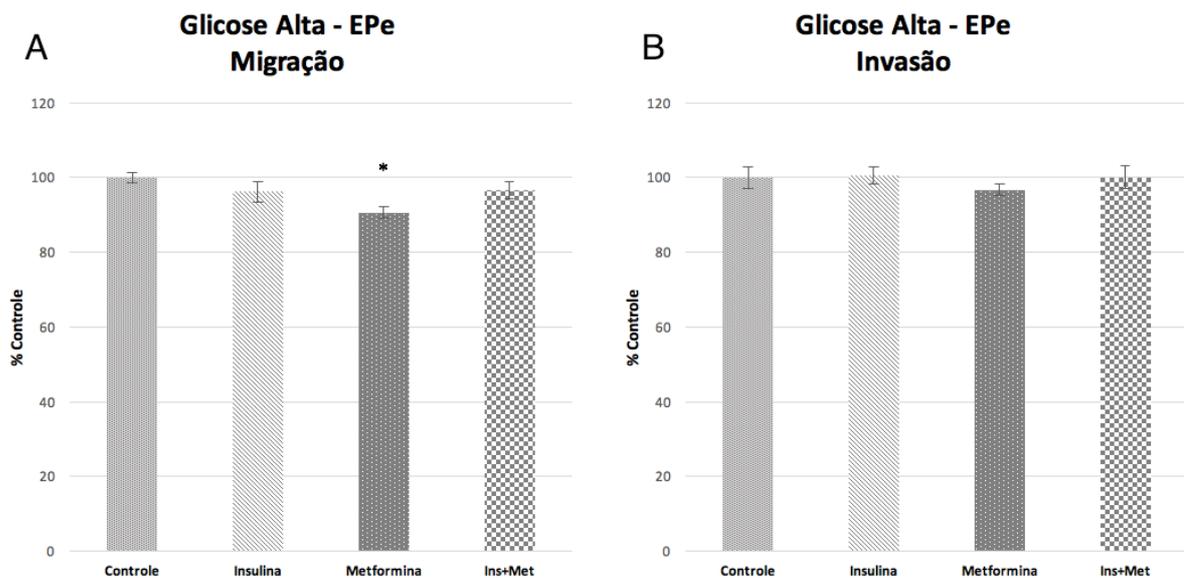


Figura 12: Habilidade de migração e invasão das células epiteliais primárias endometriais (EPE) expostas a um ambiente com altos níveis de glicose. (A) Migração; * $P < 0,001$. (B) Invasão. Média \pm erro padrão da média; $N=5$; Ins+Met= insulina + metformina.

Metformina na dose de 0,1 mM não diminui a taxa de proliferação das células de câncer de endométrio

Para determinar se a concentração de glicose presente no meio de cultivo interfere na resposta do potencial de proliferação das células de câncer de endométrio expostas a um ambiente com elevados níveis de insulina e/ou tratadas com metformina, células da linhagem celular Ishikawa foram tratadas nos diferentes grupos, sendo a dose de metformina usada de 0,1mM durante o período de 72 horas em condição com concentração alta e normal de glicose.

Os resultados na figura 13 demonstraram que independente da concentração de glicose presente no meio de cultivo, o tratamento com a insulina aumentou a proliferação das células de câncer de endométrio quando comparado ao grupo controle, apresentando 1,15-fold quando expostas a níveis altos de glicose ($P=0,029$), e 1,14-fold quando expostas a níveis normais de glicose ($P=0,003$). Entretanto, o tratamento com metformina na concentração de 0,1 mM não foi eficiente para diminuir a proliferação dessas células comparado ao grupo controle, tanto em alto quanto em nível normal de glicose. Além disso, neste período de tratamento, a concentração de 0,1 mM de metformina não foi capaz de inibir o efeito

estimulatório da insulina sobre o potencial de proliferação em ambas as concentrações de glicose (Figura 13).

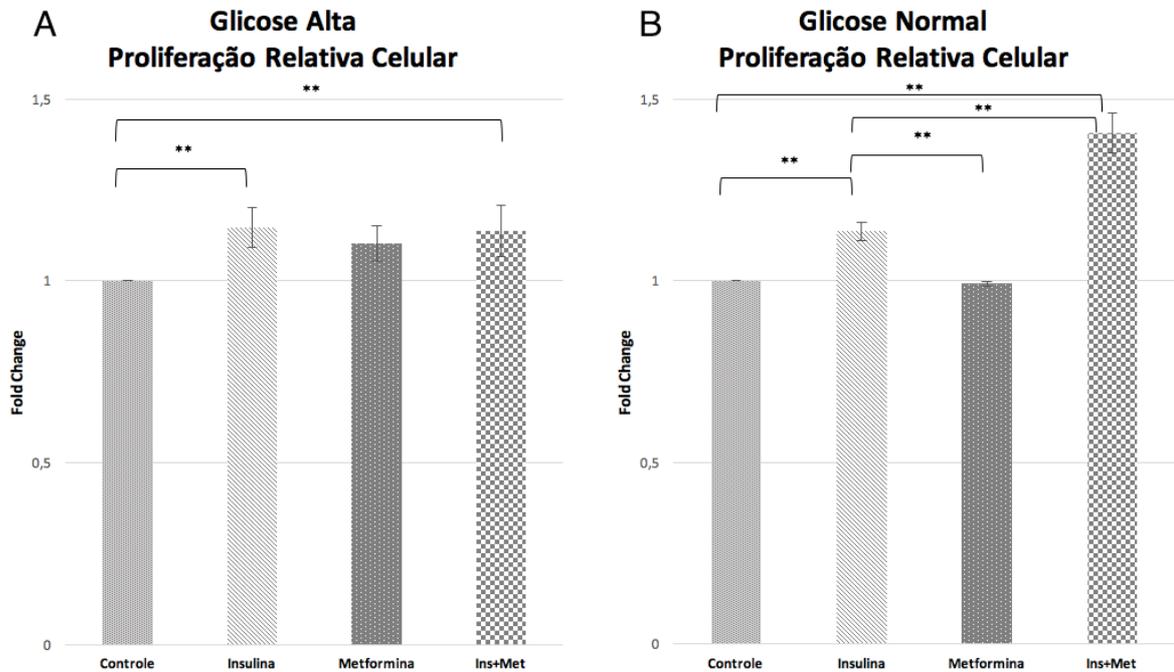


Figura 13: Proliferação relativa celular de células de câncer de endométrio. (A) Células expostas a altos níveis de glicose; * $P < 0,05$. (B) Células expostas a níveis normais de glicose; * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$. Média \pm erro padrão da média; $N=3$; Ins+Met= insulina + metformina.

A sensibilidade das células de câncer de endométrio submetidas ao tratamento com diferentes doses de metformina (0 mM, 0,1 mM, 1 mM e 5 mM) expostas a meio de cultivo com diferentes concentrações de glicose foi testada com a finalidade de determinar a partir de qual dose de metformina neste modelo, no período de tratamento de 72 horas, apresentaria um efeito antiproliferativo. Conforme demonstrado na figura 14, independente da concentração de glicose no meio celular o potencial de proliferação não foi alterado com a dose de 0,1 mM durante as 72 horas de tratamento (1,0-fold para altos níveis de glicose e 0,97-fold para níveis normais de glicose). Entretanto, quando expostas a um ambiente com altos níveis de glicose, a dose de 1 mM de metformina diminuiu a proliferação celular relativa em 0,08-fold ($P=0,037$) seguida por redução dose-dependente, onde a dose

de 5 mM reduziu a proliferação em 0,19-fold comparado ao controle (P=0,002). Já em uma condição com níveis normais de glicose, foi possível notar um efeito antiproliferativo levemente mais pronunciado em relação ao controle, onde a dose de 1 mM diminuiu o potencial proliferativo em 0,11-fold (P=0,027) e a dose de 5 mM em 0,24-fold (P=0,002).

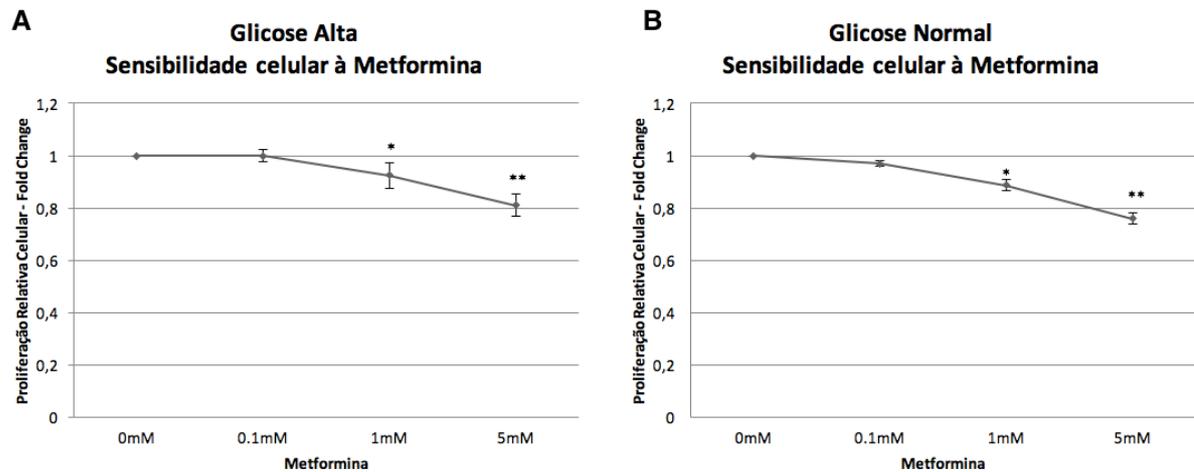


Figura 14: Sensibilidade das células de câncer de endométrio ao tratamento dose-dependente de metformina. (A) Células expostas a um ambiente com altos níveis de glicose; *P=0,037 e **P=0,002. (B) Células expostas a um ambiente com níveis normais de glicose; *P= 0,027 e **P=0,002. Média \pm erro padrão da média; N=3; Ins+Met= insulina + metformina.

Discussão

O carcinoma endometrial é uma das neoplasias ginecológicas mais frequentes em mulheres dependendo da região geográfica (Acs, 2014; Inca, 2014; Rki, 2015; Siegel *et al.*, 2016), sendo que um número considerável de pacientes sofre recorrência da neoplasia e/ou formação de metástases, piorando o prognóstico. Cerca de 30% dos casos de câncer endometrial não são diagnosticados até que surjam metástases locais à distância (Bing *et al.*, 2014). As metástases envolvem migração e invasão de células e dependem da interação com a matriz extracelular, mediadas por fatores produzidos pelas células tumorais e o estroma circundante. Além disso, a proliferação anormal de células neoplásicas também é um evento fundamental para a progressão do tumor (Yesilkanal *et al.*, 2014).

A glicose é um nutriente essencial para manter a homeostase energética celular sendo a concentração normal de glicose no plasma humano em torno de 5,5 mM. Entretanto, o aumento dos níveis de glicose e a hiperglicemia são fatores que contribuem para o crescimento e desenvolvimento do câncer de endométrio (Lambe *et al.*, 2011) sendo considerado um fator determinante no aumento do risco de câncer em pacientes com DM tipo II (Szablewski, 2014). Além disso, a hiperinsulinemia, a qual também é considerada um fator de risco, pode estar presente em uma condição de resistência à insulina independente de obesidade, como em alguns casos de pacientes com PCOS. Demonstrando que apesar de um estado normoglicêmico, somente a condição hiperinsulinêmica pode *per se* ser um fator promotor para a iniciação e progressão do câncer (Moran *et al.*, 2011; Mu *et al.*, 2012).

Considerando o aumento das pesquisas sobre a metformina na terapia do câncer, assim como em pacientes com DM tipo II e a expansão de sua utilização para a população não-diabética (Evans *et al.*, 2005; Kourelis *et al.*, 2012; Sarfstein *et al.*, 2013; Pernicova *et al.*, 2014), este estudo investigou o efeito de uma dose, considerada baixa para estudos *in vitro* (Dowling *et al.*, 2012), de metformina sobre o desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio. Com o objetivo de avaliar a metformina como um agente terapêutico atuando na prevenção e/ou tratamento do adenocarcinoma endometrial tipo I, células epiteliais de câncer de endométrio e

células EPe foram cultivadas em meios com diferentes níveis de glicose, expostas a um ambiente com concentração elevada de insulina e tratadas com metformina.

Altos níveis de glicose parecem constituir um ambiente propício para que células de câncer apresentem resistência ao efeito do tratamento com a metformina (Menendez *et al.*, 2012; Sinnett-Smith *et al.*, 2013; Zhuang *et al.*, 2014). No presente estudo, foram avaliadas a ação da insulina e o efeito do tratamento com a metformina sobre o potencial metastático de células de câncer de endométrio quando expostas a um ambiente com meio contendo concentrações alta e normais de glicose. Foi demonstrado que independente da concentração de glicose presente no meio, a insulina atua aumentando a habilidade de migração e invasão das células de câncer de endométrio, entretanto, apresentando efeito mais pronunciado quando cultivadas em um ambiente com altos níveis de glicose. A dose de 0,1 mM de metformina foi eficiente para diminuir a ação da insulina quando realizado tratamento simultâneo em ambas condições de concentração de glicose. Quando expostas a um ambiente com níveis normais de glicose foi possível observar que a metformina isoladamente atuou diminuindo a habilidade de migração dessas células comparado ao controle. Este efeito não foi observado quando as células foram expostas a meio com altos níveis de glicose. É possível que este efeito isolado da metformina não tenha sido observado porque as células de câncer de endométrio apresentaram resistência ao efeito da baixa dose de metformina na presença de um ambiente com altos níveis de glicose.

Para avaliar esta resistência das células de câncer induzida pelos altos níveis de glicose no meio, e determinar a eficiência do tratamento com metformina na dose de 0,1 mM, foi realizado o mesmo experimento utilizando células EPe. Os resultados demonstraram que a exposição ao ambiente com níveis elevados de insulina não alterou a migração e a invasão das células primárias. Entretanto, o tratamento com a metformina isoladamente diminuiu a habilidade de migração das células EPe comparado ao controle, mas não houve alteração quando administrado em conjunto com a insulina. É possível que as células primárias endometriais não possuam habilidade de migração e invasão como as células de câncer, e que o período de incubação de 16 horas do ensaio provavelmente não tenha sido suficiente para a insulina ativar vias de sinalização intracelulares que estimulasse o potencial migratório e invasivo dessas células. Porém, a metformina isoladamente foi

suficiente para inibir o potencial migratório inerente a técnica, ou seja, inerente ao princípio de quimiotaxia do ensaio, corroborando com as evidências que um ambiente com altos níveis de glicose interfere no efeito da metformina sobre células de câncer. Recentemente, Jianjun Han e colaboradores relataram um aumento da capacidade de adesão e invasão em duas linhagens de câncer de endométrio relacionado aos níveis de glicose presente no meio, sugerindo que o metabolismo da glicose pode ser um alvo promissor para a estratégia terapêutica no tratamento do câncer de endométrio (Han *et al.*, 2015).

Este estudo é um dos primeiros a demonstrar que a metformina apresenta um efeito inibitório sobre o potencial metastático de células epiteliais de câncer de endométrio, enquanto que o efeito do tratamento com metformina na inibição da habilidade de migração e invasão já foi relatado de forma dose-dependente em outras neoplasias, como de ovário (Wu *et al.*, 2012), de próstata (Kato *et al.*, 2015) e de osteosarcomas (Chen *et al.*, 2015).

Além do possível efeito antimetastático da metformina, diversos estudos têm sugerido que a metformina possa ser um agente antiproliferativo para células de câncer de endométrio (Cantrell *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012; Mitsuhashi *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2015). Cantrell e colaboradores, 2010, relataram, pela primeira vez, que a metformina potencialmente inibe o crescimento de duas linhagens de câncer de endométrio (apresentando um IC_{50} - *half maximal inhibitory concentration* de 1 mM de metformina) após 72 horas de tratamento em um ambiente com níveis normais de glicose (Cantrell *et al.*, 2010). Takahashi e colaboradores, demonstraram que após 48 horas de tratamento com doses crescentes de metformina em meio com níveis normais de glicose, 5 mM ou doses maiores de metformina reduzem significativamente o número de células de câncer de endométrio viáveis (IC_{50} de 6,78 mM de metformina) (Takahashi *et al.*, 2014). O efeito antiproliferativo da metformina foi relatado também em outros tipos de tecido. Wu e colaboradores, demonstraram que a metformina reduz a proliferação de células de câncer de ovário em condições dose dependente e tempo dependente de tratamento *in vitro* (IC_{50} de 16,67 mM de metformina) e *in vivo* (Wu *et al.*, 2012). Kato e colaboradores, avaliaram os efeitos da metformina sobre a proliferação de três linhagens diferentes de células de câncer de próstata utilizando dois ensaios diferentes (ensaio colorimétrico e contagem celular), e demonstraram que o número

de células de câncer de próstata viáveis diminuiu significativamente após o tratamento com a metformina (IC_{50} de 5 mM de metformina) no período de 48 horas (Kato *et al.*, 2015). Entretanto, o presente estudo observou que a insulina aumentou a proliferação relativa da linhagem epitelial de câncer de endométrio, porém sem alguma alteração sobre o potencial proliferativo ao adicionar 0,1 mM de metformina, independente da concentração de glicose presente no ambiente. Essa diferença em relação aos resultados encontrados na literatura pode ser devido às altas concentrações de metformina utilizadas nestes estudos, as quais variam de 1 mM até 20 mM. Essas são doses de metformina superiores as doses terapêuticas utilizadas em pacientes com DM tipo II, as quais resultam em níveis plasmáticos que atingem em torno de 0,01 mM podendo chegar ao máximo em 0,04 mM (Owen *et al.*, 2000; He *et al.*, 2015). Quando nesse estudo, foram utilizadas doses mais altas de metformina, 1 mM e 5 mM, foi possível observar uma diminuição do potencial de proliferação em ambas condições de concentração de glicose. Contudo, o efeito foi um pouco mais pronunciado em uma condição com níveis normais de glicose. É importante destacar que esses achados foram realizados na presença de estradiol, um importante fator para doenças endometriais proliferativas, o qual não foi utilizado nos estudos sobre câncer de endométrio presentes na literatura (Cantrell *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2012; Mitsuhashi *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2015).

CAPÍTULO II

Efeito do tratamento com metformina (curto e longo) sobre vias de sinalização de células de câncer de endométrio quando expostas a diferentes concentrações de glicose

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do tratamento curto (72 horas) e longo (20 dias) com metformina na dose de 0,1 mM sobre vias de sinalização de células de linhagem de câncer de endométrio expostas a meio de cultura com concentração alta e normal de glicose.

Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da metformina na dose de 0,1 mM sobre a expressão gênica de *MKI67*, *mTOR*, *JAG1*, *NOTCH1* e *NOTCH3* em células de linhagem de câncer de endométrio após 72 horas e 20 dias de tratamento quando expostas a meio de cultura com elevados níveis de insulina e cultivadas em condição com altas concentrações de glicose;
- Avaliar o efeito da metformina na dose de 0,1 mM sobre a expressão gênica de *MKI67*, *mTOR*, *JAG1*, *NOTCH1* e *NOTCH3* em células de linhagem de câncer de endométrio após 72 horas e 20 dias de tratamento quando expostas a meio de cultura com elevados níveis de insulina e cultivadas em condição com concentração normal de glicose;

Hipótese

A dose de 0,1 mM de metformina é eficiente para alterar vias de sinalização intracelular de desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio.

Método

Delineamento

Foi realizado um estudo experimental *in vitro*.

Linhagem de câncer de endométrio

As células de câncer de endométrio foram provenientes de linhagem celular de adenocarcinoma endometrial tipo I - Ishikawa (Sigma-Aldrich, Alemanha). As células foram cultivadas com meio MEM, suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 0,5 mg/mL), 1% NEAA.

Cultivo celular

O cultivo das células de linhagem de câncer de endométrio foi realizado conforme descrito no capítulo I e de acordo com o plano de trabalho a seguir (Figura 15).

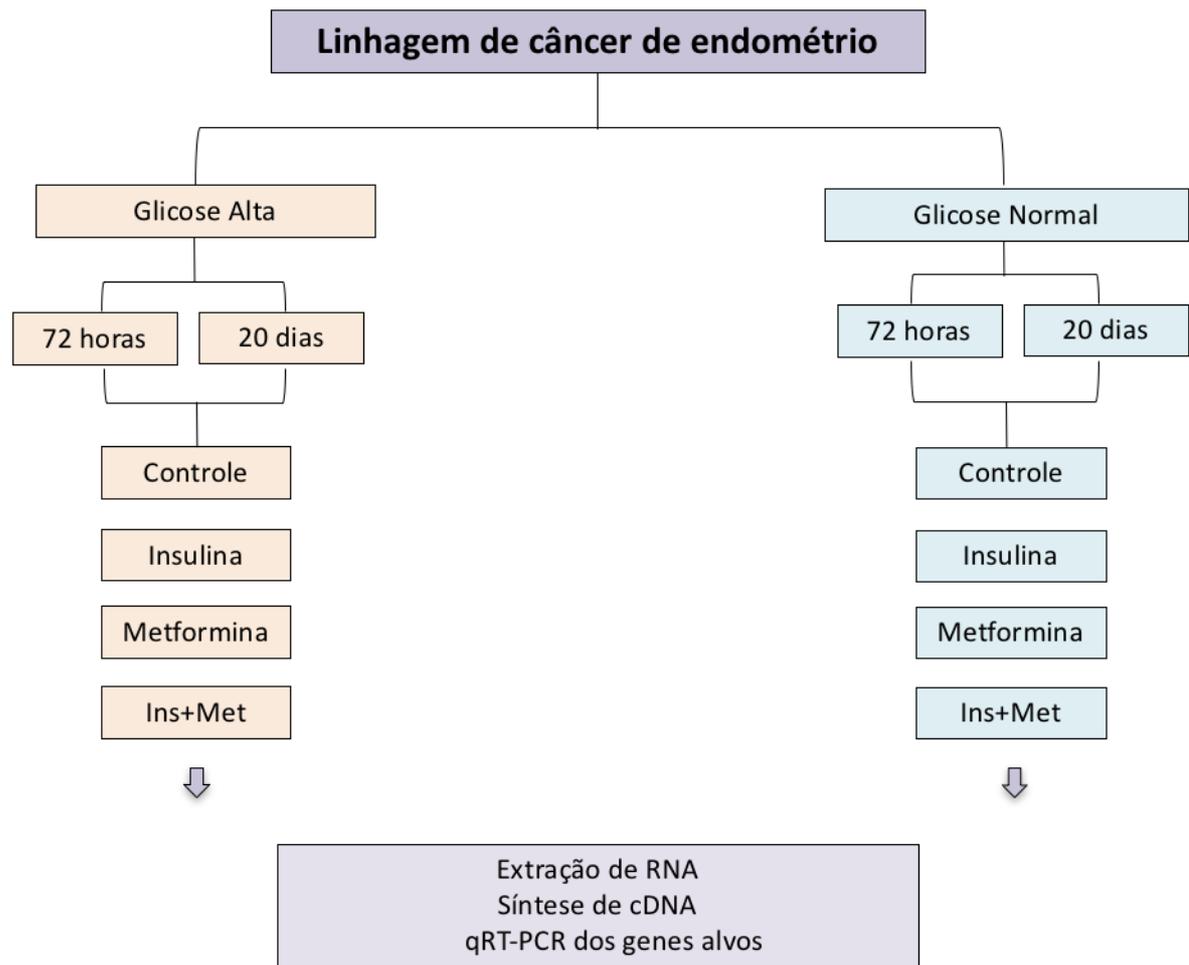


Figura 15: Plano de trabalho do capítulo II.

Após as células serem liberadas da garrafa de cultura e submetidas ao teste de viabilidade, as células de linhagem de câncer de endométrio foram semeadas em placas *multiwell* de 6 poços na concentração de 1×10^5 células/mL para os experimentos com tratamento curto, durante 72 horas, e na concentração de 1×10^4 células/mL para os experimentos com tratamento longo, durante 20 dias. Inicialmente as células foram semeadas com meio correspondente a concentração de glicose sem tratamento por 16 horas. No dia seguinte, o meio foi trocado e adicionado os respectivos grupos de tratamento (Tabela 2), sendo realizada a troca de meio a cada 48 horas.

Tabela 2: Concentração de Estradiol (E₂), Insulina e Metformina nos diferentes grupos.

Grupo	E₂	Insulina	Metformina
Controle	10 ⁻⁸ M		
Insulina	10 ⁻⁸ M	100 ng/mL	
Metformina	10 ⁻⁸ M		0,1 mM
Ins+Met	10 ⁻⁸ M	100 ng/mL	0,1 mM

Extração de RNA total

Após os diferentes tempos de tratamento, as células foram lavadas duas vezes com 1 mL de PBS e lisadas diretamente nas placas com solução de fenol e isotiocianato de guanidina (Trizol, Gibco BRL, Gaithersburg, MD) usando 1 mL de trizol/10cm². A solução contendo o lisado de células foi transferido para tubos de microcentrifuga e incubada por 5 minutos a 15-30°C. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio por mL de trizol e as amostras agitadas vigorosamente por 15 segundos. A seguir, foram incubadas por 2-3 minutos a 15-30°C e centrifugadas a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. A amostra foi separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para tubos novos e identificados, onde o RNA foi precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5 mL/mL de trizol). As amostras foram armazenadas a -20°C por 24 horas ou incubadas a 15-30°C por 10 minutos e centrifugadas a 12000 xg por 10 minutos a 4°C. O RNA precipitado foi lavado com etanol 75%, adicionando 1mL de etanol/mL de Trizol. As amostras foram agitadas em um vórtex e centrifugadas a 12000 xg, 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi vertido e o precipitado seco à temperatura ambiente por 10 minutos. O RNA foi dissolvido em água ultrapura tratada com DEPC (*diethylpyrocarbonate*) e incubado por 10 minutos a 60°C. Após este procedimento o RNA foi quantificado e as amostras armazenadas para posterior síntese de cDNA.

Quantificação do RNA

A quantificação da concentração de RNA de cada grupo de tratamento das amostras foi realizada por meio do fluorímetro QuBit™ (Invitrogen®, EUA) segundo o protocolo específico Qubit Quantitation Platform, com reagentes do kit Quant-it™ (Invitrogen®, EUA), utilizando-se 1 µL de RNA diluído 1:20 para cada 190 µL de *working solution* em cada leitura. Este aparelho utiliza sondas (*dyes*) avançadas que emitem sinais fluorescentes somente quando se ligam a moléculas específicas, mesmo na presença de nucleotídeos livres ou ácidos nucleicos degradados. Esse sistema fluorimétrico de quantificação fornece dados mais sensíveis e específicos em relação à quantidade de RNA, DNA ou proteínas, mesmo em baixas concentrações.

Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do RNAm (SuperScript III First-Strand Synthesis System, Invitrogen, CA), produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o *primer* e os desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 com KCl 50 mM, cloreto de magnésio 25 mM 10 mM e ditioneitol (DTT) 0,1 M sendo incubado por 2 minutos a 42°C. Em seguida as amostras foram incubadas com a enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 minutos. Após nova desnaturação a 70°C por 15 minutos, as amostras foram incubadas com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20 µL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

qRT-PCR

A quantificação dos genes de interesse (Tabela 3) foi realizada a partir do sistema de detecção de sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e analisadas no equipamento PCR real time 7500 Fast (Applied Biosystems).

Tabela 3: *Primers* para análise da expressão do mRNA dos genes alvos.

Primer *	UniGene
<i>MKI67</i>	Hs01032443_m1
<i>mTOR</i>	Hs00234508_m1
<i>JAG1</i>	Hs01070032_m1
<i>NOTCH1</i>	Hs01062014_m1
<i>NOTCH3</i>	Hs01128541_m1
<i>RPLO**</i>	Hs99999902_m1

*Life Technologies ** Gene normalizador

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, 50 ciclos a 94 °C por 50 segundos e a 60 °C por 45 segundos, utilizando o método quantitativo ΔCt onde o aumento do sinal fluorescente está associado com um aumento exponencial do produto da qPCR. Para fazer a comparação dos grupos, foi realizado o cálculo do *fold change* ($(2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})})$), que consiste no valor da expressão do gene normalizado ($2^{(-\Delta\text{Ct})}$) na amostra do grupo experimental dividido pela expressão do gene normalizado ($2^{(-\Delta\text{Ct})}$) na amostra do grupo controle, para cada gene. Os valores de *fold-change* maior que 1 indicam um aumento de expressão gênica. Os valores de *fold-change* menor que 1 indicam uma diminuição de expressão gênica.

Índice de duplicação populacional (IDP) e índice de duplicação populacional cumulativo (IDPC)

Para avaliar o comportamento de replicação da linhagem de câncer de endométrio ao longo do período de tratamento de 20 dias com os tratamentos pré-estabelecidos (Tabela 2), as células foram semeadas em placas de 24 poços na densidade de 1×10^4 células/mL com meio sem tratamento por 16 horas. No dia seguinte, os respectivos tratamentos foram adicionados e após 72 horas de tratamento as células foram liberadas do poço com o uso de tripsina, coradas e contadas em hemocítômetro para determinar a densidade celular. Em seguida, a população celular de cada grupo foi semeada novamente na densidade de 1×10^4

células/mL com meio sem tratamento por 16 horas, recebendo tratamento no dia seguinte (Figura 16). Após as contagens, foi determinado o IDP conforme descrito por Filippi-Chiela e colaboradores (Filippi-Chiela *et al.*, 2015), utilizando a equação $IDP = [\log N(t) - \log N(t_0)] / \log 2$, onde $N(t)$ é o número final de células por poço e $N(t_0)$ é o número de células que foram semeadas. O IDPC é a soma das duplicações populacionais (DPs) em um intervalo de tempo. Os dados estão representados graficamente em função do tempo de cultura. Foram realizados três experimentos independentes, onde cada experimento foi executado em triplicatas.

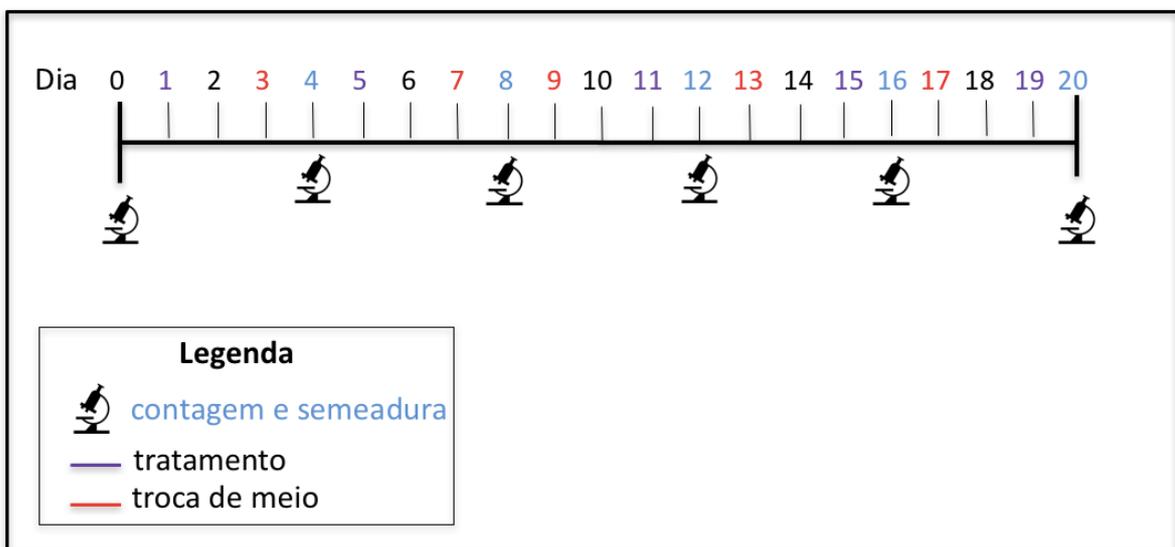


Figura 16: Algoritmo do protocolo de execução do ensaio para determinar o índice de duplicação populacional cumulativa.

Análise da rede de interação entre vias de sinalização celular

A avaliação da rede de interação entre a via de sinalização de Notch e a via PI3K/AKT/mTOR foi realizada através da plataforma *online* String (<http://string-db.org/>). A plataforma String integra em seu sistema diferentes plataformas públicas de informações validadas com funcionalidades diretas ou indiretas e de associações/interações de gene/proteínas (Von Mering *et al.*, 2005). A rede foi construída associando ações moleculares entre os genes *NOTCH1*, *NOTCH3*, *JAG1* e *mTOR* utilizando o alto nível de 0,7 de confiança e no máximo 10 interações.

Análise estatística

O teste de Shapiro-Wilk com correção de Lilliefors foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição das variáveis analisadas. Os dados obtidos foram representados como média \pm erro padrão da média por terem apresentado distribuição normal. Os dados de expressão do mRNA dos experimentos com concentrações altas de glicose durante o período de 20 dias e 72 horas de tratamento, e dos experimentos em níveis normais de glicose durante 72 horas de tratamento nos diferentes grupos foram avaliados quantitativamente através da Análise de Variância (ANOVA) unidirecional seguido do teste *post hoc* de LSD. Os dados de expressão do mRNA dos genes nos experimentos com nível normal de glicose durante 20 dias de tratamento e os dados de crescimento celular estão representados de forma descritiva.

Para todos os testes, as diferenças encontradas foram consideradas significativas quando $P \leq 0,05$. Todas as análises foram feitas através do programa SPSS 23.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

Locais de realização

Os experimentos deste capítulo foram realizados no Laboratório de Endométrio e Implantação instalado no Departamento de Ginecologia Endócrina e Medicina Reprodutiva, Hospital de Heidelberg, Alemanha.

Resultados

Resistência das células de câncer de endométrio ao tratamento longo com metformina na dose de 0,1 mM em meio de cultura com concentração alta de glicose:

- sobre via de proliferação e crescimento celular

Considerando que a metformina apresenta dois mecanismos de ação, atua indiretamente, sistemicamente, e diretamente, sobre vias de sinalização celular, o presente estudo avaliou em condições com diferentes níveis de glicose a expressão do marcador de proliferação Ki67 e do fator promotor de câncer, mTOR, em células de linhagem de câncer de endométrio submetidas a meio de cultura com concentrações elevadas de insulina e ao tratamento curto (72 horas) e longo (20 dias) com metformina na dose de 0,1 mM. Os valores foram expressos em *fold change* (FC).

A figura 17 representa a expressão do mRNA do marcador de proliferação *MKi67*. Em uma condição com concentração alta de glicose no meio, quando as células de câncer de endométrio foram tratadas apenas com insulina ou metformina, durante 72 horas, não foi encontrada diferença estatística na expressão do mRNA do marcador de proliferação *MKi67*, apresentando um nível de expressão de 1,42-fold ($P=0,250$) e 1,63-fold ($P=0,08$), respectivamente, comparado ao grupo controle. Contudo, quando realizado o tratamento concomitante, houve um aumento de 1,05-fold na expressão do marcador de proliferação (FC=2,05; $P<0,007$) comparado ao grupo controle (Figura 17A). Entretanto, quando as células foram cultivadas durante 20 dias (Figura 17B), a insulina aumentou 0,98-fold (FC=1,98; $P=0,05$) a expressão de *MKi67*, e o tratamento com a metformina isoladamente aumentou a expressão do marcador de proliferação 1,7-fold comparado ao controle (FC=2,7; $P=0,002$) enquanto quando administrados em conjunto, houve um aumento 1,0-fold comparado ao controle (FC=2,0; $P=0,05$). Em uma condição com níveis normais de glicose no meio, provavelmente em razão do número amostral pequeno, não foi possível observar diferença entre os grupos (Figura 17C,D).

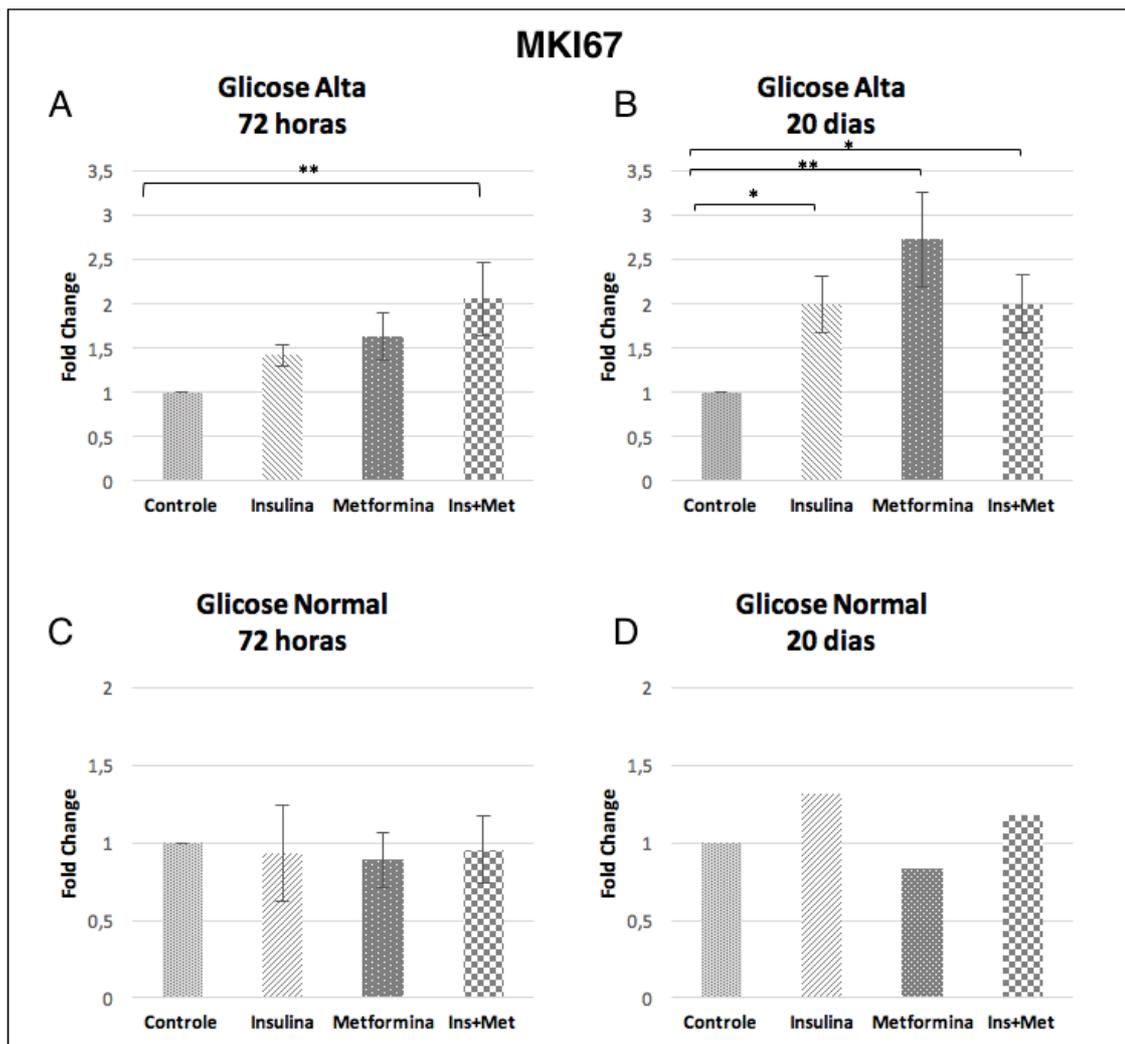


Figura 17: Expressão relativa do mRNA de *MKI67* nos diferentes grupos e tempos de tratamento. (A) Condição com concentrações altas de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=7; **P=0,007. (B) Condição com concentrações altas de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; N=7; *P=0,05 e **P=0,002. (C) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=3. (D) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; dados descritivos N=1. A expressão do mRNA de *MKI67* foi normalizada pelo gene normalizador RPL0 e expressa em *fold-change*. Média ± erro padrão da média; Ins+Met= insulina + metformina.

Considerando os resultados de expressão gênica do marcador de proliferação celular Ki67, nos quais o tratamento longo com metformina na dose de 0,1 mM em um meio de cultura com altas concentrações de glicose, apresentou maior expressão comparado aos outros grupos em relação ao controle, o índice de duplicação populacional cumulativa (IDPC) dessas células ao longo do período de 20 dias de tratamento foi determinado. Com este ensaio é possível verificar o padrão

de crescimento e resposta das células aos diferentes tratamentos realizados de forma aguda e crônica. A forma aguda é determinada a partir do DP, o qual considera o número de vezes em que a população celular duplicou em cada intervalo de 72 horas de tratamento. Já a forma crônica, é determinada a partir da soma dos DPs ao longo dos 20 dias de tratamento, o IDPC, e demonstra o perfil de resposta de uma população isolada.

A figura 18 representa o efeito do tratamento sobre o número total de vezes em que as células de linhagem de câncer de endométrio duplicaram a cada 72 horas e os dados estão representado de forma descritiva da média de três experimentos individuais executados em triplicata. Nas primeiras 72 horas de tratamento, as células tratadas com insulina isoladamente e tratadas concomitantemente com insulina e metformina apresentaram maior densidade celular (Figura 19), apresentando um índice de duplicação de 3,13 vezes e 2,97 vezes, respectivamente, seguido pelo grupo controle 2,93 vezes. Já as células tratadas isoladamente com metformina, apresentaram o menor crescimento celular, IDP de 2,84 vezes comparado aos outros grupos. Entretanto, ao longo do tempo, o padrão de duplicação das células de câncer de endométrio alterou, onde nos dois últimos pontos de contagem as células tratadas com metformina e insulina isoladamente apresentaram maior IDP comparado aos outros grupos.

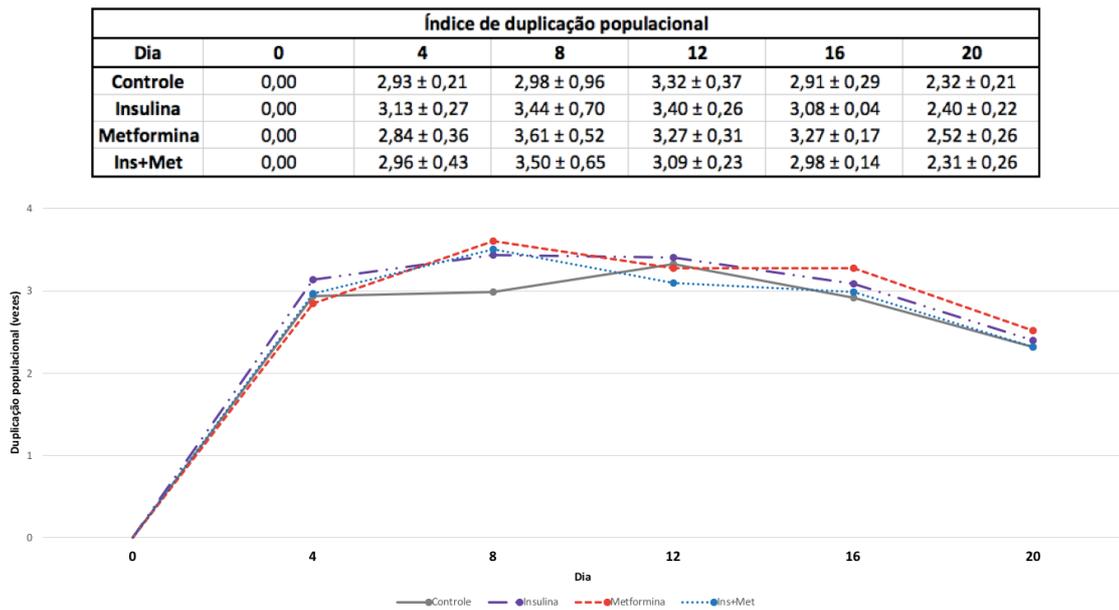


Figura 18: Índice de duplicação populacional (IDP) representando o número total de vezes em que a população celular duplicou em um espaço determinado de tempo. Contagem realizada a cada 72 horas de tratamento ao longo do período de 20 dias de cultivo. Dados descritivos representados em média \pm erro padrão. N=3. Ins+Met= insulina + metformina.

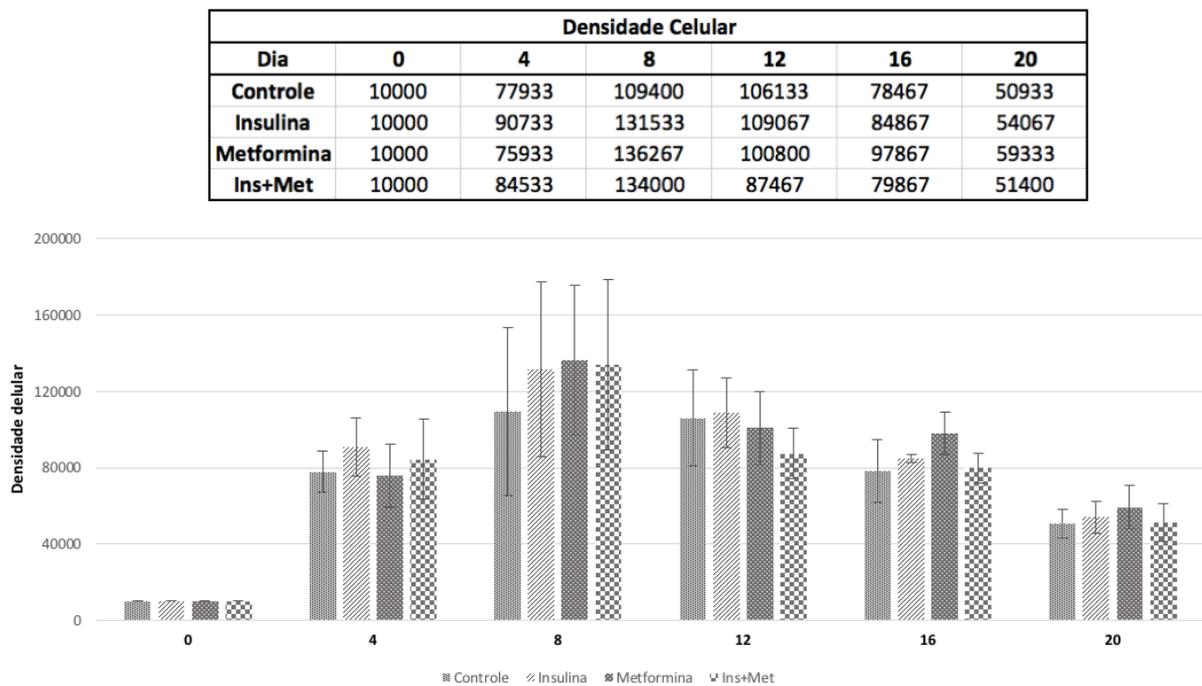


Figura 19: Densidade relativa celular nos diferentes grupos em cada intervalo de tratamento. Dados descritivos representados em média \pm erro padrão. N=3. Ins+Met= insulina + metformina.

Ao ser avaliado o efeito do tratamento de forma crônica, ou seja, ao longo do período de 20 dias, utilizando o IDPC, foi observado que inicialmente, nos três primeiros pontos, as células tratadas com insulina apresentaram maior padrão de crescimento celular comparado aos outros grupos (Figura 20). Entretanto, quando foram avaliadas as células tratadas isoladamente com metformina, foi observado que inicialmente após 72 horas de tratamento, estas células apresentaram menor crescimento comparado aos outros grupos, sendo modificado este padrão a cada nova contagem ao longo do tempo de tratamento. No segundo ponto (dia 8), as células tratadas com metformina já apresentaram um IDPC de 6,45 vezes em relação a 5,92 vezes das células do grupo controle. No próximo ponto (dia 12), essa população celular apresenta maior IDPC comparado tanto as células controle quanto as células que receberam tratamento concomitante. Contudo, nos dois últimos pontos (dia 16 e dia 20), as células tratadas isoladamente com metformina ultrapassaram o IDPC de todos os outros grupos de células, incluindo as células tratadas com insulina. Apresentando um IDPC de 15,50 vezes, seguido pelas células tratadas com insulina (15,34 vezes), as células que receberam tratamento simultâneo (14,68 vezes) e as células do grupo controle (14,49 vezes).

Índice de duplicação populacional cumulativo						
Dia	0	4	8	12	16	20
Controle	0,00	2,93 ± 0,21	5,92 ± 1,17	9,24 ± 1,52	12,04 ± 1,51	14,49 ± 1,40
Insulina	0,00	3,13 ± 0,27	6,57 ± 0,98	9,97 ± 1,23	12,90 ± 1,18	15,34 ± 0,99
Metformina	0,00	2,84 ± 0,36	6,45 ± 0,87	9,72 ± 1,19	12,94 ± 1,13	15,50 ± 0,89
Ins+Met	0,00	2,96 ± 0,43	6,47 ± 1,08	9,56 ± 1,31	12,33 ± 1,33	14,68 ± 1,09

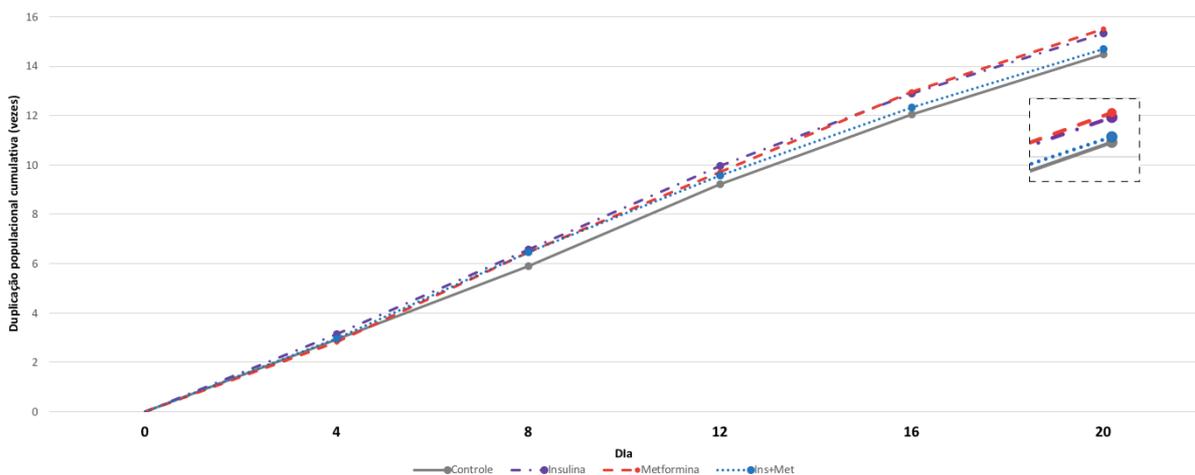


Figura 20: Índice de duplicação populacional cumulativo (IDPC) representando a soma do número total de vezes em que a população celular duplicou em um espaço determinado de tempo. Contagem realizada a cada 72 horas de tratamento ao longo do período de 20 dias de cultivo. Dados descritivos representados em média \pm erro padrão. N=3. Ins+Met= insulina + metformina.

Portanto, foi possível observar que não somente o marcador de proliferação celular Ki67 encontra-se mais expresso nas células tratadas com a dose de 0,1 mM de metformina durante 20 dias em uma condição com altos níveis de glicose, como também, foi possível observar que o índice de duplicação populacional cumulativo dessas células e a densidade celular encontra-se maior comparado aos outros grupos.

Ao ser avaliada a expressão relativa do mRNA de *mTOR* foi observado que os dados encontrados apresentam padrão de expressão similar aos dados de expressão do marcador de proliferação Ki67. O mTOR está relacionado ao crescimento e sobrevivência celular, e é definido como um alvo intracelular direto ou indireto, via AMPK, da metformina. Em uma condição com altos níveis de glicose, não foi possível observar uma diferença estatística de expressão do mRNA de *mTOR* entre os grupos quando as células foram tratadas durante o período de 72 horas. Contudo, o grupo tratado com insulina apresentou a expressão de 1,3-fold ($P=0,758$ em relação ao controle), enquanto as células tratadas com metformina isoladamente apresentaram uma expressão de 1,7-fold ($P=0,448$). Quando a insulina e a metformina foram administradas em conjunto, foi verificada uma expressão de 2,9-fold ($P=0,07$ em relação ao grupo controle) (Figura 21A). Entretanto, quando as células foram cultivadas durante o período de 20 dias (Figura 21B), o tratamento isolado com a metformina aumentou a expressão do mRNA de *mTOR* comparado ao grupo controle (FC=2,78; $P=0,027$). As células tratadas com insulina isoladamente (FC=1,95) e tratadas concomitantemente com insulina e metformina (FC=2,19) não apresentaram um aumento de expressão estatístico em relação ao grupo controle ($P=0,222$ e $P=0,129$ respectivamente). Em uma condição com níveis normais de glicose no meio, provavelmente em razão do número amostral pequeno, não foi possível observar diferença entre os grupos (Figura 21C,D).

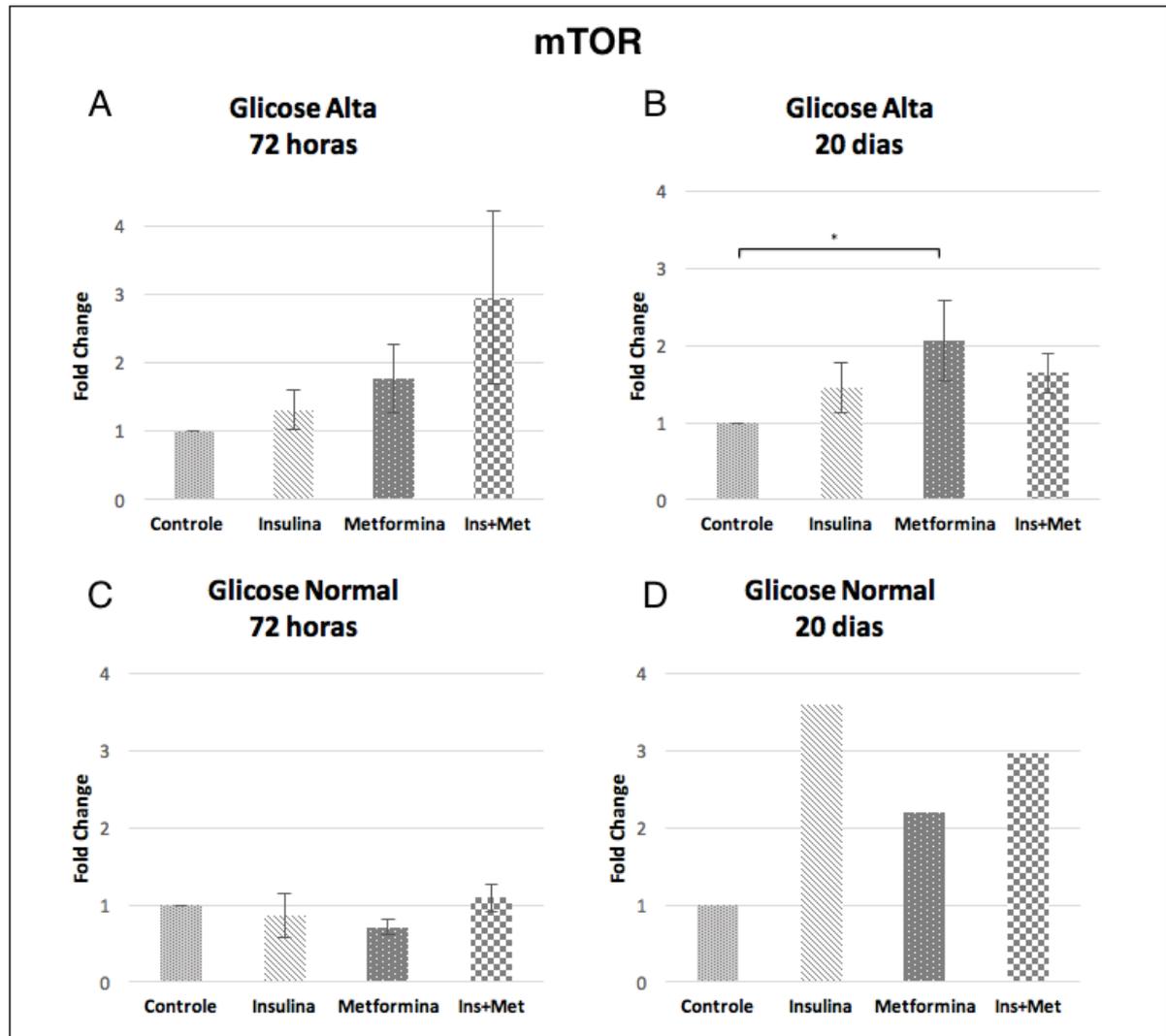


Figura 21: Expressão relativa do mRNA de *mTOR* nos diferentes grupos e tempos de tratamento. (A) Condição com altas concentrações de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=4. (B) Condição com altas concentrações de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; N=7; *P=0,027. (C) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=3. (D) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; dados descritivos N=1. A expressão do mRNA de *mTOR* foi normalizada pelo gene normalizador RPL0 e expressa em vezes. Média \pm erro padrão da média; Ins+Met= insulina + metformina.

- sobre via de progressão do câncer

Considerando que alterações na via de sinalização de Notch têm sido correlacionadas com a progressão de diversos tipos de câncer, incluindo câncer de endométrio, inicialmente foi avaliada a interação entre a via de sinalização de Notch e a via PI3K/AKT/mTOR através da plataforma *online* String. Em seguida, foi

avaliada, em condições com concentrações altas e normais de glicose, a expressão genica dos receptores transmembrana *NOTCH1* e *NOTCH3* e do ligante transmembrana *JAG1* em células de linhagem de câncer de endométrio quando submetidas a meio de cultura com concentrações elevadas de insulina e ao tratamento curto e longo com a dose de 0,1 mM de metformina.

A rede de interações entre os genes da via Notch e da via PI3K/AKT/mTOR executadas pela plataforma String está representada na figura 22. A rede foi construída associando ações moleculares entre os genes/proteínas *NOTCH1*, *NOTCH3*, *JAG1* e *mTOR* utilizando o alto nível de 0.7 de confiança e no máximo 10 interações. Existe interação entre as duas vias analisadas (Figura 22A), sendo a ação molecular de ligação presente diretamente entre *NOTCH1* e *mTOR* (Figura 22B).

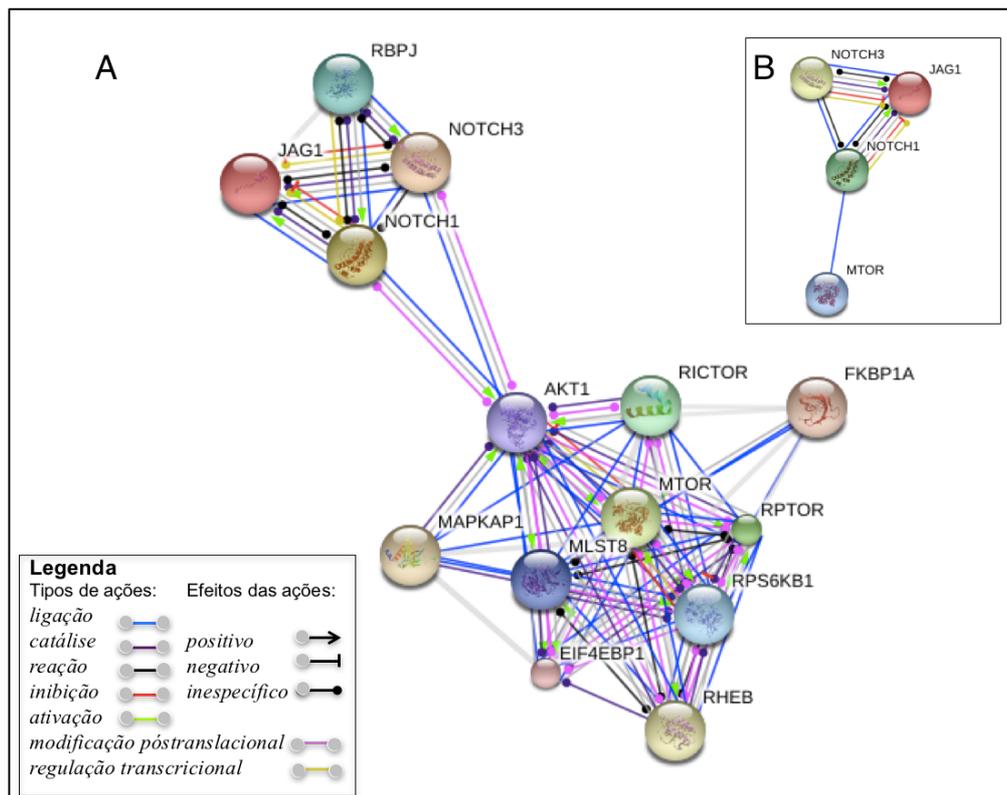


Figura 22: Rede de interação entre as vias de sinalização de Notch e PI3K/AKT/mTOR construída a partir da plataforma online String, (A) utilizando até 10 interações. (B) utilizando interação direta entre *NOTCH1*, *NOTCH3*, *JAG1* e *mTOR*.

Ao ser avaliada a expressão relativa do mRNA dos receptores transmembranas *NOTCH1*, *NOTCH3* e de seu ligante transmembrana *JAG1*, foi

observado um padrão de expressão semelhante entre esses genes. Em condições com altas concentrações de glicose no meio, não foi possível observar uma diferença estatística de expressão do mRNA de *NOTCH1* entre os grupos quando as células foram tratadas durante o período de 72 horas. O grupo tratado com insulina apresentou a expressão de 2,36-fold ($P=0,156$ em relação ao controle), enquanto as células tratadas com metformina isoladamente apresentaram uma expressão de 2,64-fold ($P=0,090$). No grupo tratado com insulina e metformina, foi verificado uma expressão de 2,71-fold ($P=0,077$ em relação ao controle) (Figura 23A). Entretanto, os experimentos crônicos em que as células de câncer de endométrio foram cultivadas durante 20 dias (Figura 23B), o tratamento isolado com a metformina aumentou o nível de expressão do receptor transmembrana *NOTCH1* (FC=3,40) comparado ao grupo controle ($P=0,022$). As células tratadas com insulina isoladamente (FC=2,18) e tratadas concomitantemente com insulina e metformina (FC=2,71) não apresentaram um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($P=0,238$ e $P=0,094$ respectivamente). Em uma condição com níveis normais de glicose no meio, não foi possível observar diferença entre os grupos tratados durante 72 horas (Figura 23C). Entretanto, os resultados dos níveis de expressão do mRNA de *NOTCH1* nas células cultivadas durante o período de 20 dias, demonstram que as células que foram tratadas com a insulina isoladamente apresentaram 3,78-fold de expressão, enquanto as células tratadas com 0,1 mM de metformina isoladamente apresentaram 3,55-fold. Contudo, as células que receberam o tratamento com insulina e metformina apresentaram 4,81-fold de expressão (Figura 23D).

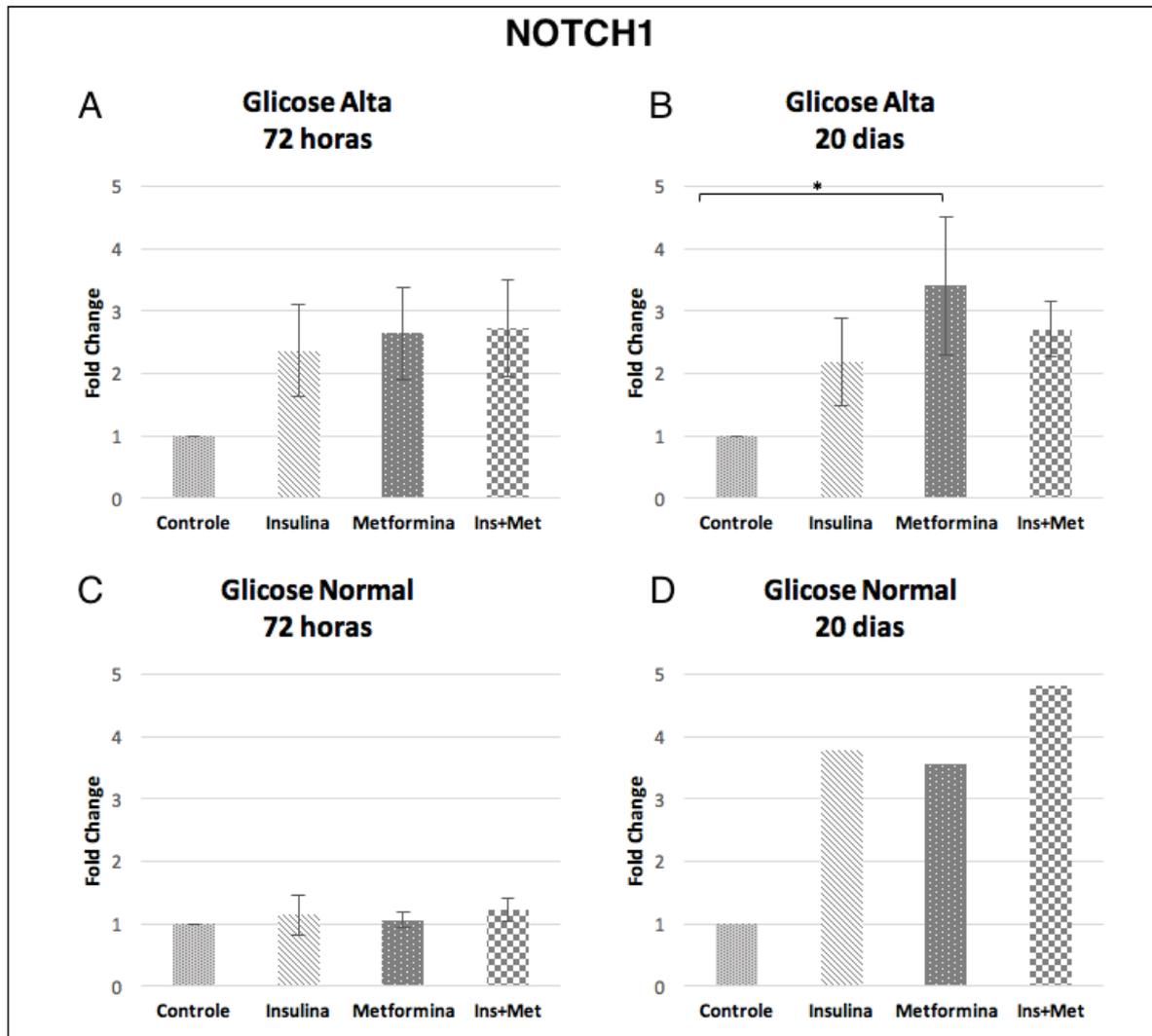


Figura 23: Expressão relativa do mRNA de *NOTCH1* nos diferentes grupos e tempos de tratamento. (A) Condição com concentrações altas de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=6. (B) Condição com concentrações altas de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; N=7; *P=0,022. (C) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=3. (D) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; dados descritivos N=1. A expressão do mRNA de *NOTCH1* foi normalizada pelo gene normalizador RPL0 e expressa aumento em *fold-change*. Média \pm erro padrão da média; Ins+Met= insulina + metformina.

Na figura 24 é possível observar a expressão do mRNA do receptor transmembrana *NOTCH3*. Quando as células de câncer de endométrio foram cultivadas em uma condição com altos níveis de glicose e tratadas durante o período de 72 horas, não foi possível observar uma diferença estatística sobre expressão de *NOTCH3* em relação ao controle quando as células foram tratadas com insulina ou

metformina isoladamente, apresentando 2,20-fold ($P=0,198$) e 2,59-fold ($P=0,095$) de expressão, respectivamente. Entretanto, quando as células foram tratadas com insulina e metformina, houve um aumento no nível de expressão de *NOTCH3* ($FC=3,01$; $P=0,038$) comparado ao grupo controle (Figura 24A). Durante o período de 20 dias de tratamento representado na figura 24B, as células tratadas isoladamente com metformina apresentaram um aumento da expressão de *NOTCH3* ($FC=2,78$; $P=0,027$) comparado ao grupo controle, entretanto, não foi possível observar um aumento significativo sobre a expressão deste gene quando as células foram tratadas apenas com insulina ($FC=1,95$; $P=0,222$) e com insulina e metformina ($FC=2,19$; $P=0,129$). Em uma condição com níveis normais de glicose, não foi possível observar diferença entre os grupos quando as células foram tratadas durante 72 horas (Figura 24C). Contudo, os dados demonstrativos dos níveis de expressão do mRNA de *NOTCH3* nas células cultivadas durante o período de 20 dias, demonstraram que as células que foram tratadas com a insulina isoladamente apresentaram 3,32-fold de expressão, enquanto as células tratadas com 0,1 mM de metformina isoladamente apresentaram 2,71-fold. Contudo, as células que receberam o tratamento com insulina e metformina apresentaram 3,46-fold (Figura 24D).

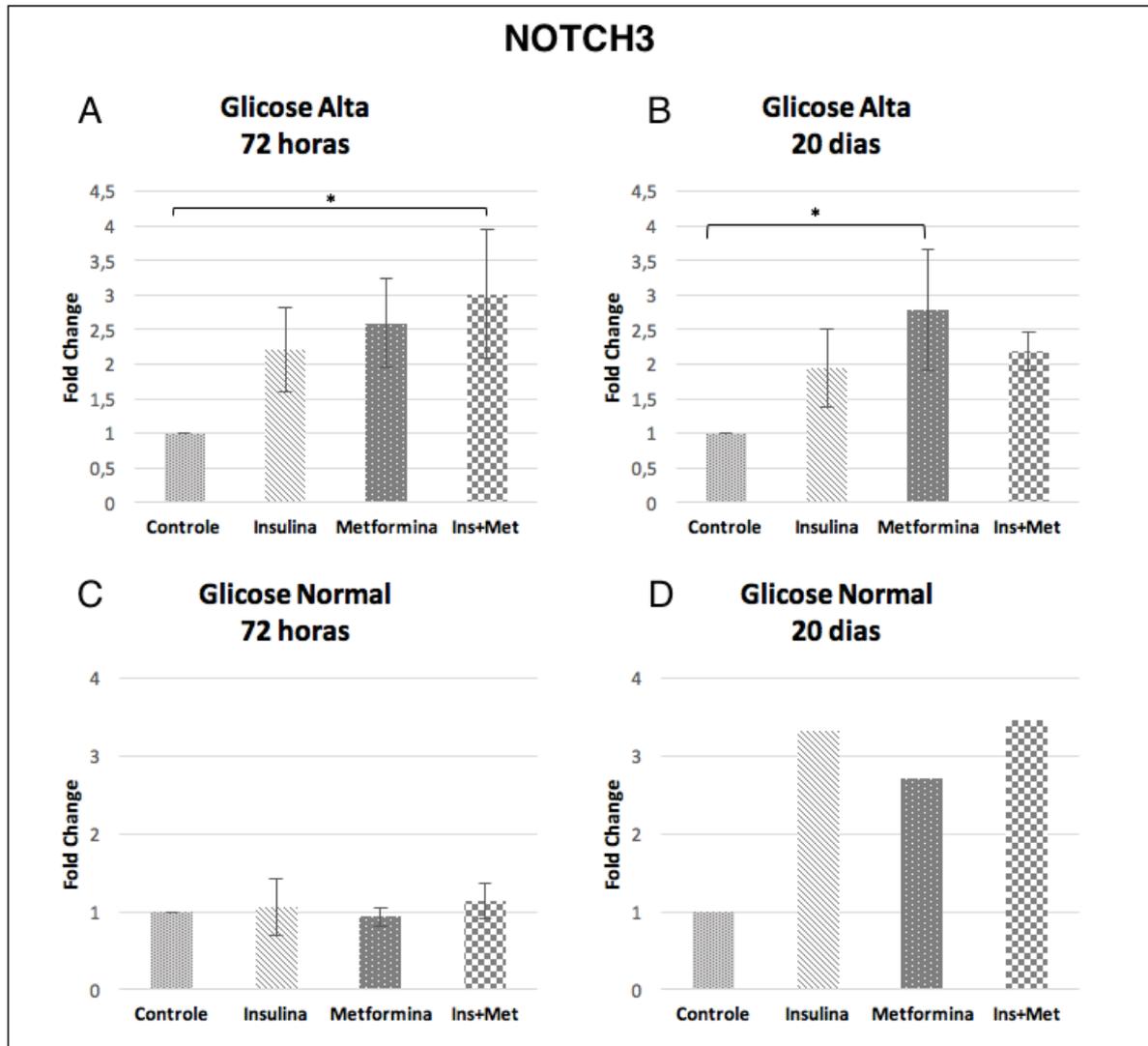


Figura 24: Expressão relativa do mRNA de *NOTCH3* nos diferentes grupos e tempos de tratamento. (A) Condição com altos níveis de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=6; *P=0,038. (B) Condição com concentrações altas de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; N=7; *P=0,027. (C) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=3. (D) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; dados descritivos N=1. A expressão do mRNA de *NOTCH3* foi normalizada pelo gene normalizador RPL0 e expressa em *fold-change*. Média \pm erro padrão da média; Ins+Met= insulina + metformina.

Os dados de expressão do mRNA do ligante transmembrana *JAG1* estão representados na figura 25. Independente da condição da concentração de glicose e tempo de tratamento, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Contudo, o padrão de expressão deste gene foi semelhante ao padrão de expressão

dos receptores transmembrana *NOTCH1* e *NOTCH3* representados nas figuras 23 e 24 respectivamente, porém de forma menos intensa.

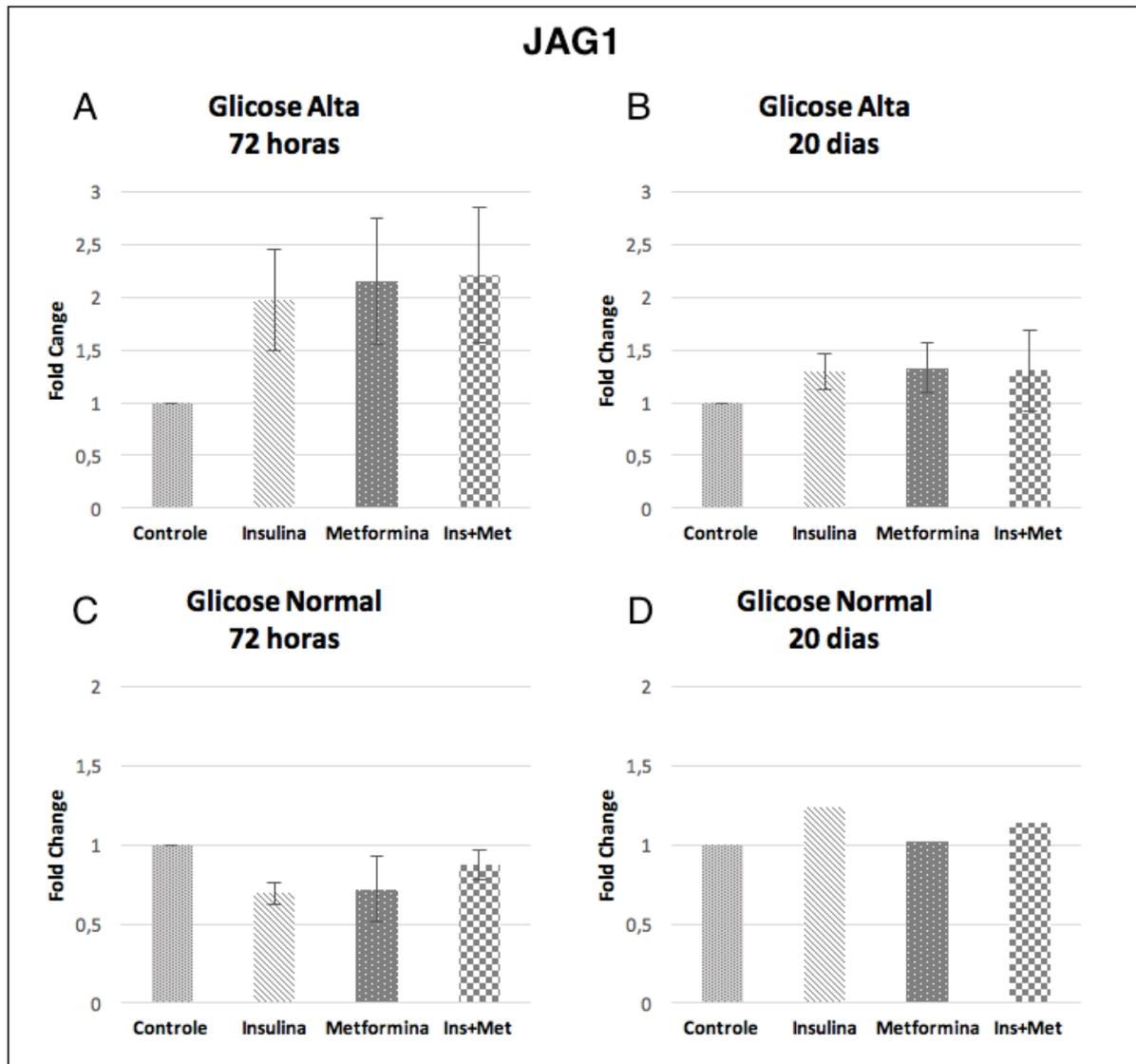


Figura 25: Expressão relativa do mRNA de *JAG1* nos diferentes grupos e tempos de tratamento. (A) Condição com concentrações altas de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=6. (B) Condição com concentrações altas de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; N=7. (C) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 72 horas; N=3. (D) Condição com níveis normais de glicose e tratamento realizado durante 20 dias; dados descritivos N=1. A expressão do mRNA de *JAG1* foi normalizada pelo gene normalizador *RPL0* e expressa em *fold change*. Média \pm erro padrão da média; Ins+Met= insulina + metformina.

Discussão

O comportamento celular é modulado pelo ambiente, o qual pode gerar alterações sobre a expressão de vários genes envolvidos na fisiologia celular, alterando a síntese de proteínas, que podem ter um impacto negativo. A compreensão dos mecanismos intracelulares envolvidos na fisiopatologia do câncer de endométrio é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que atuem sobre vias de sobrevivência, crescimento, proliferação, motilidade e apoptose celular. Estudos demonstraram que células de câncer de endométrio, muitas vezes, apresentam alterações na fosfatase do cromossomo 10 da via de sinalização [PTEN]/Akt/mTOR, principalmente devido a inativação ou mutações no PTEN, amplificação da subunidade catalítica da PI3K e superexpressão do mTOR (Oda *et al.*, 2005; Velasco *et al.*, 2006; Gadducci *et al.*, 2011).

Diversos autores sugeriram que a metformina pode atuar na prevenção e no tratamento de diferentes tipos de câncer, porém muitos detalhes sobre a ação da metformina e dos mecanismos moleculares envolvidos ainda não estão bem esclarecidos (Sarfstein *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2014; He *et al.*, 2015; Kato *et al.*, 2015). Uma importante revisão publicada em 2014, (Pernicova *et al.*, 2014) com o objetivo de discutir e analisar as potenciais implicações das recentes descobertas sobre os mecanismos de ação da metformina, sumarizou as possíveis ações propostas na literatura. Acredita-se que o efeito antitumoral da metformina é exercido pela combinação dos efeitos indiretos (sistêmicos) e diretos. A influência do efeito sistêmico parece ser secundária as ações diretas da metformina nos tecidos alvos sensíveis à insulina. Sistemicamente, a metformina reduz os níveis de glicose e insulina, o que pode diminuir o crescimento e progressão do tumor mediado pela ação da insulina. Os possíveis efeitos anti-inflamatórios interpostos pela metformina também podem reduzir o risco de câncer. Diretamente, a metformina pode inibir o mTORC1 em vários níveis de regulação. Baixa carga de energia em células de câncer tratadas com metformina ativa a AMPK, a qual ativa o gene supressor tumoral TSC2, resultando na inibição do mTORC1, contendo o crescimento e proliferação celular. A metformina pode também diminuir a sinalização *downstream* entre os receptores de IGF-1 e insulina, através da diminuição dos níveis de insulina e da fosforilação AMPK-dependente do IRS-1, conseqüentemente, inibindo a sinalização da via PI3K/AKT/mTOR. Além disso, tem sido sugerido que a AMPK

pode atuar na inibição das células de câncer através de numerosos outros mecanismos, incluindo supressão da síntese de ácidos graxos. Contudo, a metformina pode inibir o mTORC1 independentemente da fosforilação da AMPK, através da inativação direta do complexo Ragulator, resultando na inibição de RAG GTPases e dissociação do mTORC1 do ativador RHEB (Pernicova *et al.*, 2014). Em células de câncer de endométrio, devido à elevada prevalência de mutações no PTEN levando a expressão constitutiva da Akt, o mecanismo de ação da metformina atuando através da ativação da AMPK ou independentemente, parece ser uma estratégia atraente para a prevenção e tratamento desta neoplasia.

Considerando os achados no capítulo anterior, onde um ambiente com altos níveis de glicose conferiu maior resistência para as células de câncer de endométrio, e a concentração de 0,1 mM de metformina foi capaz de reduzir a ação da insulina sobre o potencial metastático destas células, sem diminuir a proliferação (De Barros Machado *et al.*, 2016), motivou no presente capítulo, ser investigado o efeito intracelular desta dose de 0,1 mM de metformina sobre vias de proliferação e crescimento celular, assim como sobre vias de progressão do câncer de endométrio quando realizado o tratamento a curto e a longo prazo na presença de diferentes níveis de glicose. Neste estudo, foi considerado que com o tratamento curto, durante 72 horas, normalmente utilizado nos estudos experimentais, é possível avaliar o efeito agudo do tratamento, e, no tratamento longo, durante 20 dias, é possível avaliar o efeito crônico do tratamento sobre as células.

O efeito do tratamento intracelular sobre a proliferação e crescimento celular pode ser avaliado pela expressão relativa do mRNA de *MKi67* e *mTOR*. A expressão de Ki67 é fortemente associada ao crescimento e proliferação tumoral. O fato de estar presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) e não na fase de repouso (G0) faz do Ki67 um excelente marcador para determinar a fração do crescimento de uma população celular sendo amplamente utilizado na rotina anatomopatológica de investigação tumoral (Li, L. T. *et al.*, 2015). Entretanto, apesar da quantificação da expressão de Ki67 ser útil e facilmente utilizada como um biomarcador tumoral, para câncer de endométrio ainda não está bem estabelecido (Sivalingam *et al.*, 2016). Já o mTOR possui papel fundamental no crescimento e metabolismo celular. A ativação exagerada da sinalização de mTOR,

conforme descrito por Hanahan e Weinberg, está associada ao crescimento, angiogênese e metástase tumoral (Hanahan *et al.*, 2011).

O impacto do uso da metformina no crescimento tumoral tem sido avaliado *in vivo* utilizando estudos com janela pré-cirúrgica, onde a expressão do marcador de proliferação Ki67 é mensurada no tecido, antes e depois do tratamento com metformina, em pacientes aguardando cirurgia para retirada do câncer de mama (Hadad *et al.*, 2011; Bonanni *et al.*, 2012; Niraula *et al.*, 2012), próstata (Joshua *et al.*, 2014) e endométrio (Laskov *et al.*, 2014; Mitsunashi *et al.*, 2014; Schuler *et al.*, 2015). Os estudos com pacientes com câncer de endométrio relatam que o uso da metformina durante 2 a 4 semanas antes da cirurgia reduziu a expressão de Ki67 em tumores endometriais (Laskov *et al.*, 2014; Mitsunashi *et al.*, 2014; Schuler *et al.*, 2015). Porém, nestes estudos, não foi possível atribuir essas mudanças ao uso da metformina devido a ausência de grupo controle. Recentemente, Sivalingam e colaboradores, publicaram um estudo onde eles avaliaram o efeito pré-cirúrgico da dose máxima de metformina utilizada clinicamente durante o período de 7 a 30 dias em pacientes com câncer de endométrio. Neste estudo, as análises não foram realizadas somente entre o tecido pré- e pós-tratamento, mas também foi comparado com um grupo controle não tratado. Os autores observaram que houve uma redução da expressão de Ki67 nos pacientes que fizeram o uso da metformina. Entretanto, a redução da fosforilação da via PI3K/AKT/mTOR observada foi demonstrada tanto no grupo tratado com metformina como no não tratado (Sivalingam *et al.*, 2016).

Contudo, não se sabe se as doses de metformina utilizadas em pacientes diabéticos são suficientes para apresentar um efeito antineoplásico *in vivo*. Em estudos experimentais *in vitro*, concentrações dezenas de vezes maiores do que as utilizadas clinicamente são necessárias para inibir a via PI3K/AKT/mTOR em células de linhagem de câncer (Cantrell *et al.*, 2010; Zakikhani *et al.*, 2010; Sarfstein *et al.*, 2013). Cantrell e colaboradores, avaliaram o efeito de doses crescentes de metformina (0,01 – 5 mM) em duas linhagens de câncer de endométrio, expostas a meio de cultura com níveis normais de glicose e sugeriram que a metformina induz a fosforilação da proteína AMPK e p70S6K, sendo a segunda proteína um alvo *downstream* da via do mTOR (Cantrell *et al.*, 2010). Entretanto, esses dados não

estão apresentados de forma estatística e somente é possível perceber alguma diferença a partir da concentração de 2 mM de metformina.

No presente estudo, foi observado que o perfil da expressão relativa do mRNA do marcador de proliferação *MKi67* e do *mTOR* foi similar. Em um ambiente com concentração alta de glicose, ao ser avaliado o efeito do tratamento de forma aguda (72 horas), foi observado que o tratamento com a insulina aumentou, sem atingir significância estatística, os níveis de expressão de *MKi67* e *mTOR* (42 % e 30 %, respectivamente) enquanto o tratamento isolado com a metformina aumentou também não significativamente 63 % e 70 % a expressão desses genes. Porém, quando a insulina e a metformina foram administradas em conjunto, a expressão do gene *MKi67* foi potencializada de forma acentuada, atingindo significância. Quando avaliado o efeito agudo sobre a densidade celular, foi observado que o tratamento com a insulina atuou estimulando a proliferação das células de câncer de endométrio, enquanto, diferentemente dos níveis de expressão gênica, as células tratadas apenas com metformina apresentaram uma densidade celular 3 % menor que as células controle, e 17 % menor que as células tratadas com insulina. E, que quando administrada com a insulina, a metformina foi capaz de inibir a ação proliferativa da insulina, diminuindo 7 % a densidade celular. Entretanto, esta discordância nos resultados pode ter sido consequência de eventos intracelulares pós-tradução, sendo necessário a realização de uma análise de expressão proteica para a confirmação dos dados de expressão gênica. Além disso, no capítulo I não foi possível observar este efeito inibitório da dose de 0,1 mM de metformina sobre a ação proliferativa da insulina, mas é preciso considerar que os ensaios experimentais utilizados apresentam princípios diferentes, e os dados de densidade celular estão representados de forma descritiva.

Entretanto, ao ser avaliado o efeito do tratamento crônico ao longo de 20 dias, foi observado que a insulina continuou ao longo do tempo estimulando a proliferação e crescimento celular. No entanto, o tratamento com a metformina isoladamente na concentração de 0,1 mM aumentou fortemente a expressão dos marcadores de proliferação e crescimento celular, em 170 e 178 %, respectivamente, sugerindo que as células de câncer de endométrio não somente foram resistentes a essa dose de metformina, como também responderam com um aumento acentuado da proliferação e agressividade celular. Para confirmar este

efeito sobre a expressão do mRNA, foi avaliado o padrão de crescimento e resposta das células ao longo de 20 dias nos diferentes tratamentos utilizando o protocolo para a determinação do IDP. Este protocolo permite avaliar o efeito de um determinado tratamento sobre uma população específica celular, pois ao longo das contagens e semeaduras, as células que não resistem ao tratamento morrem. Os dados encontrados corroboram com os dados de expressão gênica, onde as células tratadas isoladamente com a metformina no final dos 20 dias de cultivo apresentaram maior índice de duplicação populacional e cumulativo comparado aos outros grupos, seguido pelas células tratadas com insulina. Foi possível observar que ao longo das passagens parece ocorrer uma seleção de células resistentes ao tratamento com metformina, e que a dose de 0,1 mM de metformina não foi eficiente para inibir a proliferação celular, e paradoxalmente, aumentaram drasticamente a proliferação. Contudo, quando administrados em conjunto, o efeito de resistência das células ao tratamento ocorre de forma mais branda comparado ao efeito isolado da insulina e do tratamento com metformina, nos desafiando a inferir que na presença de insulina as estratégias e mecanismos utilizados pelas células de câncer de endométrio são mais restritos comparado aos utilizados em resposta ao tratamento isolado com a metformina. Para entender estes mecanismos e estratégias, serão necessárias mais análises.

Foi observado que a via de crescimento celular PI3K/Akt/mTOR apresenta interação com a via Notch, e ao serem avaliados os efeitos dos tratamentos sobre a via do Notch foi observado um padrão similar de expressão dos marcadores de proliferação e crescimento celular. Mitsuhashi e colaboradores, avaliaram por imunohistoquímica a expressão dos receptores transmembranas NOTCH1 e NOTCH3, e de seus ligantes JAG1 e DLL4 em tecido endometrial neoplásico e normal, e demonstraram que o tecido tumoral apresenta maior expressão dessas proteínas (Mitsuhashi *et al.*, 2012). Por outro lado, Lio e colaboradores, observaram que SHARP1 (*Enhancer-of-split and hairy-related protein 1*), um fator básico de transcrição que atua como supressor tumoral, inibiu a migração e invasão de células de câncer de endométrio a partir da regulação da sinalização do NOTCH1, sugerindo que a superexpressão da via do Notch confere fenótipo mais agressivo para estas células (Liao *et al.*, 2014).

Em uma condição com níveis normais de glicose no meio, devido ao baixo número amostral não foi possível concluir e sugerir os efeitos dos tratamentos. Entretanto, Han e colaboradores recentemente avaliaram, em duas linhagens de células de câncer de endométrio, o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre a expressão de proteínas relacionadas a via de sinalização de crescimento, proliferação e progressão celular. Foi demonstrado que ambiente com altas concentrações de glicose ativa a via de sinalização da Akt/mTOR/S6 e a via da MAPK, assim como, aumenta a expressão de snail o qual atua regulando a expressão de E-caderina, aumentando a motilidade e habilidade de invasão celular, sugerindo que a hiperglicemia isoladamente contribua para o desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio (Han *et al.*, 2015).

É fundamental avaliar o efeito intracelular *in vitro* de concentrações de metformina utilizadas clinicamente, pois a concentração de metformina encontrada no tecido endometrial equivale a 20 % da concentração encontrada no plasma, correspondendo a concentrações 400 vezes menores das concentrações que demonstraram efeito *in vitro* (Mitsubishi *et al.*, 2014). Neste estudo, altas concentrações de glicose constituíram um ambiente propício para que as células de câncer de endométrio apresentassem resistência ao efeito a longo prazo do tratamento com a dose de 0,1 mM de metformina e expressassem um genótipo mais agressivo. Demonstrando, portanto, a importância de alvos terapêuticos que atuem no metabolismo da glicose como potenciais estratégias para a prevenção e tratamento do câncer de endométrio. A dose ótima de metformina com efeitos antineoplásicos ainda não está definida para estudos clínicos (Sivalingam *et al.*, 2016), entretanto, uma possível explicação para resultados *in vivo* tão promissores é a atuação em conjunto dos mecanismos indiretos e diretos da metformina, onde ao diminuir os níveis séricos de glicose e insulina o ambiente celular torna-se mais favorável para a atuação da metformina diretamente na célula.

CAPÍTULO III

Estabelecimento de um modelo de cocultura de endométrio tridimensional *in vitro*

Objetivo Geral

Construção de um modelo de cocultura de endométrio tridimensional viável durante 20 dias de cultivo.

Objetivos específicos

- Padronizar um modelo 3D de cocultura primária de endométrio que permaneça viável durante 20 dias de cultivo;

- Padronizar um modelo 3D de cocultura de células de linhagem de câncer de endométrio que permaneça viável durante 20 dias de cultivo.

Hipótese

É possível o desenvolvimento de uma camada endometrial em uma matriz extracelular temporária, que permaneça viável durante 20 dias de cultivo.

Método

Delineamento

Foi realizado um estudo experimental *in vitro*.

Pacientes

As células epiteliais primárias de endométrio foram provenientes de pacientes ($33,6 \pm 4,3$ anos) submetidas à histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), cuja indicação foi independente deste estudo. As pacientes foram informadas que as células endometriais normalmente são descartadas e permitiram, mediante assinatura de consentimento livre e esclarecido (TCLE 14-0267, Anexo 1), a utilização deste material na pesquisa. Foram excluídas do estudo pacientes pós-menopausa, pacientes diabéticas e pacientes com neoplasias.

Isolamento das células endometriais estromais e epiteliais

O protocolo de dissociação do tecido endometrial foi realizado conforme descrito no capítulo I. Entretanto, após o isolamento, as células estromais foram suspendidas com meio DMEM suplementado com 1 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina 0,5 mg/mL) e 10 % de soro bovino fetal, enquanto as células epiteliais foram suspendidas com meio DMEM/F12 suplementado com 1 % de antibiótico (penicilina/estreptomicina 0,5 mg/mL) e 5 % de soro bovino fetal.

Linhagem de câncer de endométrio

As células epiteliais de câncer de endométrio foram provenientes da linhagem celular de adenocarcinoma endometrial tipo I - Ishikawa (Sigma-Aldrich, Alemanha). As células foram cultivadas com meio MEM, suplementado com 5 % de soro fetal bovino, 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina 0,5 mg/mL), 1% NEAA (*Non-Essential Amino Acid* - Sigma Aldrich, Alemanha).

Cultivo celular

Inicialmente as células foram cultivadas separadamente em garrafa de cultura (125 cm² - Greiner Bio-One GmbH, Alemanha) e incubadas em estufa (SANYO, Japan) a 37°C com atmosfera úmida e adição automática de 5% de CO₂. A diferenciação e proliferação celular foi observada a cada 24 horas em microscópio invertido (Axyover, Carl Zeis Jena, Alemanha) até que a monocamada de células atingisse aproximadamente 80 % de confluência.

Construção do modelo 3D de cocultura de endométrio

As células em cultivo foram liberadas das garrafas com o uso da enzima tripsina. As células em suspensão, antes da semeadura, foram submetidas a um teste de viabilidade por coloração com azul de Tripán e contagem em hemocítômetro. O protocolo de construção do modelo 3D de endométrio foi adaptado dos estudos de Park e colaboradores e Zhu e colaboradores, representado esquematicamente na figura 26 (Park *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2012). Inicialmente, as células estromais (2×10^5 céls./mL) foram misturadas, utilizando meio sem soro, com uma matriz extracelular temporária Matrigel® (Matrigel® *Matrix Growth Factor Reduced*, BD Biosciences, USA), depositadas em uma placa de cultivo de 24 poços (285 µl/poço), e incubadas a 37°C para promover a solidificação. Após o período de 2 horas, as células epiteliais primárias ou de linhagem de câncer de endométrio na concentração de 1×10^5 céls./mL em um volume de 100 µl foram semeadas no topo do complexo matriz-célula e incubado por 16 horas. No dia seguinte, foi adicionado meio DMEM/F12 sem soro suplementado com 1% de antibiótico, e o modelo de cocultura 3D foi cultivado durante o período de 20 dias, sendo realizada a troca de meio a cada 48 horas. A morfologia, diferenciação e crescimento celular foi observado a cada 24 horas em microscópio invertido (Axyover 25, Carl Zeis Jena, Germany).

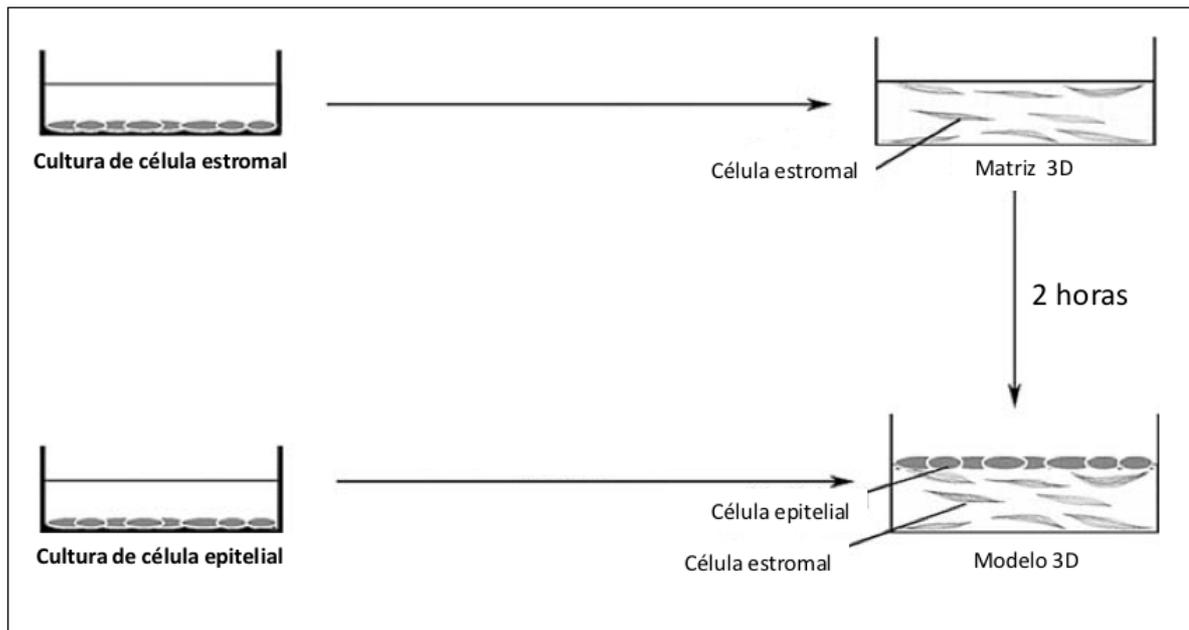


Figura 26: Representação esquemática da construção do modelo tridimensional de cocultura de endométrio.

Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para a demonstração da arquitetura do modelo de cultura de endométrio 3D. Para imunofluorescência o modelo 3D foi desenvolvido em uma câmara de 8 poços (Nunc Lab-Tek Chamber Slides system – Sigma-Aldrich, Alemanha). Marcadores de citoesqueleto específicos foram utilizados para demonstrar a presença de células epiteliais (anticitoqueratina) e células estromais (antivimentina).

O modelo 3D foi inicialmente fixado com formalina por 5 minutos em temperatura ambiente, após este período foram realizadas duas lavagens com 5% de BSA (Albumina de soro bovino - Sigma-Aldrich, Alemanha). As células foram permeabilizadas com solução de 0,2% Triton-PBS por 10 minutos e lavadas novamente duas vezes. Após, as células foram incubadas com anticorpos anticitoqueratina e antivimentina diluídos 1:200 (Abcam, USA) por 16 horas a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e incubadas com Hoechst (1:2000; Abcam, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem, a coloração da imunofluorescência foi visualizada usando microscópio confocal (Olympus, Japão). As imagens foram analisadas utilizando o software FluoView (Olympus).

Locais de realização

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, instalado no Departamento de Fisiologia, UFRGS, e no Laboratório de Endométrio e Implantação instalado no Departamento de Ginecologia Endócrina e Medicina Reprodutiva, Hospital de Heidelberg, Alemanha.

Resultados

Na literatura encontra-se diferentes protocolos de realização de modelos 3D de cocultura de células de endometriais, os quais utilizam diferentes componentes e matrizes extracelulares (Park *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Wang, H. *et al.*, 2013; Buck *et al.*, 2015). Neste capítulo é descrito como o modelo de cocultura de endométrio, viável por 20 dias de cultivo, utilizando Matrigel® como matriz extracelular temporária, foi estabelecido.

Como ilustrado na figura 27 as células epiteliais e estromais endometriais primárias apresentam morfologia diferentes, o que é compatível com a função que desempenham. Quando cultivadas diretamente no plástico da placa de cultivo, as células epiteliais apresentam morfologia cuboide, em verticilo, proliferam em torno de um centro comum, formando agrupamentos (*clusters*). O cultivo com células epiteliais apresentou uma pureza de 97 % (Figura 27A). Por outro lado, as células estromais apresentam morfologia característica de fibroblastos, são fusiformes e estreladas, e apresentaram uma pureza de 99 % (Figura 27B). O cultivo das células isoladamente não ultrapassou o período de 7 dias, pois as células epiteliais após este período apresentavam muitos vacúolos e um aumento da contaminação com células estromais.

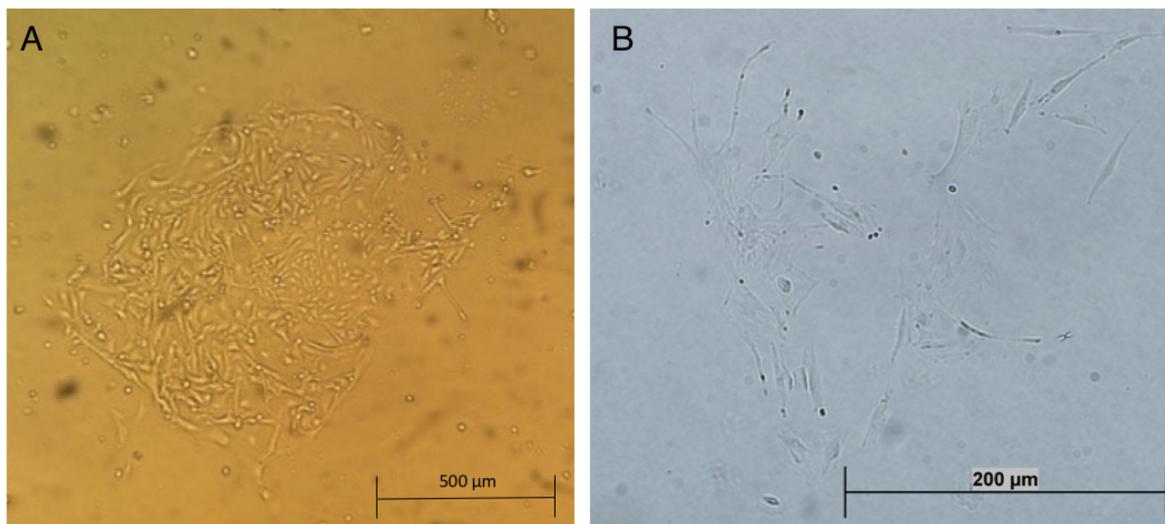


Figura 27: Morfologia característica das células (A) epiteliais (B) estromais endometriais primárias.

Inicialmente, foi padronizado o modelo 3D de cocultura utilizando células primárias de endométrio. O protocolo de construção do modelo foi adaptado dos estudos de Park e colaboradores e Zhu e colaboradores (Park *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2012). No presente estudo, foram misturadas as células estromais somente com a matriz hidrogel Matrigel®, finalizando uma concentração de 90 %. O modelo de cocultura 3D de células primárias de endométrio nos diferentes dias de cultivo está representado na figura 28.

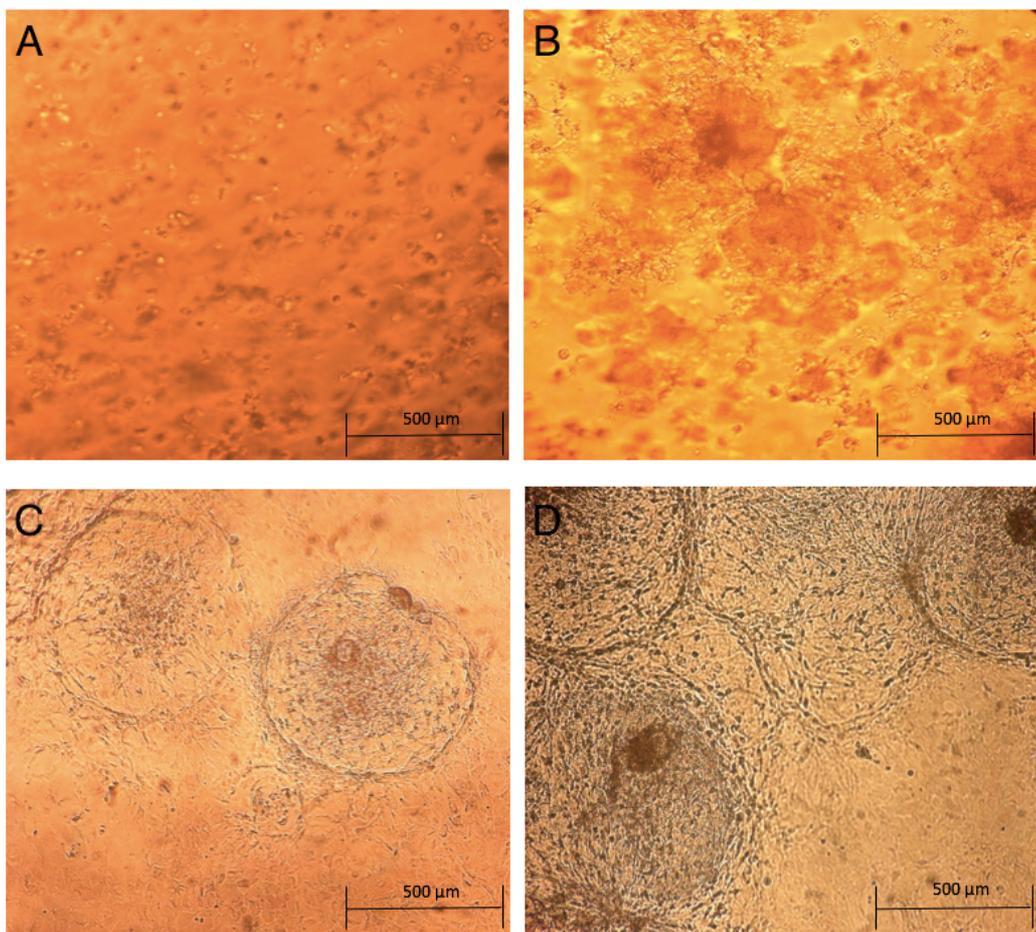


Figura 28: Organização morfológica do modelo de co-cultura tridimensional utilizando célula endometriais primárias ao longo de 20 dias de cultivo. (A) Dia 1 de cultivo. (B) Dia 5 de cultivo. (C) Dia 15 de cultivo. (D) Dia 20 de cultivo. Imagem registrada por microscópio invertido.

No dia 1 de cultivo, as células encontram-se aderidas na matriz, porém ainda na morfologia circular, sem apresentar grau de diferenciação (Figura 28A). No dia 5 de cultivo, as células apresentam maior grau de diferenciação invasão na

matriz extracelular (Figura 28B). No dia 15 de cultivo, as células epiteliais formam estruturas complexas de células agregadas (Figura 28C), as quais é possível observar a formação desde o dia 8 de cultivo. No dia 20 de cultivo, as células permanecem viáveis, proliferando, houve um aumento no número das estruturas complexas, sendo possível a visualização de uma organização celular ao redor destas estruturas, sugerindo a presença de estruturas glandulares contendo a formação de um lúmen internamente (Figura 28D). Em razão do modelo ser constituído por uma camada espessa e concentrada de Matrigel®, a observação das células estromais somente foi possível com a mudança do foco do microscópio, que permite a visualização das camadas internas do modelo. Entretanto, as células estromais apresentam-se diferenciadas desde o dia 1 de cultivo, proliferando e permanecendo viáveis durante os 20 dias de cultivo.

A coloração com marcadores de citoesqueleto específicos para cada tipo celular foi realizada para a confirmação da correta arquitetura do modelo tridimensional utilizando células epiteliais e estromais de endométrio. A imunofluorescência foi visualizada utilizando microscópio confocal. Conforme ilustrado na figura 29, no protocolo utilizado somente foi possível a marcação dos núcleos celulares. Entretanto, apesar da não marcação específica do citoesqueleto, é possível observar mais claramente o padrão de organização celular das estruturas complexas formadas pelas células epiteliais, sugerindo fortemente que neste modelo a formação de estruturas glandulares a partir das células epiteliais primárias foi possível, exibindo uma formação apropriada de contato célula-célula e célula-matriz extracelular. Contudo, não foi possível observar se as estruturas foram compostas somente por células epiteliais, assim como, não foi possível, neste protocolo, confirmar a correta arquitetura do modelo 3D de cocultura com o padrão estrutural proposto.

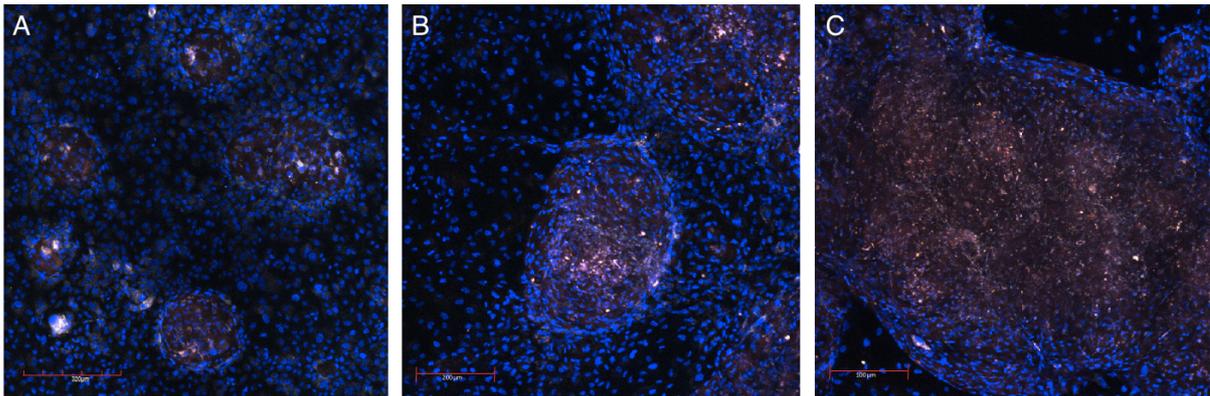


Figura 29: Imunofluorescência do modelo tridimensional de cocultura utilizando célula endometriais primárias no dia 20 de cultivo. Para a marcação das células epiteliais foi utilizado o anticorpo primário anti-citoqueratina e o anticorpo secundário específico marcado com o fluoróforo Cy3 (verde). Para a marcação das células estromais foi utilizado o anticorpo primário anti-vimentina e o anticorpo secundário marcado com o fluoróforo rodamina (vermelho). Os núcleos foram marcados com Hoechst (azul).

Para a construção do modelo 3D de cocultura de câncer de endométrio considerando que não foi possível visualizar a marcação de imunofluorescência para a confirmação da arquitetura do modelo primário, optou-se por diminuir a concentração final da mistura de células estromais com a Matrigel® para 50 %. Entretanto, ao realizar o protocolo de marcação em uma concentração final de 50 %, a matriz extracelular de hidrogel diluiu-se completamente, perdendo a estrutura tridimensional do modelo. Diversas tentativas foram realizadas, utilizando estratégias diferentes, como utilização de anticorpo conjugado, incubação a 37°C, entre outras. Contudo, conforme ilustrado na figura 30, pode-se observar a arquitetura registrada em microscópio invertido do modelo 3D de cocultura de câncer de endométrio. Para a construção deste modelo, foi utilizada células estromais primárias e células epiteliais de linhagem de câncer de endométrio. No dia 1 de cultivo, as células estromais apresentam-se diferenciadas e as células epiteliais de câncer de endométrio já formam pequenos agrupamentos (*clusters*) (Figura 30A). No dia 5 de cultivo, as células epiteliais organizam-se em estruturas complexas de aglomerados celulares ocorrendo algumas junções iniciais destas estruturas (Figura 30B). No dia 15 de cultivo, observa-se que as estruturas complexas formadas pelas células epiteliais se encontram conectadas (Figura 30C), sendo visualizado de forma mais expressiva no dia 20 de cultivo (Figura 30D). É possível observar que as células

estromais também continuaram proliferando ao longo dos 20 dias cultivo, apresentando uma morfologia bem alongada, fusiforme, onde seus filamentos em alguns pontos tocam o filamento das outras células estromais.

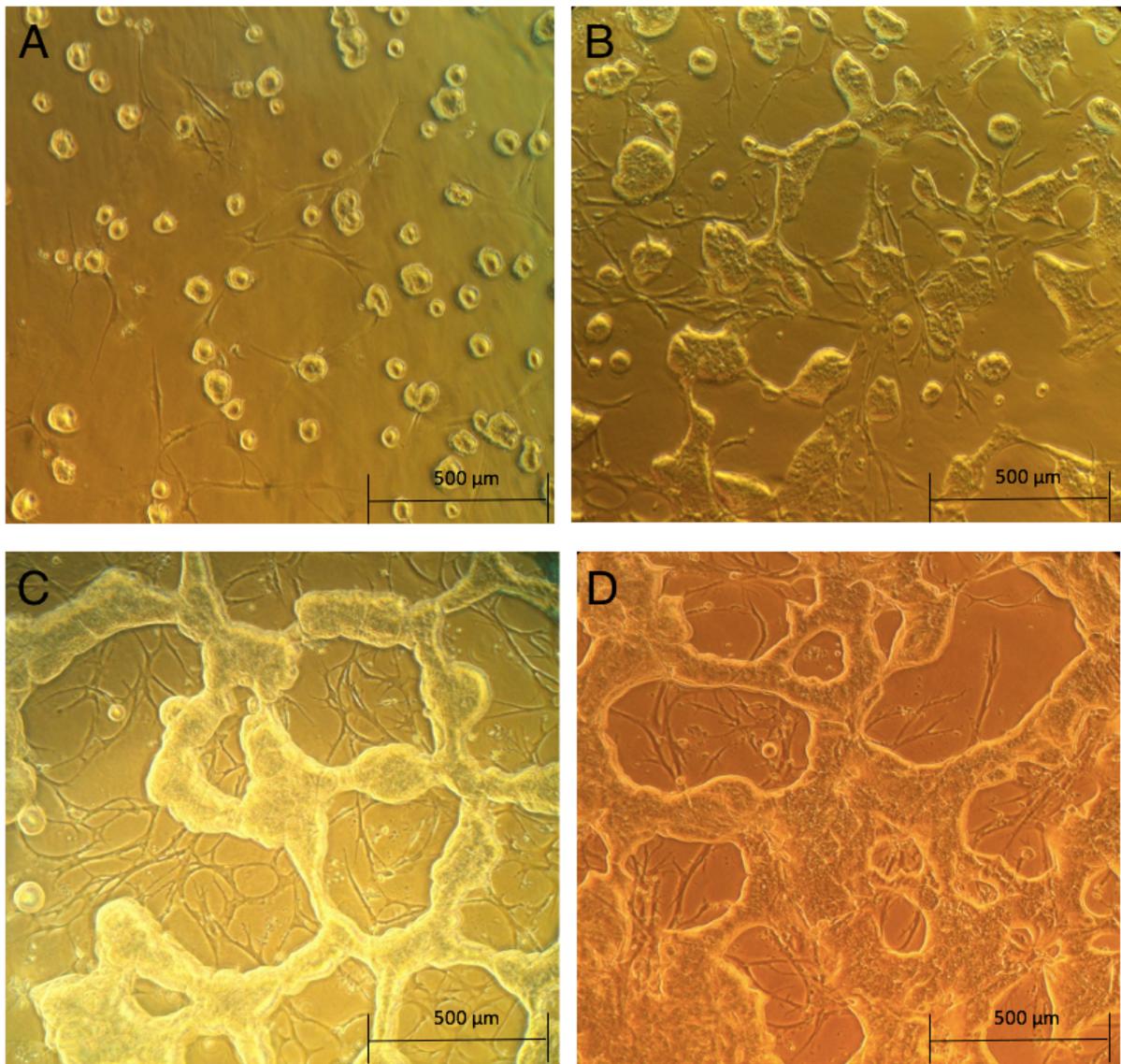


Figura 30: Organização morfológica do modelo tridimensional de cocultura de câncer de endométrio ao longo de 20 dias de cultivo. (A) Dia 1 de cultivo. (B) Dia 5 de cultivo. (C) Dia 15 de cultivo. (D) Dia 20 de cultivo. Imagem registrada por microscópio invertido.

Discussão

O tradicional modelo de cultura bidimensional é uma boa ferramenta para estudar a função biológica de células endometriais, porém apresenta muitas limitações. Com a cultura celular tradicional 2D, as células perdem suas características estruturais, pois tornam-se planas, não conseguem manter junções intercelulares e perdem a sua polaridade. Considerando a grande complexidade dos tecidos *in vivo*, modelos alternativos de culturas tornam-se importantes para entender a morfologia e função de tecidos adultos e de processos patológicos. Com essa finalidade, modelos de cultura 3D podem ser mais próximos das situações fisiológicas e patológicas, pois além de recriarem melhor a arquitetura tecidual, possibilitam que as células se organizem tridimensionalmente, a partir da interação entre célula-matriz extracelular. Além disso, também proporcionam a oportunidade de cultivar diferentes tipos celulares em modelos de cocultura, onde é possível a avaliação da comunicação entre os tipos celulares, processo essencial que coordena a diferenciação, proliferação, morfologia e entre outras funções celulares (Zhu *et al.*, 2012; Breslin *et al.*, 2013; Edmondson *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, uma grande variedade de modelos de cultura 3D foi padronizado como ferramenta experimental, onde foram utilizados diversos protocolos e matrizes extracelulares para a construção destes modelos (Park *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2012; Wang, H. *et al.*, 2013; Buck *et al.*, 2015). Considerando a importância deste modelo para a pesquisa biomédica e principalmente para estudos utilizando drogas anticâncer, neste capítulo, foi padronizado um modelo 3D de cocultura de células endometriais que permanecesse viável ao longo de 20 dias de tratamento. Para a construção do modelo, foi utilizado o protocolo adaptado dos estudos de Park e colaboradores e Zhu e colaboradores. Entretanto, no primeiro estudo os pesquisadores utilizaram uma combinação de colágeno com Matrigel® (4:1) para a formação da matriz extracelular temporária (Park *et al.*, 2003), enquanto no segundo estudo os pesquisadores utilizaram diferentes concentrações de Matrigel® (Zhu *et al.*, 2012).

A Matrigel® é o nome comercial de uma matriz extracelular de hidrogel, derivada da membrana basal de sarcoma de ratos Engelbreth-Holm-Swarm. Esta matriz é composta basicamente por laminina (60%), colágeno IV (30%) e proteoglicanos, além de fatores de crescimento (Bd_Biosciences). No presente

estudo, foi utilizada a Matrigel® com fatores de crescimento reduzidos, e foi observado que foi possível a formação de estruturas celulares complexas pelas células epiteliais tanto em uma concentração de 90 % quanto em uma concentração de 50 % de Matrigel®. Zhu e colaboradores, demonstraram que a concentração de Matrigel® utilizada para a construção do modelo, interfere na formação de estruturas multicelulares. Em modelos utilizando uma concentração de 10 % de Matrigel®, as células epiteliais não se organizam de forma agregada, porém a partir de uma concentração de 20 %, as células epiteliais primárias já formam estruturas multicelulares. Para a linhagem de câncer de endométrio RL95-2, observou-se que as células se organizam de forma agregada somente a partir da concentração de 50 % de Matrigel® (Zhu *et al.*, 2012).

Ao longo do cultivo percebeu-se que essas estruturas celulares complexas, formadas pelas células epiteliais, sugeriam a formação de glândulas com a presença de um lúmen internamente. Durante a formação de glândulas, as células epiteliais devem se organizar ao redor de um único lúmen com a sua superfície apical voltada para este lúmen. Três mecanismos têm sido associados com a formação do espaço luminal: esvaziamento (lúmen é formado pela separação da membrana de células glandulares), cavitação (o lúmen é formado pela morte das células centrais por apoptose ou autofagia) e contato focalizado (o lúmen é formado pela repulsão do contato célula-célula) (Bryant *et al.*, 2008; Mailleux *et al.*, 2008; Eritja *et al.*, 2013). A diferenciação de células epiteliais endometriais em estruturas glandulares polarizadas já foi demonstrada em modelos 3D utilizando diferentes composições de matrizes extracelulares de hidrogel (Schatz *et al.*, 1990; Bentin-Ley *et al.*, 1994; Eritja *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2012). Porém, no presente estudo, até o momento, não foi possível a padronização do protocolo de marcação por imunofluorescência para confirmação da correta arquitetura e formação glandular. No modelo 3D construído com células endometriais primárias utilizando a concentração de 90 % de Matrigel®, somente foi possível a marcação dos núcleos celulares. É possível que apesar de altas concentrações de Matrigel® contribuírem para a formação glandular, a capacidade de penetração do anticorpo para marcação celular fique limitado, conforme demonstrado por Eritja e colaboradores, ao utilizar células endometriais de ratos (Eritja *et al.*, 2010). Uma opção seria a marcação dos diferentes tipos celulares antes da construção do modelo 3D a partir da transfecção com uma proteína

fluorescente, entretanto, a limitação deste protocolo seria o tempo de cultivo do modelo 3D. Provavelmente, até que ocorresse a formação das estruturas celulares especializadas pelas células epiteliais, durante a proliferação celular a marcação prévia seria perdida. Contudo, neste estudo, se optou por utilizar uma concentração de 50 % de Matrigel® para a construção do modelo de câncer endometrial 3D. Apesar de diversas alterações terem sido realizadas no protocolo de marcação, não foi obtido sucesso. Uma possível alternativa para futuras análises, é a utilização do protocolo proposto por Pinto e colaboradores para estudos com células de câncer de mama. Neste protocolo, os pesquisadores propõem a formação de uma estrutura em sanduiche utilizando o modelo 3D de cocultura com Matrigel® entre duas camadas de um gel aquoso utilizado para processamento histológico, HistoGel (Thermo Scientific, USA), seguido de um congelamento rápido. Após, é realizado os passos do protocolo de rotina de formação de blocos de parafina, e as análises são realizadas conforme análises de imuno-histoquímica de tecido em blocos de parafina (Pinto *et al.*, 2011).

Não há dúvidas que o sistema de cultura 3D e de cocultura são uma grande promessa para a pesquisa sobre diferenciação tecidual, implantação embrionária, biologia celular do câncer, eficiência de medicamentos sobre alvos moleculares e muitas outras análises. Entretanto, ainda existem muitos obstáculos que devem ser superados antes que esses modelos 3D propostos possam ser amplamente utilizados na pesquisa e indústria farmacêutica, sendo a tecnologia empregada e os custos as principais preocupações (Edmondson *et al.*, 2014; Gu *et al.*, 2016). No presente estudo, foi estabelecido um modelo de cocultura de células endometriais que permanece viável durante 20 dias, sendo possível a utilização deste modelo nas condições experimentais propostas nos capítulos I e II para futuras análises.

DISCUSSÃO CONCLUSIVA

A metformina tem sido utilizada em pacientes com DM há mais de 40 anos. Entretanto, na última década estudos clínicos e epidemiológicos começaram a apontar uma associação entre a diminuição do desenvolvimento de diferentes tipos de câncer em pacientes diabéticos que faziam o uso do medicamento comparado aos pacientes que não faziam o uso de metformina ou utilizavam outros medicamentos. Contudo, esta associação ainda não está bem definida, assim como os mecanismos moleculares envolvidos não estão bem esclarecidos. A maioria dos estudos clínicos e epidemiológicos apresentam uma metodologia fraca, enquanto os estudos experimentais utilizam doses de metformina muito superiores as doses terapêuticas preconizadas. Por isto, discute-se se o efeito avaliado está relacionado a citotoxicidade da metformina ou seriam os efeitos antiproliferativos, antimetastáticos e apoptóticos desejados. Considerando esses fatos, esta tese visa avaliar o efeito de uma dose de metformina mais similar a dose utilizada clinicamente, sobre fatores de risco envolvidos no desenvolvimento e progressão do câncer de endométrio.

Inicialmente a proposta deste trabalho foi avaliar o efeito da metformina nos parâmetros propostos somente em uma condição de cultivo com alta concentração de glicose. Entretanto, ao longo do trabalho nossos resultados demonstraram que em um ambiente com altos níveis de glicose as células de câncer de endométrio não respondiam ao tratamento com a metformina conforme esperado. Para a compreensão desses dados, foi adicionado avaliações em condições de cultivo com concentrações de glicose no meio consideradas similares a concentrações plasmáticas normais. Contudo, nossos resultados demonstram que a dose de 0,1 mM de metformina apresenta efeito sobre o potencial metastático das células de câncer de endométrio, entretanto esta dose não apresenta efeito sobre a proliferação celular. Ao avaliarmos os mecanismos moleculares intracelulares, não foi possível observar um efeito positivo da dose de 0,1 mM de metformina sobre vias de proliferação e progressão do câncer de endométrio durante o tratamento crônico e agudo, sendo observado um genótipo agressivo adquirido durante o tratamento crônico.

Assim, na presença de altas concentrações de glicose as células de câncer de endométrio adquirem um genótipo mais agressivo e apresentam resistência ao

efeito da metformina na dose de 0,1 mM. Nossos resultados reforçam a possibilidade do uso da metformina como potencial agente adjuvante na terapia contra o câncer, pois demonstram a importância do uso de alvos terapêuticos que atuem no metabolismo da glicose como potenciais estratégias para a prevenção e tratamento do câncer de endométrio. A metformina é um grande candidato, pois *in vivo* atua indiretamente diminuindo os níveis séricos de glicose e insulina, tornando o ambiente mais favorável para sua atuação diretamente nas células.

Adicionalmente, com o objetivo de mimetizar *in vitro* o ambiente patológico do câncer de endométrio, o protocolo de construção de um modelo 3D de cocultura de células endometriais que permanece viável ao longo de 20 dias de cultivo foi padronizado, o que possibilitará a utilização deste modelo em futuras análises. O conhecimento adquirido a partir da combinação da genética do tumor, do ambiente celular e da interação entre as células pode determinar a eficiência de um possível tratamento preventivo ou adjuvante, assim como, o entendimento destes mecanismos pode levar ao desenvolvimento de novas terapias.

PERSPECTIVAS

Os resultados do capítulo II dessa tese estão incompletos, será necessário aumentar o número amostral das análises de expressão gênica dos experimentos em condições de cultivo com concentrações normais de glicose, além da confirmação dos dados a partir da análise proteica. Também pretendemos avaliar o índice de duplicação populacional cumulativo após o tratamento agudo com metformina em condições com níveis normais de glicose. Adicionalmente, objetivamos avaliar se as células de câncer de endométrio respondem ao efeito das doses de 0,5 mM e 1 mM de metformina de maneira diferente. Pretendemos realizar todas as análises até junho de 2017. Objetivamos utilizar o modelo 3D de cocultura de câncer de endométrio primário (utilizando células de pacientes com câncer de endométrio) e linhagem celular, para análises utilizando os mesmos parâmetros experimentais avaliados nessa tese, onde iremos comparar com os resultados obtidos utilizando cultivo 2D.

Os resultados encontrados até o momento permitiram a criação de novos questionamentos nesta linha de pesquisa. Paralelamente, estamos avaliando se diferentes concentrações de estradiol interferem no efeito da metformina. Assim como, temos como perspectiva a realização de rastreamento gênico e proteômico para avaliar de forma mais ampla a diferença de expressão em vias de sinalização intracelulares entre tecido endometrial normal e tecido endometrial tumoral.

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (470636/2012-2 e 24107/2013-9);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Fundo de Iniciativa para Pesquisa e Eventos do Hospital de Clinicas de Porto Alegre FIPE – HCPA (14-0267);
- *Excellence Initiative* da Universidade de Heidelberg (7.013.14).

REFERÊNCIAS

Acharya, S., *et al.* Rare uterine cancers. **Lancet Oncol**, v.6, n.12, Dec, p.961-71. 2005.

ACS. **American Cancer Society**. Disponível em <http://www.cancer.org/>. 2014. Acesso em: Maio de 2014.

Agapova, S. E., *et al.* Diagnosis and challenges of polycystic ovary syndrome in adolescence. **Semin Reprod Med**, v.32, n.3, May, p.194-201. 2014.

Al-Sharafi, B. A.; Gunaid, A. A. Prevalence of obesity in patients with type 2 diabetes mellitus in yemen. **Int J Endocrinol Metab**, v.12, n.2, Apr, p.e13633. 2014.

Albini, A., *et al.* A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer Res**, v.47, n.12, Jun 15, p.3239-45. 1987.

Altmae, S., *et al.* Guidelines for the design, analysis and interpretation of 'omics' data: focus on human endometrium. **Hum Reprod Update**, v.20, n.1, Jan-Feb, p.12-28. 2014.

Andersson, E. R., *et al.* Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. **Development**, v.138, n.17, Sep, p.3593-612. 2011.

Araujo Jr, N. L.; Athanazio, D. A. [Hormone replacement therapy and endometrial cancer]. **Cad Saude Publica**, v.23, n.11, Nov, p.2613-22. 2007.

Arcidiacono, B., *et al.* Insulin resistance and cancer risk: an overview of the pathogenetic mechanisms. **Exp Diabetes Res**, v.2012, p.789174. 2012.

Arsene, E., *et al.* Implications of a two-step procedure in surgical management of patients with early-stage endometrioid endometrial cancer. **J Gynecol Oncol**, v.26, n.2, Apr, p.125-33. 2015.

Azziz, R., *et al.* Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v.91, n.11, Nov, p.4237-45. 2006.

Bailey, C. J.; Day, C. Avandamet: combined metformin-rosiglitazone treatment for insulin resistance in type 2 diabetes. **Int J Clin Pract**, v.58, n.9, Sep, p.867-76. 2004.

BD_Biosciences. **BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix**. Disponível em <http://bd.com/resource.aspx?IDX=17841>. Acesso em:

Becker, S., *et al.* Obesity related hyperinsulinaemia and hyperglycaemia and cancer development. **Arch Physiol Biochem**, v.115, n.2, May, p.86-96. 2009.

Bedogni, B. Notch signaling in melanoma: interacting pathways and stromal influences that enhance Notch targeting. **Pigment Cell Melanoma Res**, v.27, n.2, Mar, p.162-8. 2014.

Bentin-Ley, U., *et al.* Isolation and culture of human endometrial cells in a three-dimensional culture system. **J Reprod Fertil**, v.101, n.2, Jul, p.327-32. 1994.

Bing, L., *et al.* MicroRNA-543 suppresses endometrial cancer oncogenicity via targeting FAK and TWIST1 expression. **Arch Gynecol Obstet**, v.290, n.3, Sep, p.533-41. 2014.

Bonanni, B., *et al.* Dual effect of metformin on breast cancer proliferation in a randomized presurgical trial. **J Clin Oncol**, v.30, n.21, Jul 20, p.2593-600. 2012.

Boyden, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. **J Exp Med**, v.115, Mar 1, p.453-66. 1962.

Breslin, S.; O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discov Today**, v.18, n.5-6, Mar, p.240-9. 2013.

Brown, D. C.; Gatter, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v.40, n.1, Jan, p.2-11. 2002.

Brown, E. J., *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. **Nature**, v.369, n.6483, Jun 30, p.756-8. 1994.

Bryant, D. M.; Mostov, K. E. From cells to organs: building polarized tissue. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.11, Nov, p.887-901. 2008.

Brzozowa-Zasada, M., *et al.* Notch signalling pathway as an oncogenic factor involved in cancer development. **Contemp Oncol (Pozn)**, v.20, n.4, p.267-72. 2016.

Buck, V. U., *et al.* Interaction of human trophoblast cells with gland-like endometrial spheroids: a model system for trophoblast invasion. **Hum Reprod**, v.30, n.4, Apr, p.906-16. 2015.

Byrne, F. L., *et al.* Metabolic vulnerabilities in endometrial cancer. **Cancer Res**, v.74, n.20, Oct 15, p.5832-45. 2014.

Campagnoli, C., *et al.* Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women. **Gynecol Endocrinol**, v.29, n.2, Feb, p.119-24. 2013.

Cantrell, L. A., *et al.* Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy. **Gynecol Oncol**, v.116, n.1, Jan, p.92-8. 2010.

Capaccione, K. M.; Pine, S. R. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. **Carcinogenesis**, v.34, n.7, Jul, p.1420-30. 2013.

Castro, A. V., *et al.* Obesity, insulin resistance and comorbidities? Mechanisms of association. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v.58, n.6, Aug, p.600-9. 2014.

Chen, J., *et al.* Activation of PI3K/Akt/mTOR pathway and dual inhibitors of PI3K and mTOR in endometrial cancer. **Curr Med Chem**, v.21, n.26, p.3070-80. 2014.

Chen, X., *et al.* Metformin inhibits the proliferation, metastasis, and cancer stem-like sphere formation in osteosarcoma MG63 cells in vitro. **Tumour Biol**, v.36, n.12, Dec, p.9873-83. 2015.

Choi, H. N., *et al.* Inhibition of S6K1 enhances glucose deprivation-induced cell death via downregulation of anti-apoptotic proteins in MCF-7 breast cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.432, n.1, Mar 1, p.123-8. 2013.

Coughlan, K. A., *et al.* AMPK activation: a therapeutic target for type 2 diabetes? **Diabetes Metab Syndr Obes**, v.7, p.241-53. 2014.

Dallenbach, C., *et al.* [Histologic endometrial findings in patients on the day of planned embryo transfer]. **Geburtshilfe Frauenheilkd**, v.47, n.9, Sep, p.623-9. 1987.

de Barros Machado, A., *et al.* Proliferation and metastatic potential of endometrial cancer cells in response to metformin treatment in a high versus normal glucose environment. **Oncology Letters**, v.12, p.3626-3632. 2016.

Dedes, K. J., *et al.* Emerging therapeutic targets in endometrial cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v.8, n.5, May, p.261-71. 2011.

Diamanti-Kandarakis, E.; Dunaif, A. Insulin Resistance and the Polycystic Ovary Syndrome Revisited: An Update on Mechanisms and Implications. **Endocr Rev**, Oct 12. 2012.

Diamanti-Kandarakis, E.; Papavassiliou, A. G. Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome. **Trends Mol Med**, v.12, n.7, Jul, p.324-32. 2006.

Dong, P., *et al.* Emerging therapeutic biomarkers in endometrial cancer. **Biomed Res Int**, v.2013, p.130362. 2013.

Dowling, R. J., *et al.* Metformin in cancer: translational challenges. **J Mol Endocrinol**, v.48, n.3, Jun, p.R31-43. 2012.

Dunaif, A., *et al.* Characterization of groups of hyperandrogenic women with acanthosis nigricans, impaired glucose tolerance, and/or hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab**, v.65, n.3, Sep, p.499-507. 1987.

Edmondson, R., *et al.* Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay Drug Dev Technol**, v.12, n.4, May, p.207-18. 2014.

Eritja, N., *et al.* Three-dimensional epithelial cultures: a tool to model cancer development and progression. **Histol Histopathol**, v.28, n.10, Oct, p.1245-56. 2013.

Eritja, N., *et al.* A novel three-dimensional culture system of polarized epithelial cells to study endometrial carcinogenesis. **Am J Pathol**, v.176, n.6, Jun, p.2722-31. 2010.

Evans, J. M., *et al.* Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ**, v.330, n.7503, Jun 4, p.1304-5. 2005.

Fader, A. N., *et al.* Endometrial cancer and obesity: epidemiology, biomarkers, prevention and survivorship. **Gynecol Oncol**, v.114, n.1, Jul, p.121-7. 2009.

Filippi-Chiela, E. C., *et al.* Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v.11, n.7, p.1099-113. 2015.

Foretz, M., *et al.* Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. **J Clin Invest**, v.120, n.7, Jul, p.2355-69. 2010.

Gacaferri Lumezi, B., *et al.* Mixed form of hirsutism in an adolescent female and laser therapy. **Iran Red Crescent Med J**, v.16, n.6, Jun, p.e9410. 2014.

Gadducci, A., *et al.* Tissue and serum biomarkers as prognostic variables in endometrioid-type endometrial cancer. **Crit Rev Oncol Hematol**, v.80, n.2, Nov, p.181-92. 2011.

Garg, K.; Soslow, R. A. Endometrial carcinoma in women aged 40 years and younger. **Arch Pathol Lab Med**, v.138, n.3, Mar, p.335-42. 2014.

Garg, S. K., *et al.* Diabetes and cancer: two diseases with obesity as a common risk factor. **Diabetes Obes Metab**, v.16, n.2, Feb, p.97-110. 2014.

Gargett, C. E.; Ye, L. Endometrial reconstruction from stem cells. **Fertil Steril**, v.98, n.1, Jul, p.11-20. 2012.

Gerdes, J., *et al.* Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer**, v.31, n.1, Jan 15, p.13-20. 1983.

Germeyer, A., *et al.* Metformin modulates IL-8, IL-1beta, ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. **Reprod Biomed Online**, v.22, n.4, Apr, p.327-34. 2011.

Giudice, L. C. Potential biochemical markers of uterine receptivity. **Hum Reprod**, v.14 Suppl 2, Dec, p.3-16. 1999.

Goudas, V. T.; Dumesic, D. A. Polycystic ovary syndrome. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.26, n.4, Dec, p.893-912. 1997.

Group, S. G. O. Clinical Practice Endometrial Cancer Working, *et al.* Endometrial cancer: a review and current management strategies: part I. **Gynecol Oncol**, v.134, n.2, Aug, p.385-92. 2014.

Gu, L.; Mooney, D. J. Biomaterials and emerging anticancer therapeutics: engineering the microenvironment. **Nat Rev Cancer**, v.16, n.1, Jan, p.56-66. 2016.

Hadad, S., *et al.* Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. **Breast Cancer Res Treat**, v.128, n.3, Aug, p.783-94. 2011.

Han, J., *et al.* Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. **Gynecol Oncol**, v.138, n.3, Sep, p.668-75. 2015.

Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, Mar 4, p.646-74. 2011.

Harborne, L., *et al.* Descriptive review of the evidence for the use of metformin in polycystic ovary syndrome. **Lancet**, v.361, n.9372, May 31, p.1894-901. 2003.

Harnden, D. G. Cell Biology and Cell Culture Methods—A Review. In: Harkness, R. A., *et al.* (Org.). **The Cultured Cell and Inherited Metabolic Disease**. 1977.

Harper, M. J. The implantation window. **Baillieres Clin Obstet Gynaecol**, v.6, n.2, Jun, p.351-71. 1992.

Harrison, R. G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. **Journal of Experimental Zoology**, v.9, n.4, December 1990, p.787-846. 1990.

Harrison, R. G., *et al.* Observations of the living developing nerve fiber. **The Anatomical Record**, v.1, n.5, 1 June 1907, p.116-128. 1907.

Hasty, L. A., *et al.* Hormonal regulation of complement components and receptors throughout the menstrual cycle. **Am J Obstet Gynecol**, v.170, n.1 Pt 1, Jan, p.168-75. 1994.

Haycock, J. W. 3D cell culture: a review of current approaches and techniques. **Methods Mol Biol**, v.695, p.1-15. 2011.

He, H., *et al.* Metformin, an old drug, brings a new era to cancer therapy. **Cancer J**, v.21, n.2, Mar-Apr, p.70-4. 2015.

Heitman, J., *et al.* Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. **Science**, v.253, n.5022, Aug 23, p.905-9. 1991.

Holland, C. M., *et al.* Expression of the VEGF and angiopoietin genes in endometrial atypical hyperplasia and endometrial cancer. **Br J Cancer**, v.89, n.5, Sep 1, p.891-8. 2003.

Hubbard, S. A., *et al.* Evidence for cancer stem cells in human endometrial carcinoma. **Cancer Res**, v.69, n.21, Nov 1, p.8241-8. 2009.

Imamura, Y., *et al.* Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. **Oncol Rep**, v.33, n.4, Apr, p.1837-43. 2015.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer.** Disponível em <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. 2014. Acesso em:

_____. **Estimativa 2016, Incidência de Câncer no Brasil.** 2016. p.

Inwald, E. C., *et al.* Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Res Treat**, v.139, n.2, Jun, p.539-52. 2013.

JAMA. Cancer statistics. **JAMA**, v.310, n.9, Sep 4, p.982. 2013.

Jayshree, R. S., *et al.* Cell intrinsic & extrinsic factors in cervical carcinogenesis. **Indian J Med Res**, v.130, n.3, Sep, p.286-95. 2009.

Johnson, N. P. Metformin use in women with polycystic ovary syndrome. **Ann Transl Med**, v.2, n.6, Jun, p.56. 2014.

Josefsson, A., *et al.* Low endoglin vascular density and Ki67 index in Gleason score 6 tumours may identify prostate cancer patients suitable for surveillance. **Scand J Urol Nephrol**, v.46, n.4, Aug, p.247-57. 2012.

Joshua, A. M., *et al.* A pilot 'window of opportunity' neoadjuvant study of metformin in localised prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Dis**, v.17, n.3, Sep, p.252-8. 2014.

Kato, H., *et al.* Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor 1 receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v.461, n.1, May 22, p.115-21. 2015.

Kidd, S., *et al.* Sequence of the notch locus of *Drosophila melanogaster*: relationship of the encoded protein to mammalian clotting and growth factors. **Mol Cell Biol**, v.6, n.9, Sep, p.3094-108. 1986.

Kim, L. C., *et al.* mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. **Oncogene**, Oct 17. 2016.

Kitchener, H. Management of endometrial cancer. **Eur J Surg Oncol**, v.32, n.8, Oct, p.838-43. 2006.

Kourelis, T. V.; Siegel, R. D. Metformin and cancer: new applications for an old drug. **Med Oncol**, v.29, n.2, Jun, p.1314-27. 2012.

Krzesełak, A., *et al.* Expression of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in endometrial and breast cancers. **Pathol Oncol Res**, v.18, n.3, Jul, p.721-8. 2012.

Kyo, S.; Kato, K. Endometrial Cancer Stem Cell as a Potential Therapeutic Target. **Semin Reprod Med**, v.33, n.5, Sep, p.341-9. 2015.

Lambe, M., *et al.* Impaired glucose metabolism and diabetes and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancer. **Cancer Causes Control**, v.22, n.8, Aug, p.1163-71. 2011.

Laskov, I., *et al.* Anti-diabetic doses of metformin decrease proliferation markers in tumors of patients with endometrial cancer. **Gynecol Oncol**, v.134, n.3, Sep, p.607-14. 2014.

Legro, R. S., *et al.* Total testosterone assays in women with polycystic ovary syndrome: precision and correlation with hirsutism. **J Clin Endocrinol Metab**, v.95, n.12, Dec, p.5305-13. 2010.

Lessey, B. A. Assessment of endometrial receptivity. **Fertil Steril**, v.96, n.3, Sep, p.522-9. 2011.

Li, A., *et al.* Menstrual-like breakdown and apoptosis in human endometrial explants. **Hum Reprod**, v.20, n.6, Jun, p.1709-19. 2005.

Li, L. T., *et al.* Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). **Mol Med Rep**, v.11, n.3, Mar, p.1566-72. 2015.

Li, X., *et al.* Regulation of Androgen Receptor Expression Alters AMPK Phosphorylation in the Endometrium: In Vivo and In Vitro Studies in Women with Polycystic Ovary Syndrome. **Int J Biol Sci**, v.11, n.12, p.1376-89. 2015.

Liao, Y., *et al.* Suppression of the epithelial-mesenchymal transition by SHARP1 is linked to the NOTCH1 signaling pathway in metastasis of endometrial cancer. **BMC Cancer**, v.14, p.487. 2014.

Mailleux, A. A., *et al.* Lumen formation during mammary epithelial morphogenesis: insights from in vitro and in vivo models. **Cell Cycle**, v.7, n.1, Jan 1, p.57-62. 2008.

Makker, A.; Goel, M. M. Tumor progression, metastasis, and modulators of epithelial-mesenchymal transition in endometrioid endometrial carcinoma: an update. **Endocr Relat Cancer**, v.23, n.2, Feb, p.R85-R111. 2016.

Matias-Guiu, X.; Prat, J. Molecular pathology of endometrial carcinoma. **Histopathology**, v.62, n.1, Jan, p.111-23. 2013.

Menendez, J. A., *et al.* Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. **Cell Cycle**, v.11, n.15, Aug 1, p.2782-92. 2012.

Mitsuhashi, A., *et al.* Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: a preoperative prospective trial. **Cancer**, v.120, n.19, Oct 1, p.2986-95. 2014.

Mitsuhashi, Y., *et al.* Prognostic significance of Notch signalling molecules and their involvement in the invasiveness of endometrial carcinoma cells. **Histopathology**, v.60, n.5, Apr, p.826-37. 2012.

Mohr, O. L. Character Changes Caused by Mutation of an Entire Region of a Chromosome in Drosophila. **Genetics**, v.4, n.3, May, p.275-82. 1919.

Moran, L. J., *et al.* Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. **Cochrane Database Syst Rev**, n.2, p.CD007506. 2011.

Mu, N., *et al.* Insulin resistance: a significant risk factor of endometrial cancer. **Gynecol Oncol**, v.125, n.3, Jun, p.751-7. 2012.

Mulholland, H. G., *et al.* Dietary glycaemic index, glycaemic load and endometrial and ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis. **Br J Cancer**, v.99, n.3, Aug 5, p.434-41. 2008.

Nead, K. T., *et al.* Evidence of a Causal Association Between Insulinemia and Endometrial Cancer: A Mendelian Randomization Analysis. **J Natl Cancer Inst**, v.107, n.9, Sep. 2015.

Nicholas, Zachary; Hu, Nan; Ying, Jian; Soisson, Patrick; Dodson, Mark; Gaffney, David K. Impact of Comorbid Conditions on Survival in Endometrial Cancer. **American Journal of Clinical Oncology** v.37, n.2. 2014.

Niikura, H., *et al.* Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in endometrioid endometrial carcinoma. **Hum Pathol**, v.26, n.8, Aug, p.892-6. 1995.

Niraula, S., *et al.* Metformin in early breast cancer: a prospective window of opportunity neoadjuvant study. **Breast Cancer Res Treat**, v.135, n.3, Oct, p.821-30. 2012.

Nishimura, T., *et al.* Effect of the molecular targeted drug, erlotinib, against endometrial cancer expressing high levels of epidermal growth factor receptor. **BMC Cancer**, v.15, Dec 16, p.957. 2015.

Oda, K., *et al.* mTOR Signaling in Endometrial Cancer: From a Molecular and Therapeutic Point of View. **Current Obstetrics and Gynecology Reports**, v.4, n.1, p.1-10. 2015.

Oda, K., *et al.* High frequency of coexistent mutations of PIK3CA and PTEN genes in endometrial carcinoma. **Cancer Res**, v.65, n.23, Dec 1, p.10669-73. 2005.

Owen, M. R., *et al.* Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. **Biochem J**, v.348 Pt 3, Jun 15, p.607-14. 2000.

Palomba, S., *et al.* Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review. **Endocr Rev**, v.30, n.1, Feb, p.1-50. 2009.

Papaioannou, S.; Tzafettas, J. Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**, v.24, n.1, Feb, p.19-27. 2010.

Park, D. W., *et al.* A well-defined in vitro three-dimensional culture of human endometrium and its applicability to endometrial cancer invasion. **Cancer Lett**, v.195, n.2, Jun 10, p.185-92. 2003.

Pavlidou, A.; Vlahos, N. F. Molecular alterations of PI3K/Akt/mTOR pathway: a therapeutic target in endometrial cancer. **ScientificWorldJournal**, v.2014, p.709736. 2014.

Pernicova, I.; Korbonits, M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nat Rev Endocrinol**, v.10, n.3, Mar, p.143-56. 2014.

Piatkiewicz, P.; Czech, A. Glucose metabolism disorders and the risk of cancer. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, v.59, n.3, Jun, p.215-30. 2011.

Pinto, M. P., *et al.* An immunohistochemical method to study breast cancer cell subpopulations and their growth regulation by hormones in three-dimensional cultures. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v.2, p.15. 2011.

Populo, H., *et al.* The mTOR signalling pathway in human cancer. **Int J Mol Sci**, v.13, n.2, p.1886-918. 2012.

Radwan, P., *et al.* Evaluation of sonohysterography in detecting endometrial polyps - 241 cases followed with office hysteroscopies combined with histopathological examination. **Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne**, v.9, n.3, Sep, p.344-50. 2014.

Ranganathan, P., *et al.* Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. **Nat Rev Cancer**, v.11, n.5, May, p.338-51. 2011.

Revel, A. Defective endometrial receptivity. **Fertil Steril**, v.97, n.5, May, p.1028-32. 2012.

Rimann, M.; Graf-Hausner, U. Synthetic 3D multicellular systems for drug development. **Curr Opin Biotechnol**, v.23, n.5, Oct, p.803-9. 2012.

RKI. **Cancer in Germany 2011/2012**. Berlin: Robert Koch Institute 2015. 147 p.

Rose, S. L., *et al.* Notch 1 signaling is active in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, v.117, n.1, Apr, p.130-3. 2010.

Sabatini, D. M., *et al.* RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. **Cell**, v.78, n.1, Jul 15, p.35-43. 1994.

Sarfstein, R., *et al.* Metformin downregulates the insulin/IGF-I signaling pathway and inhibits different uterine serous carcinoma (USC) cells proliferation and migration in p53-dependent or -independent manners. **PLoS One**, v.8, n.4, p.e61537. 2013.

Sarmadi, S., *et al.* Altered PTEN expression; a diagnostic marker for differentiating normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. **Diagn Pathol**, v.4, Nov 25, p.41. 2009.

Sasnauskiene, A., *et al.* NOTCH1, NOTCH3, NOTCH4, and JAG2 protein levels in human endometrial cancer. **Medicina (Kaunas)**, v.50, n.1, p.14-8. 2014.

Satyaswaroop, P. G., *et al.* Isolation and culture of human endometrial glands. **J Clin Endocrinol Metab**, v.48, n.4, Apr, p.639-41. 1979.

Schatz, F., *et al.* Culture of human endometrial cells under polarizing conditions. **Differentiation**, v.42, n.3, Feb, p.184-90. 1990.

Schuler, K. M., *et al.* Antiproliferative and metabolic effects of metformin in a preoperative window clinical trial for endometrial cancer. **Cancer Med**, v.4, n.2, Feb, p.161-73. 2015.

Sciacca, L., *et al.* Clinical and molecular mechanisms favoring cancer initiation and progression in diabetic patients. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.23, n.9, Sep, p.808-15. 2013.

Shao, R., *et al.* Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res**, v.33, p.41. 2014.

Siegel, R. L., *et al.* Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin**, v.66, n.1, Jan-Feb, p.7-30. 2016.

Sieri, S., *et al.* High glycemc diet and breast cancer occurrence in the Italian EPIC cohort. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v.23, n.7, Jul, p.628-34. 2013.

Simon, D.; Balkau, B. Diabetes mellitus, hyperglycaemia and cancer. **Diabetes Metab**, v.36, n.3, Jun, p.182-91. 2010.

Sinnett-Smith, J., *et al.* Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: dependence on glucose concentration and role of AMPK. **Biochem Biophys Res Commun**, v.430, n.1, Jan 4, p.352-7. 2013.

Sivalingam, V. N., *et al.* Measuring the biological effect of presurgical metformin treatment in endometrial cancer. **Br J Cancer**, v.114, n.3, Feb 2, p.281-9. 2016.

Slomovitz, B. M.; Coleman, R. L. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer. **Clin Cancer Res**, v.18, n.21, Nov 1, p.5856-64. 2012.

Stattin, P., *et al.* Prospective study of hyperglycemia and cancer risk. **Diabetes Care**, v.30, n.3, Mar, p.561-7. 2007.

Szablewski, L. Diabetes mellitus: influences on cancer risk. **Diabetes Metab Res Rev**, v.30, n.7, Oct, p.543-53. 2014.

Takahashi, A., *et al.* Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. **Cancer Cell Int**, v.14, p.53. 2014.

Takemura, Y., *et al.* Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. **J Clin Endocrinol Metab**, v.92, n.8, Aug, p.3213-8. 2007.

Traub, M. L. Assessing and treating insulin resistance in women with polycystic ovarian syndrome. **World J Diabetes**, v.2, n.3, Mar 15, p.33-40. 2011.

Tree, T. I., *et al.* Evidence for recognition of novel islet T cell antigens by granule-specific T cell lines from new onset type 1 diabetic patients. **Clin Exp Immunol**, v.121, n.1, Jul, p.100-5. 2000.

Uchima, F. D., *et al.* Growth of mouse endometrial luminal epithelial cells in vitro: functional integrity of the oestrogen receptor system and failure of oestrogen to induce proliferation. **J Endocrinol**, v.128, n.1, Jan, p.115-20. 1991.

Velasco, A., *et al.* PIK3CA gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. **Hum Pathol**, v.37, n.11, Nov, p.1465-72. 2006.

Vinson, K. E., *et al.* The Notch pathway in colorectal cancer. **Int J Cancer**, v.138, n.8, Apr 15, p.1835-42. 2016.

von Gruenigen, V. E., *et al.* The impact of obesity and age on quality of life in gynecologic surgery. **Am J Obstet Gynecol**, v.193, n.4, Oct, p.1369-75. 2005.

von Mering, C., *et al.* STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. **Nucleic Acids Res**, v.33, n.Database issue, Jan 1, p.D433-7. 2005.

Wang, C. F., *et al.* Overexpression of the insulin receptor isoform A promotes endometrial carcinoma cell growth. **PLoS One**, v.8, n.8, p.e69001. 2013.

Wang, H., *et al.* Sex steroids regulate epithelial-stromal cell cross talk and trophoblast attachment invasion in a three-dimensional human endometrial culture system. **Tissue Eng Part C Methods**, v.19, n.9, Sep, p.676-87. 2013.

Wang, H., *et al.* A novel model of human implantation: 3D endometrium-like culture system to study attachment of human trophoblast (Jar) cell spheroids. **Mol Hum Reprod**, v.18, n.1, Jan, p.33-43. 2012.

Wharton, K. A., *et al.* Nucleotide sequence from the neurogenic locus notch implies a gene product that shares homology with proteins containing EGF-like repeats. **Cell**, v.43, n.3 Pt 2, Dec, p.567-81. 1985.

Wilcox, A. J., *et al.* Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy. **N Engl J Med**, v.340, n.23, Jun 10, p.1796-9. 1999.

Wilson, Edwin; Maher, Helen. Cancer and Tuberculosis, with some Comments on Cancer and Other Diseases. **Am J Obstet Gynecol**, v.16, p.227-250. 1932.

Wu, B., *et al.* Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. **Oncol Rep**, v.28, n.3, Sep, p.903-8. 2012.

Wurth, R., *et al.* Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt. **Cell Cycle**, v.12, n.1, Jan 1, p.145-56. 2013.

Yesilkanal, A. E.; Rosner, M. R. Raf kinase inhibitory protein (RKIP) as a metastasis suppressor: regulation of signaling networks in cancer. **Crit Rev Oncog**, v.19, n.6, p.447-54. 2014.

Zakikhani, M., *et al.* Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**, v.123, n.1, Aug, p.271-9. 2010.

Zhang, L., *et al.* Metformin and phenformin activate AMP-activated protein kinase in the heart by increasing cytosolic AMP concentration. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.1, Jul, p.H457-66. 2007.

Zhang, W., *et al.* A review of the three-dimensional cell culture technique: Approaches, advantages and applications. **Curr Stem Cell Res Ther**, v.11, n.4, p.370-80. 2016.

Zhou, H.; Huang, S. The complexes of mammalian target of rapamycin. **Curr Protein Pept Sci**, v.11, n.6, Sep, p.409-24. 2010.

Zhou, X. H., *et al.* Diabetes, prediabetes and cancer mortality. **Diabetologia**, v.53, n.9, Sep, p.1867-76. 2010.

Zhu, H. Y., *et al.* Three-dimensional cultures of human endometrial cells on Matrigel mimic in vivo morphology. **Chin Med J (Engl)**, v.125, n.5, Mar, p.863-8. 2012.

Zhuang, Y., *et al.* Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both in vitro and in vivo. **PLoS One**, v.9, n.9, p.e108444. 2014.

ANEXO 1**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 _____



**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 CAPP

HELENA VON EYE CORLETA

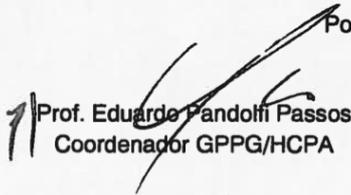
AMANDA DE BARROS MACHADO

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

ANEXO 2**Proliferation and metastatic potential of endometrial cancer cells in response to metformin treatment in a high versus normal glucose environment**

Amanda de Barros Machado¹⁻³, Vania dos Reis^{1,2}, Sebastian Weber³, Julia Jauckus³, Ilma Simoni Brum^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{1,2}, Thomas Strowitzki³, Edison Capp¹⁻³ e Ariane Germeyer³

¹ Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

² Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisa Experimental, Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, UFRGS, Brazil

³ Departamento de Ginecologia Endocrinologia e Medicina Reprodutiva, Universidade de Heidelberg, Alemanha.

Proliferation and metastatic potential of endometrial cancer cells in response to metformin treatment in a high versus normal glucose environment

AMANDA DE BARROS MACHADO¹⁻³, VANIA DOS REIS^{1,2}, SEBASTIAN WEBER³,
JULIA JAUCKUS³, ILMA SIMONI BRUM^{1,2}, HELENA VON EYE CORLETA^{1,2},
THOMAS STROWITZKI³, EDISON CAPP¹⁻³ and ARIANE GERMEYER³

¹Laboratory of Molecular Endocrine Biology and Tumor Biology, Department of Physiology, Institute of Basic Sciences of Health, Federal University of Rio Grande do Sul; ²Laboratory of Molecular Obstetrics and Gynecology, Experimental Research Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90050-170, Brazil; ³Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Hospital Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany

Received February 3, 2016; Accepted July 22, 2016

DOI: 10.3892/ol.2016.5041

Abstract. In order to improve our understanding of the potential preventive and therapeutic role of metformin, the present study aimed to investigate the capability of low-dose metformin in the efficient inhibition of cancer development and the reduction of the metastasis of endometrial adenocarcinoma type I and primary endometrial epithelial cells (eEPs), with the drug acting as a treatment in a hyperinsulinemic environment exposed to high and normal glucose conditions. The Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line and primary eEPs were exposed to an environment with high (17 mM) or normal glucose (5 mM) and treated with insulin, low-dose metformin (0.1 mM) or a combined treatment. Metastatic potential was assessed by migration and invasion assays, and relative cell proliferation was determined. Metformin at a low dose potently inhibited the insulin action, decreasing the ability of the endometrial cancer (EC) cell line to migrate and invade in a high and normal glucose environment, and decreasing the migration ability of the primary eEPs. In the EC cell line, the insulin treatment increased the proliferation, without any subsequent reduction of proliferation by the addition of 0.1 mM metformin; however, relative cell proliferation sensitivity to metformin was observed in the range between 1 and 5 mM regardless of the glucose concentration present. Overall, metformin at 0.1 mM is not efficient enough to decrease the

proliferation in an EC cell line. However, at this concentration, metformin can inhibit the insulin action in endometrial epithelial cancer cells, demonstrating an anti-metastatic effect in high and normal glucose environments.

Introduction

Endometrial cancer (EC) is one of the most common gynecological malignancies worldwide (1) and is classified into estrogen-dependent type I and estrogen-independent type II forms. The type I form is the most common, accounting for 75-85% of all cases of EC (2). Unopposed estrogen has been shown to increase the risk of EC development, as estrogens stimulate endometrial cell proliferation and inhibit apoptosis (3). Additionally, diseases associated with insulin resistance, such as obesity, type II diabetes mellitus and polycystic ovary syndrome (PCOS), are considered significant risk factors for the development and progression of type I EC (4-6). Insulin resistance is a condition in which target tissues have decreased sensitivity to insulin, and blood insulin levels consequently increase to maintain normal glucose levels. The chronic hyperinsulinemic state has been found to exert direct and indirect effects that contribute to EC development (7). A large body of evidence has suggested that women with diabetes possess a stronger association with neoplastic processes (5), and furthermore, diabetic patients with cancer experience increased mortality compared with normoglycemic individuals (8). Finally, a meta-analysis study has shown that women with diabetes have a two-fold risk for EC (9). Insulin resistance appears to play a central role in endometrial carcinogenesis. Therefore, treatment with insulin-sensitizing agents that act through reducing insulin levels could offer a general approach to prevent the development of cancer and reduce metastasis (10,11).

Metformin, an anti-hyperglycemic and insulin sensitizing agent, is the most commonly used drug for treating type II diabetes mellitus, as well as off-label insulin resistance

Correspondence to: Ms. Amanda de Barros Machado, Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Hospital Heidelberg, Building 440, D-69120 Heidelberg, Germany
E-mail: amandabarros@yahoo.com.br

Key words: endometrial cancer, metformin, hyperinsulinemia, glucose, metastasis, cancer development

(as observed in women with PCOS) (12). In recent years, numerous studies have indicated that metformin could be effective as a cancer therapy, along with its traditional role in treating diabetes (13-15). Metformin use can prevent malignant transformation indirectly via systemic changes (improving hyperglycemia, hyperlipidemia and hyperinsulinemia) and via direct effects, such as suppression of mammalian target of rapamycin via 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase activation, leading to reduced protein synthesis and cell proliferation (16,17). A meta-analysis of 18 observational studies showed that metformin therapy is associated with an overall 27% reduction in the risk of developing any type of cancer in patients with type II diabetes (18). A retrospective study showed that metformin use is additionally associated with less recurrence and improved overall survival in EC patients; although, when recurrence took occurred, it was not delayed compared with that in the control (19). However, the majority of these previous studies possessed methodological weaknesses and/or insufficient data. Additionally, experimental studies revealed that metformin is an effective antiestrogenic agent, inhibiting cell proliferation and leading to growth arrest, as well as inducing apoptosis in EC (17,20-22). Furthermore, recent findings have suggested that metformin is important in suppressing the migration and invasion of cancer cells, which could prevent metastasis (23-25). However, in these studies metformin action was observed at high supra-pharmacological concentrations and without estradiol addition, an important factor in endometrial proliferative disorders.

The present study investigated the capability of low-dose metformin (0.1 mM) to inhibit the development of cancer and reduce the metastatic potential of endometrial adenocarcinoma type I *in vitro* using the Ishikawa cell line in the high and normal glucose environments. Finally, the study evaluated the efficiency of low-dose metformin to prevent EC using normal uterine endometrial epithelial cells (eEPs) exposed to high glucose concentrations.

Materials and methods

Isolation and culture of primary eEPs. The primary eEPs were isolated from endometrial biopsies (between March and August 2015) taken from healthy, regularly cycling women (34.1±3.4 years old) undergoing laparoscopic surgery for benign reasons. Informed consent was obtained and the study protocol was approved by the the Clinical Hospital of Porto Alegre (Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil) and the University of Heidelberg (Heidelberg, Germany). Exclusion criteria were hormonal stimulation within the preceding 3 months, endocrinopathies, cancerous lesions and irregular menstrual bleeding. Human endometrial tissues were digested with collagenase type Ia (Gibco, Karlsruhe, Germany) for 2 h. Thereafter, the cells were washed, centrifuged (800 x g, room temperature) and separated using a 40- μ m filter. The stromal cells passed through the filter and the epithelial cells were retained. Epithelial cells were recovered from the filter by backwashing with Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/F12 (Gibco; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Cell culture. The Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line was purchased from Sigma-Aldrich (Merck

Millipore, Darmstadt, Germany; European Collection of Cell Culture authenticated). Ishikawa cells were grown in minimal essential medium (MEM; Sigma-Aldrich; Merck Millipore) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; HyClone; Thermo Fisher Scientific Inc.), 1% penicillin-streptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific Inc.), 1% non-essential amino acids (Sigma-Aldrich; Merck Millipore) and 5 μ g/ml bovine insulin (Sigma-Aldrich; Merck Millipore), while the primary eEPs were maintained in DMEM/F12 supplemented with 5% FBS and 1% penicillin-streptomycin at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

For the experiments in a high glucose environment, the cells were cultured in various conditions with DMEM/F12 medium containing 17 mM glucose, and for the experiments in a normal glucose environment, the cells were cultured with MEM containing 5.5 mM glucose. The media for all conditions were supplemented with 10⁻⁸ M estradiol. The different conditions included: a) Control group, medium only; b) insulin group, medium plus 100 ng/ml insulin; c) metformin group, medium plus 0.1 mM metformin; and d) insulin plus metformin group, medium plus 100 ng/ml insulin and 0.1 mM metformin. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Merck Millipore).

Migration and invasion analysis. To assess the ability of cellular motility in the different conditions, Transwell filters (6.5 mm in diameter; 5- μ m pore size; Corning Inc., Corning, NY, USA) were used. The cells were harvested as aforementioned and suspended in serum-free medium. The Transwell filter was coated with 100 μ l medium for the migration assay or with 100 μ l Matrigel (1:1 dilution; Corning Matrigel Growth Factor Reduced; Corning Inc.) for the invasion assay. Thereafter, the primary eEPs (1x10⁴ in 200 μ l) or Ishikawa cells (2.5x10⁵ in 200 μ l) were added with the individual treatment conditions into the Transwell chamber. Medium containing 5% FBS was added to the lower well, then the Transwells were incubated for 16 h. Non-migrated/invading cells were removed with a cotton swab, and migrated/invading cells were fixed in 3.7% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline, permeabilized with 100% methanol and stained with Giemsa. Cell migration/invasion, repeated five times, was quantified by blinded counting of the number of migrated/invaded cells in each insert in four different areas. Data are expressed as the percentage compared with the control group.

Cell proliferation assays. The CellTiter Glo Luminescent assay (Promega Corporation, Madison, WI, USA) was used to evaluate the relative cell proliferation of Ishikawa cells exposed to high and normal glucose conditions. The cells were seeded into 96-well plates at a density of 5,000 cells/well in 100 μ l drug-free medium overnight. The cells were then treated with the indicated treatment (control, insulin, metformin or insulin plus metformin) for 72 h. After this period, the plates were equilibrated at room temperature for 30 min, and 100 μ l of CellTiter Glo reagent was added in each well, mixed for 2 min and incubated at room temperature for 10 min. The luminescence was detected by a Centro LB 960 Microplate Luminometer (Berthold Technologies GmbH and Co. KG, Bad Wildbad, Germany).

In order to evaluate the sensitivity of the epithelial carcinoma cells to varying doses of metformin in high and

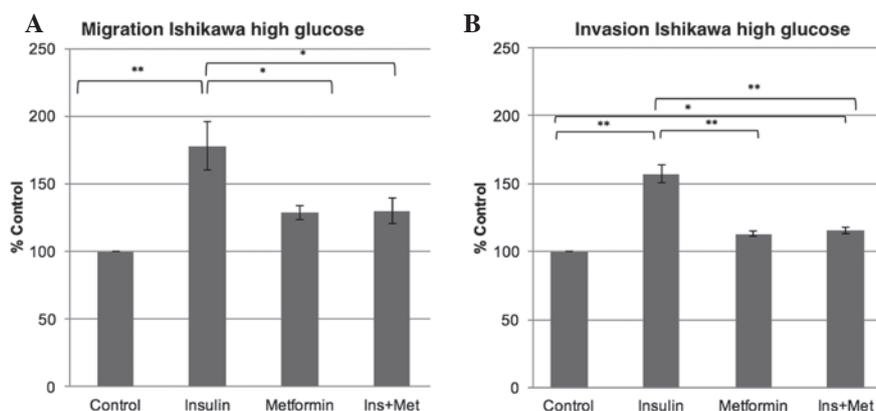


Figure 1. Migration and invasion of the Ishikawa cell line in a high glucose environment during 16 h of incubation. The insulin treatment increased the ability to migrate and invade. The metformin treatment was able to inhibit the insulin effect. (A) Migration assay in a high glucose environment; * $P=0.023$ and ** $P<0.001$. (B) Invasion assay in a high glucose environment; * $P=0.030$ and ** $P<0.001$. Mean \pm standard error of the mean. Ins, insulin; Met, metformin.

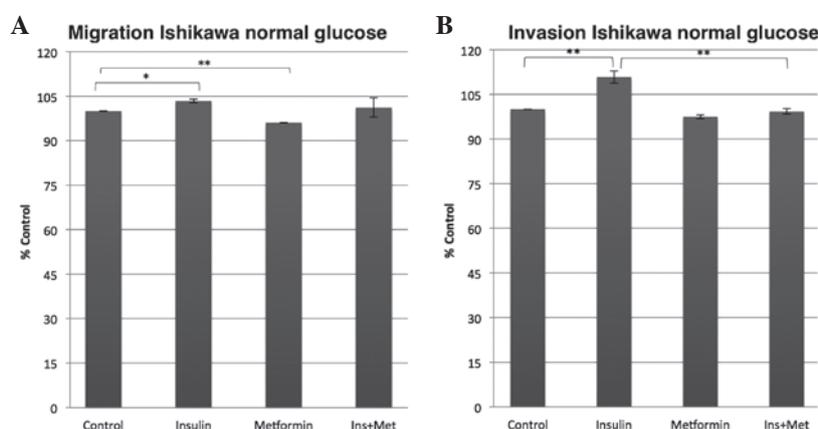


Figure 2. Migration and invasion of the Ishikawa cell line in a normal glucose environment during 16 h of incubation. The insulin treatment increased the ability to migrate and invade. The metformin treatment was able to inhibit the insulin effect. (A) Migration assay in a high glucose environment; * $P=0.032$ and ** $P=0.001$. (B) Invasion assay in a high glucose environment; ** $P=0.006$. Mean \pm standard error of the mean. Ins, insulin; Met, metformin.

normal glucose conditions, the Ishikawa cells were seeded into 96-well plates at a density of 5,000 cells/well in 100 μ l drug-free medium overnight. The cells were then treated with increasing doses of metformin (0, 0.1, 1 and 5 mM) for 72 h. A CellTiter Glo Luminescent assay was performed as aforementioned. The effect of the different treatments was calculated as a fold-change compared with the control group. Each experiment was performed in sextuplicate and repeated three times.

Statistical analysis. Quantitative data are represented as the mean \pm standard error of the mean of at least three independent experiments. SPSS version 23 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) was used to perform a one-way analysis of variance and Turkey's post-hoc test, a generalized estimating equation test or Student's t-test, as appropriate. $P<0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Low-dose metformin inhibits the insulin effect on the migration and invasion in the EC cell line. The present study examined the effect of a hyperinsulinemic environment with or without metformin treatment on the migration and

invasion ability of Ishikawa cells when exposed to a high or normal glucose environment. In a high glucose environment, insulin exposure increased the migration by 77% ($P<0.001$) and the invasion capability by 57% ($P<0.001$) in the Ishikawa cells compared with the control. While metformin alone did not confer any change in the migration and invasion capabilities of the Ishikawa cells in a high glucose environment when compared with the control, the metformin co-treatment (insulin plus 0.1 mM metformin) markedly attenuated the insulin effect, leading to a decrease in the migration ability by 47% ($P=0.023$) and in the invasion ability by 42% ($P<0.001$), therefore reducing the insulin effect (Fig. 1). In the normal glucose environment, however, the insulin and the metformin effects were less dominant compared with those in the high glucose environment. While the insulin exposure of the Ishikawa cells only slightly increased the migration and invasion ability by 3% ($P=0.032$) and 10% ($P=0.006$), respectively, compared with the control, the metformin co-treatment almost completely abolished the insulin effect on the invasion potential, as the metformin co-treatment inhibited the insulin effect on the invasion ability to a control rate (Fig. 2). Metformin alone on the other hand significantly decreased the capability of the Ishikawa cells to migrate by

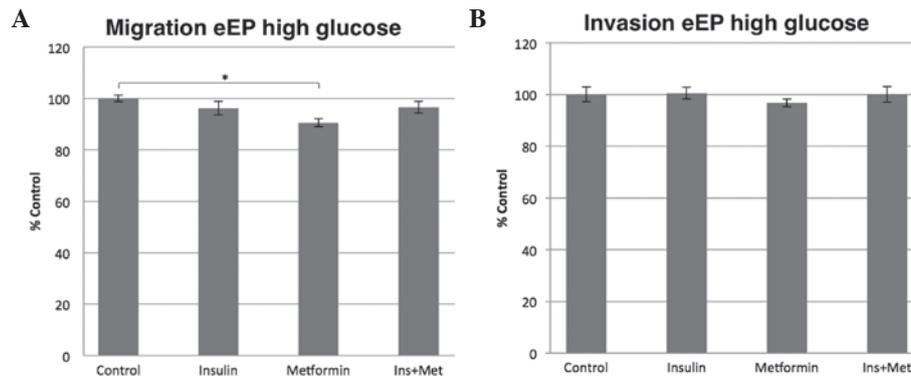


Figure 3. Migration and invasion of the primary eEPs in a high glucose environment during 16 h of incubation. The metformin treatment decreased the migration effect. (A) Migration assay in a high glucose environment. (B) Invasion assay in a high glucose environment. Mean \pm standard error of the mean. * $P < 0.001$. eEPs, endometrial epithelial cells; Ins, insulin; Met, metformin.

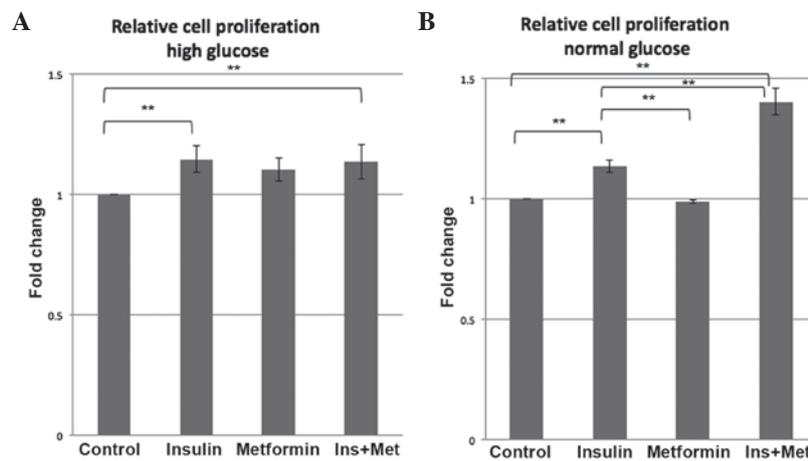


Figure 4. Relative cell proliferation of the Ishikawa cell line in a (A) high glucose and a (B) normal glucose environment. The insulin treatment increased the proliferation in the two glucose conditions and metformin at 0.1 mM was not able to reduce the proliferation. Mean \pm standard error of the mean. ** $P = 0.05$. Ins, insulin; Met, metformin.

4% ($P = 0.001$) and non-significantly decreased their ability to invade by 3% ($P = 0.069$) compared with the control.

Low-dose metformin is effective in primary eEPs. To investigate the efficiency of metformin treatment, the effect of metformin on normal eEPs was analyzed. When the primary eEPs were cultured in a high glucose environment, insulin alone or in combination with metformin did not change the migration or invasion potential after 16 h. However, metformin alone inhibited the migration potential significantly by 10% ($P < 0.001$) and the invasion capacity non-significantly by 4% ($P = 1.000$) compared with the control (Fig. 3).

Low-dose metformin does not decrease the proliferation of the EC cell line. To determine if the glucose environment affects the proliferation potential of epithelial cancer cells, Ishikawa cells were treated using the four treatment conditions (control, insulin, metformin and insulin plus metformin) for 72 h in media containing high or normal glucose. As shown in Fig. 4, insulin treatment increased the proliferation of the Ishikawa cells by 1.15-fold in the high glucose condition ($P = 0.029$) and by 1.13-fold in the normal glucose condition ($P = 0.003$) compared to the control group. However, treatment

with 0.1 mM metformin did not have a significant effect on Ishikawa cell proliferation compared with the control group in the 72 h, either in a high or normal glucose environment. Furthermore, in this treatment period, 0.1 mM metformin in combination with insulin was not able to inhibit the stimulatory insulin effect on the proliferation potential in high glucose and even lead to an enhanced proliferation potential in the normal glucose condition compared with the control (1.40-fold; $P < 0.001$).

Metformin decreases EC cell line proliferation in a dose-dependent manner. In order to test the sensitivity of the EC cell line to metformin at different concentrations in a high and normal glucose environment, the proliferation of Ishikawa cells treated with metformin (0, 0.1, 1 and 5 mM) in medium containing high and normal levels of glucose for 72 h was measured (Fig. 5). Independent of the glucose concentration in the medium, the proliferation potential was unchanged at 0.1 mM during 72 h (1.0-fold with high glucose and 0.97-fold with normal glucose relative to the control), while reduced proliferation was noted with 1 mM metformin (0.92-fold with high glucose; $P = 0.037$), followed by a further reduction with increasing metformin concentration (0.81-fold at 5 mM

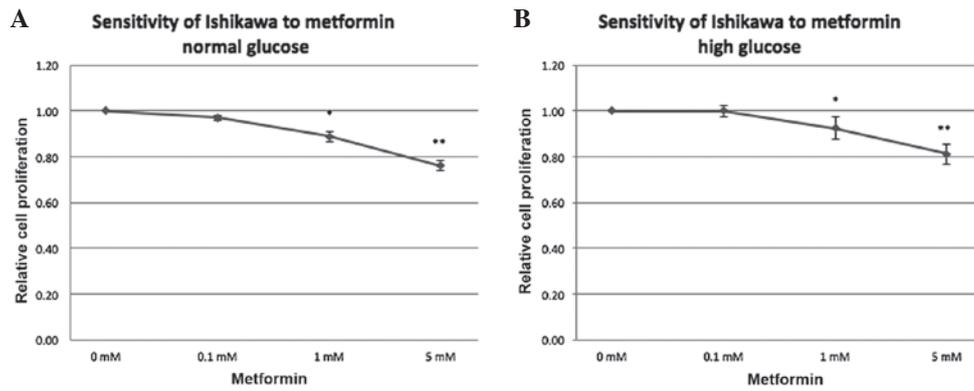


Figure 5. Sensitivity of the Ishikawa cell line to metformin in a (A) high glucose and in a (B) normal glucose environment. The Ishikawa cell line was cultured in the presence of varying concentrations of metformin for 72 h. (A) *P=0.037 and **P=0.002; (B) *P=0.027 and **P=0.002. The relative cell proliferation sensitivity of the Ishikawa cell line to metformin was in the range of 1 and 5 mM in the two glucose environments. Mean \pm standard error of the mean.

with high glucose; P=0.002). In a normal glucose condition, a slightly more pronounced effect was noted compared with that in the high glucose environment (0.89-fold for 1 mM, P=0.027; and 0.79-fold for 5 mM, P=0.002).

Discussion

Considering the increasing level of metformin research in cancer therapy, as well as in patients with type II diabetes mellitus, thus extending its use to the non-diabetic population, the present study investigated the effectiveness of low-dose metformin in EC development and prevention. In order to analyze metformin as a cancer prevention agent and/or cancer progression treatment in endometrial adenocarcinoma type I eEPs and endometrial epithelial cancer cells were exposed to metformin in either a high glucose or normal glucose medium with or without insulin substitution.

Glucose is an essential nutrient that supports cellular energy homeostasis. The normal serum glucose level is usually maintained at \sim 5.5 mM. However, increased blood glucose levels and hyperglycemia contribute to growth and carcinogenesis in EC (26), and act as a critical link between the observed increased cancer risk in patients with type II diabetes (5). Furthermore, in conditions such as PCOS, insulin resistance can be obesity-independent. Despite a normoglycemic state, the associated hyperinsulinemia is believed to be a promoting factor not only for cancer initiation, but also for cancer progression (7,27).

Several studies have suggested that high glucose levels create an optimal environment for cancer cells to exhibit a resistance to metformin (28-30). The current study evaluated the insulin action and the metformin efficiency on the metastatic potential of EC cells when exposed to a high and normal glucose environment. The findings showed that insulin treatment in each glucose condition increased the migration and invasion ability of the endometrial epithelial cancer cells, however, this effect was more pronounced in the high glucose environment. In addition, low-dose metformin effectively attenuated the effects of insulin action in high and normal glucose conditions, leading to a less profound effect. Notably, the results in the normal glucose environment showed a decrease in the ability of the cells to migrate when treated with metformin compared with

the control group. However, a significant difference could not be found between the metformin and control groups in a high glucose environment, but compared with the normal glucose environment, a tendency of cancer cell resistance was present when exposed to high glucose levels. By contrast, insulin alone or in combination with metformin showed no effect on primary eEPs exposed to high glucose conditions with regard to their migration or invasion potential after 16 h. We assume that primary eEPs do not have the metastatic potential observed in cancer cells. Furthermore the short incubation of 16 h may not be long enough for the insulin to activate the invasion potential of these cells. However, metformin alone was able to reduce the inherent migration capability of the eEPs. These results support the evidence that a high glucose environment interferes in the metformin effect on cancer cells.

To the best of our knowledge, the present study shows for the first time the ability of metformin to inhibit the metastatic potential of endometrial epithelial cancer cells, while the metformin efficiency in the inhibition of migration and invasion has already been reported in a dose-dependent manner in other types of cancer cells, including ovarian (23) and prostate (31) cancer cells, and osteosarcoma (32). Recently, Han *et al* reported an increased ability of adhesion and invasion in two EC cell lines, suggesting that targeting glucose metabolism may be a promising therapeutic strategy for the treatment of EC (33).

Besides the potential anti-metastatic effect of metformin, several studies have indicated that metformin may be a useful anti-proliferation agent for EC cells. Cantrell *et al* showed for the first time that metformin potently inhibits growth in two EC cell lines [half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 1 mM metformin] after 72 h of treatment in a normal glucose environment (17). Takahashi *et al* demonstrated that after 48 h of treatment with increasing concentrations of metformin in normal glucose conditions, \geq 5 mM metformin significantly reduce the number of viable cells (IC₅₀ of 6.78 mM metformin) (21). Furthermore, the metformin inhibitory proliferation effect has been reported for certain other types of cancer. Wu *et al* showed that metformin inhibits the proliferation of ovarian cancer cells in a dose- and time-dependent manner *in vitro* (IC₅₀ of 16.67 mM metformin) and *in vivo* in a nude mouse model (23). Kato *et al* examined the effects of metformin in prostate cancer cell proliferation using the MTS assay and cell counting.

The number of viable cells of three prostate cancer cell lines decreased significantly after incubation with metformin (IC₅₀ of 5 mM metformin) for 48 h (31). However, in the present study, in the Ishikawa endometrial epithelial cancer cell line, it was observed that the insulin treatment increased cell proliferation, without any reduction in proliferation by the addition 0.1 mM metformin regardless of the glucose concentration present. This apparent discrepancy may result from the high micromolar metformin concentrations used in the previous studies, which are much greater than the steady-state levels in the patients' plasma. The present study observed the relative cell proliferation sensitivity to metformin in the EC cell line in the range between 1 and 5 mM in each glucose environment, although this was more pronounced in the normal glucose condition. Moreover, these findings were in the presence of estradiol, an important factor in endometrial proliferative disorders, but not used in the published endometrial studies.

In addition, the epidemiological and laboratory studies remain controversial. Numerous details of the action of metformin remain to be identified, and the risk of harm must be considered when designing novel metformin-based therapies. The knowledge gained from the combination of tumor genetics, patient metabolic profiles and the cellular environment will assist in determining the tumor preventative or treatment efficiency of metformin. We expect to improve the understanding of the mechanisms linking glucose metabolism, hyperinsulinemia and metformin treatment with EC development and progression. According to the present findings, it is indicated that metformin at 0.1 mM is not efficient enough to decrease the proliferation in 72 h of treatment in an EC cell line. However, in this concentration, metformin can inhibit the insulin effect by decreasing the high cellular invasion and migration potential in high and normal glucose environments, demonstrating an anti-metastatic effect of metformin in endometrial epithelial cancer cells. Nevertheless, further investigations are necessary to improve the knowledge of metformin as an effective targeted therapy in cancer, as well as a long term treatment to be efficient in the inhibition of target genes and proteins connected to the development and progression of cancer.

Acknowledgements

This study was generously supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq; grant no. 470636/2012-2), Incentive Fund for Research and Events of Clinics Hospital of Porto Alegre (FIPE-HCPA; grant no. 14-0267), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Excellence Initiative from the University of Heidelberg (grant no. 7.013.14).

References

1. No authors listed: Cancer statistics. *JAMA* 310: 982, 2013.
2. Garg K and Soslow RA: Endometrial carcinoma in women aged 40 years and younger. *Arch Pathol Lab Med* 138: 335-342, 2014.
3. Clarke CL and Sutherland RL: Progesterone regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev* 11: 266-301, 1990.
4. Nead KT, Sharp SJ, Thompson DJ, Painter JN, Savage DB, Semple RK, Barker A: Australian National Endometrial Cancer Study Group (ANECs), Perry JR, Attia J, *et al*: Evidence of a causal association between insulinemia and endometrial cancer: A mendelian randomization analysis. *J Natl Cancer Inst* 107: pii: djv178, 2015.
5. Szablewski L: Diabetes mellitus: Influences on cancer risk. *Diabetes Metab Res Rev* 30: 543-553, 2014.
6. SGO Clinical Practice Endometrial Cancer Working Group, Burke WM, Orr J, Leitao M, Salom E, Gehrig P, Olawaiye AB, Brewer M, Boruta D, Vilella J, *et al*: Endometrial cancer: A review and current management strategies: Part I. *Gynecol Oncol* 134: 385-392, 2014.
7. Mu N, Zhu Y, Wang Y, Zhang H and Xue F: Insulin resistance: A significant risk factor of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 125: 751-757, 2012.
8. Barone BB, Yeh HC, Snyder CF, Peairs KS, Stein KB, Derr RL, Wolff AC and Brancati FL: Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *JAMA* 300: 2754-2764, 2008.
9. Friberg E, Orsini N, Mantzoros CS and Wolk A: Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: A meta-analysis. *Diabetologia* 50: 1365-1374, 2007.
10. Bowers LW, Rossi EL, O'Flanagan CH, deGraffenried LA and Hursting SD: The role of the insulin/IGF system in cancer: Lessons learned from clinical trials and the energy balance-cancer link. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6: 77, 2015.
11. Gallagher EJ and LeRoith D: Obesity and diabetes: The increased risk of cancer and cancer-related mortality. *Physiol Rev* 95: 727-748, 2015.
12. Shao R, Li X, Feng Y, Lin JF and Billig H: Direct effects of metformin in the endometrium: A hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 33: 41, 2014.
13. Umene K, Banno K, Kisu I, Yanokura M, Nogami Y, Tsuji K, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Yamagami W, *et al*: New candidate therapeutic agents for endometrial cancer: Potential for clinical practice (review). *Oncol Rep* 29: 855-860, 2013.
14. Febbraro T, Lengyel E and Romero IL: Old drug, new trick: Repurposing metformin for gynecologic cancers? *Gynecol Oncol* 135: 614-621, 2014.
15. He H, Ke R, Lin H, Ying Y, Liu D and Luo Z: Metformin, an old drug, brings a new era to cancer therapy. *Cancer J* 21: 70-74, 2015.
16. Viollet B, Guigas B, Sanz Garcia N, Leclerc J, Foretz M and Andreelli F: Cellular and molecular mechanisms of metformin: An overview. *Clin Sci (Lond)* 122: 253-270, 2012.
17. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA and Bae-Jump VL: Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation-implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol* 116: 92-98, 2010.
18. Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GF, Pellegrini F and Nicolucci A: Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: Systematic review. *PLoS One* 8: e71583, 2013.
19. Ko EM, Walter P, Jackson A, Clark L, Franasiak J, Bolac C, Havrilesky LJ, Secord AA, Moore DT, Gehrig PA and Bae-Jump V: Metformin is associated with improved survival in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 132: 438-442, 2014.
20. Tabrizi AD, Melli MS, Foroughi M, Ghojzadeh M and Bidadi S: Antiproliferative effect of metformin on the endometrium-a clinical trial. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 10067-10070, 2014.
21. Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, Takebayashi A, Kita N, Takahashi K and Murakami T: Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int* 14: 53, 2014.
22. Sarfstein R, Friedman Y, Attias-Geva Z, Fishman A, Bruchim I and Werner H: Metformin downregulates the insulin/IGF-I signaling pathway and inhibits different uterine serous carcinoma (USC) cells proliferation and migration in p53-dependent or -independent manners. *PLoS One* 8: e61537, 2013.
23. Wu B, Li S, Sheng L, Zhu J, Gu L, Shen H, La D, Hambly BD, Bao S and Di W: Metformin inhibits the development and metastasis of ovarian cancer. *Oncol Rep* 28: 903-908, 2012.
24. Chou CC, Lee KH, Lai IL, Wang D, Mo X, Kulp SK, Shapiro CL and Chen CS: AMPK reverses the mesenchymal phenotype of cancer cells by targeting the Akt-MDM2-Foxo3a signaling axis. *Cancer Res* 74: 4783-4795, 2014.
25. Bao B, Azmi AS, Ali S, Zaiem F and Sarkar FH: Metformin may function as anti-cancer agent via targeting cancer stem cells: The potential biological significance of tumor-associated miRNAs in breast and pancreatic cancers. *Ann Transl Med* 2: 59, 2014.
26. Lambe M, Wigertz A, Garmo H, Walldius G, Jungner I and Hammar N: Impaired glucose metabolism and diabetes and the risk of breast, endometrial, and ovarian cancer. *Cancer Causes Control* 22: 1163-1171, 2011.
27. Moran LJ, Hutchison SK, Norman RJ and Teede HJ: Lifestyle changes in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*: CD007506, 2011.

28. Sinnett-Smith J, Kisfalvi K, Kui R and Rozengurt E: Metformin inhibition of mTORC1 activation, DNA synthesis and proliferation in pancreatic cancer cells: Dependence on glucose concentration and role of AMPK. *Biochem Biophys Res Commun* 430: 352-357, 2013.
29. Menendez JA, Oliveras-Ferreras C, Cufí S, Corominas-Faja B, Joven J, Martín-Castillo B and Vazquez-Martin A: Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle* 11: 2782-2792, 2012.
30. Zhuang Y, Chan DK, Haugrud AB and Miskimins WK: Mechanisms by which low glucose enhances the cytotoxicity of metformin to cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 9: e108444, 2014.
31. Kato H, Sekine Y, Furuya Y, Miyazawa Y, Koike H and Suzuki K: Metformin inhibits the proliferation of human prostate cancer PC-3 cells via the downregulation of insulin-like growth factor I receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 461: 115-121, 2015.
32. Chen X, Hu C, Zhang W, Shen Y, Wang J, Hu F and Yu P: Metformin inhibits the proliferation, metastasis, and cancer stem-like sphere formation in osteosarcoma MG63 cells *in vitro*. *Tumour Biol* 36: 9873-9883, 2015.
33. Han J, Zhang L, Guo H, Wysham WZ, Roque DR, Willson AK, Sheng X, Zhou C and Bae-Jump VL: Glucose promotes cell proliferation, glucose uptake and invasion in endometrial cancer cells via AMPK/mTOR/S6 and MAPK signaling. *Gynecol Oncol* 138: 668-675, 2015.

