



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISIOLOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, ENDÓCRINA E TUMORAL

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE FATORES
DE CRESCIMENTO E SEMAFORINA EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS *IN VITRO***

Gustavo Dias Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Porto Alegre, novembro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA MOLECULAR, ENDÓCRINA E TUMORAL

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE A EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE FATORES
DE CRESCIMENTO E SEMAFORINA EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS *IN VITRO***

Gustavo Dias Ferreira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Porto Alegre, novembro de 2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Professores e Funcionários.

Ao Prof. Edison Capp, pela oportunidade e confiança depositada em todos os momentos.

Profa. Ilma Brum e Profa. Helena Corleta, pela disposição e sábios conselhos.

Prof. Thomas Strowitzki, Dra. Ariane Germeyer e Julia Jauckus pela receptividade e experiência.

Aos meus colegas de laboratório, Vanderlei Biolchi, Lolita Pizzolato, Gisele Branchini, Patrícia Martiny, Carol Hillebrand, Fernanda Seibel, Joelson Tomedi, Diego Alcoba, Ana Paula Santin, Carlos Flores, Juliana Rangel, Stefan Gödde, Gabriela e todas alunas de iniciação científica, pela paciência, amizade e o aprendizado, fazendo com que um fisioterapeuta se sinta muito bem dentro de um laboratório de Biologia Molecular. Em especial a Amanda, Aline e Tadeu, que compartilhei muitos momentos na sala de cultura.

Aos meus colegas de mestrado e doutorado, Rafael Fernandes, Taína e Felipe Moyses, pela amizade.

À Gabriela Klein Couto, presente em todos os momentos com um carinho e um apoio incondicional.

Enfim, aos meus pais, Sérgio e Rosângela, e minha irmã, Juliana, por tudo e sempre. Sem vocês, nada seria possível.

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE ABREVIATURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE FIGURAS	13
INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS SEÇÃO I	29
OBJETIVOS SEÇÃO II	29
MATERIAIS E MÉTODOS SEÇÃO I.....	30
Delineamento	30
Pacientes.....	30
Cálculo do tamanho da amostra.....	30
Cultura das células estromais endometriais	31
Imunocitoquímica	34
Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR)	34
Normalização.....	38
Western blot	38
Análise estatística.....	40
MATERIAIS E MÉTODOS SEÇÃO II.....	42
Delineamento	42
Pacientes.....	42
Análise dos tecidos.....	42
Cultura de células estromais endometriais	43
Decidualização celular.....	43
Extração de RNA total e síntese de cDNA	44
qRT-PCR de SEMA3A-F	44
ELISA de SEMA3A no tecido endometrial no período proliferativo e secretório.....	45

Análise estatística.....	45
ASPECTOS ÉTICOS	46
DESCARTE DE RESÍDUOS.....	47
LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO PROJETO.....	47
FONTES DE FINANCIAMENTO.....	48
RESULTADOS.....	49
Seção I	49
Seção II	63
DISCUSSÃO.....	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido	105
ANEXO 2 – Artigo 1	107
ANEXO 3 - Artigo 2.....	129
ANEXO 4 – Artigo 3	157
ANEXO 5 – Artigo 4	178

RESUMO

Este trabalho foi dividido em duas seções, a primeira teve o objetivo de avaliar a ação da metformina sobre a expressão proteica e gênica dos receptores de insulina (IR) e IGF-1 (IGF-1R), como também proteínas da via de sinalização destes receptores, Akt/PKB, ERK, PI3K e GLUT4, em cultura primária de células estromais endometriais hiperandrogênicas e hiperinsulinêmicas, simulando características da Síndrome dos Ovários Policísticos (SOP). A segunda seção verificou a expressão de semaforina da classe 3 (SEMA3A-F) nas fases do ciclo menstrual e a ação da metformina, em diferentes concentrações, na expressão desta semaforina em cultura primária de células estromais endometriais.

No primeiro estudo foram realizadas culturas primárias de células estromais endometriais em diferentes grupos estimulados com estrogênio, progesterona, insulina e androgênios (características da SOP), e tratados com metformina por 10 min, 24 e 48 h. Após 14 dias foram extraídos RNA e proteína para realização das técnicas de qRT-PCR, para avaliar IR e IGF-1R, e *Western blot*, para avaliar IR, IGF-1R, Akt/PKB, ERK, PI3K e GLUT4. Houve aumento da expressão gênica de IR nos grupos tratados com insulina, e uma potencialização deste efeito quando a metformina foi associada. Enquanto que o androgênio diminuiu a expressão de IGF-1R e a metformina reverteu este efeito. Quanto à expressão proteica, observou-se que a interação da metformina com a insulina aumentou a expressão do IR em relação aos outros grupos. O IGF-1R sofreu efeito principalmente da insulina, que causou o aumento da expressão deste receptor, e a metformina não influenciou em sua expressão. PI3K e GLUT4 apresentaram uma maior expressão nos grupos

estimulados com insulina, e ainda maior quando tratados com insulina e metformina. A proteína ERK não sofreu influência da metformina, enquanto a fosforilação da Akt/PKB foi diminuída significativamente pela ação da metformina.

No segundo estudo foram coletadas biópsias endometriais nas fases proliferativa e secretória do ciclo menstrual e por qRT-PCR e ELISA foi quantificada a expressão de SEMA3A-F comparando estas fases do ciclo menstrual. Também em culturas primárias de células estromais endometriais foi observado o efeito da metformina, em diferentes concentrações, sobre a expressão desta classe de semaforina. Foi observado uma maior expressão das semaforinas 3A, 3C, 3D e 3E na fase proliferativa do ciclo menstrual comparado com a fase secretória. Em cultura de células, altas doses de metformina inibiram a expressão das semaforinas 3A, 3D e 3E.

Como conclusão, a metformina tem efeito sobre células estromais endometriais atuando sobre fatores de crescimento e proteínas de suas vias de sinalização, normalmente aumentando sua expressão, quando associada à insulina. A fosforilação da Akt/PKB foi inibida pela metformina possivelmente por sua ação antiproliferativa. A semaforina de classe 3 está relacionada com a proliferação de células endometriais, e a metformina, em altas doses, diminui sua expressão.

ABSTRACT

This study has two sections, the first aimed to evaluate the effect of metformin on gene and protein expression of insulin receptor (IR) and IGF-1 receptor (IGF-1R), as well as proteins of the pathway signaling of growth factors; Akt/PKB, ERK, PI3K and Glut4 in primary cultures hyperinsulinemic and hyperandrogenism of endometrial stromal cells, simulating polycystic ovary syndrome (PCOS). The second section to evaluate the expression of the class 3 semaphorin (SEMA3A-F) on phases of the menstrual cycle, and the effect of metformin on expression of this semaphorin in endometrial stromal cells. Method: At first, primary cultures of endometrial stromal cells were performed in different groups stimulated with estrogen, progesterone, insulin and androgens (PCOS characteristics) and metformin for 10 minutes, 24 and 48 hours. After 14 days were extracted RNA and protein for qRT-PCR to evaluate IR and IGF-1R, and Western blot to assess IR, IGF-1R, Akt/PKB, ERK, PI3K, and Glut4. In the second, were collected endometrial biopsies in proliferative and secretory phases of the cycle, and by qRT-PCR and ELISA observed the expression of SEMA3A-F comparing these phases of the menstrual cycle. Also in primary cultures of endometrial stromal cells was observed effects of metformin on the expression of semaphorin class. Results: In the first section, the gene expression of IR showed an increase in the groups treated with insulin, and a more effect when metformin was associated, whereas androgen decreased expression of IGF-1R and metformin reversed this state. Regarding protein expression, it was observed that the interaction of metformin with insulin increased the expression of IR; and of IGF-1R, insulin affected mainly by increasing expression of this receptor, and metformin did not

affect expression. Glut4 and PI3K showed higher expression in insulin-stimulated groups, and even greater when treated with insulin and metformin. The protein ERK was not affected by metformin, while the phosphorylation of Akt/PKB was significantly decreased by metformin action. In the second section, we observed a higher expression of semaphorin 3A, 3C, 3D and 3E in the proliferative phase of the menstrual cycle compared with the secretory phase. In cell culture, high doses of metformin inhibited the expression of semaphorin 3A, 3D, and 3E. Conclusions: Metformin has an effect on endometrial stromal cell acting on growth factors and their proteins signaling pathways, usually increasing expressions when combined with insulin. Phosphorylation of Akt/PKB was inhibited by metformin possibly for its antiproliferative action. The semaphorin class 3 is related to the proliferation of endometrial cells, and metformin (high doses), decreases its expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt/PKB	serina-treonina cinase B/Proteína cinase B
AMPK	<i>adenosine mono-phosphate-activated protein kinase</i>
cDNA	DNA complementar
Ct	<i>threshold cycle</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DHT	Diidrotestosterona
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle medium</i> high glucose
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfatados
E ₂	Estradiol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ER	receptor de estrogênio
ERK	proteína cinase ativada por sinais extracelulares
FBS	soro bovino fetal
GEE	Generalized Estimatin Equations
GLUT4	transportador de glicose tipo 4
HPRT1	<i>hipoxantina fosforibosil-transferase</i>
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
IGF-1R	Receptor de fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
IGFBP-1	proteína ligadora de IGFBP-1
IR	<i>insulin receptor</i>

LH	hormônio luteinizante
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
Npn	Neuropinina
P ₄	Progesterona
PBS	tampão salina fosfato
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinase
PR	receptor de progesterona
RNA	ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
qRT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SBF	soro bovino fetal
SEMA3A-F	semaforina da classe 3 (de A a F)
SHBG	globulina carreadora de esteroides sexuais
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Primers utilizados para análise da expressão do RNAm de IR e IGF-1R.....	37
--	----

Tabela 2: Primers utilizados para análise da expressão do RNAm da SEMA3A-F.....	46
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagens obtidas por microscópio invertido: células estromais endometriais demonstrando sua morfologia característica em monocamada diferenciada e confluenta.	51
Figura 2: Imunocitoquímica de fluorescência. Células estromais endometriais de cultura primária com anticorpo primário antivimentina e anticorpo secundário específico rodamina	51
Figura 3: Expressão gênica do receptor de insulina (A) e IGF-1 (B) após 24 h de tratamento com metformina	53
Figura 4: Expressão proteica de receptor de insulina após 24 (A) e 48 h (B) de tratamento com metformina	55
Figura 5: Expressão proteica do receptor de IGF-1 após 24 (A) e 48 h (B) de tratamento com metformina	57
Figura 6: Expressão proteica de PI3K (A) e Glut4 (B) após 24h de tratamento com metformina.	59
Figura 7: Expressão proteica da razão da fosforilação da ERK com sua basal após 10 min, 24 e 48 h de tratamento com metformina.	61
Figura 8: Fosforilação da Akt/PKB após 10 min (A) e 24 h (B) de tratamento com metformina.	62
Figura 9: Expressão gênica da SEMA3A-F no período proliferativo vs.	

secretório em biópsias de endométrio humano. 64

Figura 10: Expressão proteica de SEMA3A no período proliferativo e secretório em biópsias de endométrio humano..... 65

Figura 11: Níveis de prolactina no sobrenadante de cultura de células estromais endometriais decidualizadas após tratamento de 14 dias de diferentes concentrações de metformina..... 68

Figura 12: Expressão gênica de SEMA3A-F após tratamento de 14 dias com diferentes concentrações de metformina em cultura de células estromais endometriais..... 69

Figura 13: Autofosforilação de IR..... 80

INTRODUÇÃO

O endométrio, parede mucosa que reveste o útero, é um tecido que varia no decorrer do ciclo menstrual, o qual é composto por uma fase de descamação do endométrio, período da menstruação que varia aproximadamente do dia 0 até o 5º dia do ciclo, uma fase proliferativa do endométrio, com predominância do hormônio estrogênio (E_2), do dia 5 ao 14º dia do ciclo, quando ocorre a ovulação, e um período secretório, com predominância da progesterona (P_4) variando do 14º até o 28º dia de um ciclo regular. Este ciclo, com crescimento e transformação endometrial por influência de oscilações hormonais (a partir de 1 mm de espessura no início do ciclo menstrual, chega até 12 mm na fase secretória), proporciona condições adequadas para receber um blastocisto (Dallenbach, Sterzik et al. 1987; Gargett and Ye 2012).

Concomitantemente à transformação da superfície endometrial, há a decidualização, processo que se caracteriza por mudanças morfológicas e funcionais nos tecidos endometriais glandulares e que inclui várias etapas, entre elas as fases de remodelação tecidual e vascular. A decidualização ocorre principalmente sob influência dos hormônios esteroides ovarianos (Giudice, Cataldo et al. 1996), embora diversos fatores de crescimento participem ativamente deste processo (King 2000). A prolactina, além de ter ação no crescimento e proliferação, é um marcador importante de decidualização do tecido (Tsutsumi, Hiroi et al. 2009) e é detectada em cultura de células estromais do endométrio tratadas com E_2 e P_4 (Garzia, Borgato et al. 2004; Capp, Jauckus et al. 2011; Germeyer, Jauckus et al. 2011).

Na fase secretória, ocorre o intervalo implantacional, no qual o endométrio é

receptivo à aposição, adesão e invasão embrionária. Este intervalo, conhecido como “janela de implantação”, é temporalmente definido e restrito durante o ciclo menstrual (Revel 2012). Mesmo não existindo um consenso sobre o momento exato da implantação embrionária na espécie humana, estudos clínicos sugeriram que a janela de implantação ocorra entre o 20° e 24° dia do ciclo menstrual, ou seja, do sexto ao décimo dia pós-ovulação em um ciclo menstrual padrão de 28 dias. Houve evidências de que o estradiol e a progesterona estejam envolvidos na formação e maturação da janela de implantação, por ação em receptores específicos de E₂ (ER) e de P₄ (PR) (Bergh and Navot 1992; Wilcox, Baird et al. 1999; Revel 2012).

Na preparação de um endométrio receptivo participam todos os tipos celulares: epitélio superficial, epitélio glandular, estroma endometrial, fibroblastos, células musculares lisas, macrófagos e monócitos (Giudice 1999). A implantação é o momento crítico para o estabelecimento da gestação e requer eventos celulares e moleculares que resultam na diferenciação do endométrio para permitir a invasão do blastocisto (Guzeloglu-Kayisli, Kayisli et al. 2009).

Contudo, a taxa de insucesso deste processo é alta em humanos (Casper 2011). A preparação do endométrio não é apenas dependente de uma estimulação adequada de hormônios esteroides. Para que a implantação ocorra é necessária uma comunicação adequada entre um embrião viável (blastocisto) e um endométrio receptivo (Lindhard, Bentin-Ley et al. 2002; Fazleabas, Kim et al. 2004; Strowitzki, Germeyer et al. 2006; Singh, Chaudhry et al. 2011; Bourdieu, Shao et al. 2012). Neste processo, estão envolvidos múltiplos mecanismos moleculares e alto grau de redundância de informação, dependendo da expressão de diversas proteínas (Lessey 2011). Entre os fatores envolvidos na comunicação embrião-endométrio estão prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, fatores de transcrição, moléculas de

adesão, e fatores de crescimento secretados pelo embrião e pelo endométrio. Estabelece-se, assim, uma interação sequencial de efeitos biológicos que codificam as primeiras etapas de uma gestação saudável (Paria, Ma et al. 2001; Lessey 2011; Singh, Chaudhry et al. 2011). Embora vários mecanismos já sejam bem conhecidos, alguns efeitos realizados por fatores de crescimento e hormônios necessitam ser elucidados.

Os fatores de crescimento compõem uma grande família de ligantes, receptores e proteínas de ligação. A maior parte de suas transduções de sinal intracelular ocorre através da ativação de tirosina cinases. A insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1) se ligam à porção extracelular dos seus receptores, e ativam a função tirosina cinase da subunidade intracelular. Esta, por sua vez, ativa substratos citoplasmáticos que seguem rotas de ativação para a realização do efeito biológico (ativação da mitose, expressão de proteínas, entre outros)(Cardone, Roy et al. 1998).

Os membros da família IGF e suas proteínas de ligação participam do crescimento, diferenciação e angiogênese e têm sido amplamente estudados no endométrio (Irwin, de las Fuentes et al. 1993; Irwin and Giudice 1998; Cavagna and Mantese 2003). A produção do RNA mensageiro (RNAm) de IGF-1 aumenta durante a fase proliferativa e no início da fase secretória (Giudice, Mark et al. 1998), e possuem ação mitogênica, afetando tanto o crescimento tecidual como o metabolismo celular quando se ligam ao receptor de IGF-1 (IGF-1R), que é um receptor com atividade tirosina cinase intrínseca, assim como o receptor da insulina (Lin, Li et al. 2003; Nayak and Giudice 2003). Verificou-se que a administração de IGF sobre o endométrio provoca um aumento localizado da permeabilidade vascular e da decidualização (Paria, Ma et al. 2001; Paria, Reese et al. 2002). Outro efeito

dos IGFs pode ser exercido diretamente sobre os embriões. Demonstrou-se que quando embriões humanos foram cultivados *in vitro* com a suplementação do IGF ao meio de cultura houve redução no número de células em apoptose e aumento na porcentagem de embriões que se desenvolveram até a fase de blastocisto (Spanos, Becker et al. 2000). A proteína ligadora de IGF-1 (*insulin like growth factor -1 binding protein* – IGFBP1) é abundantemente expressa em células do estroma endometrial, com funções nos processos de proliferação e diferenciação celular necessários para a manutenção do início da gestação (Cavagna and Mantese 2003). A IGFBP-1 liberada, juntamente com a prolactina, servem como marcadores de decidualização do tecido (Tsutsumi, Hiroi et al. 2009; Germeyer, Jauckus et al. 2011; Yin, Pavone et al. 2012) estando sua expressão aumentada na fase secretória (Corleta, Capp et al. 2000).

A insulina é um hormônio capaz de ativar várias vias intracelulares com efeitos múltiplos na regulação homeostática, incluindo transporte da glicose, síntese proteica, apoptose, proliferação, sobrevivência e divisão celular. O receptor de insulina pertence à família dos receptores com tirosina cinase e sofre autofosforilação. Posteriormente, substratos intracelulares, por exemplo, substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), são fosforilados servindo como locais de ancoragem para proteínas como fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) (De Fea and Roth 1997; Tseng and Mazella 2002; Yin, Pavone et al. 2012). A PI3K ativada, fosforila e ativa a via da Akt/Proteína Cinase B (Akt/PKB). A Akt/PKB desempenha um papel crítico no controle da proliferação, apoptose, sobrevivência celular e metabolismo da glicose (Burgering and Coffey 1995; Datta, Dudek et al. 1997; Cardone, Roy et al. 1998). Por imuno-histoquímica, foi demonstrado que a expressão das proteínas transportadoras de glicose (GLUT1 e GLUT4) estão aumentadas no endométrio

durante a fase lútea. O aumento da expressão destas proteínas é crescente até as primeiras semanas de gestação (Strowitzki, Capp et al. 2001). Além da ativação da via de sinalização da PI3K, a insulina ativa outras vias, incluindo a MAPK/ERK. A MAPK desempenha um papel crucial em várias vias, mediando sinais de fatores de crescimento e proteínas G (Selva, Raden et al. 1993). A ligação e a sinalização de insulina estão aumentadas na fase secretora do ciclo menstrual (Strowitzki, von Eye et al. 1993).

Com estas mudanças cíclicas do endométrio ao longo do ciclo menstrual, em preparação para implantação ou menstruação, ocorrem mitoses, diferenciação celular e apoptose. Distúrbios endometriais e disfunções da placenta são comuns em estados de hiperinsulinemia, tais como obesidade e Síndrome dos ovários policísticos (SOP), com o aumento do risco de hiperplasia endometrial, infertilidade e distúrbios no crescimento fetal, tornando-se importante o estudo do endométrio *in vitro*, em diversas condições e tratamentos (Lathi, Hess et al. 2005; Schutte and Taylor 2012).

A SOP é uma endocrinopatia ginecológica de etiologia desconhecida, que acomete aproximadamente 8 % das mulheres em idade reprodutiva (Harborne, Fleming et al. 2003; Gluszak, Stopinska-Gluszak et al. 2012). Foi descrita pela primeira vez em 1935, por Stein e Leventhal, caracterizada por infertilidade, obesidade, amenorréia e hirsutismo (Gluszak, Stopinska-Gluszak et al. 2012). Com o passar dos anos, foram sendo demonstradas outras características endócrinas e bioquímicas, tornando-a uma síndrome clinicamente heterogênea e muitas vezes, indistinguível de outras endocrinopatias.

Em maio de 2003, em um encontro da Sociedade Europeia de Reprodução

Humana e Embriologia (ESHRE) com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), foi estabelecido o Consenso de Rotterdam, o qual define a presença da SOP. Quando a paciente apresentar no mínimo dois dos três critérios seguintes: a) distúrbios menstruais/anovulação; b) evidência clínica ou bioquímica de hiperandrogenismo; c) padrão policístico ovariano ultra sonográfico (Rotterdam 2004; Trivax and Azziz 2007).

As mulheres com SOP apresentam alterações em aspectos reprodutivos e metabólicos que podem variar ao longo da vida. A SOP é um distúrbio que, em geral, começa na adolescência, progredindo para a infertilidade e o aumento de complicações metabólicas ao longo dos anos (Teede, Deeks et al. 2010). Há uma oligo-ovulação ou anovulação crônica, as quais se manifestam como oligomenorreia, caracterizada por menos de nove ciclos menstruais por ano, ou amenorreia, ausência de menstruação por no mínimo três ciclos em mulheres que apresentavam ciclo menstrual espontâneo, causando infertilidade nessas pacientes (Boivin, Griffiths et al. 2011).

Mulheres com SOP apresentaram taxas de infertilidade em torno de 70 %, porém esta alta taxa não pode ser atribuída somente à anovulação. Além disso, fatores como a redução na qualidade dos oócitos e embriões, alterações endometriais e dificuldades na implantação podem contribuir para a infertilidade (Brassard, AinMelk et al. 2008). Pacientes grávidas com SOP apresentaram maior risco de aborto, *diabete mellitus* gestacional, hipertensão na gestação, pré-eclampsia e bebês com baixo peso ao nascer (Palomba, Falbo et al. 2009; Qiao and Feng 2011).

Apesar da incerteza sobre a causa primária da SOP, há relatos sobre a

importância da hiperinsulinemia na sua promoção. Entre 50 e 70 % das mulheres com SOP apresentam resistência periférica à insulina, o que agrava o quadro de hiperandrogenismo (Legro, Castracane et al. 2004).

Na década de 80, foi descrita a hiperinsulinemia consequente à resistência periférica à insulina (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012). A hiperinsulinemia, presente em cerca de 60 % das mulheres com SOP, altera a regulação do metabolismo lipídico e proteico, bem como a síntese e metabolismo dos esteroides sexuais (Traub 2011).

Mulheres com SOP e hiperinsulinemia têm maior produção de testosterona, tornando a paciente e os folículos androgênicos, colaborando para a atresia folicular, anovulação, padrão polimicrocístico a ecografia (efeitos sobre o ovário), acne, hirsutismo, alopecia dependente de androgênio, distribuição central de gordura – efeitos androgênicos comuns associados à síndrome metabólica (Moran, Misso et al. 2010). O aumento da concentração sérica de insulina relaciona-se também ao aumento da síntese hepática de IGF-1, redução da produção hepática de globulina carreadora de esteróides sexuais (SHBG) e de IGFBP-1, além de alterações clínicas como perfil lipídico aterogênico, hipertensão, *diabete mellitus* tipo 2, que determinam aumento do risco de doenças cardiovasculares (Goudas and Dumesic 1997; Harborne, Fleming et al. 2003; Azziz, Carmina et al. 2006; Legro, Schlaff et al. 2010).

Entre as condições clínicas presentes, a obesidade é o fator mais importante para a hiperinsulinemia, estando diretamente relacionada à SOP. A incidência de obesidade em mulheres com SOP varia de 30 a 75 % (Diamanti-Kandarakis and Dunaif 2012). Mulheres com SOP também apresentam uma maior prevalência da síndrome metabólica comparadas a mulheres controles, estando também a

síndrome associada com dislipidemias (Dokras, Bochner et al. 2005; Rajendran, Willoughby et al. 2009; Hosseinpanah, Barzin et al. 2011; Mandrelle, Kamath et al. 2012; Moran, Arriaga et al. 2012).

Na SOP, o IGF-1 tem uma atividade semelhante ao hormônio luteinizante e à insulina na produção androgênica nas células da teca (Sarapik, Velthut et al. 2012).

O tratamento atual da SOP envolve o manejo das manifestações clínicas: os distúrbios menstruais, o hiperandrogenismo, a infertilidade e a obesidade. Tais esquemas terapêuticos aliviam os sintomas clínicos, mas não atuam sobre um dos problemas básicos, que é a resistência aumentada à insulina. A meta principal a ser alcançada nessas pacientes é a perda de peso, proteção à lesão endometrial e a prevenção de doenças cardiovasculares (Norman, Dewailly et al. 2007).

O primeiro tratamento para mulheres com SOP e obesidade é a modificação no estilo de vida, incluindo dietas e exercícios físicos. A perda de peso em torno de 10 % pode diminuir os níveis séricos de insulina e androgênio, restabelecer a função ovariana, melhorando a resposta à indução da ovulação (Guzick, Wing et al. 1994; Motta 2012).

Quando somente mudanças no estilo de vida não melhoram os sintomas, uma das opções terapêuticas é o uso de agentes sensibilizantes à insulina, sendo a metformina (*1,1-dimethylbiguanide hydrochloride*) a importante medicação deste grupo. Seu uso no tratamento da infertilidade está sendo muito discutido e pesquisado (Velazquez, Mendoza et al. 1994; Santana, de Sa et al. 2004; Costello, Chapman et al. 2006; Zhang and Liao 2010).

A metformina é um agente antidiabético, da classe das biguanidas,

amplamente utilizado, o qual melhora a sensibilidade à insulina no tratamento da diabetes *mellitus* tipo 2, pois possui ações em vários tecidos, tais como fígado, músculo esquelético, tecido adiposo, endométrio e ovários (Goodarzi and Bryer-Ash 2005; Palomba, Falbo et al. 2009). O uso da metformina no tratamento de pacientes com SOP vem aumentando nos últimos anos, principalmente pelo decréscimo no nível de androgênios periféricos, na restauração dos ciclos menstruais sem aumento da taxa de gestações múltiplas (Sonntag, Gotte et al. 2005) e diminuição da resistência à insulina (Lord, Flight et al. 2003; Eisenhardt, Schwarzmans et al. 2006). A resistência à insulina, e hiperinsulinemia, podem contribuir para a perda precoce da gestação na SOP, afetando negativamente a função endometrial e o local de implantação (Jakubowicz, Seppala et al. 2001).

Em mulheres com SOP, o tratamento com metformina restabelece a natureza cíclica da menstruação e aumenta a ovulação, reduz os níveis androgênicos, aumenta a taxa de fertilização e gestação (Tosca, Solnais et al. 2006; Katsiki and Hatzitolios 2010). Embora a metformina tenha sido utilizada clinicamente por mais de 40 anos, seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado (Hundal and Inzucchi 2003). A maioria dos estudos mostra uma diminuição na produção endógena de glicose pelo fígado seguido por uma redução da hiperinsulinemia (Radziuk, Zhang et al. 1997), alternativa sugerida por mecanismos que incluem alteração direta nos tecidos sensíveis à insulina, por exemplo, por mudanças na atividade da tirosina cinase do receptor de insulina (Sonntag, Gotte et al. 2005). Em mulheres obesas, a metformina pode reduzir os níveis de androgênios séricos, colesterol total e restaurar a regularidade dos ciclos menstruais (Chou, von Eye Corleta et al. 2003; Seibel, Chou et al. 2008; Moran, Pasquali et al. 2009), principalmente paralelo a uma mudança no estilo de vida da paciente (Ladson,

Dodson et al. 2011).

Apesar da metformina já ser um tratamento conhecido para mulheres com SOP anovulatória, sua função no tecido endometrial não está bem esclarecida. Estudos mostram que a metformina pode atuar diretamente no processo de decidualização das células estromais *in vitro*, e modular diversas proteínas envolvidas na implantação (Germeyer, Jauckus et al. 2011).

Em trabalhos recentes, sugere-se que a metformina seja utilizada para combater a proliferação celular no câncer (Landriscina and Esposito 2011). Supõe-se que o mecanismo relacionado a essa ação é a ativação da *adenosine monophosphate-activated protein kinase* (AMPK). A ativação da AMPK suprime diversos processos dependentes de alto gasto de ATP, tais como gliconeogênese e síntese de proteínas, além de inibir o complexo *mammalian target of rapamycin* (mTOR) relacionado com o crescimento e a proliferação celular (Gonzalez-Angulo and Meric-Bernstam 2010). Em células endometriais, esta ação da metformina é dependente da dose, atingindo o seu melhor efeito na inibição da proliferação celular com altas doses (5-10 mM) (Takemura, Osuga et al. 2007; Cantrell, Zhou et al. 2010).

O uso da metformina já foi proposto para prevenção do carcinoma endometrial em pacientes com SOP, pois fatores relacionados à síndrome, como hiperinsulinemia crônica, síndrome metabólica, diabetes, estimulam a proliferação endometrial (Campagnoli, Abba et al. 2013). O efeito antiproliferativo da metformina tem também sido demonstrado em outros tipos de câncer, como de mama, próstata, e em glioblastomas, apresentando ação inibitória sobre a via da Akt (Wright and Stanford 2009; Decensi, Puntoni et al. 2010; Gonzalez-Angulo and Meric-Bernstam 2010; Jalving, Gietema et al. 2010; Wysocki and Wierusz-Wysocka 2010; Wurth,

Pattarozzi et al. 2013).

No entanto, os efeitos do tratamento a longo prazo com a metformina não estão elucidados, e mais estudos são necessários para que se proponha o uso tanto para a melhora da implantação, como também para a prevenção de hiperplasias e câncer de endométrio.

Dentre as diversas proteínas relacionadas à proliferação celular e ao câncer, recentemente, vem se estudando as semaforinas, as quais, inicialmente, foram caracterizadas, em 1993, pelo seu papel no sistema nervoso central e, atualmente, são conhecidas como reguladoras cruciais da morfogênese e da homeostase de outros sistemas e órgãos (Yazdani and Terman 2006). Nesses sistemas, as semaforinas podem influenciar vários processos biológicos, principalmente na migração de células e ativação de citocinas (Tamagnone and Comoglio 2004; Mann, Chauvet et al. 2007).

As semaforinas são definidas pelos seus domínios e ligações com plexinas, neuropilinas e integrinas. São categorizadas em oito classes: as semaforinas de invertebrados são agrupadas em classes 1, 2 e 5 (cinco semaforinas no total); as classes 3-7 são semaforinas de vertebrados (20 semaforinas) e a classe V contém semaforinas viralmente codificadas (duas semaforinas). A sinalização da semaforina e sua implicação na doença humana tem provocado um enorme interesse no seu receptor e mecanismos de sinalização intracelular. Diversos trabalhos têm colaborado para melhorar a compreensão da biologia da semaforina e seus mecanismos de sinalização intracelular. As semaforinas individuais são bifuncionais e podem exercer efeitos de atração ou repulsão celular, dependendo do contexto biológico em que são encontradas. Os sinais moduladores tanto extrínsecos como

intrínsecos podem facilitar as respostas desta proteína. Sinais extracelulares (por exemplo, receptores tirosina cinase) geralmente influenciam a função semaforina, modulando seu receptor (Toyofuku, Zhang et al. 2004; Falk, Bechara et al. 2005; Ben-Zvi, Ben-Gigi et al. 2007; Chauvet, Cohen et al. 2007; Swiercz, Worzfeld et al. 2008).

Os receptores de semaforina são, em geral, proteínas do tipo plexina (plexinA1-plexinA4, plexinB1-plexinB3, plexinC1 e plexinD1). Além das plexinas, há diversos correceptores de semaforina, neuropilinas (Npns), os quais podem servir como ligantes.

As semaforinas da Classe 3 (semaforinas SEMA3A-F) atuam classicamente como axônio repelentes e controlam a formação de ligações neuronais *in vivo*. As SEMA3A-F também são atrativas e expressas em tecidos não neuronais e regulam a morfogênese cardíaca, angiogênese e carcinogênese através dos seus efeitos de migração, sobrevivência, crescimento e proliferação celular (Yazdani and Terman 2006).

As plexinas pertencentes às classes A e D servem como receptores para as SEMA3A-F, porém estas semaforinas não interagem diretamente com o receptor, se ligam a Npn-1 ou Npn-2 para ativar o complexo Npn-plexina (Suto, Ito et al. 2005; Yaron, Huang et al. 2005). Em casos de repulsão, algumas plexinas estão relacionadas à inativação da via PI3K-Akt. A sinalização repulsiva de SEMA3A em neurônios também regula o PTEN, um regulador negativo da PI3K-Akt, evitando a fosforilação de serina/treonina cinase (Chadborn, Ahmed et al. 2006).

As SEMA3A, SEMA3B e SEMA3F estão descritas geralmente como moduladoras de tumores e metástases (Roche, Boldog et al. 1996; Sekido, Bader et

al. 1996; Tse, Xiang et al. 2002; Kusy, Potiron et al. 2005; Futamura, Kamino et al. 2007). As SEMA3B e SEMA3F foram primeiramente avaliadas com a inibição da proliferação de células tumorais em câncer de pulmão, atuando como supressores de tumor (Roche, Boldog et al. 1996; Xiang, Hensel et al. 1996; Tse, Xiang et al. 2002; Xiang, Davalos et al. 2002). A SEMA3F é expressa em muitas linhagens celulares tumorais humanas, mas é pouco expressa em células de tumores em metástases *in vivo* (Bielenberg, Hida et al. 2004). No câncer de ovário, a SEMA3B tem sido correlacionada com a diminuição do crescimento celular *in vitro* e com a formação de tumores *in vivo* (Tse, Xiang et al. 2002). A SEMA3A tem sido relacionada à inibição da migração de células de tumor e na quimiotaxia de células de câncer de mama (Bachelder, Lipscomb et al. 2003), além de regular a adesão e a invasão do câncer de próstata (Herman and Meadows 2007). Porém, o papel prognóstico das SEMA3s é dependente do tecido de ação, por exemplo, níveis elevados de SEMA3A têm sido correlacionados com mau prognóstico em pacientes com câncer pancreático e os níveis altos de SEMA3F com um estágio avançado de melanoma (Bielenberg, Hida et al. 2004; Muller, Giese et al. 2007).

Para além das proteínas acima mencionadas, várias outras proteínas intracelulares foram implicadas na sinalização de SEMA3A-F, incluindo a ativação das MAPKs relacionadas com a ativação de vias mitóticas (Kruger, Aurandt et al. 2005). A SEMA3E, em contraste com as outras SEMA3s, diretamente liga-se à plexina (plexinD1), que atua em axônios em crescimento e migração de células endoteliais. No sistema nervoso embrionário, a SEMA3E controla a formação de projeções frontais de axônios (Chauvet, Cohen et al. 2007). Enquanto a SEMA3F inibe a metástase, a SEMA3E induz o crescimento invasivo e metástase no pulmão (Christensen, Ambartsumian et al. 2005). A expressão de SEMA3E em células de

adenocarcinoma de pulmão induz a formação de colônias de migração *in vivo* e *in vitro* (Gaur, Bielenberg et al. 2009).

Como descrito, os estudos são recentes, com resultados divergentes conforme o tecido analisado. Não há na literatura nenhum estudo correlacionando as semaforinas da classe 3 com sua expressão de ativação ou inibição de proliferação celular no endométrio e sua modulação por metformina como agente antiproliferativo.

OBJETIVOS SEÇÃO I

A primeira seção deste estudo avalia a ação da metformina sobre fatores relacionados à implantação em um modelo de hiperandrogenismo e hiperinsulinemia em células estromais endometriais *in vitro* e teve como objetivo:

- avaliar a ação da metformina sobre a expressão gênica e proteica dos receptores de insulina e de IGF-1.

- Avaliar a ação da metformina sobre a expressão proteica de PI3K e GLUT4.

- Verificar o efeito da metformina sobre a fosforilação das proteínas ERK e Akt/PKB.

OBJETIVOS SEÇÃO II

A segunda seção avalia a expressão da semaforina, como uma possível proteína proliferativa no ciclo menstrual, e o efeito da metformina a longo prazo sobre esta proteína, como um medicamento antiproliferativo, tendo como objetivos:

- Verificar a expressão gênica e proteica das semaforinas da classe 3 em biópsias de endométrio humano nos períodos proliferativo e secretório do ciclo menstrual.

- O efeito da metformina sobre a expressão gênica da semaforina de classe 3 em células estromais endometriais *in vitro*, além de seu efeito na decidualização.

MATERIAIS E MÉTODOS SEÇÃO I

Delineamento

Foi realizado um estudo experimental *in vitro*.

Pacientes

As células endometriais foram provenientes de pacientes submetidas à histerectomia (n=12), cuja indicação é independente deste estudo, do Serviço de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As pacientes foram informadas sobre os objetivos do estudo e que as células endometriais normalmente são descartadas, assim, permitiram, mediante assinatura de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), a utilização deste material na pesquisa. Foram fatores de exclusão: período pós-menopausa, diabetes *mellitus* e uso de hormônios esteroides nos três meses anteriores à cirurgia.

Cálculo do tamanho da amostra

Para detectar uma diferença de um desvio padrão (tamanho de efeito de moderado a grande) na expressão proteica da Akt/PKB entre os grupos, considerando um $\alpha=0,05$, um poder de 90% e uma correlação entre as medidas de 0,7 foram necessárias 7 culturas. Para o cálculo da amostra foi utilizado o programa PEPI 4.0.

Cultura das células estromais endometriais

O endométrio foi obtido imediatamente após a retirada da peça (útero) durante a histerectomia. O útero foi incisionado e o tecido endometrial retirado por raspagem sendo então identificado e imediatamente transferido em gelo para o laboratório em solução salina de Hank's (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) com penicilina/streptomicina 0,5 mg/mL (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA). Após corte em pequenos pedaços (1 mm cúbico) na capela de fluxo laminar, o tecido foi adicionado a um Erlenmeyer de dissociação com meio Hank's com uma concentração de colagenase tipo IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) de 3mg/mL, por 2 h, a 37°C, sob agitação, para dissociação das células (Satyaswaroop, Bressler et al. 1979).

Após esse período, adicionou-se o dobro do volume de Hank's para inibir a ação da colagenase. Porções não digeridas foram retidas após filtração em nylon 100 µm (Polylabo, Strasbourg, France). Centrifugou-se a 800xg por 10 min, e então, o sobrenadante foi desprezado e as células suspendidas com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* High glucose (DMEM) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil).

A separação de células estromais das células epiteliais foi realizada através de uma filtração por filtro de 40 µm (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA), onde somente as células estromais ultrapassam o filtro e as epiteliais ficam retidas. As células estromais filtradas foram suspendidas no meio DMEM com 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina, 10% de soro bovino fetal (FBS) (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e enriquecido com estradiol (E₂) na concentração de 10⁻⁸ mol/L. Após,

foram plaqueadas em uma garrafa de cultura de 75cm² (TPP – Techno Plastic Products AG, Suíça) e cultivadas em estufa (NuAire Inc., Minnesota, USA) a 37°C com 5,5% de CO₂. O meio foi substituído a cada 2 dias durante o período de 5 dias, até que as células estivessem completamente aderidas em monocamada, diferenciadas e com confluência em torno de 80%.

No quinto dia de cultivo, as células foram tripsinizadas e, em hemocitômetro, foi realizada uma contagem com o corante azul de Tripán. As células foram plaqueadas (considerando dia 0) na quantidade de 1X10⁴ cél/mL em placas de plástico estéreis do tipo multiwell 6 poços (TPP – Techno Plastic Products AG, Suíça) para as técnicas de imunocitoquímica, extração de proteína e RNA, e coleta de sobrenadante, conforme os grupos experimentais (Apparao, Lovely et al. 2002; Zhang and Liao 2010; Germeyer, Jauckus et al. 2011). O meio de cultivo foi trocado a cada 48 h com os tratamentos correspondentes a cada grupo.

Os grupos experimentais foram divididos em:

- Grupo Controle (C): DMEM + estradiol (10⁻⁸ mol/L) + progesterona (10⁻⁶ mol/L);
- Grupo Controle + Metformina (CM): DMEM + estradiol (10⁻⁸ mol/L) + progesterona (10⁻⁶ mol/L) + metformina (10 mmol/L);
- Grupo Controle + Insulina (CI): DMEM + estradiol (10⁻⁸ mol/L) + progesterona (10⁻⁶ mol/L) + 100 ng/mL insulina;
- Grupo Controle + Androgênio (CA): DMEM + estradiol (10⁻⁸ mol/L) + progesterona (10⁻⁶ mol/L) + androgênio (diidrotestosterona 10⁻⁶ mol/L);
- Grupo Androgênio + Insulina (AI): DMEM + estradiol (10⁻⁸ mol/L) +

progesterona (10^{-6} mol/L)+ 100 ng/mL de insulina + androgênio (diidrotestosterona 10^{-6} mol/L);

- Grupo Androgênio + Insulina + Metformina (AIM): DMEM + estradiol (10^{-8} mol/L) + progesterona (10^{-6} mol/L); + 100 ng/mL de insulina + androgênio (diidrotestosterona 10^{-6} mol/L) + metformina (10 mmol/L).

As células estromais endometriais são fisiologicamente dependentes de estradiol para manterem-se viáveis durante todo o cultivo, sendo necessária a presença deste hormônio em todos os grupos experimentais (Apparao, Lovely et al. 2002).

No primeiro momento, as células foram tratadas em seus respectivos grupos, sem o tratamento com metformina, durante os primeiros 6 dias após a semeadura (dia 0), para permitir a adesão, diferenciação e crescimento celular. No dia 6, os grupos previstos foram tratados com metformina em três diferentes tempos: 10 min, 24 h e 48 h.

As células foram cultivadas nos grupos por 8 dias, totalizando 14 dias de cultivo, a 37°C com 5,5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação no microscópio (Axyover 25, Carl Zeis, Germany).

Ao final de cada tempo estipulado, o sobrenadante foi coletado e as células lisadas em 1mL de Trizol (Invitrogen), para extração do RNA, ou em 0,3 mL de Solução de Lise (RIPA) para extração de proteínas.

Imunocitoquímica

Lamínulas de vidro contendo as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min e permeabilizadas com solução de Triton X-100 0,1%/PBS por 5 min em temperatura ambiente. Após, foram incubadas em uma solução de PBS com 5% de albumina bovina sérica durante duas horas para o bloqueio de sítios inespecíficos. As células foram incubadas *overnight* com anticorpo primário de antivimentina (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA) para marcação de vimentina (marcador de célula estromal), diluído 1:50 em TTBS (0,5M Tris Base, 9% NaCl, 0.5% Tween 20, pH 8.4). Após, foram incubadas com anticorpo secundário específico rodamina (vermelho, sheep anti-mouse; 1:400) durante duas horas. Foram realizados controles negativos, sem a incubação com o anticorpo primário, nos quais não foi observada imunoreatividade. Os núcleos foram corados com 0,25 µg/mL do corante 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). As lâminas foram observadas em microscópio invertido e as imagens foram capturadas através de câmera digital acoplada (Loureiro, Romao et al. 2010).

Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (qRT-PCR)

Os níveis de RNA mensageiro (RNAm) dos receptores de insulina e IGF-1 foram avaliados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa. A técnica consiste na transcrição reversa do RNAm a DNA complementar (cDNA), o qual é submetido à Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real, que permite a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.

Extração de RNA total

Após as células receberem as diferentes condições de tratamento, foram lavadas duas vezes com 1mL 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 incubada por 5 min 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 min a 15-30°C e centrifugadas a 12.000 x g por 15 min a 4°C. A amostra é separada em fase orgânica (fenol-clorofórmio), interface e fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para tubos novos e identificada, onde o RNA é precipitado com a adição de álcool isopropílico (0,5 mL/mL de trizol). As amostras foram armazenadas a -20°C *overnight* e então, centrifugadas a 12.000 xg por 10 min a 4°C. O RNA precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75%. As amostras foram agitadas no vórtex e centrifugadas a 12.000 x g, 5 min a 4°C. O sobrenadante foi vertido e o precipitado seco à temperatura ambiente por 10 min. O RNA foi dissolvido em água ultrapura tratada com *diethylpyrocarbonate* (DEPC) e incubado por 10 min 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 1µL de RNA para cada 199 µL de solução de trabalho em cada leitura. Este aparelho utiliza sondas 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 feita a partir de 0,5µg de RNA total, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do RNAm, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. Considerando que a fração do RNAm corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estima-se que 0,5 µg dá origem a 10ng de cDNA. O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 min juntamente com o *primer* e os desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 20mM pH 8,4 com KCl 50mM, cloreto de magnésio 25mM 10mM e ditioneitol (DTT) 0,1M sendo incubado por 2 min a 42° C. Em seguida, foi feita a incubação da enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 min. Após nova desnaturação a 70°C por 15 min, a mistura foi incubada com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 min a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20µL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

qRT-PCR

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência.

Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do sistema de detecção de sondas TaqMan® (Reagente TaqMan PCR Master Mix - Applied Biosystems).

Os ensaios de expressão gênica TaqMan® (*Gene Expression Assays*) consistem em um par de *primers* não marcados e uma sonda TaqMan® com marcação FAM™ ou VIC® na extremidade 5' e MGB (*minor groove binder*) e NFQ (*nonfluorescent quencher*) na extremidade 3'. Este ensaio é baseado na atividade 5' nuclease da enzima *Taq* DNA polymerase. O equipamento utilizado foi o PCR real time 7500 Fast (Applied Biosystems) para detecção TaqMan® (TaqMan PCR Master Mix reagent - Applied Biosystems) (Tabela 1).

As condições de reação foram desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, 50 ciclos continuando a desnaturação em 94 °C por 50 segundos, anelamento a 60 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 2 min. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do delta-delta *threshold cycle* (Ct), onde o aumento do sinal fluorescente está associado com um aumento exponencial do produto da qPCR.

Tabela 1: Primers utilizados para análise da expressão do RNAm de IR e IGF-1R

Primer *	Códigos
IR	HS00961557_m1
IGF-1R	HS00951562_m1
HPRT**	HS02800695_m1

* Life Technologies ** Gene Normalizador

Normalização

A análise quantitativa da expressão do gene por RT-qPCR envolve a utilização de controles internos conhecidos como genes normalizadores, que são utilizados para a normalização da expressão de genes alvo (Vandesompele, De Preter et al. 2002; Santin, Souza et al. 2012; Souza, Brum et al. 2012).

Este é um passo importante para determinar com precisão os níveis de expressão de genes no tecido. A normalização dos níveis de expressão de um gene alvo é realizada para compensar a variabilidade associada à técnica da RT-qPCR. As maiores fontes dessas variações são a qualidade da extração, e pureza do RNA total, além da eficiência da síntese de cDNA (Silver, Best et al. 2006).

Foi escolhido como gene normalizador para esta condição de cultura a *hipoxantina fosforibosil-transferase 1 (HPRT1)*, número de acesso no NCBI (*Gene Bank*) NM_000194.2. Conforme um estudo prévio do nosso laboratório (Machado, A.B. e colaboradores, dados ainda não publicados), este gene apresentou menor variabilidade e uma boa estabilidade. Foram avaliados e comparados diferentes genes por meio do *software NormFinder*, ferramenta específica para busca de normalizadores de fácil acesso, disponível *on-line* e que utiliza o Microsoft Excel (Windows Office) como plataforma de trabalho (Andersen, Jensen et al. 2004)..

Western blot

Os tubos contendo as células em 0,3 mL de RIPA (Tris-HCl 50mM; NaCl 150 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 1%; deoxicolato de sódio 0,25%; PMSF 1 mM;

leupeptina 1µg/mL, fluoreto de sódio 1 mM) foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora no gelo, sendo agitadas algumas vezes no vórtex por alguns segundos. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000xg por 10 min a 4°C, e o sobrenadante transferido para um tubo limpo, e armazenado a -20°C para posterior dosagem de proteínas pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford 1976), onde a quantidade de proteínas foi determinada por espectrometria com comprimento de onda 595 nm.

Para separação das proteínas foi utilizado SDS-PAGE com uma concentração de poliacrilamida de 8 a 10%. Aproximadamente 60 µg de proteínas extraídas das amostras foram incubadas com solução de Laemmli (glicerol 50%, SDS 10%, Tris 62,5 mM, azul de bromofenol 0,1% e 2-β-mercaptoetanol 0,05%) (Laemmli 1970), a 95°C por 3 min, e colocadas em cada poço. A eletroforese foi efetuada na presença de tampão contendo glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 0,1%, pH 8,3. As proteínas migraram no gel por aproximadamente 2 h e 30 min, submetidas a uma diferença de potencial elétrico de 120 V. A corrida das proteínas foi monitorada pelo azul de bromofenol, presente no tampão de amostra e pelo marcador de peso molecular.

Depois de efetuada a eletroforese, foi realizada a etapa de transferência das proteínas para membrana de PVDF por 45 min, com voltagem de 20 v no sistema semi-seco foi realizada.

As membranas de PVDF foram incubadas durante 1 hora em solução bloqueadora, contendo NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, Tween 0,05% (TTBS), leite em pó desnatado 5%, pH 7,4, para o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos.

Em seguida, colocadas sob agitação em primeiro anticorpo em câmara fria (4°C) *overnight*. Foram utilizados anticorpos (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA) anti-IR (sc-20739), anti-IGF-1R (sc-7952), anti-p-AKT (sc-7985/ser473)/anti-AKT (sc-8312), anti-p-ERK(sc-101760)/anti-ERK (sc-292838), anti-PI3K (sc-7189), anti-GLUT4 (sc-7938), e para a proteína constitutiva β -tubulina (Invitrogen REF 322600, USA).

Após a incubação com o primeiro anticorpo, as membranas foram lavadas 3 vezes de 10 min (30 min) com TTBS e incubadas com o segundo anticorpo (anti-Rabbit Santa Cruz[®] – sc-2357) por duas horas em temperatura ambiente, sendo novamente lavadas 3 vezes de 10 min (30 min). Em seguida, em câmara escura, as membranas foram expostas por aproximadamente 1 min a substância quimiluminescente (ECL Promega REF W1015, Madison, USA) e, após, as membranas de PVDF foram colocadas em contato com o filme autoradiográfico (GE Healthcare[®]) por aproximadamente 60 segundos.

O filme foi revelado e analisado por densitometria no equipamento Image Master VDS (Amershan Pharmacia Biosciences[®]) para identificar e quantificar a densidade das bandas permitindo a comparação e a análise dos resultados da expressão proteica em unidades arbitrárias.

Análise estatística

Os dados foram avaliados quantitativamente através do teste de Equações de Estimação Generalizadas (*Generalized Estimating Equations – GEE*) e teste de Bonferroni *post hoc*. O método GEE estima coeficientes de regressão e erros padrões com distribuições amostrais normais e não normais, e tem o objetivo de

estimar parâmetros de regressão especialmente quando os dados estão correlacionados. O modelo GEE avalia a relação entre a variável resposta e as variáveis preditoras em um contexto populacional, e não somente individual, sendo o método mais recomendado para se estudar a diferença na resposta média populacional entre grupos com diferentes fatores de risco ou em amostras que possuam características em comum, e, portanto, não possam ser consideradas independentes (Twisk 2004).

Foi considerado estatisticamente significativo quando $\alpha < 0,05$. O processamento e análise dos dados foram realizados utilizando o processador de dados SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para Windows.

MATERIAIS E MÉTODOS SEÇÃO II

Delineamento

Foi realizado um estudo experimental *in vitro*.

Pacientes

O endométrio foi obtido a partir de biópsias endometriais de mulheres saudáveis, com ciclo menstrual regular, no período proliferativo (n=16) e secretório (n=6) submetidas à histerectomia por razões não endometriais, na Clínica da Mulher (*Frauenklinik*) da Universidade de Heidelberg (Ruprecht-Karls), Alemanha. Critérios de exclusão foram mulheres na fase pós-menopausa, endocrinopatias e estimulação hormonal nos últimos 3 meses anteriores à cirurgia. A análise histológica foi realizada pelo Departamento de Patologia da Universidade de Heidelberg, Alemanha, para confirmar a fase do ciclo.

Análise dos tecidos

Após coletadas, as biópsias foram imediatamente estocadas a -80°C para futura extração de RNA e proteínas, utilizando 1 mL de Trizol (Gibco, Karlsruhe, Germany) e 0,3 mL de tampão de RIPA, respectivamente para homogeneizar os tecidos.

Cultura de células estromais endometriais

As células provenientes de biópsias endometriais de mulheres na fase proliferativa do ciclo (n=8) foram dissociadas com colagenase, filtradas (conforme já descrito) e plaqueadas em uma garrafa por cinco dias com o seguinte meio de cultura: DMEM com Piruvato (66%), MCDB-105 (22%), Nistatina (1%), Gentamicina (0,1%), Penicilina/Streptomicina (1%), Insulina (10 mg/mL) e soro bovino fetal (10%). Após este período o meio de cultura foi alterado para: DMEM com piruvato, MCDB-105, Nistatina, Gentamicina, ácido ascórbico e apotransferrina por 24 horas e para o seguinte tratamento por duas semanas:

- Grupo E₂: células tratadas com estrogênio na concentração 10⁻⁸M,
- Grupo E₂P₄: considerado o grupo controle, células tratadas com estrogênio na concentração 10⁻⁸M e com progesterona 10⁻⁶M.
- Grupo 10⁻⁵M: células tratadas com E₂P₄ e metformina na 10⁻⁵M
- Grupo 10⁻⁴M: células tratadas com E₂P₄ e metformina na 10⁻⁴M .
- Grupo 10⁻³M: células tratadas com E₂P₄ e metformina na 10⁻³M .
- Grupo 10⁻²M: células tratadas com E₂P₄ e metformina na 10⁻²M .

Após tratamento de duas semanas com metformina as células foram lisadas pelo método Trizol e o sobrenadante coletado.

Decidualização celular

O sobrenadante das células dos diferentes grupos foi coletado, em

microtubos de 2mL e estocados a -80°C para posterior análise da expressão proteica.

O kit ELISA (*Human Prolactin DuoSet, DY682, R&D Systems*) foi utilizado como meio de quantificar a proteína prolactina, para avaliar os efeitos sobre decidualização das células estromais, após tratamento com metformina (Germeyer, Jauckus et al. 2011). Os ensaios utilizados são do tipo sanduíche (R & D Systems) e foram realizados de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras (sobrenadante) foram medidas em duplicata dentro do intervalo da curva padrão para cada ligante. A concentração de proteína total foi medida por método colorimétrico.

Extração de RNA total e síntese de cDNA

O protocolo utilizado para extração de RNA e síntese de cDNA das células e tecidos de biópsias foi o mesmo já descrito no item “Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR)” no Método Seção I desta tese.

qRT-PCR de SEMA3A-F

A expressão gênica de SEMA3A-F foi avaliada por qRT-PCR e os primers Taqman da Applied Biosystems (Darmstadt, Germany) estão descritos na Tabela 2. Foram realizados 40 ciclos (10 min a 95°C, 15s a 95°C, 1 min a 60°C) utilizando 7500 Fast real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), de acordo com protocolo do fabricante tanto para avaliar a expressão gênica dos

tecidos, como também nas células.

Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) de SEMA3A no tecido endometrial no período proliferativo e secretor

A expressão proteica da SEMA3A no tecido foi avaliada por ELISA (cat.1250-S3-025 R&D Systems) de acordo com o protocolo do fabricante.

Análise estatística

Os dados foram avaliados com o número de vezes em relação à referência (*fold change*) (qRT-PCR) em média \pm desvio padrão (proteína SEMA3A e prolactina). Teste t de Student foi utilizado para avaliar SEMA3s na fase proliferativa comparada com a fase secretória no tecido. Análise de Variância seguido de Bonferroni foi utilizada para os grupos tratados com metformina em relação ao controle na cultura de células. Diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

Tabela 2: Primers utilizados para análise da expressão do RNAm da SEMA3A-F

Primer *	Códigos
Sema3A	HS00173810_m1
Sema3B	HS00190328_m1
Sema3C	HS00989373_m1
Sema3D	HS00380877_m1
Sema3E	HS00180842_m1
Sema3F	HS00188273_m1
RPLO**	HS99999902_m1

* Life Technologies ** Gene Normalizador

ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi realizado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde), e aprovado pelo Comitê de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (10-0351). As pacientes que concordaram em participar do estudo receberam a garantia de seu anonimato e que o uso do material coletado seria absolutamente restrito para fins de pesquisa científica. Assim, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1).

DESCARTE DE RESÍDUOS

De acordo com a Resolução N° 306 de 07 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária e a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 358 de 29 de abril de 2005, que dispõe sobre o tratamento e disposição final de resíduos de serviços de saúde, os resíduos biológicos gerados nesse estudo (úteros humanos) fazem parte do grupo A3. Esses resíduos foram acondicionados em sacos brancos contendo o símbolo universal de risco biológico, sem quaisquer outros tipos de resíduos misturados e encaminhados para descarte pelo Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

LOCAIS DE REALIZAÇÃO DO PROJETO

Na primeira etapa do trabalho, a coleta do tecido de endométrio foi realizada no Bloco Cirúrgico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O cultivo e a incubação das células do endométrio no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral - LaBiMET, Departamento de Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (análises de expressão gênica) e no LaGOM (Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular), no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (análise de expressão proteica).

A segunda etapa do trabalho fez parte do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior/ Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível

Superior (PDSE/CAPES) e foi realizada no Departamento de Ginecologia Endócrina e Medicina Reprodutiva na Universidade de Heidelberg, Alemanha.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Este trabalho teve o suporte financeiro da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPG-UFRGS), do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia da UFRGS (PPGFISIO), do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e CNPq processo #470636/2012-2. Foram concedidas bolsa de doutorado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e de doutorado sanduíche pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em duas seções: a primeira realizada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e a segunda na Universidade de Heidelberg, Alemanha.

Seção I

Neste trabalho foi realizado o cultivo primário de células estromais endometriais hiperestimuladas com insulina e androgênio, simulando características da SOP, e tratadas com metformina por 10 min, 24 e 48 h. Apesar deste modelo já estar padronizado e estabelecido por um recente estudo no Laboratório de Biologia Molecular, Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia – UFRGS (Machado, A.B. e colaboradores, dados ainda não publicados), a progressão da cultura foi acompanhada temporalmente após o plaqueamento, adesão, diferenciação e proliferação celular.

Observou-se que após 24 h após o plaqueamento, as células já estavam aderidas na placa e com 48 h já diferenciadas, num formato fusiforme e alongado, medindo em torno de 50µm, característico destas células. Após 5 dias de cultivo, as células apresentam confluência superior a 90% (Figura 1)

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para confirmar o cultivo de células estromais endometriais com o uso da vimentina. A vimentina é um marcador

de células de origem mesenquimal, apresentando marcação positiva caracterizando o cultivo de células estromais (Figura 2).

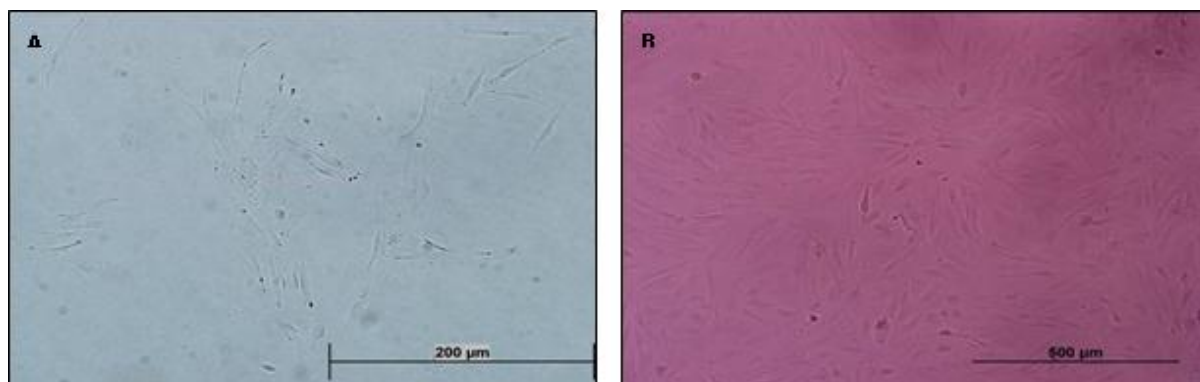


Figura 1: Imagens obtidas por microscópio invertido: células estromais endometriais mostrando sua morfologia característica em monocamada diferenciada e confluenta. A) Terceiro dia de cultivo, células aderidas e diferenciadas; B) Monocamada confluenta após 6 dias de cultivo.



Figura 2: Imunocitoquímica de fluorescência. Células estromais endometriais de cultura primária com anticorpo primário antivimentina e anticorpo secundário específico rodamina (vermelho, sheep anti-mouse; 1:400), marcação positiva para vimentina confirmando o cultivo de células estromais. Os núcleos foram corados com DAPI (azul).

O primeiro artigo desta tese (Anexo 2) teve o objetivo de avaliar o efeito da metformina sobre os receptores de insulina (IR) e IGF-1 (IGF-1R) em células estromais endometriais *in vitro*, com estimulação de insulina e androgênio.

Nestes primeiros experimentos não serão apresentados dados do grupo tratado apenas com metformina (CM), visto que este foi adicionado no decorrer do trabalho, sendo analisado apenas nas proteínas da via de sinalização dos fatores de

crescimento do segundo artigo.

A figura 3 apresenta a expressão gênica (qRT-PCR n=6) de IR (A) e IGF-1R (B) após 24 h de tratamento com metformina. Grupos tratados com insulina (CI) (2,9 *fold change* $p<0,05$), e androgênio mais insulina (AI) (2,8 *fold change* $p<0,05$) apresentaram um aumento na expressão do IR comparados com o grupo controle (C). Quando a metformina foi adicionada, grupo com androgênio, insulina e metformina (AIM), este efeito foi potencializado e a expressão do IR foi significativamente maior comparado a todos os grupos (4,7 *fold change* $p<0,001$). O tratamento somente com androgênio não apresentou diferença em relação ao grupo controle (Figura 3A).

A expressão gênica de IGF-1R após 24 horas de incubação com metformina apresentou um aumento nos grupos CI (1,83 *fold change* $p<0,001$) e AIM (1,78 *fold change* $p<0,001$) quando comparado com o controle (C). O androgênio (AI) inibiu a ação da insulina, entretanto a metformina reverteu este efeito (Figura 3B).

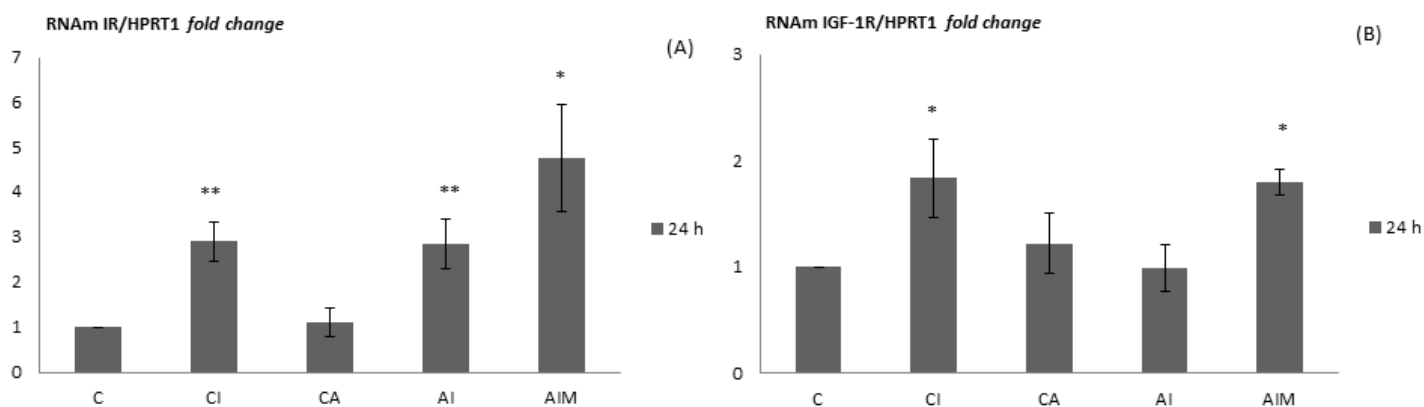


Figura 3: Expressão gênica do receptor de insulina, * $p < 0,001$ (diferença em relação aos outros grupos), ** $p < 0,05$ (diferença em relação a C e CA) (A) e IGF-1, * $p < 0,001$ (diferença em relação a C, CA e AI) (B) após 24 h de tratamento com metformina. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Grupos C (E₂ + P₄), CI (E₂ + P₄ + insulina), CA (E₂ + P₄ + DHT), AI (E₂ + P₄ + insulina + DHT), AIM (E₂ + P₄ + insulina + DHT + metformina).

A análise proteica foi realizada pela técnica de *Western blotting* sendo realizadas 12 culturas para analisar os receptores de insulina (IR) e IGF-1 (IGF-1R). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão.

A figura 4 apresenta a expressão proteica do IR após 24 h (Figura 4A) e 48 h (Figura 4B) de tratamento com metformina. Grupos tratados por 24 h com insulina (CI) (153634 ± 29123) e androgênio mais insulina (AI) (162854 ± 86258) apresentaram um aumento na expressão do IR comparados com o controle (C) (104654 ± 5634) ($p < 0,05$). O grupo tratado somente com androgênio (CA) (71595 ± 3439), entretanto, não apresentou diferença do grupo controle. As ações do androgênio mais insulina foram potencializadas pela metformina (AIM) e este grupo apresentou uma maior expressão do IR (249869 ± 15878) comparando com os demais grupos ($p < 0,001$) (Figura 4A). De forma semelhante ao tempo anterior, após 48 de tratamento com metformina, o grupo AIM teve uma maior expressão do IR que os demais (33729 ± 9537), e os grupos tratados com insulina (CI) (20369 ± 6944) e androgênio mais insulina (AI) (22221 ± 7485) apresentaram uma maior expressão do IR comparados com o grupo controle (12181 ± 2874) ($p < 0,05$), enquanto o grupo CA (13242 ± 3942) não diferiu do controle (Figura 4B).

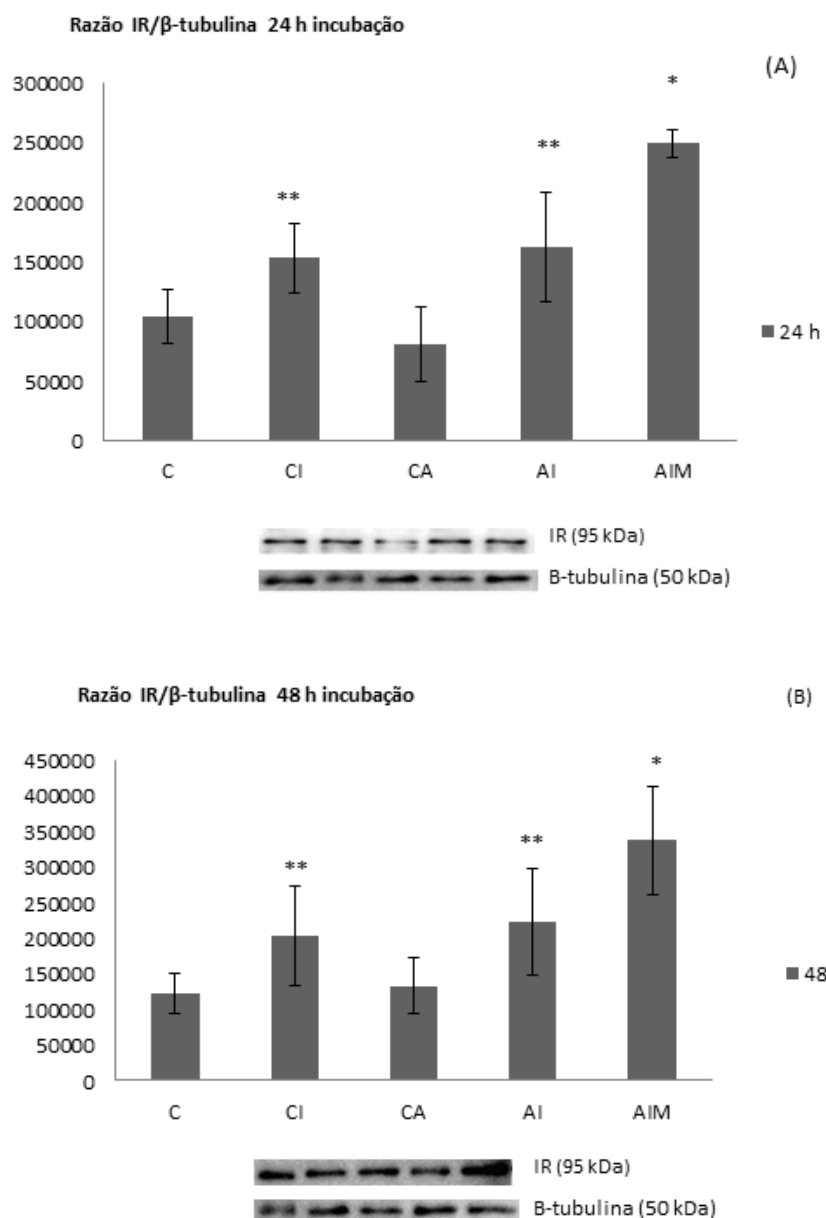


Figura 4: Expressão proteica de receptor de insulina após 24 (A) e 48 h (B) de tratamento com metformina * $p < 0,001$ (diferença em relação aos outros grupos) ** $p < 0,05$ (diferença em relação a C e CA). Dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Grupos: C ($E_2 + P_4$), CI ($E_2 + P_4 +$ insulina), CA ($E_2 + P_4 +$ DHT), AI ($E_2 + P_4 +$ insulina+ DHT), AIM ($E_2 + P_4 +$ insulina+ DHT+metformina).

A figura 5 apresenta a expressão proteica de IGF-1R após 24 horas (Figura 5A) e 48 horas (Figura 5B) de tratamento com metformina. Foi observado efeito da insulina no aumento da expressão de IGF-1R, porque o grupo CI (127711 ± 4591), AI (151098 ± 5194), e AIM (182987 ± 7925) apresentaram uma maior

expressão desta proteína que os grupos C e CA ($p < 0,001$) após 24h (Figura 5A), Da mesma forma, com 48 horas de tratamento de metformina, os grupos CI (159481 ± 6815), AI (211033 ± 9649), e AIM (264557 ± 12604 $p < 0.05$) apresentaram maior expressão quando comparados com controle (C) (108948 ± 4891) e com o grupo androgênio (CA) (112812 ± 4721) (Figura 5B). Nos dois tempos de tratamento, parece não ter efeito da metformina, visto que o grupo AIM não apresentou diferença em relação ao grupo AI.

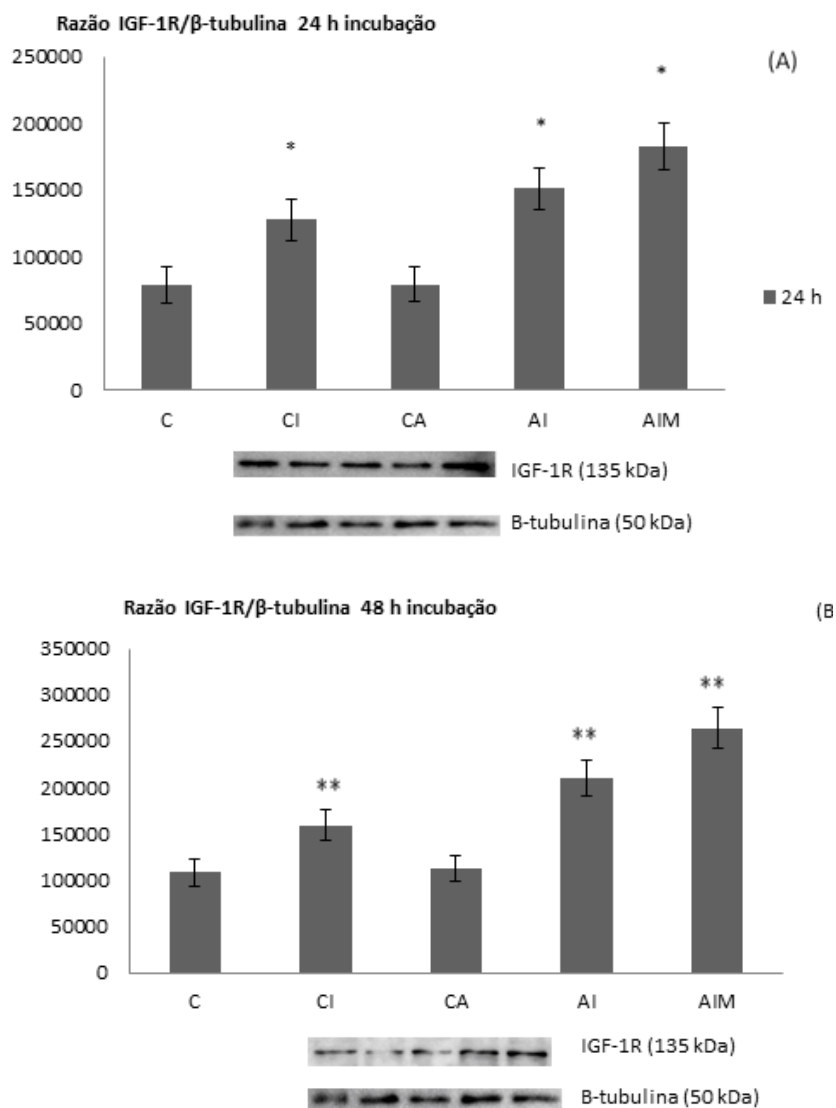


Figura 5: Expressão proteica do receptor de IGF-1 após 24 (A) e 48 h (B) de tratamento com metformina * $p < 0,001$ ** $p < 0,05$ (diferença em relação a C e CA). Dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Grupos: C ($E_2 + P_4$), CI ($E_2 + P_4 +$ insulina), CA ($E_2 + P_4 +$ DHT), AI ($E_2 + P_4 +$ insulina + DHT), AIM ($E_2 + P_4 +$ insulina + DHT+metformina).

Após observar que a metformina teve um efeito positivo sobre a expressão do receptor de insulina, o segundo artigo (Anexo 3) teve como objetivo analisar algumas proteínas desta via de sinalização importante na implantação endometrial. As proteínas analisadas foram a PI3K e o GLUT4 após 24 e 48 h de tratamento com metformina, e a fosforilação da ERK e Akt/PKB (10 minutos, 24 e 48h de tratamento com metformina).

A figura 6 mostra a expressão das proteínas PI3K (A) e o GLUT4 (B) após 24 h de tratamento com metformina. Os grupos tratados somente com metformina (CM) (117803 ± 31417) e insulina (CI) (107019 ± 30143), e com a adição de insulina e androgênio (AI) (109143 ± 25470) apresentaram uma maior expressão de PI3K comparados com o grupo controle (C) (66093 ± 2262) e com o grupo tratado somente com androgênio (CA) (61851 ± 10900) ($p < 0,05$). Ocorreu um efeito potencializador da metformina com a ação da insulina e do androgênio (grupo AIM) (184998 ± 35263), com um aumento significativo da expressão de PI3K em relação aos outros grupos ($p < 0,001$) (Figura 6A). Os resultados após 48 h de incubação com metformina foram similares (dados não mostrados).

A expressão proteica de GLUT4 após 24 h de tratamento com metformina foi aumentada nos grupos CM (64277 ± 8594), CI (65362 ± 13983) e AI (67008 ± 10508) comparados com controle (C) (47063 ± 7918) e CA (54039 ± 11870) ($p < 0,05$) (Figura 6B). O grupo com insulina, androgênio e metformina (AIM) após 24 horas de tratamento com metformina (83604 ± 14456) (Figura 6B) ou 48 horas (69966 ± 7719) mostraram um aumento significativo da expressão em relação aos demais grupos ($p < 0,001$).

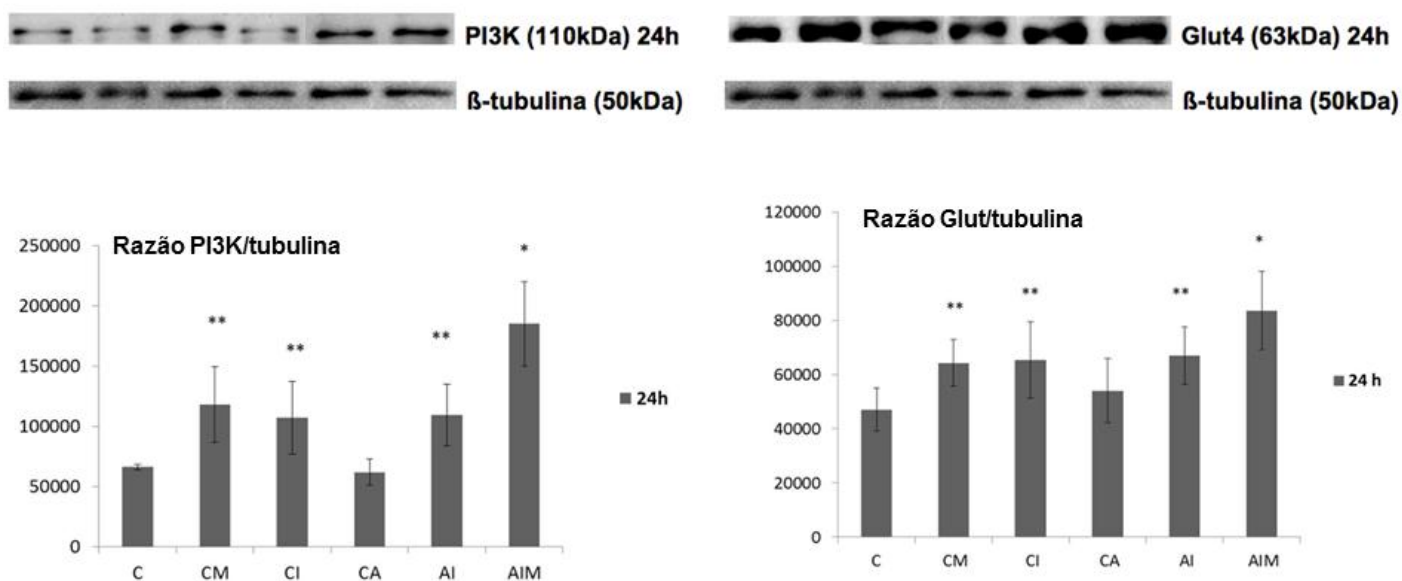


Figura 6: Expressão proteica de PI3K (A) e GLUT4 (B) após 24h de tratamento com metformina. * $p < 0,001$ (diferença em relação aos outros grupos), ** $p < 0,05$ (diferença em relação a C e CA). Dados foram expressos como média \pm desvio padrão Grupos: C ($E_2 + P$), CM ($E_2 + P +$ metformina), CI ($E_2 + P +$ insulina), CA ($E_2 + P +$ DHT), AI ($E_2 + P +$ insulina + DHT), AIM ($E_2 + P +$ insulina + DHT + metformina).

A avaliação da atividade das proteínas ERK e Akt/PKB foram realizadas pela razão da expressão destas proteínas fosforiladas (pERK, pAkt) e suas respectivas basais (ERK, Akt).

A atividade da ERK não apresentou diferença entre os grupos em 10 min e 24 h de tratamento. Apenas o grupo tratado com insulina (CI) (192187 ± 21342) teve uma maior expressão desta proteína, em 48 h, quando comparado ao controle (C) (138593 ± 5925) ($p < 0,001$) (Figura 7).

Em 10 min de tratamento com metformina, o grupo tratado com insulina e androgênio (AI) (142299 ± 10869) apresentou uma maior atividade da pAkt/PKB em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), enquanto o grupo tratado somente com metformina (CM) (50092 ± 805) teve esta atividade diminuída significativamente em relação aos outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 8A). Após 24 h de tratamento, os grupos com insulina, CI (139594 ± 18071) e AI (135642 ± 16084), apresentaram uma maior atividade da Akt/PKB em relação aos demais grupos ($p < 0,001$), enquanto os grupos tratados com metformina, CM (60958 ± 195) e AIM (60130 ± 9949), apresentaram esta atividade diminuída em comparação aos outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 8B).

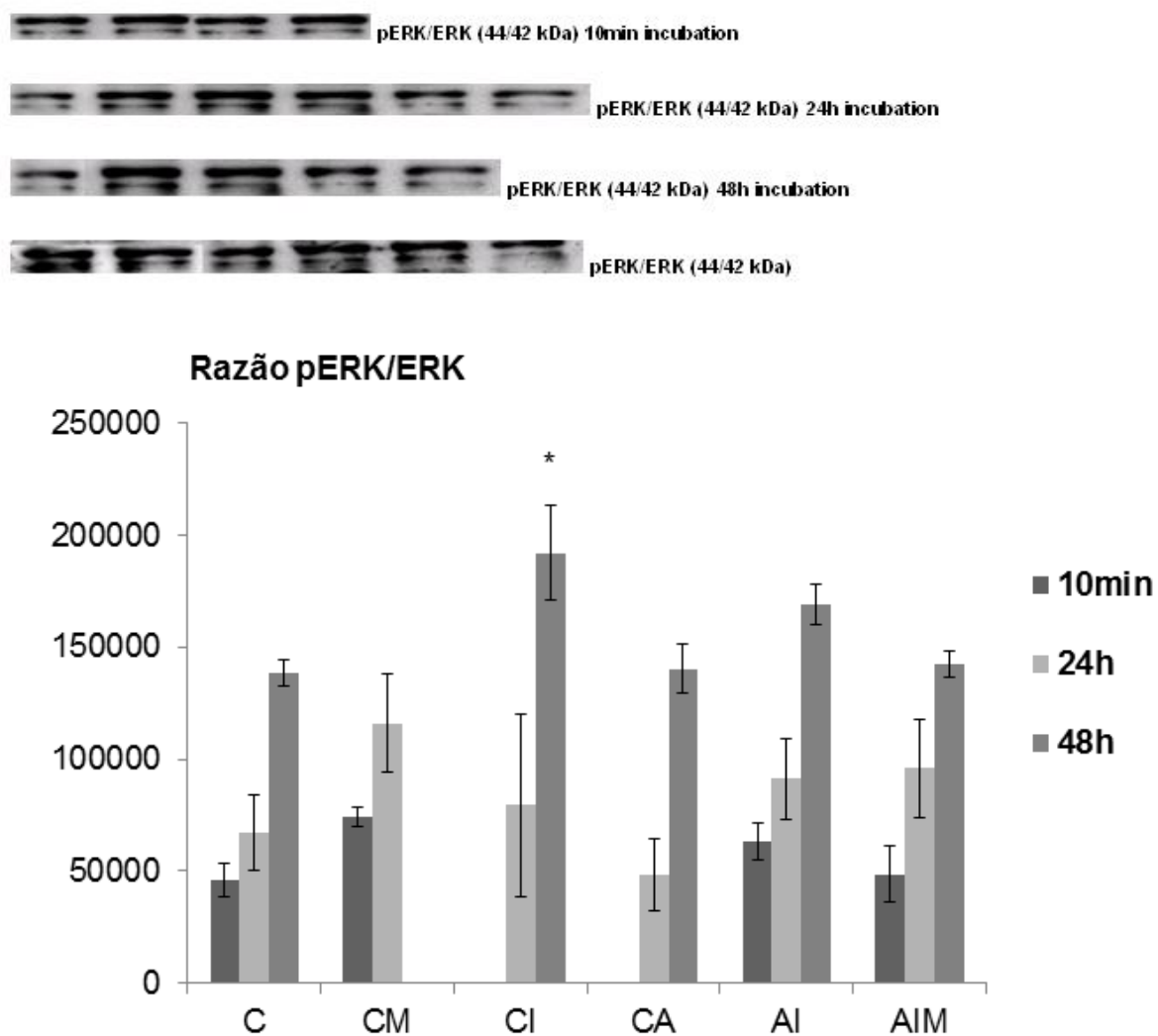


Figura 7: Expressão proteica da razão da expressão fosforilação da ERK com sua basal após 10 min, 24 e 48 h de tratamento com metformina. * $p < 0.05$ (diferença em relação aos outros grupos). Dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Grupos: C ($E_2 + P_4$), CM ($E_2 + P_4 +$ metformina), CI ($E_2 + P_4 +$ insulina), CA ($E_2 + P_4 +$ DHT), AI ($E_2 + P_4 +$ insulina + DHT), AIM ($E_2 + P_4 +$ insulina + DHT + metformina)

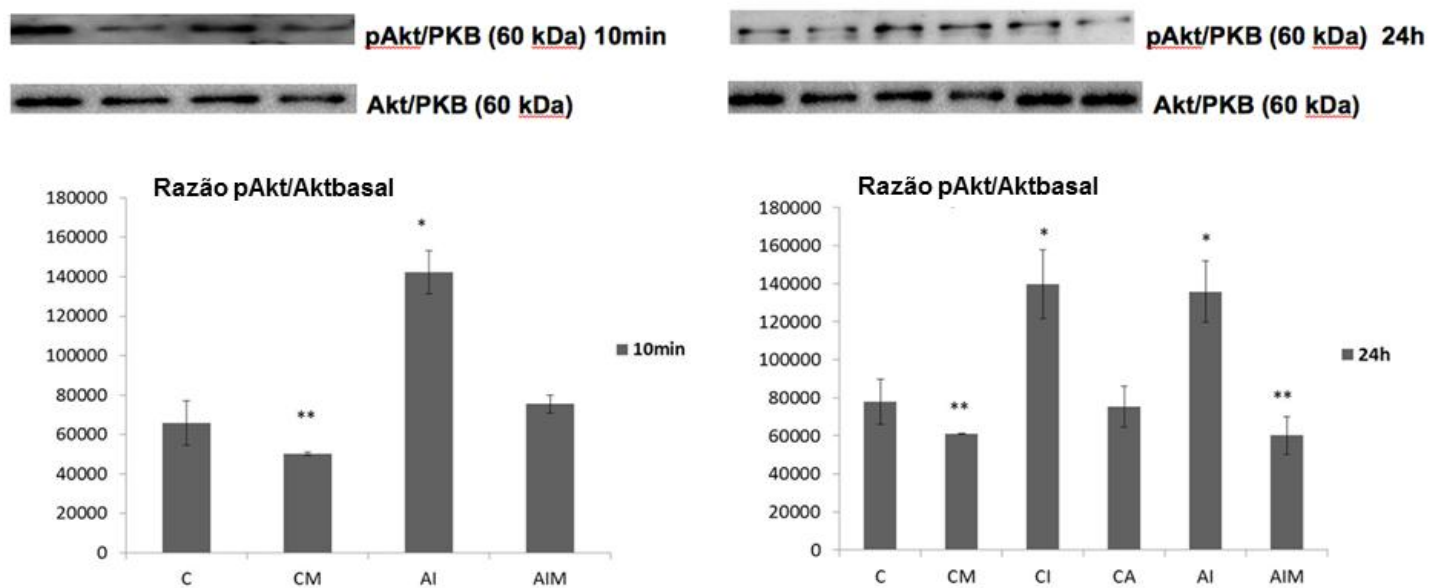


Figura 8: Fosforilação da Akt/PKB após 10 min, * $p < 0.001$ (diferença em relação aos outros grupos) e ** $p < 0.05$ (diferença em relação aos outros grupos) (A) e 24 h, * $p < 0.001$ (diferença em relação a C, CM, CA e AIM) e ** $p < 0.05$ (diferença em relação a C, CI, CA, AI) (B) de tratamento com metformina. * $p < 0.001$ (diferença em relação aos outros grupos) e ** $p < 0.05$ (diferença em relação aos outros grupos). Dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Grupos: C ($E_2 + P$), CM ($E_2 + P +$ metformina), CI ($E_2 + P +$ insulina), CA ($E_2 + P +$ DHT), AI ($E_2 + P +$ insulina + DHT), AIM ($E_2 + P +$ insulina + DHT + metformina).

Seção II

Devido aos primeiros resultados obtidos e à diminuição da atividade da via da Akt/PBK pela ação da metformina, optou-se por avaliar os efeitos antiproliferativos da metformina a longo prazo. Para isto, foi utilizada a semaforina de classe 3, que parece estar relacionada com o crescimento e migração celular, e ainda com neoplasias. Inicialmente caracterizamos a presença da semaforina de classe 3 nas fases do ciclo menstrual e sua relação com a proliferação celular no tecido endometrial. Após, em cultura de células, foi observada a expressão de semaforina sob efeito de diferentes doses de metformina.

No terceiro artigo (Anexo 4) foi realizada análise da expressão gênica (qRT-PCR) de seis subtipos da semaforina de classe 3, da SEMA3A até a SEMA3F (SEMA3A-F) em tecidos endometriais no período proliferativo e secretório do ciclo menstrual. A expressão gênica foi significativamente maior no período proliferativo comparado com o período secretório na SEMA3A (8,76 *fold change* $p < 0,01$), SEMA3C (4,45 *fold change* $p < 0,01$), SEMA3D (16 *fold change* $p < 0,01$) e SEMA3E (3,07 *fold change* $p < 0,05$). A expressão de SEMA3B e SEMA3F foi similar no período proliferativo e secretório (Figura 9).

Também foi realizada a análise proteica da SEMA3A (ELISA) nos tecidos, confirmando uma maior expressão de SEMA3A no período proliferativo ($1,035 \pm 0,18$) em relação ao secretório ($0,669 \pm 0,23$) ($p \leq 0,05$) (Figure 10). Assim, podemos sugerir que, no endométrio, a semaforina de classe 3, possivelmente esteja relacionada à proliferação celular.

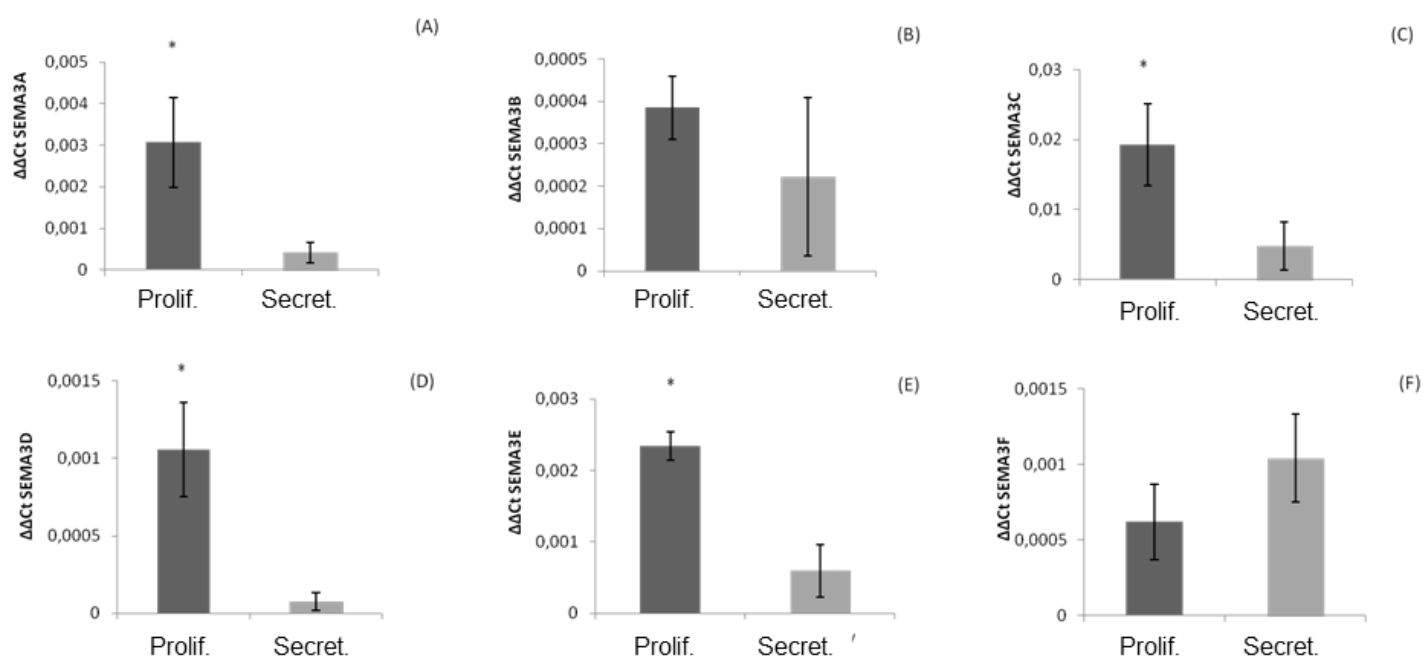


Figura 9: Expressão gênica da SEMA3A-F no período proliferativo vs. secretório em biópsias de endométrio humano. (A) SEMA3A, (B) SEMA3B, (C) SEMA3C, (D) SEMA3D, (E) SEMA3E, (F) SEMA3F (* $p < 0,05$).

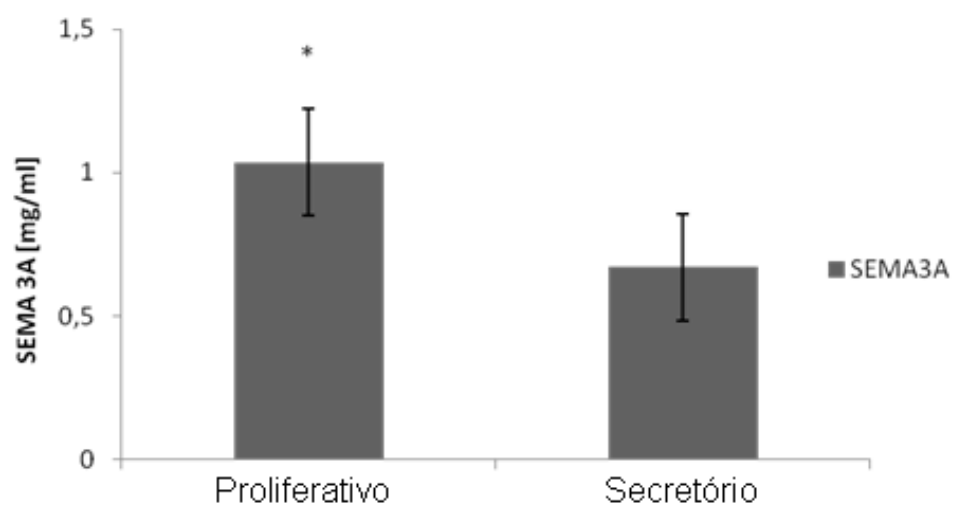


Figura 10: Expressão proteica de SEMA3A no período proliferativo e secretório em biópsias de endométrio humano. (* $p < 0,05$)

Após caracterizar a semaforina no tecido endometrial e sua relação com a proliferação celular, o quarto artigo (Anexo 5) teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações de metformina em culturas de células estromais endometriais.

Para avaliar o efeito da metformina no processo de decidualização das células, pela técnica de ELISA, foram avaliados os níveis de prolactina no sobrenadante da cultura. A decidualização celular é importante para a preparação do endométrio para a implantação, porém em estados patológicos ou na pós-menopausa pode estar relacionada com a neoplasia. Após 14 dias de tratamento, foi observada uma significativa redução na secreção de prolactina nos grupos tratados com as doses mais altas de metformina em relação ao controle, assim como no grupo não decidualizado (controle E₂P₄ 382,4 ± 123 vs. metformina 10⁻³M 130,8 ± 30, metformina 10⁻²M 104,4 ± 21 e E₂ 65 ± 35, p < 0,05, Figura 11).

Em relação ao efeito de diferentes concentrações da metformina na expressão gênica da SEMA3A-F em células estromais endometriais observou-se uma diminuição da expressão de SEMA3A nos grupos com altas doses de metformina (10⁻³M = 0,43 *fold change*, p < 0,05, e 10⁻²M = 0,5 *fold change*, p < 0,05) em relação ao grupo controle (E₂P₄) (Figure 12A). Na expressão de SEMA3B e SEMA3C, a metformina não teve nenhum efeito, e o grupo apenas com estrogênio teve um aumento de expressão de SEMA3B (5,46 *fold change*) em relação ao controle (Figura 12B e 12C).

Altas doses de metformina também diminuíram a expressão de SEMA3D (10⁻³M = 0,29 *fold change*, p < 0,05, e 10⁻²M = 0,17 *fold*, p < 0,01) e SEMA3E (10⁻³M = 0,3 *fold change*, p < 0,01, and 10⁻²M = 0,23 *fold change*, p < 0,05) em relação ao

grupo controle (Figura 12D e 12E). A expressão de SEMA3D no grupo E₂ (7 *fold change*, $p < 0,05$) foi estatisticamente maior comparada a do grupo controle. A metformina não alterou a expressão de SEMA3F, enquanto o grupo E₂ apresentou uma maior expressão desta semaforina do que o controle E₂P₄ (Figura 12F).

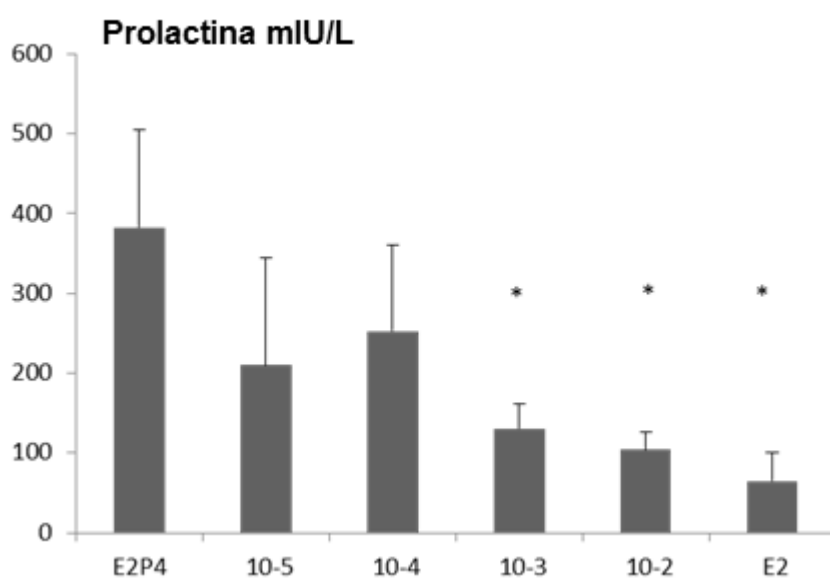


Figura 11: Níveis de prolactina no sobrenadante de cultura de células estromais endometriais decidualizadas após tratamento de 14 dias com diferentes concentrações de metformina. Dados apresentados em média \pm desvio padrão (* $p < 0,02$ diferença em relação ao grupo controle).

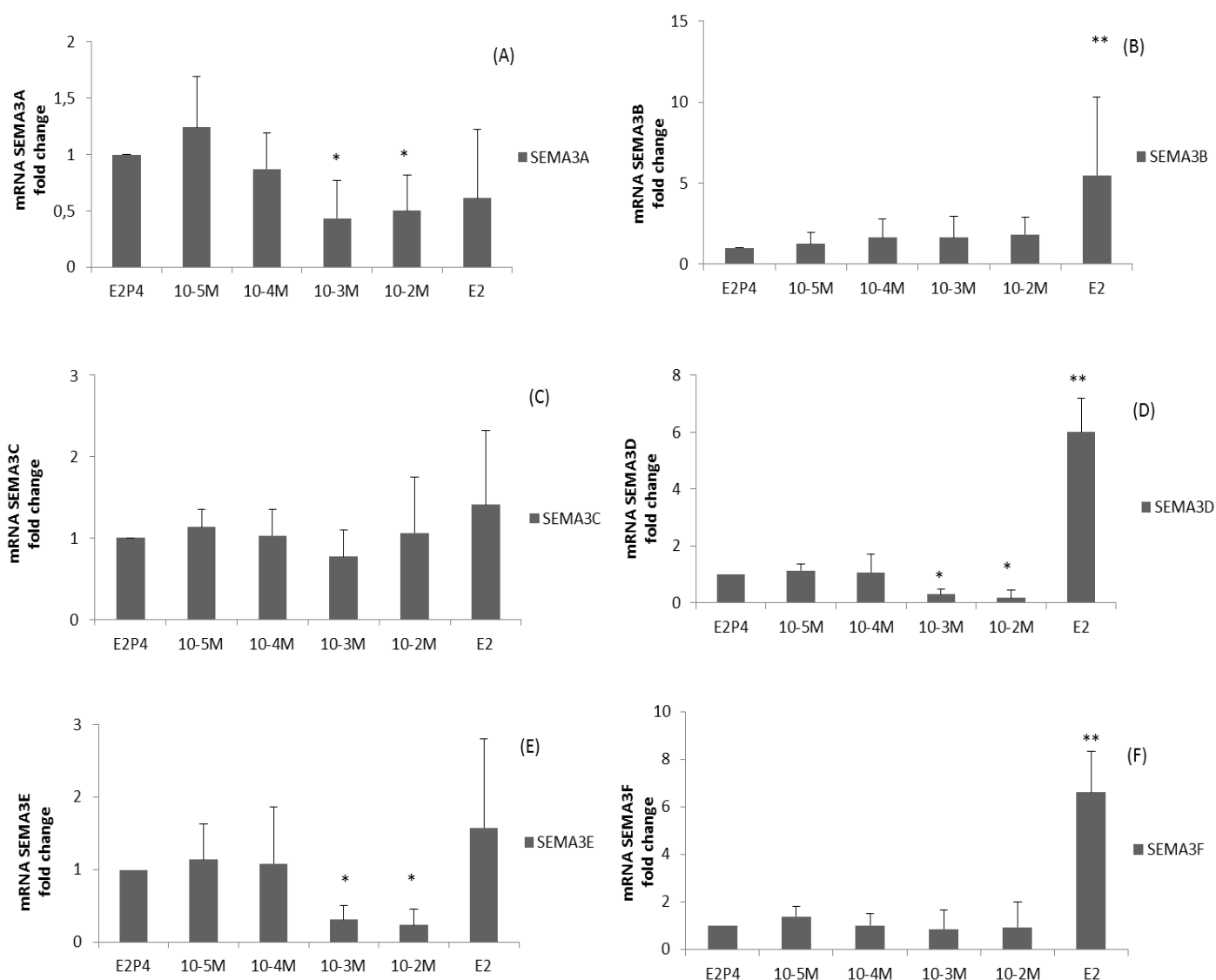


Figura 12: Expressão gênica de SEMA3A-F após tratamento de 14 dias com diferentes concentrações de metformina em cultura de células estromais endometriais. Grupos: E₂P₄ = controle, 10-5 = metformina 10⁻⁵M, 10-4 = metformina 10⁻⁴M, 10-3 = metformina 10⁻³M, 10-2 = metformina 10⁻²M. (A) = SEMA3A, (B) = SEMA3B, (C) = SEMA3C, (D) = SEMA3D, (E) = SEMA3E, (F) = SEMA3F (*p < 0,05 **p < 0,001 diferença em relação ao grupo controle).

DISCUSSÃO

A compreensão do controle hormonal endometrial e a avaliação da receptividade contribuem para o esclarecimento e o avanço das técnicas usadas medicina reprodutiva (Paulson 2011). Com isso, são necessários estudos experimentais para melhor conhecimento da fisiologia endometrial e dos fatores relacionados à implantação (Lessey 2011). O cultivo primário, em diversas condições e tratamentos, pode fornecer informações importantes sobre análises proteicas e gênicas relacionadas à infertilidade independente de anovulação (Schutte and Taylor 2012).

A primeira etapa deste estudo teve como o objetivo demonstrar o efeito da metformina sobre a expressão de receptores de fatores de crescimento, relacionados à implantação, utilizando o modelo de culturas de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas, simulando características da SOP. A ideia foi elaborada inspirada nos trabalhos de Zhang e Liao em 2010, que avaliaram os efeitos da testosterona e da metformina no metabolismo da glicose no endométrio, e de Capp e Jauckus em 2011, que demonstraram a influência da metformina na expressão gênica de receptores de insulina e IGF-1 e na fosforilação da Akt (Zhang and Liao 2010; Capp, Jauckus et al. 2011).

Todos os grupos receberam E_2 , hormônio necessário para a adesão, diferenciação e proliferação celular. O grupo C foi estimulado com progesterona, hormônio predominante no endométrio secretor e fundamental para a receptividade uterina (Lessey 2011). O grupo CM além de P_4 , foi tratado com metformina (10 mmol/L) nos tempos indicados. O grupo CI, recebeu a adição de 100 ng/mL de insulina e o CA recebeu DHT (10^{-6} mol/L). Os grupos CI e CA foram incluídos como

um controle do grupo AI, e assim confirmar um efeito por insulina, androgênio ou associação. O grupo AI recebeu insulina e DHT, simulando características da SOP, enquanto o grupo AIM recebeu, além dos hormônios, o tratamento com metformina por 10 min, 24 e 48 h de cultivo.

As concentrações de insulina e metformina foram determinadas segundo a publicação de Germeyer e colaboradores, a qual, avaliou os efeitos da metformina em células estromais no processo de decidualização e na expressão gênica de interleucinas relacionadas à implantação (Germeyer, Jauckus et al. 2011). Já a concentração de DHT foi determinada por um estudo que teve o objetivo de investigar o perfil de receptores de androgênio no endométrio de mulheres com ciclos menstruais normais e em mulheres com SOP (Apparao, Lovely et al. 2002).

As células epiteliais são as primeiras a terem contato com o blastocisto, porém este estudo foi realizado com células estromais, que são as células dominantes do endométrio, e estão em contato com células endoteliais, logo com seus substratos sanguíneos, como por exemplo, diversos medicamentos, tendo ações parácrinas sobre as células epiteliais próximas (Psychoyos, Nikas et al. 1995). Um estudo de cocultura ou em uma matriz extracelular temporária com células epiteliais e estromais é necessário e está sendo iniciado em nosso laboratório de pesquisa.

O anticorpo primário antivimentina é utilizado como marcador de células estromais pela técnica de imunocitoquímica de fluorescência, e neste caso, confirmou o uso destas células em cultivo (Wang, Pilla et al. 2012; Zhu, Wang et al. 2012).

Neste trabalho, avaliando o IR foi observado um aumento da expressão

proteica nos grupos tratados por 24 horas com metformina comparados com o controle e grupo tratado somente com androgênio. O grupo tratado com androgênio, insulina e metformina (AIM) teve este aumento potencializado, sendo o grupo em que o IR foi mais expresso em relação aos outros. Supomos que este aumento seja em decorrência da interação da metformina com a insulina superando a ação inibitória do androgênio, pois o grupo controle com insulina (CI) teve sua expressão aumentada em relação ao grupo controle (C) e controle com androgênio (CA).

Em 48 horas de tratamento com metformina observamos resultados semelhantes, sendo o IR mais expresso no grupo AIM em relação aos demais. No grupo com androgênio e insulina (AI) houve uma maior expressão do IR comparado aos grupos C e CA. Não foi possível realizar o experimento com o grupo tratado somente com metformina, pois este foi incluído durante o estudo e o número amostral não foi suficiente para realizar a análise estatística. Estes resultados mostraram que o tempo e a dose de tratamento não foram suficientes para causar um *down-regulation* do IR, que foi nossa hipótese inicial.

A expressão gênica do IGF-1R mostrou uma inibição do androgênio na expressão (AI), sendo que a metformina reverteu esta inibição (AIM). Na expressão proteica do IGF-1R a insulina mostrou ser um fator determinante, pois após tratamento de 24 horas com metformina o grupo CM não diferiu do grupo controle (dados não mostrados), enquanto os grupos com insulina (CI, AI e AIM) aumentaram a expressão desse receptor. Em 48 horas de tratamento, os grupos com insulina aumentaram na mesma proporção a expressão de IGF-1R em relação aos grupos C e CA.

Os receptores de insulina e IGF-1 pertencem à família dos receptores

tirosina cinase. Estes são compostos por um domínio extracelular, no qual há a ligação de hormônios, porção transmembrana e domínio intracelular, o qual tem atividade intrínseca de tirosina cinase e quando ativada se autofosforila desencadeando a cascata intracelular de transmissão do sinal (Scotlandi and Picci 2008).

Um estudo, do nosso grupo de pesquisa, realizado em células da granulosa *in vitro*, que avaliou o efeito do tratamento com a metformina e com metformina associada à insulina na expressão gênica dos receptores de insulina e IGF-1, mostrou que o tratamento com metformina por 30 min aumentou a expressão gênica do IR, porém este tratamento somado à insulina por 30 e 60 minutos não diferiu do grupo controle. A análise proteica dos receptores deste estudo não mostrou diferença significativa entre os grupos (Furhmeister IP e colaboradores, dados ainda não publicados).

Em células estromais endometriais, grupos estimulados com insulina não demonstraram diferença na expressão gênica dos receptores de insulina e IGF-1 após 24h de tratamento com metformina. Comparando com o grupo sem estimulação com insulina, a metformina por 24 h diminuiu a expressão do IR (Capp, Jauckus et al. 2011). Nosso estudo mostra um aumento da expressão destes receptores quando tratados com insulina e metformina, porém não foi realizada análise com um tratamento somente com metformina para comparação.

Como a metformina alterou a expressão do IR, outras proteínas analisadas foram a PI3K e o GLUT4. Quanto à expressão proteica de PI3K, observa-se um aumento no grupo tratado com androgênio, insulina e metformina (AIM) após 24 e 48 h. Ainda, os grupos: tratado somente com metformina (CM), estimulado com insulina (CI) e com androgênio e insulina (AI) registraram uma maior expressão desta

proteína em comparação aos grupos controle (C) e somente com androgênio (CA). O GLUT4 teve um aumento de expressão no grupo estimulado com androgênio e insulina e tratado com metformina (AIM) tanto em 24 h, como em 48 h de tratamento. Novamente, o grupo tratado com metformina (CM), com insulina (CI), com insulina e androgênio (AI) aumentaram a expressão do Glut4 em relação aos grupos C e CA, demonstrando a forte interação da insulina com metformina nestes casos (Figura 13).

A autofosforilação do receptor tirosina cinase ativa a PI3K, a qual é uma enzima intracelular que fosforila o grupo 3-hidroxila de fosfoinosítídeos, sendo sua classe IA, capaz de fosforilar na membrana fosfatidilinositol-di-fosfato (PIP2) e transformar em fosfatidilinositol-tri-fosfato (PIP3). Esta reação leva à ativação de diversas vias de sinalização intracelulares (Taniguchi, Emanuelli et al. 2006). Já o GLUT4 é uma proteína da família de transportadores de glicose através da membrana celular. Em geral, quando há a ativação do IR, há a expressão e translocação de GLUT4 de um local de armazenamento intracelular até a membrana plasmática. Doenças relacionadas à resistência à insulina, como obesidade, diabetes e SOP, têm a expressão do GLUT4 diminuída (Lee, Lee et al. 2011; Mioni, Mozzanega et al. 2012).

Há evidências de que o GLUT4, além de sua ativação clássica via IR/PI3K/Akt, pode ser ativado pela AMPK/Rab4, os quais são ativados pela metformina. O Rab é membro da família Ras de proteínas G monoméricas, e junto com AMPK exercem ativação no AS160, substrato envolvido na translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, estabelecendo assim uma nova via de expressão e ativação metformina/AMPK/GLUT4 (Lee, Lee et al. 2011) (Figura 13 mostra esta via). Um trabalho de Zhang e Liao, em 2010, avaliou o substrato 1 do

receptor de insulina (IRS-1) e o GLUT4 em células endometriais. Após estímulo com testosterona, foi observado que a expressão gênica de IRS-1 e GLUT4 diminuíram, porém após tratamento com metformina, ação mediada por AMPK, este efeito foi revertido e os valores retornaram ao controle, reduzindo a resistência à insulina (Zhang and Liao 2010). Nossos resultados são similares a este estudo, onde os grupos tratados com metformina aumentaram a expressão do GLUT4.

Outro estudo, que avaliou o efeito da metformina em células endometriais de mulheres com SOP e obesas, verificou que tanto a expressão gênica, como a proteica de GLUT4 foram aumentadas após o tratamento com metformina, com os valores próximos ao grupo controle (Zhai, Liu et al. 2012).

Outra via que é ativada pelos receptores tirosina cinase é a da *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK). Diversas fosforilações ativam três principais grupos de proteínas: *extracellular signal-regulated Kinases* (Zhou, Gunput et al.), p38 e *c-Jun NH2-terminal Kinases* (JNK). A ERK tem ação principal no citoplasma, onde regula o crescimento, mitose e diferenciação celular, mas também pode se translocar ao núcleo, onde participa da ativação de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica (Song, Zhang et al. 2010).

Após avaliar a fosforilação da ERK, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em 10 min e 24 h de tratamento. Uma diferença foi observada apenas em 48 h de tratamento, com o aumento do grupo tratado com insulina (CI) em relação ao controle (C). A metformina não influenciou na expressão da ERK neste modelo.

Um trabalho de Lathi e Hess demonstrou que, em endométrio, a fosforilação da ERK e da Akt por insulina é dependente de dose, sendo a via da Akt já

estimulada por baixas doses, enquanto a ERK só começa a ser expressa numa dose maior (Lathi, Hess et al. 2005). Em nosso estudo, mesmo com uma dose alta de insulina, em células primárias, este efeito da ERK só foi observado após 48 horas.

Dependendo do tecido estudado, estes dados ainda são contraditórios na literatura. Em células da granulosa, a metformina associada com insulina diminuiu a atividade da MAPK, porém em tecido adiposo marrom a via da MAPK foi ativada pela metformina (Klein, Westphal et al. 2004; Sonntag, Gotte et al. 2005).

Neste trabalho ficou clara a inibição da Akt após incubação com metformina. Em 10 min de tratamento, o grupo tratado com androgênio e insulina (AI) teve uma maior atividade da Akt fosforilada em comparação aos demais, enquanto o grupo tratado somente com metformina teve esta atividade diminuída. Em 24 horas de tratamento, os grupos estimulados com insulina (CI) e androgênio e insulina (AI) mostraram uma maior fosforilação da Akt, enquanto os grupos tratados com metformina, CM e AIM, tiveram uma diminuição da atividade de fosforilação desta proteína em relação aos outros grupos. A diminuição da atividade da Akt contrariou a nossa hipótese inicial, que seria uma maior fosforilação nos grupos tratados com metformina por aumentar a sensibilidade do receptor de insulina.

A Akt/PKB é ativada quando sua ligação com PIP3, próxima à membrana plasmática, permite a fosforilação dos sítios treonina 308, pela enzima *3-phosphoinositide-dependent protein kinase* (PDK1) e serina 473, pelo complexo do mTOR (mTOR2) (Sarbasov, Guertin et al. 2005). A fosforilação da Akt/PKB está envolvida com o aumento do metabolismo, sobrevivência, crescimento e diferenciação celular, tráfico de vesículas intracelulares e angiogênese, estando relacionada também com a proliferação celular em casos de câncer endometrial

(Fayard, Tintignac et al. 2005; Gentilini, Busacca et al. 2007). A Akt/PKB também é influenciada por vários fármacos, incluindo a metformina (Lee, Lee et al. 2011).

O trabalho de Capp e colaboradores (2011) analisou em células endometriais a fosforilação da Akt em grupos estimulados pela insulina após tratamento com metformina, por 1, 5 e 10 minutos. Foi identificado que o grupo tratado somente com insulina teve um aumento na fosforilação da Akt comparado ao grupo controle, porém a incubação de metformina por si só não influenciou a fosforilação de Akt, não mostrando diferença significativa entre grupos tratados com metformina e controle em células estromais do endométrio *in vitro*. (Capp, Jauckus et al. 2011). Nossos resultados mostraram uma diminuição na fosforilação da Akt sob efeito da metformina.

Villavicencio e Rojas demonstraram que o sobrepeso, a obesidade e o câncer endometrial estão relacionados com o aumento da proliferação celular e fosforilação da Akt (Villavicencio, Aguilar et al. 2010). Estudos atuais relacionam a metformina como um possível medicamento anticâncer. Gonzalez-Angulo e Meric-Bernstam descreveram a metformina como uma possível alternativa no tratamento do câncer de mama, destacando inicialmente o principal papel do medicamento, com a ativação da AMPK, a qual suprime muitos processos dependentes de alta quantidade de ATP, como gliconeogênese, biossíntese de colesterol e proteínas. Assim, aumenta o estoque de glicose em músculo e diminui a glicose circulante, aumentando a sensibilidade e diminuindo a resistência à insulina. Paralela a esta ação, a AMPK inibe o complexo da mTOR, a qual, atuando com a Akt, está envolvida no crescimento e proliferação celular no câncer (mTOR1) (Gonzalez-Angulo and Meric-Bernstam 2010) (Figura 13 indica esta via). Outros estudos correlacionando metformina e endométrio corroboram com esta ideia (Brown,

Samarajeewa et al. 2013; Umene, Banno et al. 2013).

No endométrio, a metformina foi descrita como uma potente inibidora da proliferação celular, com sua ação dependente de dose, e sendo em doses acima de 5 mM seu maior rendimento, também por ativação da AMPK (Cantrell, Zhou et al. 2010). Em nosso trabalho foi utilizado uma dose de 10 mM.

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, utilizando este mesmo modelo e grupos em cultura de células, observou-se, pela técnica do MTT (*dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide*), uma inibição da proliferação celular no grupo tratado com metformina por 48h comparando aos grupos controles e ao grupo hiperinsulinêmico e hiperandrogênico (Machado, A.B. dados ainda não publicados). Dados estes que corroboram com Takemura e colaboradores, que testaram diferentes doses de metformina sobre a síntese de DNA de células estromais endometriais e encontraram a maior taxa de inibição da proliferação celular na mesma dose e no mesmo período de tratamento utilizada por Machado e colaboradores (Takemura, Osuga et al. 2007).

Campagnoli e colaboradores propuseram o uso de metformina como um agente preventivo de carcinoma endometrial, pois a metformina juntamente com mudança no estilo de vida pode inibir a proliferação celular endometrial (Campagnoli, Abba et al. 2013).

Estudos demonstram o efeito antiproliferativo da metformina e sua possível ação anticâncer, por sua ação inibitória sobre a via da Akt (Wurth, Pattarozzi et al. 2013), pela ação da metformina ativando AMPK, e esta por sua vez inibindo o complexo da mTOR (mTOR1), o qual é ativado pela Akt e está envolvido na proliferação celular. Apesar do complexo da mTOR ser ativado principalmente pela

via PI3K/Akt, estudos o indicam que a mTOR2 é a mais provável responsável pela fosforilação do sítio de serina 473 na própria Akt/PKB, e sem esta fosforilação a Akt não poderá ser ativada (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Como o anticorpo utilizado neste trabalho para Akt fosforilada reconhece exclusivamente a fosforilação em serina 473, sugerimos que a diminuição da expressão da Akt esteja relacionada com a diminuição da proliferação celular e com a ação da metformina inibindo o complexo mTOR (mTOR 1 e mTOR2) via AMPK (Figura 13).

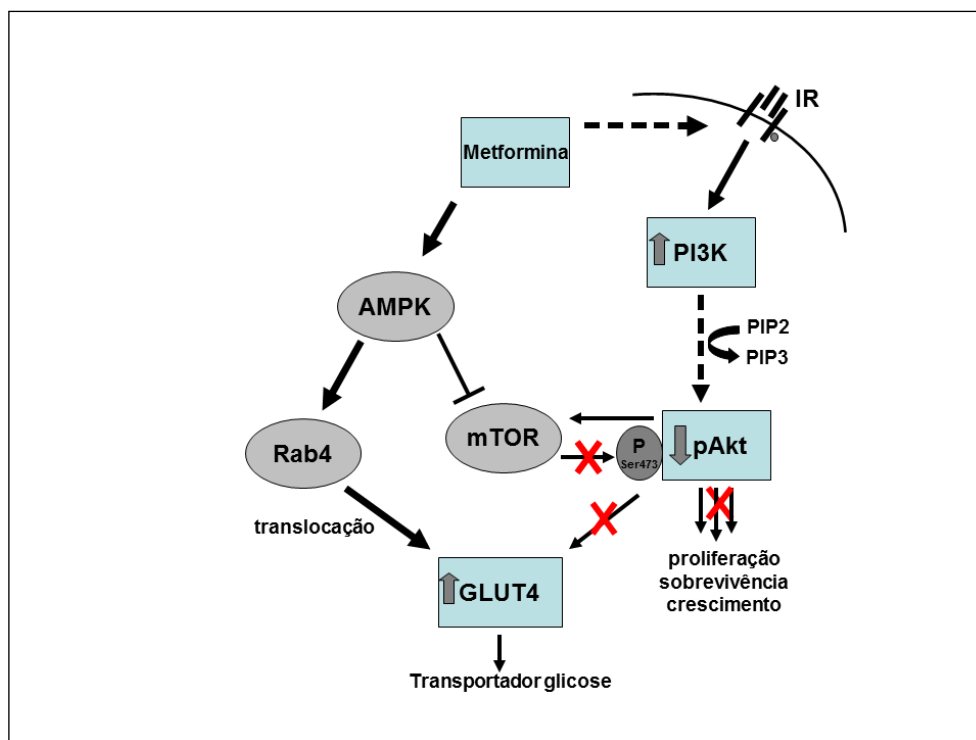


Figura 13: Autofosforilação de IR ativa PI3K, a qual fosforila PIP2 para PIP3. Akt é ativada quando se conecta com PIP3 seguida de fosforilação de treonina 308 e serina 473 por PDK1 e complexo mTOR, respectivamente. GLUT4 pode ser ativado por Akt e Rab4. Metformina ativa AMPK, a qual ativa Rab4 e inibe o complexo mTOR, o qual fosforila e ativa Akt. pAkt e mTOR estão envolvidos com a proliferação celular. IR: *insulin receptor*; PI3K: *phosphatidylinositol 3-kinase*; mTOR: *mammalian target of rapamycin complex*; Rab4: *Ras family of monomeric G proteins*; GLUT4: *glucose transporter-4*; Akt: *Protein Kinase B*; AMPK: *AMP-activated Protein Kinase*; PIP2: *phosphorylate phosphatidylinositol-di-phosphate*; PIP3: *phosphatidylinositol-tri-phosphate*; PDK1: *3-phosphoinositide-dependent Protein Kinase*.

Com o resultado de diminuição da fosforilação da Akt sob influência da metformina, a segunda etapa do trabalho teve o objetivo de aprofundar o conhecimento sobre ação antiproliferativa da metformina. Para isto, utilizamos a semaforina que em muitos tecidos está relacionada com a proliferação e migração celular. Em um primeiro momento, foi preciso caracterizar a semaforina no ciclo menstrual.

As semaforinas foram descritas em 1993 com ação no sistema nervoso central, mas atualmente já é conhecido que tem outros importantes efeitos na regulação celular em tecidos não neuronais (Tamagnone and Comoglio 2004; Mann, Chauvet et al. 2007). Estudos recentes indicam que a semaforina é bifuncional, podendo exercer efeitos atrativos ou repulsivos, dependendo do contexto biológico em que está inserida (Zhou, Gunput et al. 2008).

Nossos resultados mostraram que a SEMA3A, a qual está relacionada com Npn-1, está mais expressa no período proliferativo, e a SEMA3F, relacionada com Npn-2 não mostrou diferença durante o ciclo menstrual. Em endométrio de macacos *rhesus*, a expressão gênica de Npn-1 foi mais expressa no período proliferativo e suprimida no período secretório (Germeyer, Hamilton et al. 2005). A expressão Npn-1 nas células epiteliais foi altamente correlacionada com a proliferação destas células, entretanto a Npn-2 foi diminuída na fase proliferativa (Germeyer, Hamilton et al. 2005).

Os receptores de semaforina são geralmente proteínas plexinas. Existem plexinas relacionadas com espécie de invertebrados (PlexA and PlexB) e vertebrados (plexinA1-plexinA4, plexinB1-plexinB3, plexinC1 and plexinD1) (Suto, Ito et al. 2005). Em adição às plexinas, existem correceptores os quais servem para

ligação (Neuropilins ou Npns) e modulação do sinal (imunoglobulina de células de adesão). As SEMA3A-F não interagem diretamente com os receptores plexinas, mas intermediados por Npn-1 ou Npn-2 para ativar o complexo Npn-plexin. Em neurônios, o complexo Npn-1-plexinA4 é o principal ligante para SEMA3A, enquanto o complexo Npn-2-plexinA3 para SEMA3F (Yaron, Huang et al. 2005).

Neste estudo, SEMA3B e SEMA3F não apresentaram diferença na expressão gênica entre o período proliferativo e secretório. Possivelmente a ação de SEMA3B e 3F no endométrio é similar a de outros tecidos, não atuando no aumento da proliferação celular. A SEMA3B e SEMA3F foram as primeiras caracterizadas como supressoras de tumor, com a inibição de proliferação celular no câncer de pulmão (Roche, Boldog et al. 1996; Xiang, Hensel et al. 1996; Tse, Xiang et al. 2002; Xiang, Davalos et al. 2002). A SEMA3B foi utilizada *in vitro* para inibir o crescimento tumoral em células cancerígenas de pulmão e mama (Castro-Rivera, Ran et al. 2004). No câncer do ovário, a SEMA3B foi bem relacionada à diminuição do crescimento celular *in vitro* e formação tumoral *in vivo* (Tse, Xiang et al. 2002). A expressão de SEMA3F está caracterizada com tumores altamente encapsulados e pouco vascularizados. A análise histológica revela que SEMA3F induz uma barreira em torno da cápsula e impede invasão de vasos sanguíneos (Bielenberg and Klagsbrun 2007).

Em nossos resultados, no tecido endometrial, a SEMA3A foi mais expressa no período proliferativo em relação ao secretório. A SEMA3A foi relacionada à migração celular e quimiotaxia no câncer de mama (Bachelder, Lipscomb et al. 2003). No câncer de próstata, SEMA3A regula a adesão e invasão celular (Herman and Meadows 2007). Estas ações são dependentes do tecido, por exemplo, altos níveis de SEMA3A são relacionados com um mau prognóstico no câncer pancreático

(Muller, Giese et al. 2007).

A SEMA3E, contrastando com SEMA3B e 3F, promove crescimento axonal e migração de células endoteliais. No sistema nervoso embrionário, SEMA3E controla a formação frontal do cérebro (Chauvet, Cohen et al. 2007). A SEMA3E foi mais expressa no período proliferativo em comparação ao secretório, ação similar às células endoteliais (Gaur, Bielenberg et al. 2009). O mesmo aconteceu com a SEMA3D.

Na análise nas células endometriais, a metformina não mostrou nenhuma ação na SEMA3B e 3F, similar aos tecidos. Metformina também não mostrou ação na SEMA3C, a qual está mais expressa na fase proliferativa nos tecidos. Altas doses de metformina diminuíram a expressão de SEMA3A, 3C e 3D comparados ao controle (E_2P_4), possivelmente relacionadas com uma ação inibitória de migração e proliferação celular, corroborando a análise tecidual. A metformina em altas concentrações também diminuiu a expressão da prolactina, a qual além de atuar como um fator de crescimento, é um importante marcador de decidualização celular.

Resumindo, SEMA3B e SEMA3F não tiveram diferença em suas expressões gênicas entre as fases proliferativa e secretória no ciclo menstrual, enquanto SEMA3A, 3C, 3D e 3E são possivelmente relacionadas com a proliferação celular no endométrio, sendo mais expressas na fase proliferativa. A metformina, em altas doses e após um tratamento a longo prazo, inibiu a expressão da SEMA3A, 3D e 3E, possivelmente por sua ação antiproliferativa já descrita em outros tecidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metformina é um medicamento sensibilizador do receptor da insulina utilizado há 20 anos na reprodução humana para melhorar as taxas de ovulação em pacientes. Seu mecanismo ainda não é bem esclarecido, e existem estudos que indicam que, além de melhorar a ovulação, a metformina tem uma importante ação em alguns fatores implantacionais no endométrio. Atualmente, este medicamento vem sendo fortemente ligado à diminuição da proliferação celular em vários tipos de câncer.

Neste estudo, em um primeiro momento, foi avaliado o efeito da metformina sobre receptores de fatores de crescimento (insulina e IGF-1R) que estão relacionados com a implantação do blastocisto no endométrio. Os resultados mostraram que a metformina atuou aumentando a expressão principalmente do receptor de insulina. Visto isto, foram analisadas algumas proteínas principais na via de sinalização da insulina. Foi observado que, quando associada com insulina, a metformina aumentou a expressão de PI3K e Glut4. Porém, sobre proteínas relacionadas com mitose e proliferação celular (ERK e Akt), a metformina não teve efeito sobre a expressão ou diminuiu a atividade destas.

Surgiu então a segunda etapa do experimento, que teve o objetivo de avaliar a ação da metformina em relação à proliferação celular. Para tal, foi escolhida a semaforina, a qual está descrita em diversos tumores, em alguns com efeito contrário e em outros a favor da proliferação. Inicialmente, foi necessário caracterizar a presença da semaforina no ciclo menstrual e sua relação pró ou contra a proliferação celular, visto que em endométrio não foi encontrada bibliografia

relacionando diretamente a semaforina de classe 3 com este tecido em humanos.

Analisando biópsias endometriais, foi observado que há predominância de semaforina de classe 3 no período proliferativo em relação ao secretório (mostrando que a semaforina está relacionada com a proliferação celular do endométrio). Então foram realizadas mais culturas de células para o tratamento com metformina como um medicamento antiproliferativo. Foi avaliado que altas concentrações de metformina diminuíram a expressão das semaforinas que estavam relacionadas com o período proliferativo.

Além disso, a metformina em altas concentrações também diminuiu a decidualização celular endometrial. Apesar deste efeito não influenciar em grande escala a implantação em mulheres com idade reprodutiva, este aspecto é importante na modificação da estrutura celular em pacientes que se encontram em estados patológicos, pós-menopausa e com risco de câncer endometrial.

Concluindo, foi observado que a metformina tem um efeito em receptores de fatores de crescimento e proteínas da via de sinalização da insulina que exercem influência na implantação, aumentando assim estes efeitos.

A metformina também pode estar relacionada com a diminuição da proliferação celular, sendo um possível medicamento a ser estudado para o combate a células malignas no câncer.

Como perspectivas, é necessário ampliar os estudos da metformina tanto em relação à implantação como também à inibição de proliferação celular. Inicialmente *in vitro*, porém em uma cultura de 3 dimensões onde tenhamos interação de células epiteliais e estromais, e em seguida com um avanço para estudo clínicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andersen, C. L., J. L. Jensen, et al. (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." Cancer Res 64(15): 5245-5250.

Apparao, K. B., L. P. Lovely, et al. (2002). "Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome." Biol Reprod 66(2): 297-304.

Azziz, R., E. Carmina, et al. (2006). "Positions statement: criteria for defining polycystic ovary syndrome as a predominantly hyperandrogenic syndrome: an Androgen Excess Society guideline." J Clin Endocrinol Metab 91(11): 4237-4245.

Bachelder, R. E., E. A. Lipscomb, et al. (2003). "Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells." Cancer Res 63(17): 5230-5233.

Ben-Zvi, A., L. Ben-Gigi, et al. (2007). "Modulation of semaphorin3A activity by p75 neurotrophin receptor influences peripheral axon patterning." J Neurosci 27(47): 13000-13011.

Bergh, A. P. and D. Navot (1992). "Treatment strategies for severe ovarian

hyperstimulation." Acta Eur Fertil 23(6): 289-292.

Bielenberg, D. R., Y. Hida, et al. (2004). "Semaphorin 3F, a chemorepulsant for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype." J Clin Invest 114(9): 1260-1271.

Bielenberg, D. R. and M. Klagsbrun (2007). "Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins." Cancer Metastasis Rev 26(3-4): 421-431.

Boivin, J., E. Griffiths, et al. (2011). "Emotional distress in infertile women and failure of assisted reproductive technologies: meta-analysis of prospective psychosocial studies." BMJ 342: d223.

Bourdiec, A., R. Shao, et al. (2012). "Human Chorionic Gonadotropin Triggers Angiogenesis via the Modulation of Endometrial Stromal Cell Responsiveness to Interleukin 1: A New Possible Mechanism Underlying Embryo Implantation." Biol Reprod.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-254.

Brassard, M., Y. AinMelk, et al. (2008). "Basic infertility including polycystic ovary syndrome." Med Clin North Am 92(5): 1163-1192, xi.

Burgering, B. M. and P. J. Coffey (1995). "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction." Nature 376(6541): 599-602.

Campagnoli, C., C. Abba, et al. (2013). "Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women." Gynecol Endocrinol 29(2): 119-124.

Cantrell, L. A., C. Zhou, et al. (2010). "Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy." Gynecol Oncol 116(1): 92-98.

Capp, E., J. Jauckus, et al. (2011). "Does metformin influence the insulin-, IGF I- and IGF II-receptor gene expression and Akt phosphorylation in human decidualized endometrial stromal cells?" Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 158(2): 248-253.

Cardone, M. H., N. Roy, et al. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." Science 282(5392): 1318-1321.

Casper, R. F. (2011). "It's time to pay attention to the endometrium." Fertil Steril 96(3): 519-521.

Cavagna, M. and J. C. Mantese (2003). "Biomarkers of endometrial receptivity--a review." Placenta 24 Suppl B: S39-47.

Chadborn, N. H., A. I. Ahmed, et al. (2006). "PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse." J Cell Sci 119(Pt 5): 951-957.

Chauvet, S., S. Cohen, et al. (2007). "Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain

development." Neuron 56(5): 807-822.

Chou, K. H., H. von Eye Corleta, et al. (2003). "Clinical, metabolic and endocrine parameters in response to metformin in obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind and placebo-controlled trial." Horm Metab Res 35(2): 86-91.

Christensen, C., N. Ambartsumian, et al. (2005). "Proteolytic processing converts the repelling signal Sema3E into an inducer of invasive growth and lung metastasis." Cancer Res 65(14): 6167-6177.

Corleta, H., E. Capp, et al. (2000). "Cycle modulation of insulin-like growth factor-binding protein 1 in human endometrium." Braz J Med Biol Res 33(11): 1387-1391.

Costello, M. F., M. Chapman, et al. (2006). "A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome." Hum Reprod 21(6): 1387-1399.

Dallenbach, C., K. Sterzik, et al. (1987). "[Histologic endometrial findings in patients on the day of planned embryo transfer]." Geburtshilfe Frauenheilkd 47(9): 623-629.

Datta, S. R., H. Dudek, et al. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." Cell 91(2): 231-241.

De Fea, K. and R. A. Roth (1997). "Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase." J Biol Chem 272(50): 31400-31406.

Diamanti-Kandarakis, E. and A. Dunaif (2012). "Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications." Endocr Rev 33(6): 981-1030.

Dokras, A., M. Bochner, et al. (2005). "Screening women with polycystic ovary syndrome for metabolic syndrome." Obstet Gynecol 106(1): 131-137.

Eisenhardt, S., N. Schwarzmann, et al. (2006). "Early effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial." J Clin Endocrinol Metab 91(3): 946-952.

Falk, J., A. Bechara, et al. (2005). "Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure." Neuron 48(1): 63-75.

Fayard, E., L. A. Tintignac, et al. (2005). "Protein kinase B/Akt at a glance." J Cell Sci 118(Pt 24): 5675-5678.

Fazleabas, A. T., J. J. Kim, et al. (2004). "Implantation: embryonic signals and the modulation of the uterine environment--a review." Placenta 25 Suppl A: S26-31.

Futamura, M., H. Kamino, et al. (2007). "Possible role of semaphorin 3F, a candidate tumor suppressor gene at 3p21.3, in p53-regulated tumor angiogenesis

suppression." Cancer Res 67(4): 1451-1460.

Gargett, C. E. and L. Ye (2012). "Endometrial reconstruction from stem cells." Fertil Steril 98(1): 11-20.

Garzia, E., S. Borgato, et al. (2004). "Lack of expression of endometrial prolactin in early implantation failure: a pilot study." Hum Reprod 19(8): 1911-1916.

Gaur, P., D. R. Bielenberg, et al. (2009). "Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis." Clin Cancer Res 15(22): 6763-6770.

Gentilini, D., M. Busacca, et al. (2007). "PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors." Mol Hum Reprod 13(5): 317-322.

Germeyer, A., A. E. Hamilton, et al. (2005). "Cellular expression and hormonal regulation of neuropilin-1 and -2 messenger ribonucleic Acid in the human and rhesus macaque endometrium." J Clin Endocrinol Metab 90(3): 1783-1790.

Germeyer, A., J. Jauckus, et al. (2011). "Metformin modulates IL-8, IL-1beta, ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells." Reprod Biomed Online 22(4): 327-334.

Giudice, L. C. (1999). "Potential biochemical markers of uterine receptivity." Hum Reprod 14 Suppl 2: 3-16.

Giudice, L. C., N. A. Cataldo, et al. (1996). "Growth factors in normal ovarian follicle development." Semin Reprod Endocrinol 14(3): 179-196.

Giudice, L. C., S. P. Mark, et al. (1998). "Paracrine actions of insulin-like growth factors and IGF binding protein-1 in non-pregnant human endometrium and at the decidual-trophoblast interface." J Reprod Immunol 39(1-2): 133-148.

Gluszk, O., U. Stopinska-Gluszk, et al. (2012). "Phenotype and metabolic disorders in polycystic ovary syndrome." ISRN Endocrinol 2012: 569862.

Gonzalez-Angulo, A. M. and F. Meric-Bernstam (2010). "Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer." Clin Cancer Res 16(6): 1695-1700.

Goodarzi, M. O. and M. Bryer-Ash (2005). "Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents." Diabetes Obes Metab 7(6): 654-665.

Goudas, V. T. and D. A. Dumesic (1997). "Polycystic ovary syndrome." Endocrinol Metab Clin North Am 26(4): 893-912.

Guzeloglu-Kayisli, O., U. A. Kayisli, et al. (2009). "The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions." Semin Reprod Med 27(1): 62-79.

Guzick, D. S., R. Wing, et al. (1994). "Endocrine consequences of weight loss in obese, hyperandrogenic, anovulatory women." Fertil Steril 61(4): 598-604.

Harborne, L., R. Fleming, et al. (2003). "Descriptive review of the evidence

for the use of metformin in polycystic ovary syndrome." Lancet 361(9372): 1894-1901.

Herman, J. G. and G. G. Meadows (2007). "Increased class 3 semaphorin expression modulates the invasive and adhesive properties of prostate cancer cells." Int J Oncol 30(5): 1231-1238.

Hosseiniapanah, F., M. Barzin, et al. (2011). "The lack of association between polycystic ovary syndrome and metabolic syndrome: Iranian PCOS prevalence study." Clin Endocrinol (Oxf) 75(5): 692-697.

Hundal, R. S. and S. E. Inzucchi (2003). "Metformin: new understandings, new uses." Drugs 63(18): 1879-1894.

Irwin, J. C., L. de las Fuentes, et al. (1993). "Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion." Regul Pept 48(1-2): 165-177.

Irwin, J. C. and L. C. Giudice (1998). "Insulin-like growth factor binding protein-1 binds to placental cytotrophoblast alpha5beta1 integrin and inhibits cytotrophoblast invasion into decidualized endometrial stromal cultures." Growth Horm IGF Res 8(1): 21-31.

Jakubowicz, D. J., M. Seppala, et al. (2001). "Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations and enhances uterine vascularity and blood flow

in the polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab 86(3): 1126-1133.

Katsiki, N. and A. I. Hatzitolios (2010). "Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update." Curr Opin Obstet Gynecol 22(6): 466-476.

King, A. (2000). "Uterine leukocytes and decidualization." Hum Reprod Update 6(1): 28-36.

Kruger, R. P., J. Aurandt, et al. (2005). "Semaphorins command cells to move." Nat Rev Mol Cell Biol 6(10): 789-800.

Kusy, S., V. Potiron, et al. (2005). "Promoter characterization of Semaphorin SEMA3F, a tumor suppressor gene." Biochim Biophys Acta 1730(1): 66-76.

Ladson, G., W. C. Dodson, et al. (2011). "The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind study." Fertil Steril 95(3): 1059-1066 e1051-1057.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.

Landriscina, M. and F. Esposito (2011). "Insulin-resistant conditions: A favorable milieu for aggressive drug-resistant malignancies." J Gastrointest Oncol 2(1): 11-12.

Lathi, R. B., A. P. Hess, et al. (2005). "Dose-dependent insulin regulation

of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways." J Clin Endocrinol Metab 90(3): 1599-1606.

Lee, J. O., S. K. Lee, et al. (2011). "Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells." J Cell Physiol 226(4): 974-981.

Legro, R. S., V. D. Castracane, et al. (2004). "Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls." Obstet Gynecol Surv 59(2): 141-154.

Legro, R. S., W. D. Schlaff, et al. (2010). "Total testosterone assays in women with polycystic ovary syndrome: precision and correlation with hirsutism." J Clin Endocrinol Metab 95(12): 5305-5313.

Lessey, B. A. (2011). "Assessment of endometrial receptivity." Fertil Steril 96(3): 522-529.

Lin, J., R. Li, et al. (2003). "The influence of insulin on secretion of IGF-I and IGFBP-I in cultures of human endometrial stromal cells." Chin Med J (Engl) 116(2): 301-304.

Lindhard, A., U. Bentin-Ley, et al. (2002). "Biochemical evaluation of endometrial function at the time of implantation." Fertil Steril 78(2): 221-233.

Lord, J. M., I. H. Flight, et al. (2003). "Insulin-sensitising drugs (metformin,

troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome." Cochrane Database Syst Rev(3): CD003053.

Loureiro, S. O., L. Romao, et al. (2010). "Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes." Brain Res 1355: 151-164.

Mandrelle, K., M. S. Kamath, et al. (2012). "Prevalence of metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome attending an infertility clinic in a tertiary care hospital in south India." J Hum Reprod Sci 5(1): 26-31.

Mann, F., S. Chauvet, et al. (2007). "Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases." Prog Neurobiol 82(2): 57-79.

Moran, C., M. Arriaga, et al. (2012). "Obesity differentially affects phenotypes of polycystic ovary syndrome." Int J Endocrinol 2012: 317241.

Moran, L. J., M. L. Misso, et al. (2010). "Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis." Hum Reprod Update 16(4): 347-363.

Moran, L. J., R. Pasquali, et al. (2009). "Treatment of obesity in polycystic ovary syndrome: a position statement of the Androgen Excess and Polycystic Ovary Syndrome Society." Fertil Steril 92(6): 1966-1982.

Motta, A. B. (2012). "The role of obesity in the development of polycystic ovary syndrome." Curr Pharm Des 18(17): 2482-2491.

Muller, M. W., N. A. Giese, et al. (2007). "Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer." Int J Cancer 121(11): 2421-2433.

Nayak, N. R. and L. C. Giudice (2003). "Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders." Placenta 24(4): 281-296.

Norman, R. J., D. Dewailly, et al. (2007). "Polycystic ovary syndrome." Lancet 370(9588): 685-697.

Palomba, S., A. Falbo, et al. (2009). "Effect of preconceptional metformin on abortion risk in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials." Fertil Steril 92(5): 1646-1658.

Paria, B. C., W. Ma, et al. (2001). "Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A 98(3): 1047-1052.

Paria, B. C., J. Reese, et al. (2002). "Deciphering the cross-talk of implantation: advances and challenges." Science 296(5576): 2185-2188.

Paulson, R. J. (2011). "Hormonal induction of endometrial receptivity." Fertil Steril 96(3): 530-535.

Psychoyos, A., G. Nikas, et al. (1995). "The role of prostaglandins in blastocyst implantation." Hum Reprod 10 Suppl 2: 30-42.

Qiao, J. and H. L. Feng (2011). "Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence." Hum Reprod Update 17(1): 17-33.

Radziuk, J., Z. Zhang, et al. (1997). "Effects of metformin on lactate uptake and gluconeogenesis in the perfused rat liver." Diabetes 46(9): 1406-1413.

Rajendran, S., S. R. Willoughby, et al. (2009). "Polycystic ovary syndrome is associated with severe platelet and endothelial dysfunction in both obese and lean subjects." Atherosclerosis 204(2): 509-514.

Revel, A. (2012). "Defective endometrial receptivity." Fertil Steril 97(5): 1028-1032.

Roche, J., F. Boldog, et al. (1996). "Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin." Oncogene 12(6): 1289-1297.

Rotterdam (2004). "Migrant Health in Europe. Abstracts of the International Conference on Differences in Health and in Health Care Provision. 23-25 June 2004, Rotterdam, The Netherlands." Ethn Health 9 Suppl 1: S3-128.

Santana, L. F., M. F. de Sa, et al. (2004). "Effect of metformin on the clinical and metabolic assessment of women with polycystic ovary syndrome." Gynecol Endocrinol 19(2): 88-96.

Sarapik, A., A. Velthut, et al. (2012). "Follicular proinflammatory cytokines and chemokines as markers of IVF success." Clin Dev Immunol 2012: 606459.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science 307(5712): 1098-1101.

Satyaswaroop, P. G., R. S. Bressler, et al. (1979). "Isolation and culture of human endometrial glands." J Clin Endocrinol Metab 48(4): 639-641.

Schutte, S. C. and R. N. Taylor (2012). "A tissue-engineered human endometrial stroma that responds to cues for secretory differentiation, decidualization, and menstruation." Fertil Steril 97(4): 997-1003.

Scotlandi, K. and P. Picci (2008). "Targeting insulin-like growth factor 1 receptor in sarcomas." Curr Opin Oncol 20(4): 419-427.

Seibel, S. A., K. H. Chou, et al. (2008). "Effect of metformin on IGF-1 and IGFBP-1 levels in obese patients with polycystic ovary syndrome." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 138(1): 122-124.

Sekido, Y., S. Bader, et al. (1996). "Human semaphorins A(V) and IV reside in the 3p21.3 small cell lung cancer deletion region and demonstrate distinct expression patterns." Proc Natl Acad Sci U S A 93(9): 4120-4125.

Selva, E., D. L. Raden, et al. (1993). "Mitogen-activated protein kinase stimulation by a tyrosine kinase-negative epidermal growth factor receptor." J Biol Chem 268(3): 2250-2254.

Silver, N., S. Best, et al. (2006). "Selection of housekeeping genes for

gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR." BMC Mol Biol 7: 33.

Singh, M., P. Chaudhry, et al. (2011). "Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors." J Endocrinol 210(1): 5-14.

Song, X. R., H. Y. Zhang, et al. (2010). "[Extracellular signal-regulated protein kinase activation in endometrium with polycystic ovary syndrome and its significance]." Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 45(10): 767-771.

Sonntag, B., M. Gotte, et al. (2005). "Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells." Fertil Steril 84 Suppl 2: 1173-1179.

Spanos, S., D. L. Becker, et al. (2000). "Anti-apoptotic action of insulin-like growth factor-I during human preimplantation embryo development." Biol Reprod 63(5): 1413-1420.

Strowitzki, T., E. Capp, et al. (2001). "Expression of glucose transporter 1 in human endometrial and decidual tissue." Gynecol Endocrinol 15(3): 219-224.

Strowitzki, T., A. Germeyer, et al. (2006). "The human endometrium as a fertility-determining factor." Hum Reprod Update 12(5): 617-630.

Strowitzki, T., H. C. von Eye, et al. (1993). "Tyrosine kinase activity of insulin-like growth factor I and insulin receptors in human endometrium during the menstrual cycle: cyclic variation of insulin receptor expression." Fertil Steril 59(2):

315-322.

Suto, F., K. Ito, et al. (2005). "Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance." J Neurosci 25(14): 3628-3637.

Swiercz, J. M., T. Worzfeld, et al. (2008). "ErbB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1." J Biol Chem 283(4): 1893-1901.

Takemura, Y., Y. Osuga, et al. (2007). "Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells." J Clin Endocrinol Metab 92(8): 3213-3218.

Tamagnone, L. and P. M. Comoglio (2004). "To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration." EMBO Rep 5(4): 356-361.

Taniguchi, C. M., B. Emanuelli, et al. (2006). "Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action." Nat Rev Mol Cell Biol 7(2): 85-96.

Teede, H., A. Deeks, et al. (2010). "Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan." BMC Med 8: 41.

Tosca, L., P. Solnais, et al. (2006). "Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells." Biol Reprod 75(3): 342-351.

Toyofuku, T., H. Zhang, et al. (2004). "Dual roles of Sema6D in cardiac

morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2." Genes Dev 18(4): 435-447.

Traub, M. L. (2011). "Assessing and treating insulin resistance in women with polycystic ovarian syndrome." World J Diabetes 2(3): 33-40.

Trivax, B. and R. Azziz (2007). "Diagnosis of polycystic ovary syndrome." Clin Obstet Gynecol 50(1): 168-177.

Tse, C., R. H. Xiang, et al. (2002). "Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line." Cancer Res 62(2): 542-546.

Tseng, L. and J. Mazella (2002). "Endometrial cell specific gene activation during implantation and early pregnancy." Front Biosci 7: d1566-1574.

Tsutsumi, R., H. Hiroi, et al. (2009). "Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke." Fertil Steril 91(4 Suppl): 1614-1617.

Twisk, J. W. (2004). "Longitudinal data analysis. A comparison between generalized estimating equations and random coefficient analysis." Eur J Epidemiol 19(8): 769-776.

Velazquez, E. M., S. Mendoza, et al. (1994). "Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance,

hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy." Metabolism 43(5): 647-654.

Wilcox, A. J., D. D. Baird, et al. (1999). "Time of implantation of the conceptus and loss of pregnancy." N Engl J Med 340(23): 1796-1799.

Wurth, R., A. Pattarozzi, et al. (2013). "Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt." Cell Cycle 12(1): 145-156.

Xiang, R., A. R. Davalos, et al. (2002). "Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice." Cancer Res 62(9): 2637-2643.

Xiang, R. H., C. H. Hensel, et al. (1996). "Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer." Genomics 32(1): 39-48.

Yaron, A., P. H. Huang, et al. (2005). "Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins." Neuron 45(4): 513-523.

Yazdani, U. and J. R. Terman (2006). "The semaphorins." Genome Biol 7(3): 211.

Yin, X., M. E. Pavone, et al. (2012). "Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis." J Clin Endocrinol Metab 97(1): E35-43.

Zhai, J., C. X. Liu, et al. (2012). "Effects of metformin on the expression of GLUT4 in endometrium of obese women with polycystic ovary syndrome." Biol Reprod 87(2): 29.

Zhang, L. and Q. Liao (2010). "Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium." Fertil Steril 93(7): 2295-2298.

Zhou, Y., R. A. Gunput, et al. (2008). "Semaphorin signaling: progress made and promises ahead." Trends Biochem Sci 33(4): 161-170.

ANEXO 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido

**Projeto: EFEITO DA METFORMINA EM CÉLULAS ENDOMETRIAIS *IN VITRO*
EM UM MODELO DE SÍNDROME DE OVÁRIOS POLICÍSTICOS**

Pesquisadores responsáveis: Gustavo Ferreira/ Edison Capp

Telefones para contato: (051) 33597625/ (051) 81718492.

Prezada paciente,

A senhora irá realizar a cirurgia de histerectomia (remoção do útero), sendo assim, gostaria de convidá-la para participar do 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. Caso aceite, sua participação na pesquisa consistirá em permitir que após o término da cirurgia sejam coletadas células do útero removido. Trata-se de um estudo exploratório e sua participação como doadoras das células **não** está necessariamente relacionada com a presença de ovários policísticos, infertilidade ou aumento da resistência à insulina. Cabe salientar que as células endometriais são sempre descartadas após a cirurgia, então, este projeto **não** trará nenhum malefício à sua saúde. Este trabalho não implicará em nenhum custo à senhora. Possíveis desconfortos poderão ocorrer apenas durante a aplicação de um questionário de coleta de dados. Os resultados desta pesquisa não trarão benefícios diretos para a senhora. Porém, no futuro, essas avaliações poderão auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas à infertilidade.

No início aplicaremos um questionário para obtermos informações gerais de identificação, saúde geral e ginecológica. Ao final da pesquisa será feita a análise estatística e divulgação dos resultados.

Os seus dados serão mantidos em sigilo, não sendo revelados a outras pessoas que não os participantes do projeto, nem mesmo relacionado os resultados e descobertas futuras com a doadora.

Você poderá interromper a participação neste estudo a qualquer momento, sem que haja prejuízo no seu atendimento médico.

Qualquer dúvida que surja basta entrar em contato com um dos telefones acima citados, ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone 33598304.

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: _____

Investigador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de _____

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
25/11/2010
nº 100351 83

ANEXO 2 – Artigo 1

“Are Growth Factor Receptors modulated by metformin in human endometrial stromal cells with presence of androgen and insulin?”
submetido em setembro de 2013 para *Archives of Gynecology and Obstetrics*.

Are Growth Factor Receptors modulated by metformin in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin?

Gustavo Dias Ferreira^{1,2}, Amanda de Barros Machado^{1,2}, Tadeu Ludwig do Nascimento^{1,2}, Ilma Brum da Silva^{1,2}, Ariane Germeyer³, Thomas Strowitzki³, Helena von Eye Corleta^{1,2,4}, Edison Capp^{1,2,3,4}

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

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

³Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

⁴Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003.

Corresponding author:

Prof. Dr. Edison Capp

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11^o andar Porto Alegre, RS, CEP 90035-903,
Brazil

Telephone/FAX: 0055 51 33598117 – e-mail: edcapp@ufrgs.br

Abstract

Objective: To assess the effect of metformin on gene and protein expression of insulin receptor (IR) and IGF-1 (IGF-1R) receptor in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin. **Study Design:** Primary culture of endometrial stromal cells stimulated with estrogen, progesterone with or without androgen or insulin, and treated with metformin for 24 and 48 hours, followed by RNA (qRT-PCR) and protein (Western blot) extraction and analysis. **Results:** IR gene expression was increased after treatment with insulin (2.9 fold change, $p < 0.05$) and further after metformin treatment (4.7 fold change, $p < 0.001$), and in IGF-1R, the group treated with insulin (1.83 fold change) and metformin (1.78 fold change) showed more expression, than control group ($p < 0.05$). Similarly IR protein expression was increased after addition of metformin and insulin (249869 ± 15878) in relation to the other groups ($p < 0.001$). Furthermore cells treated with insulin (153634 ± 29123) and androgen plus insulin (162854 ± 86258) had a higher IR protein expression compared to control (104654 ± 5634) and androgen group (71595 ± 3439 , $p < 0.05$). In groups treated with insulin (127711 ± 4591) and androgen plus insulin (151098 ± 5194) the protein IGF-1R was increased compared to control (79355 ± 3470) and the androgen only

group (79326 ± 3114) ($p < 0.001$). **Conclusion:** Metformin in combination with insulin increased IR protein and gene expressions, while it had no influence in the protein expression of IGF-1R in endometrial stromal cells.

Keywords: endometrium; stromal cells; metformin; hyperinsulinism; insulin receptor; IGF-I receptor; PCOS.

Introduction

Metformin (1, 1-dimethylbiguanide hydrochloride) is a biguanide and acts in different tissues by improving insulin sensitivity (1, 2). In human reproduction, metformin has been successfully used in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS) disease associated with hyperinsulinemia, which has features such as anovulation, hyperandrogenism and ovarian microcysts (3-6). In addition, insulin resistance and hyperinsulinemia may contribute to early pregnancy loss in women with PCOS, potentially affect endometrial function negatively, leading to impairment of the implantation window, decreasing rates of gestation (7).

In PCOS women, metformin treatment restores ovulation and cyclical nature of menstruation, and reduces androgen levels, thus increasing fertilization rates (8, 9). The metformin action has not yet been defined. A decrease in endogenous glucose production by the liver followed by a reduction of hyperinsulinemia has been demonstrated (10). Others suggest direct changes in tyrosine kinase activity of the insulin receptor in the peripheral target tissues sensitive to insulin (11).

Endometrial preparation for implantation involves multiple molecular mechanisms, leading to regulation of proteins expression of implantation factors, like growth factors (12-14). The insulin receptor (IR), a tyrosine kinase receptor, activates several intracellular pathways with important effects in the homeostasis (15-17). The family of insulin-like growth factor (IGF) and its binding proteins are involved in endometrial growth, differentiation and angiogenesis and its mitogenic action has been studied widely in endometrial tissue (18-20).

Although metformin is a known (off-label) treatment for anovulatory PCOS women, its role in endometrial tissue is not fully elucidated. Studies have shown that metformin has direct effects in the decidualization process of stromal cells *in vitro*, influencing several proteins and growth factors involved in implantation (21).

The objective of our study was to evaluate the effect of metformin on gene and protein expression of IR and IGF-1R in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin *in vitro*.

Material and methods

Study design

An experimental study with primary endometrial stromal cell cultures was performed.

Patients

Endometrial cells were obtained from regularly cycling women undergoing hysterectomy (n = 12) in the Service of Obstetrics and Gynecology at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Exclusion criteria were postmenopausal status, endocrinopathies, endometriosis or other uterine diseases, and hormonal stimulation three months prior to surgery. This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#10-0351). Patients who agreed to participate signed a consent form.

Endometrial stromal cells culture

Human endometrial stromal cell culture was performed as previously described (22). After hysterectomy, the tissue was dissociated by collagenase type IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) of 3mg/mL for 2 hours at 37°C while shaking. Epithelial cells were separated by 40 µm filter (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA). The remaining stromal cells were suspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium High glucose (DMEM) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) with 1% of penicillin/streptomycin antibiotic, 10 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) and estrogen (E_2) (10^{-8} M), and cultivated at 37 ° C with 5.5% CO_2 .

On the fifth day of culture, the confluent monolayer cells were trypsinized and plated (1×10^4 cells/mL) in six-well plates for later gene and protein analyses. Cells were then treated for nine days according to five groups: C: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M); CI: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus insulin (100 ng/mL); CA: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus androgen (dihydrotestosterone 10^{-6} M); AI: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus insulin (100 ng/mL) plus androgen (dihydrotestosterone 10^{-6} M); AIM: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus insulin (100 ng/mL) plus androgen (dihydrotestosterone 10^{-6} M) plus metformin (10^{-3} M) (21, 23, 24). Concentrations of stimulations and treatments were determined according to previous studies with endometrium (21, 23).

Then RNA was extracted after 24 hours of metformin treatment with phenol and guanidine isothiocyanate (Trizol) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), and proteins were isolated after 24 and 48 hours of metformin treatment in 0.3 mL of RIPA solution - lysis buffer (50 mM Tris-HCl; 150 mM sodium chloride; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 3% Triton X-100; 0.25% sodium deoxycholate; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 1 µg/mL leupeptin, 1 mM sodium fluoride).

Isolation of total RNA and cDNA synthesis

Isolation of total RNA was performed according to the Trizol protocol using 1 mL of Trizol/10 cm². Then 0.2 mL of chloroform was added and centrifuged at 12,000 g for 15 min at 4°C. The aqueous phase was transferred to new tubes and RNA precipitated by the addition of isopropyl alcohol (0.5 mL/mL Trizol). After overnight at -20 ° C, the tubes were centrifuged at 12,000 g for 10 min at 4°C and the RNA precipitate washed with 1 mL of 75% ethanol. The RNA was dissolved in ultra pure water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC) and quantified for later cDNA synthesis.

Quantitation of RNA concentration of each treatment group of samples was performed using the fluorimeter QuBit™ (Invitrogen ®, USA) according to the specific protocol Qubit Quantitation Platform, with reagents Quant-it™ (Invitrogen ®, USA) using 1 µL of RNA for each 199µL of working solution into each reading.

The cDNA synthesis was performed with 0.5 µg of total RNA per 20 µL solution of RT-PCR 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany).

Polymerase Chain Reaction - Real-Time from Reverse Transcription (RT-qPCR)

The mRNA levels of insulin receptor and IGF-1 receptor were evaluated by the technique of Polymerase Chain Reaction Real-Time from Reverse Transcription. TaqMan® (TaqMan PCR Master Mix reagent - Applied Biosystems) was used for detection, IR Hs00961557_m1 and IGF-1R Hs00951562_m1, with 40 cycles (10 min at 95°C, 15s at 95°C, 1 min at 60°C) on a 7500 Fast real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's protocol. Quantitative values were obtained from threshold cycle (Ct), where the increase in the fluorescent signal associated with an exponential increase of the product of qRT-PCR.

Protein isolation

Cells were homogenized in RIPA and incubated for 1 h while shaking, followed by centrifugation at 10,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to a clean tube to measure protein via the Bradford colorimetric method (25). The quantity of protein was determined by spectrometry at 595 nm.

Western blot

Proteins were then separated using a SDS-PAGE polyacrylamide 8% gel. For this reason 60 μ g of protein combined with Laemmli solution (50% glycerol, 10% SDS, 62.5mM Tris, 0.1% bromophenol blue and 0.05% 2- β -mercaptoethanol) were pipetted into the gel (26). Electrophoresis was performed in buffer with 192 mM glycine, 25 mM Tris and 0.1% SDS, pH 8.3. Proteins migrated through the gel for about 3h at 120 volts, followed by a semi-dry transfer to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) was performed by semi-dry for 45 min at 20 volts. PVDF membranes were incubated for 1 h in blocking solution containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.05% Tween (TTBS), 5% skimmed milk, pH 7.4. Then were incubated with the following first antibodies: anti-IR (sc-20739) and anti-IGF-1R (sc-7952 Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz CA, USA) and anti- β -tubulin (T5293 Sigma-Aldrich, MO, USA) as control protein at 4°C overnight. After the incubation with the second antibody (anti-rabbit Santa Cruz - sc-2357) for 2 h at room temperature the membranes were exposed to the chemiluminescent reagent (ECL) for about 1 min. The film autoradiography (GE Healthcare®) was analyzed by Image Master VDS (Pharmacia Biosciences Amershan ®) to quantify the density bands and analyse the results of protein expression that are presented in arbitrary units.

Statistical analysis

Data were analyzed by testing Generalized Estimating Equations (GEE) and Bonferroni post hoc test using the 20.0 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Data was expressed as mean \pm SD and significance was considered when $p < 0.05$.

Results

qRT-PCR

Figure 1 shows the mRNA expression of IR (A) and IGF-1R (B) after 24h of metformin treatment. Groups treated with insulin (CI) (2.9 fold change $p < 0.05$) and androgen plus insulin (AI) (2.8 fold change $p < 0.05$) had a higher expression of IR compared to control group (C). Androgen, insulin and metformin (AIM) potentiated the IR expression (4.7 fold change $p < 0.001$) significantly in comparison to all other groups, and androgen alone had no difference of control group (Figure 1A). IGF-1R gene expression after 24h metformin incubation was higher in the groups CI (1.83 fold change $p < 0.001$) and AIM (1.78 fold change $p < 0.001$) compared to C (Figure 1B). Androgen inhibited insulin action (AI), but metformin reversed this expression (AIM).

Western Blot

Figure 2 shows the protein expression of IR after 24 h (Fig. 2A) and 48 h

(Fig. 2B) of metformin treatment. Groups treated for 24hours with insulin (CI) (153634 ± 29123) and androgen plus insulin (AI) (162854 ± 86258) had a higher protein expression of IR compared to control (C) (104654 ± 5634) ($p < 0.05$). Androgen alone (CA) (71595 ± 3439) however was not different to control. Androgen, insulin and metformin (AIM) potentiated the IR expression (249869 ± 15878) significantly in comparison to all other groups ($p < 0.001$) (Figure 2A). The result after 48 h incubation were similar, with the highest IR protein expression was in AIM group (33729 ± 9537 $p < 0.001$) compared to the other groups. While groups treated with insulin (CI) (20369 ± 6944) and androgen plus insulin (AI) (22221 ± 7485) higher expression of IR compared with C group (12181 ± 2874) ($p < 0.05$), while CA (13242 ± 3942) was unchanged to control (Fig. 2B).

Figure 3 shows the protein expression of IGF-1R after 24 h (Fig. 3A) and 48 h (Fig. 3B) of metformin treatment. The IGF-1R analysis after metformin treatment observed effects of insulin leading to an increase of IGF-1R protein expression, as CI (127711 ± 4591), AI (151098 ± 5194), and AIM (182987 ± 7925) showed higher protein expression than C and CA ($p < 0.001$) after 24 h (Fig. 3A), and CI (159481 ± 6815), AI (211033 ± 9649), and AIM (264557 ± 12604 $p < 0.05$) observed an increase in IGF-1R protein expression compared to the control group (C) (108948 ± 4891) or androgen treatment (CA) (112812 ± 4721) after 48 h of metformin treatment (Fig. 3B).

Discussion

PCOS characteristics include anovulation, hyperandrogenism and polycystic ovaries, and a significant hyperinsulinemia as criterium for insulin resistance, being a major cause of infertility (3, 27). Metformin, an insulin-sensitizing agent, is used for clinical treatment in PCOS (24, 28). After treatment with metformin, patients with PCOS and insulin resistance show reduced rates of hyperandrogenism, improvement in fasting glucose, lower HOMA (homeostasis model assessment) index and higher rates of ovulation (10, 29).

Growth factors are involved in the preparation of the endometrium for implantation (12-14). With that, we aimed to demonstrate the effect of metformin on growth factor receptors in vitro in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin, simulating features of PCOS.

In this study, assessing the insulin receptor (IR), we observed an consistently increase in gene and protein expression in groups treated with insulin (CI, AI e AIM). The action of insulin has been described previously (22, 30). The other relevant observation is that the group containing androgen, insulin and metformin (AIM) has the most IR protein and gene expression compared with all other groups. We assume that this increase is due to the interaction of metformin with insulin, because the insulin (CI) and androgen plus insulin (AI) group had its expression increased in relation to the control (C) and androgen group (CA). Androgen alone inhibited increase receptor expression, but when associated with insulin, and insulin plus metformin showed an antagonistic effect with increased expression.

mRNA IGF-1R expression, androgen decreased insulin action, but metformin reversed this effect. Protein IGF-1R expression, the insulin proved to be a decisive factor, because after treatment, CI, AI and AIM increased the expression of this receptor in relation to groups C and CA, and had no difference between with and without metformin treatment.

The study of Fuhrmeister et al. showed that treatment with metformin for 30 minutes increased the gene expression of insulin and IGF-1 receptors in granulosa cells in vitro, while metformin plus insulin for 30 and 60 minutes did not lead to a different IR or IGF-1R expression compared to the control group. In granulosa cells the protein analysis did not show a significant difference between the groups, perhaps by short treatment time (data not published yet).

In endometrial stromal cells, stimulation with metformin showed no difference in gene expression of IR and IGF-1R after 6h and 24h, while stimulation with insulin for 24 hours changed the expression of IR (22).

Currently, metformin is being regarded as a potential factor inhibiting cancer expansion (31, 32). In the endometrium it is thought to inhibit cell proliferation (33). Metformin acts by activating AMPK, which inhibits mTOR complex that is involved in cell growth and proliferation in cancer (34, 35). Moreover, metformin also acts by inhibiting IGF-1 and IGF-2 receptors, thereby inhibiting their intracellular activation pathways, which contribute to proliferation and mitosis (36). Our results not demonstrated the direct action of metformin to inhibit the protein of IGF-1 receptor as showed in endometrial cancer cells (36), but also not as increased expression in

relation at insulin group (CI and AI) as in the insulin receptor.

Conclusion

Growth factors are involved in preparation of the receptive endometrium and metformin acts via improving the insulin sensitivity. We may affirm that metformin increased the gene and protein expression of the insulin receptor, especially when associated with insulin, and had no influence on the protein expression of IGF-1R in human endometrial stromal cells. Growth Factor Receptors expression were inhibited with androgen, and increased with insulin stimulation. Further studies should follow to assess metformin alone effect, and metformin plus insulin to after look at the potential local application of metformin in vivo in affected PCOS women.

Acknowledgements

This work had financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proc. 470636/2012-2), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da UFRGS (PPGFISIO) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Edison Capp, Ilma Simoni Brum da Silva, Gustavo Dias Ferreira, Amanda de Barros Machado and Tadeu Ludwig do Nascimento are scholarship recipients from CNPq.

References

1. Goodarzi MO, Bryer-Ash M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab.* 2005 Nov;7(6):654-65.
2. Palomba S, Falbo A, Orio F, Jr., Zullo F. Effect of preconceptional metformin on abortion risk in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1646-58.
3. Migrant Health in Europe. Abstracts of the International Conference on Differences in Health and in Health Care Provision. 23-25 June 2004, Rotterdam, The Netherlands. *Ethn Health.* 2004 Jun;9 Suppl 1:S3-128.
4. Eisenhardt S, Schwarzmann N, Henschel V, Germeyer A, von Wolff M, Hamann A, et al. Early effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):946-52.
5. Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 2007 Mar;50(1):168-77.
6. Baran S, Api M, Goksedef BP, Cetin A. Comparison of metformin and clomiphene citrate therapy for induction of ovulation in the polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2010 Oct;282(4):439-43.
7. Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv.* 2004 Feb;59(2):141-54.
8. Katsiki N, Hatzitolios AI. Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010 Dec;22(6):466-76.
9. Tosca L, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J. Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 2006 Sep;75(3):342-51.
10. Chou KH, von Eye Corleta H, Capp E, Spritzer PM. Clinical, metabolic and endocrine parameters in response to metformin in obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *Horm Metab Res.* 2003 Feb;35(2):86-91.
11. Sonntag B, Gotte M, Wulfing P, Schuring AN, Kiesel L, Greb RR. Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2005 Oct;84 Suppl 2:1173-9.

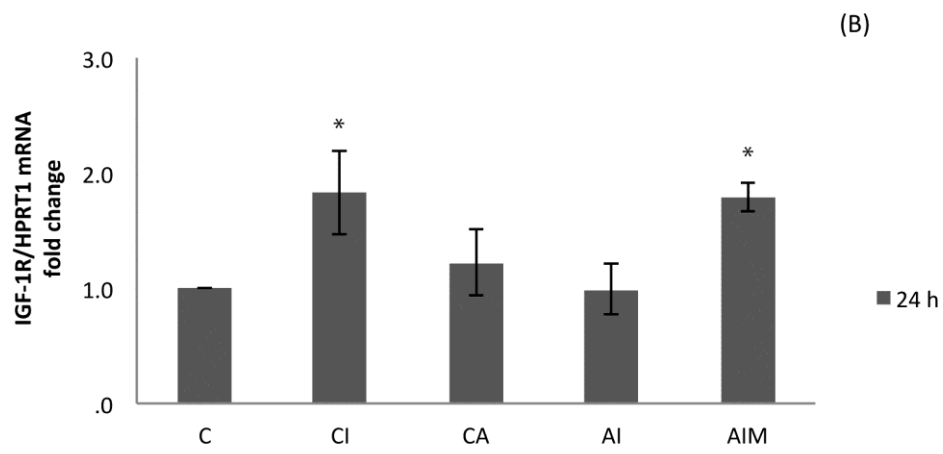
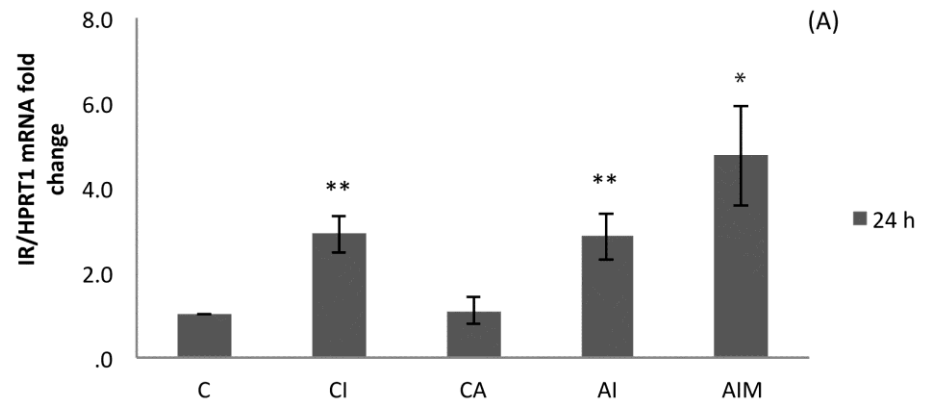
12. Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2011 Sep;96(3):522-9.
13. Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol*. 2011 Jul;210(1):5-14.
14. Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK, et al. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1047-52.
15. Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jan;97(1):E35-43.
16. De Fea K, Roth RA. Modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation and function by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1997 Dec 12;272(50):31400-6.
17. Tseng L, Mazella J. Endometrial cell specific gene activation during implantation and early pregnancy. *Front Biosci*. 2002 Jun 1;7:d1566-74.
18. Cavagna M, Mantese JC. Biomarkers of endometrial receptivity--a review. *Placenta*. 2003 Oct;24 Suppl B:S39-47.
19. Lin J, Li R, Zhou J. The influence of insulin on secretion of IGF-I and IGFBP-I in cultures of human endometrial stromal cells. *Chin Med J (Engl)*. 2003 Feb;116(2):301-4.
20. Nayak NR, Giudice LC. Comparative biology of the IGF system in endometrium, decidua, and placenta, and clinical implications for foetal growth and implantation disorders. *Placenta*. 2003 Apr;24(4):281-96.
21. Germeyer A, Jauckus J, Zorn M, Toth B, Capp E, Strowitzki T. Metformin modulates IL-8, IL-1beta, ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. *Reprod Biomed Online*. 2011 Apr;22(4):327-34.
22. Capp E, Jauckus J, von Eye Corleta H, Toth B, Strowitzki T, Germeyer A. Does metformin influence the insulin-, IGF I- and IGF II-receptor gene expression and Akt phosphorylation in human decidualized endometrial stromal cells? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2011 Oct;158(2):248-53.
23. Apparao KB, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, Lessey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod*. 2002 Feb;66(2):297-304.
24. Zhang L, Liao Q. Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium. *Fertil Steril*. 2010 May 1;93(7):2295-8.

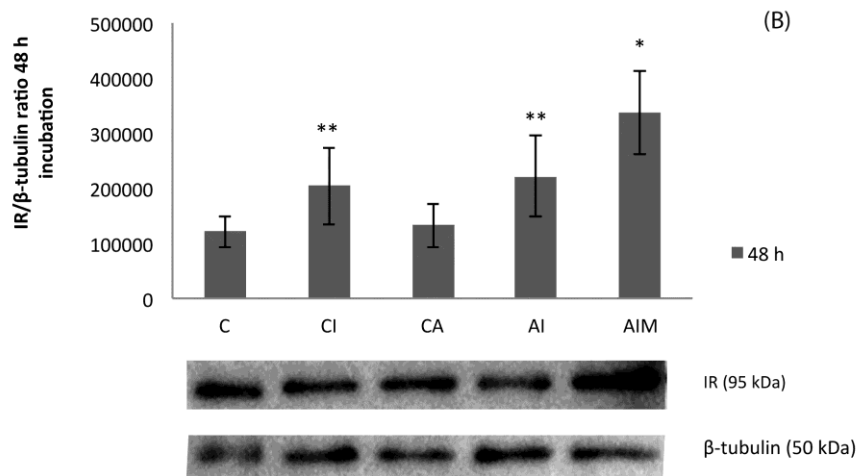
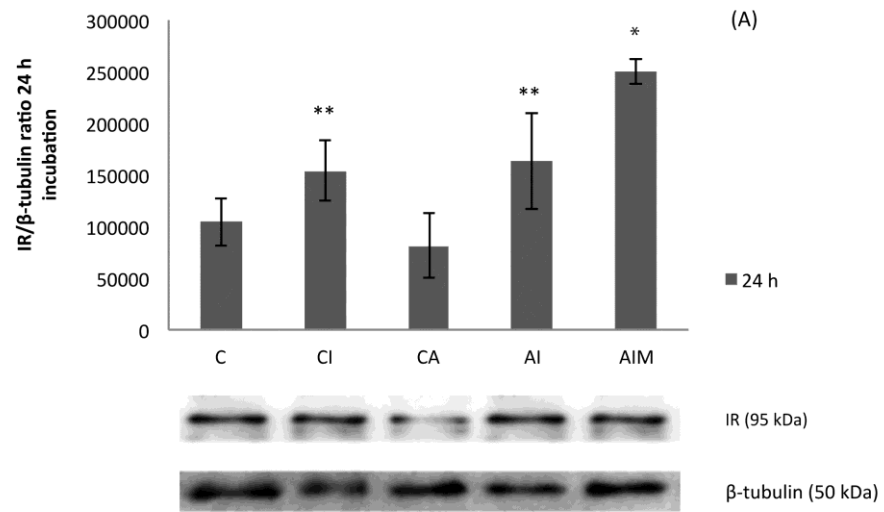
25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
26. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
27. Gluszek O, Stopinska-Gluszek U, Glinicki P, Kapuscinska R, Snochowska H, Zgliczynski W, et al. Phenotype and metabolic disorders in polycystic ovary syndrome. *ISRN Endocrinol.* 2012;2012:569862.
28. Costello MF, Chapman M, Conway U. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2006 Jun;21(6):1387-99.
29. Mahamed RR, Maganhin CC, Simoes RS, de Jesus Simoes M, Baracat EC, Soares JM, Jr. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. *Fertil Steril.* 2011 Mar 15;95(4):1507-9.
30. Wang CF, Zhang G, Zhao LJ, Li XP, Qi WJ, Wang JL, et al. Effects of insulin, insulin-like growth factor-I and -II on proliferation and intracellular signaling in endometrial carcinoma cells with different expression levels of insulin receptor isoform A. *Chin Med J (Engl).* 2013 Apr;126(8):1560-6.
31. Umene K, Banno K, Kisu I, Yanokura M, Nogami Y, Tsuji K, et al. New candidate therapeutic agents for endometrial cancer: potential for clinical practice (review). *Oncol Rep.* 2013 Mar;29(3):855-60.
32. Campagnoli C, Abba C, Ambroggio S, Brucato T, Pasanisi P. Lifestyle and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2013 Feb;29(2):119-24.
33. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol.* 2010 Jan;116(1):92-8.
34. Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar 15;16(6):1695-700.
35. Brown KA, Samarajeewa NU, Simpson ER. Endocrine-related cancers and the role of AMPK. *Mol Cell Endocrinol.* 2013 Feb 25;366(2):170-9.
36. Xie Y, Wang YL, Yu L, Hu Q, Ji L, Zhang Y, et al. Metformin promotes progesterone receptor expression via inhibition of mammalian target of rapamycin (mTOR) in endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011 Sep;126(3-5):113-20.

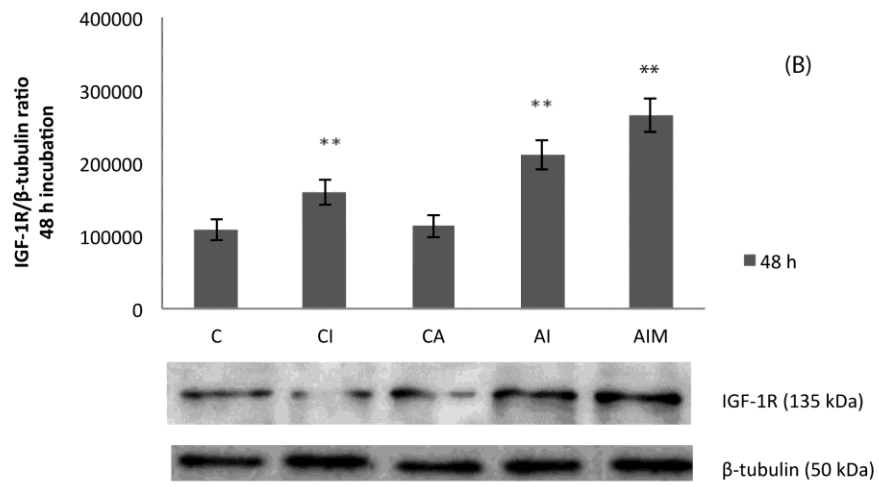
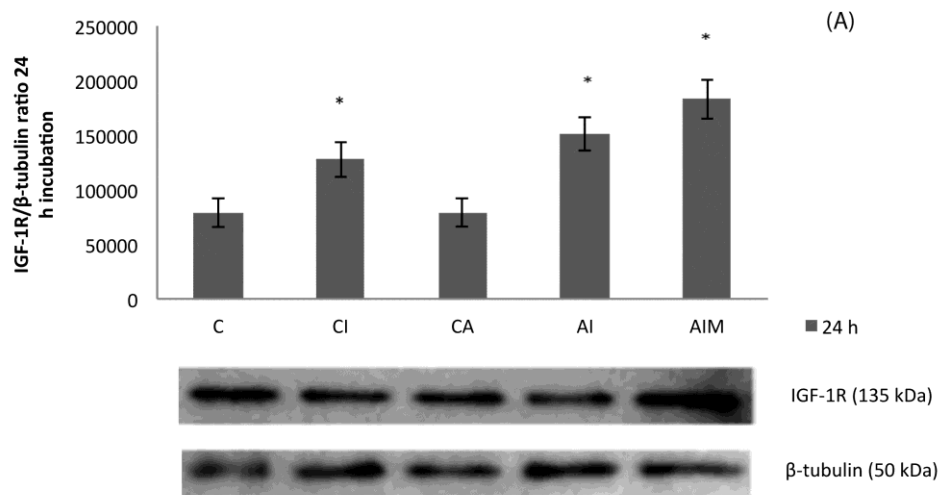
Figure 1 - Gene expression of insulin receptor (A) and IGF-1 receptor (B) after 24 treatment with metformin * $p < 0.001$ ** $p < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard deviation. Groups: C ($E_2 + P_4$), CI ($E_2 + P_4 + \text{insulin}$), CA ($E_2 + P_4 + \text{DHT}$), AI ($E_2 + P_4 + \text{insulin} + \text{DHT}$), AIM ($E_2 + P_4 + \text{insulin} + \text{DHT} + \text{metformin}$).

Figure 2 - Protein expression of insulin receptor after 24 (A) and 48 hours (B) treatment with metformin * $p < 0.001$ ** $p < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard deviation. Groups: C ($E_2 + P_4$), CI ($E_2 + P_4 + \text{insulin}$), CA ($E_2 + P_4 + \text{DHT}$), AI ($E_2 + P_4 + \text{insulin} + \text{DHT}$), AIM ($E_2 + P_4 + \text{insulin} + \text{DHT} + \text{metformin}$).

Figure 3 - Protein expression of IGF-1 receptor after 24 (A) and 48 hours (B) treatment with metformin * $p < 0.001$ ** $p < 0.05$. Data were expressed as mean \pm standard deviation. Groups: C ($E_2 + P_4$), CI ($E_2 + P_4 + \text{insulin}$), CA ($E_2 + P_4 + \text{DHT}$), AI ($E_2 + P_4 + \text{insulin} + \text{DHT}$), AIM ($E_2 + P_4 + \text{insulin} + \text{DHT} + \text{metformin}$).







ANEXO 3- Artigo 2

“Metformin modulates PI3K and GLUT4 expression and Akt/PKB phosphorylation in human endometrial stromal cells with presence of androgen and insulin” submetido em junho de 2013 para *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*.

Metformin modulates PI3K and GLUT4 expression and Akt/PKB phosphorylation in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin

Gustavo Dias Ferreira^{1,2}, Amanda de Barros Machado^{1,2}, Tadeu Ludwig do Nascimento^{1,2}, Ariane Germeyer³, Thomas Strowitzki³, Ilma Brum da Silva^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{1,2,4}, Edison Capp^{1,2,3,4}

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

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

³Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

⁴Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003.

Corresponding author:

Prof. Dr. Edison Capp

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar

Porto Alegre, RS, CEP 90035-903, Brazil

Telephone/FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: edcapp@ufrgs.br

Abstract

Objective: To assess the effect of metformin on proteins associated with growth factors, such as Akt, ERK, PI3K and GLUT4 in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin. **Study Design:** Primary Culture of endometrial stromal cells in different groups stimulated with estrogen, progesterone, androgen and insulin and treated with metformin for 10 minutes, 24 and 48 hours. After 14 days were extracted proteins for Western blot. **Results:** PI3K and GLUT4 expression were increased in the insulin treated group and further attenuated when metformin was added. The ERK protein was not affected by metformin, whereas the Akt phosphorylation was significantly decreased by the action of metformin. **Conclusion:** Metformin affects human endometrial stromal cells by acting on proteins related to growth factors, usually increasing their expression when combined with insulin. Akt phosphorylation was inhibited by metformin possibly due to its antiproliferative action.

Keywords: endometrial stromal cells, metformin, insulin, Akt, ERK, PI3K, GLUT4, PCOS.

Introduction

The Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) is a gynaecological endocrine disorder that affects approximately 8% of reproductive age women and is related to infertility, obesity, hirsutism and amenorrhea (1). It is diagnosed when the woman has at least two of the following aspects: menstrual disorders/anovulation, clinical or biochemical evidence of hyperandrogenism, and/or polycystic ovaries by ultrasonography (2). There are reports on the importance of hyperinsulinemia in promoting of PCOS. Between 50 and 70% of women with PCOS have peripheral insulin resistance that aggravates of hyperandrogenism (3).

One treatment option is the use of insulin-sensitizing agents, like metformin, when lifestyle changes do not improve symptoms (4, 5). Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride), an antidiabetic agent of the biguanide class, improves the insulin sensitivity in the treatment of Diabetes Mellitus Type II, since it acts on many tissues such as liver, skeletal muscle, adipose tissue, endometrium and ovary (6, 7). Although metformin has been used clinically for more than 40 years, its mechanism of action is not fully elucidated (8). A decrease in endogenous glucose production by the liver followed by a decrease hyperinsulinemia (9), as well as alternative mechanisms including direct changes in insulin sensitive tissues by changes in tyrosine kinase activity of the receptor insulin and its signaling pathway (10) have been suggested. In PCOS patients, metformin treatment has been shown to decrease hyperandrogenemia and to re-establish menstrual cycles without risk of multiple pregnancies. It furthermore,

influences the endometrial thickness and blood flow, and consequently improves ovulation, implantation and pregnancy (11, 12).

The implantation involves adequate communication between a functional embryo and receptive endometrium (13, 14). Involved in the preparation of the endometrium are steroid hormones, prostaglandins, leukotrienes, cytokines, transcription factors, adhesion molecules and growth factors (15, 16). Growth factors like insulin activate many intracellular pathways leading to multiple effects on homeostasis, including glucose transport, regulation of gene expression, protein synthesis, proliferation, cell survival, division and apoptosis, factors important for implantation (17). Endometrial disorders and placental dysfunctions are common in hyperinsulinemic conditions such as obesity and PCOS with increase risk of endometrial hyperplasia, infertility, fetal growth disturbances leading to abortions (18, 19).

PCOS patients are infertile due to ovulatory dysfunction. However, once restored the ovulation, several patients persist with lower pregnancy rates (20, 21) and higher abortion rates. (22). Metformin improves ovulation, implantation and pregnancy rates (11, 12). The aim of our study was to evaluate the effects of metformin on the ERK and Akt phosphorylation as well as the glucose transporter-4 (GLUT4) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) expression in decidualized human endometrial stromal cells *in vitro* after stimulation with androgen and insulin (hyperandrogenic and hyperinsulinemic environment simulating PCOS).

Material and methods

Patients

Endometrial cells were collected from regularly cycling patients in reproductive age undergoing hysterectomy in the proliferative phase of the menstrual cycle due to fibroids (n = 12) in the Department of Obstetrics and Gynecology at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. Exclusion criteria were postmenopausal status, endocrinopathies (including endometriosis), and hormonal stimulation three months prior to surgery. This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (#10-0351). Patients who agreed to participate signed a consent form.

Endometrial stromal cells culture

Human endometrial stromal cells were isolated as described before (23). After hysterectomy, the tissue was minced followed by dissociation by collagenase type IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) of 3mg/mL for 2 hours at 37°C while shaking. Epithelial cells were separate using a 40 µm filter (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA). The remaining stromal cells were suspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium High glucose (DMEM) (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) with 1% of penicillin/streptomycin antibiotic, 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) and estrogen (E₂) (10⁻⁸ M) and cultivated at 37 ° C with 5.5% CO₂.

On the fifth day of culture, the confluent monolayer cells were trypsinized and plated (1×10^4 cells/ml) in six-well plates for later immunocytochemistry and protein analyses. Cells were then treated for eight days according to six groups (5, 24): C: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M); CM: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus metformin (10^{-3} M); CI: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus insulin (100 ng/mL); CA: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus androgen (dihydrotestosterone (DHT) 10^{-6} M); AI: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus insulin (100 ng/mL) plus androgen (DHT 10^{-6} M); AIM: estrogen (10^{-8} M) plus progesterone (10^{-6} M) plus insulin (100 ng/mL) plus androgen (DHT 10^{-6} M) plus metformin (10^{-3} M).

Metformin treatment was performing for 10 min, 24 h and 48 h. Then proteins were isolated in 0.3 mL of RIPA solution – lysis buffer (50mM Tris-HCl; 150 mM sodium chloride; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 3% Triton X-100; 0.25% sodium deoxycholate; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 1 μ g/mL leupeptin, 1 mM sodium fluoride).

Protein isolation

Cells were homogenized in RIPA buffer and incubated at 4°C for 1 h while shaking, followed by centrifugation at 10,000 g or 10 min at 4°C. The supernatant was transferred to a clean tube to measure protein via the Bradford colorimetric method (25). The quantity of proteins was determined by spectrometry at 595 nm.

Western blot

Proteins were then separated using a SDS-PAGE polyacrylamide 8% gel. For this reason 60 μ g of protein combined with Laemmli solution (50% glycerol, 10% SDS, 62.5 mM Tris, 0.1% bromophenol blue and 0.05% 2- β -mercaptoethanol) were pipetted into the gel. Electrophoresis was performed in buffer with 192 mM glycine, 25 mM Tris and 0.1% SDS, pH 8.3. Proteins migrated through the gel for about 3 h at 120 volts, followed by a semi-dry transfer to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) was performed by semi-dry for 45 min at 20 volts. PVDF membranes were incubated for 1 h in blocking solution containing 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris, 0.05% Tween (TTBS), 5% skimmed milk, pH 7.4. Then they were incubated with the following first antibodies (all human polyclonal rabbit antibodies) anti-p-Akt (sc-7985)/anti-AKT, anti-p-ERK (sc-101760)/anti-ERK, anti-PI3K (sc-7189), anti-GLUT4 (sc-7938) and the β -tubulin as control protein at 4°C overnight. After the incubation with the second antibody (anti-rabbit Santa Cruz® - sc-2357) for 2 h at room temperature the membranes were exposed to the chemiluminescent reagent (ECL) for about 1 min. The film autoradiography (GE Healthcare®) was analyzed by Image Master VDS (Pharmacia Biosciences Amersham®) to quantify the density bands and analyse the results of protein expression, which is presented in arbitrary units.

Immunocytochemistry

For confirmation of stromal cell culture, plates were fixed with paraformaldehyde 4% for 30 min at room temperature. Nonspecific proteins were blocked by PBS solution containing 5% bovine serum albumin for two hours. Cells were incubated overnight with the primary mouse anti human antibody against vimentin (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA) diluted 1:50 in TTBS. Then cells were incubated with a rhodamine coated secondary antibody (red sheep anti-mouse, 1:400) for two hours. Negative controls were performed without primary antibody, no immunoreactivity was observed. Nuclei were marked with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0.25 mg/mL (26).

Statistical analysis

Data were analyzed by testing Generalized Estimating Equations (GEE) and Bonferroni post hoc test using the 20.0 Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). The GEE method estimates standard errors with sample distributions parametric and non-parametric, and aims to compare more than two groups with common characteristics and can therefore not be considered independent (27). Data was expressed as mean \pm SD and significance was considered when $p < 0.05$.

Results

Immunocytochemistry

The cell culture protocol used in our study has been previously used to

obtain endometrial stromal cell cultures with 97 % of purity (28). Vimentin is an specific marker for cells of mesenchymal origin (29). The immunocytochemistry technique with vimentin antibody showed positive staining for morphology of endometrial stromal cells (Figure 1).

Western Blot

Figure 2 shows the expression of the proteins phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) (a) and glucose transporter-4 (GLUT4) (b) after 24 h of metformin treatment. Groups treated with metformin (CM) (117803 ± 31417), insulin (CI) (107019 ± 30143) and androgen plus insulin (AI) (109143 ± 25470) had a higher expression of PI3K compared to control group (C) (66093 ± 2262) and treated with androgen alone (CA) (61851 ± 10900) ($p < 0.05$). Androgen, insulin and metformin (AIM) potentiated the PI3K expression (184998 ± 35263) significantly in comparison to all other groups ($p < 0.001$) (Figure 2a).

After 48 h incubation with metformin, the group treated with insulin (CI) (203686 ± 5428) and androgen plus insulin (AI) (222218 ± 11185) had a higher expression of PI3K compared to control group (C) (48695 ± 8819) and the group treated with androgen (CA) (132429 ± 9841) ($p < 0.05$). Androgen, insulin and metformin (AIM) potentiated the PI3K expression (337294 ± 23890) significantly in comparison to all other groups ($p < 0.001$).

GLUT4 protein expression after 24 h metformin incubation was higher in the

groups CM (64277 ± 8594), CI (65362 ± 13983) and AI (67008 ± 10508) compared to C (47063 ± 7918) and CA (54039 ± 11870) ($p < 0.05$) (Figure 2b). After 48 h incubation with metformin the group treated with insulin (CI) (46406 ± 9098) and androgen plus insulin (AI) (53333 ± 11127) had a higher expression of GLUT4 compared to control group (C) (39923 ± 9353) and the group treated with androgen (CA) (37828 ± 8203) ($p < 0.05$). The group with insulin, androgen and metformin (AIM) after 24h incubation (83604 ± 14456) (Figure 2b) or 48 hours of metformin incubation (69966 ± 7719) was also significantly increased ($p < 0.001$).

To assess the activity of ERK and Akt the ratio of phosphorylated (pERK, pAkt) vs total protein (ERK, Akt) was calculated. While the ratio of pERK/ERK was the same after 10 min and 24 h by the different treatment groups, CI (192187 ± 21342) had a higher expression compared to C (138593 ± 5925) at 48 hours ($p < 0.001$). After 10 min of metformin treatment, the group treated with insulin and androgen (AI) (142299 ± 10869) increased pAkt/Akt activity ($p < 0.001$) while the group treated with metformin (CM) (50092 ± 805) decreased significantly ($p < 0.05$) (Figure 3a). After 24 h CI (139594 ± 18071) and AI (135642 ± 16084) had the highest pAkt/Akt activity ($p < 0.001$), while CM (60958 ± 195) and AIM (60130 ± 9949) showed decreased activity ($p < 0.05$) (Figure 3b).

Discussion

Metformin improves ovulation, implantation and pregnancy rates (11, 12). The aim of our study was to evaluate the effects of metformin on the ERK and Akt

phosphorylation as well as the glucose transporter-4 (GLUT4) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) expression in decidualized human endometrial stromal cells *in vitro* after stimulation with androgen and insulin (hyperandrogenic and hyperinsulinemic environment simulating PCOS).

In order to simulate the hyperandrogenic and hyperinsulinemic environment as in PCOS, cells were decidualized *in vitro* with estrogen and progesterone as previously described (24) and stimulated with androgen and insulin.

Research involving inducing hormonal and endometrial receptivity evaluation contributes to the advancement of reproductive medicine techniques (30). It is necessary to know the physiology and factors related to endometrial implantation in experimental studies (15).

PCOS associated with a hyperandrogenemic and hyperinsulinemic environment is a common cause of infertility in women (1, 3). Therefore treatment includes weight loss and the use of insulin sensitizing agents such as metformin (4, 5) that are shown to improve fasting glucose and insulin resistance in hyperandrogenic rats (31) and to induce ovulation as well as reduction of hyperandrogenism in affected women (32).

Our study aimed to demonstrate the effect of metformin on protein growth factors related to implantation in cultured stromal cells in hyperinsulinemic and hyperandrogenic conditions, simulating features of PCOS *in vitro*. Treatment conditions (insulin, metformin and DHT) were used according to prior publications (24, 33). Furthermore prior *in vitro* studies have shown an effect of testosterone (5)

and metformin on glucose metabolism in endometrial cells (23).

We analyzed the PI3K and GLUT4 proteins since they are known to participate in activation of several intracellular signalling pathways (34) as well as glucose transport across cell membrane. Diseases associated with insulin resistance, such as obesity and PCOS, have decreased GLUT4 expression (35, 36). In our study, the expression of the proteins PI3K and GLUT4 were highest after 24 and 48 hours when DHT, insulin as well as metformin (AIM) were present in the culture. Nevertheless metformin alone or insulin with or without DHT also lead to an increase of PI3K and GLUT4 compared to control, showing an influence of insulin and metformin, on these factors, which is even potentiated when combined, suggesting that metformin potentiate insulin action.

Zhang and Liao, 2010, assessed the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and GLUT4 in endometrial glandular epithelial cells of premenopausal women. After stimulation with testosterone, it was observed that the protein expression of IRS-1 and GLUT4 decreased, but after treatment with metformin this effect was reversed and returned to control values reducing insulin resistance by AMPK-mediated action (5). Zhai et al. found a reduced expression of GLUT4 expression in endometrium of obese PCOS women. This however was normalized up to the level of control women after oral metformin treatment (37). New studies indicate that GLUT4, as well the insulin receptor/PI3K/Akt classical activation, can be activated by AMPK/Rab4 (36). Rab4 in turn can be activated by metformin and as a member of the Ras family of monomeric G proteins it is involved in the translocation of intracellular GLUT4 to the membrane (Figure 4). The local

endometrial metformin action on GLUT4 may therefore be transmitted by this pathway (36). Currently, RT-PCR experiments showed lower levels of GLUT4 mRNA and GLUT4 protein in PCOS women compared with PCOS women treated with metformin ($P < 0.05$), and had detected lower levels of p-AMPK in PCOS endometrium compared with the PCOS treated with metformin ($P < 0.05$), suggested that in PCOS patients, metformin may act directly at the endometrial level and decrease insulin resistance condition by increasing the expression of GLUT4 and indirectly restore endometrial function (38).

Another pathway that is activated by receptor tyrosine kinase is the Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK). Phosphorylations activate three groups of proteins: extracellular signal-regulated Kinases (ERK), p38 and c-Jun NH2-terminal Kinases (JNK). The ERK main action is in the cytoplasm, where it regulates cell growth, mitosis and cell differentiation, but can also translocate to the nucleus, where it participates in transcription factors that regulate gene expression (39). The ERK phosphorylation was not influenced by metformin. Only insulin treatment for 48 h increased the ERK phosphorylation compared to control, according to prior studies (19). However the change in MAPK expression by metformin is tissue/cell dependent (10, 40).

On the other hand, a bidirectional interaction between mammalian targets of rapamycin complex (mTOR) and phosphorylated Akt has been previously described (41). Both are important factors in metabolic activation, angiogenesis, cell survival, growth and differentiation, and are also involved in cell proliferation in cases of endometrial cancer (42). In our work metformin inhibited the

phosphorylation of Akt after 10 min and 24 h stimulation, while DHT and insulin increased its phosphorylation. This inhibitor effect of metformin on the Akt phosphorylation may be responsible for the beneficial effect of metformin in prevention/therapy of endometrial cancer in obese women (43, 44), as well as in breast cancer (45).

Similarly in *in vitro* studies metformin has also been described as a potent inhibitor of cell proliferation with a dose-dependent action via AMPK pathway (AMPK inhibits the mTOR complex, which phosphorylates Akt, see figure 4) (46). Current studies from our research group have also found an inhibition in cell proliferation after 48 hours of metformin treatment compared to control as well as to hyperandrogenic groups (data not yet published). These findings corroborate with Takemura et al, who tested different doses of metformin on DNA synthesis in ectopic endometrial stromal cells and found a reduction in cell proliferation with 10 mM after 24 hours (47).

The development of an embryo receptive endometrium requires the interaction of all cell types: superficial epithelial cells, glandular epithelial cells, endometrial stromal cells, fibroblasts, smooth muscular cells, macrophages and monocytes (48). The epithelial cells are the first contact with the blastocyst. However, the stromal cells are the predominant cells in the endometrium and have strong paracrine influence on adjacent epithelial cells. (49). Besides the effect of steroid hormones, several molecular mechanisms are involved in order to achieve a successful implantation, which are dependent of adequate expression of growth factors, prostaglandins, leukotrienes, LIF, interleukin-1, glicodelin, integrin and

adhesion molecules secreted by the embryo and by the endometrium (15). These factors act both in an autocrine and paracrine manner, and gene transcription regulating the implantation. These factors may affect the adhesion of the embryo to the endometrium. This sequential interaction of biological effects are determinant for the first steps of a healthy pregnancy (15, 50, 51).

Conclusion

Growth factors and their signalling pathways are involved in preparation of the receptive endometrium. Metformin acts on several factors improving the insulin sensitivity, reducing hyperandrogenemia and last, but not least inhibiting cell proliferation in endometrial cells. In our work, metformin was shown to act on the insulin signalling pathway proteins, increasing the expression of GLUT4 and PI3K, particularly when associated with insulin and inhibiting Akt phosphorylation possibly contributing to its antiproliferative action of endometrial cells. Further studies should follow to look at the potential local application of metformin in coculture with interaction between the epithelial and stromal cells, and in vivo in affected PCOS women.

Acknowledgements

This work had financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proc. 470636/2012-2),

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da UFRGS (PPGFISIO) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Edison Capp, Ilma Simoni Brum da Silva, Gustavo Dias Ferreira, Amanda de Barros Machado and Tadeu Ludwig do Nascimento are scholarship recipient from CNPq.

References

1. Gluszak O, Stopinska-Gluszak U, Glinicki P, Kapuscinska R, Snochowska H, Zgliczynski W, et al. Phenotype and metabolic disorders in polycystic ovary syndrome. *ISRN Endocrinol.* 2012;2012:569862.
2. Trivax B, Azziz R. Diagnosis of polycystic ovary syndrome. *Clin Obstet Gynecol.* 2007 Mar;50(1):168-77.
3. Legro RS, Castracane VD, Kauffman RP. Detecting insulin resistance in polycystic ovary syndrome: purposes and pitfalls. *Obstet Gynecol Surv.* 2004 Feb;59(2):141-54.
4. Costello MF, Chapman M, Conway U. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod.* 2006 Jun;21(6):1387-99.
5. Zhang L, Liao Q. Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium. *Fertil Steril.* 2010 May 1;93(7):2295-8.
6. Palomba S, Falbo A, Orio F, Jr., Zullo F. Effect of preconceptional metformin on abortion risk in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1646-58.
7. Goodarzi MO, Bryer-Ash M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab.* 2005 Nov;7(6):654-65.
8. Hundal RS, Inzucchi SE. Metformin: new understandings, new uses. *Drugs.* 2003;63(18):1879-94.

9. Radziuk J, Zhang Z, Wiernsperger N, Pye S. Effects of metformin on lactate uptake and gluconeogenesis in the perfused rat liver. *Diabetes*. 1997 Sep;46(9):1406-13.
10. Sonntag B, Gotte M, Wulfing P, Schuring AN, Kiesel L, Greb RR. Metformin alters insulin signaling and viability of human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2005 Oct;84 Suppl 2:1173-9.
11. Eisenhardt S, Schwarzmann N, Henschel V, Germeyer A, von Wolff M, Hamann A, et al. Early effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Mar;91(3):946-52.
12. Ladson G, Dodson WC, Sweet SD, Archibong AE, Kunselman AR, Demers LM, et al. The effects of metformin with lifestyle therapy in polycystic ovary syndrome: a randomized double-blind study. *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):1059-66 e1-7.
13. Strowitzki T, Germeyer A, Popovici R, von Wolff M. The human endometrium as a fertility-determining factor. *Hum Reprod Update*. 2006 Sep-Oct;12(5):617-30.
14. Bourdieu A, Shao R, Rao CV, Akoum A. Human Chorionic Gonadotropin Triggers Angiogenesis via the Modulation of Endometrial Stromal Cell Responsiveness to Interleukin 1: A New Possible Mechanism Underlying Embryo Implantation. *Biol Reprod*. 2012 Jul 18.
15. Lessey BA. Assessment of endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2011 Sep;96(3):522-9.
16. Revel A. Defective endometrial receptivity. *Fertil Steril*. 2012 May;97(5):1028-32.
17. Yin X, Pavone ME, Lu Z, Wei J, Kim JJ. Increased activation of the PI3K/AKT pathway compromises decidualization of stromal cells from endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jan;97(1):E35-43.
18. Schutte SC, Taylor RN. A tissue-engineered human endometrial stroma that responds to cues for secretory differentiation, decidualization, and menstruation. *Fertil Steril*. 2012 Apr;97(4):997-1003.
19. Lathi RB, Hess AP, Tulac S, Nayak NR, Conti M, Giudice LC. Dose-dependent insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Mar;90(3):1599-606.
20. Kodama H, Fukuda J, Karube H, Matsui T, Shimizu Y, Tanaka T. High incidence of embryo transfer cancellations in patients with polycystic ovarian

syndrome. *Hum Reprod.* 1995 Aug;10(8):1962-7.

21. Okon MA, Laird SM, Tuckerman EM, Li TC. Serum androgen levels in women who have recurrent miscarriages and their correlation with markers of endometrial function. *Fertil Steril.* 1998 Apr;69(4):682-90.

22. Qiao J, Feng HL. Extra- and intra-ovarian factors in polycystic ovary syndrome: impact on oocyte maturation and embryo developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2011 Jan-Feb;17(1):17-33.

23. Capp E, Jauckus J, von Eye Corleta H, Toth B, Strowitzki T, Germeyer A. Does metformin influence the insulin-, IGF I- and IGF II-receptor gene expression and Akt phosphorylation in human decidualized endometrial stromal cells? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Oct;158(2):248-53.

24. Germeyer A, Jauckus J, Zorn M, Toth B, Capp E, Strowitzki T. Metformin modulates IL-8, IL-1beta, ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. *Reprod Biomed Online.* 2011 Apr;22(4):327-34.

25. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

26. Loureiro SO, Romao L, Alves T, Fonseca A, Heimfarth L, Moura Neto V, et al. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes. *Brain Res.* 2010 Oct 8;1355:151-64.

27. Twisk JW. Longitudinal data analysis. A comparison between generalized estimating equations and random coefficient analysis. *Eur J Epidemiol.* 2004;19(8):769-76.

28. Irwin JC, Kirk D, King RJ, Quigley MM, Gwatkin RB. Hormonal regulation of human endometrial stromal cells in culture: an in vitro model for decidualization. *Fertil Steril.* 1989 Nov;52(5):761-8.

29. Arnold JT, Kaufman DG, Seppala M, Lessey BA. Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod.* 2001 May;16(5):836-45.

30. Paulson RJ. Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertil Steril.* 2011 Sep;96(3):530-5.

31. Mahamed RR, Maganhin CC, Simoes RS, de Jesus Simoes M, Baracat EC, Soares JM, Jr. Effects of metformin on the reproductive system of androgenized female rats. *Fertil Steril.* 2011 Mar 15;95(4):1507-9.

32. Chou KH, von Eye Corleta H, Capp E, Spritzer PM. Clinical, metabolic and endocrine parameters in response to metformin in obese women

with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind and placebo-controlled trial. *Horm Metab Res*. 2003 Feb;35(2):86-91.

33. Apparao KB, Lovely LP, Gui Y, Lininger RA, Lessey BA. Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome. *Biol Reprod*. 2002 Feb;66(2):297-304.

34. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Feb;7(2):85-96.

35. Mioni R, Mozzanega B, Granzotto M, Pierobon A, Zuliani L, Maffei P, et al. Insulin receptor and glucose transporters mRNA expression throughout the menstrual cycle in human endometrium: a physiological and cyclical condition of tissue insulin resistance. *Gynecol Endocrinol*. 2012 Dec;28(12):1014-8.

36. Lee JO, Lee SK, Jung JH, Kim JH, You GY, Kim SJ, et al. Metformin induces Rab4 through AMPK and modulates GLUT4 translocation in skeletal muscle cells. *J Cell Physiol*. 2011 Apr;226(4):974-81.

37. Zhai J, Liu CX, Tian ZR, Jiang QH, Sun YP. Effects of metformin on the expression of GLUT4 in endometrium of obese women with polycystic ovary syndrome. *Biol Reprod*. 2012 Aug;87(2):29.

38. Carvajal R, Rosas C, Kohan K, Gabler F, Vantman D, Romero C, et al. Metformin augments the levels of molecules that regulate the expression of the insulin-dependent glucose transporter GLUT4 in the endometria of hyperinsulinemic PCOS patients. *Hum Reprod*. 2013 Aug;28(8):2235-44.

39. Song XR, Zhang HY, Zhang YF, Han YK, Li KJ. [Extracellular signal-regulated protein kinase activation in endometrium with polycystic ovary syndrome and its significance]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2010 Oct;45(10):767-71.

40. Klein J, Westphal S, Kraus D, Meier B, Perwitz N, Ott V, et al. Metformin inhibits leptin secretion via a mitogen-activated protein kinase signalling pathway in brown adipocytes. *J Endocrinol*. 2004 Nov;183(2):299-307.

41. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005 Feb 18;307(5712):1098-101.

42. Gentilini D, Busacca M, Di Francesco S, Vignali M, Vignano P, Di Blasio AM. PI3K/Akt and ERK1/2 signalling pathways are involved in endometrial cell migration induced by 17beta-estradiol and growth factors. *Mol Hum Reprod*. 2007 May;13(5):317-22.

43. Villavicencio A, Aguilar G, Arguello G, Dunner C, Gabler F, Soto E, et al. The effect of overweight and obesity on proliferation and activation of AKT and ERK in human endometria. *Gynecol Oncol*. 2010 Apr;117(1):96-102.

44. Campagnoli C, Abba C, Ambroggio S, Brucato T, Pasanisi P. Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol*. 2013 Feb;29(2):119-24.
45. Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 15;16(6):1695-700.
46. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol*. 2010 Jan;116(1):92-8.
47. Takemura Y, Osuga Y, Yoshino O, Hasegawa A, Hirata T, Hirota Y, et al. Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Aug;92(8):3213-8.
48. Giudice LC. Potential biochemical markers of uterine receptivity. *Hum Reprod*. 1999 Dec;14 Suppl 2:3-16.
49. Psychoyos A, Nikas G, Gravanis A. The role of prostaglandins in blastocyst implantation. *Hum Reprod*. 1995 Dec;10 Suppl 2:30-42.
50. Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol*. 2011 Jul;210(1):5-14.
51. Paria BC, Ma W, Tan J, Raja S, Das SK, Dey SK, et al. Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jan 30;98(3):1047-52.

Legends

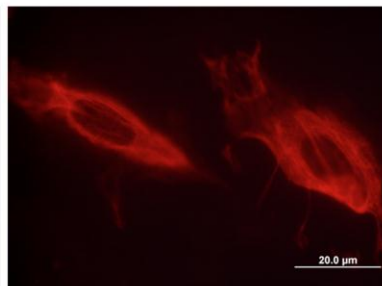
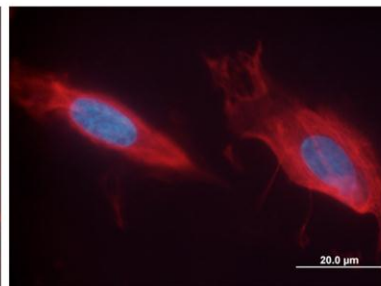
Figure 1: Immunocytochemistry fluorescence. Endometrial stromal cells in primary culture treated with antivimentin primary antibody (1:100) and rhodamine secondary antibody specific (red, sheep anti-mouse, 1:400), positive staining for vimentin confirming the cultivation of stromal cells. The nuclei were stained with DAPI (blue).

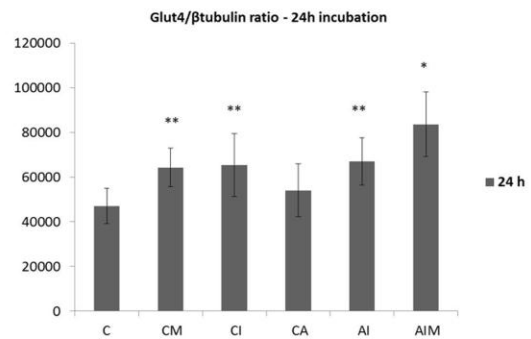
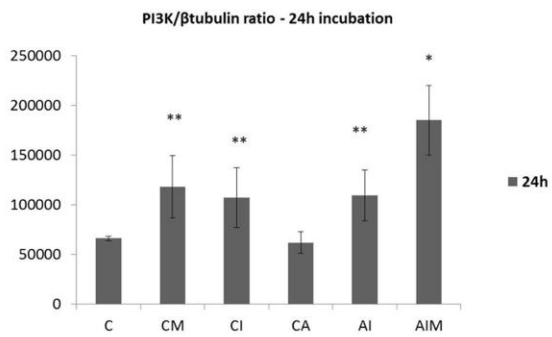
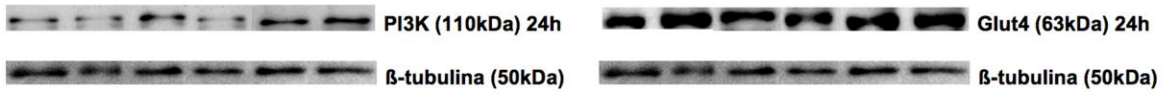
Figure 2: a) PI3K protein expression after 24 hours treatment with metformin in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin * $p < 0.001$ ** $p < 0.05$, b) GLUT4 protein expression after 24 hours treatment with metformin * $p < 0.001$ ** $p < 0.05$. C ($E_2 + P$), CM ($E_2 + P + \text{metformin}$), CI ($E_2 + P + \text{insulin}$), CA ($E_2 + P + \text{DHT}$), AI ($E_2 + P + \text{insulin} + \text{DHT}$), AIM ($E_2 + P + \text{insulin} + \text{DHT} + \text{metformin}$).

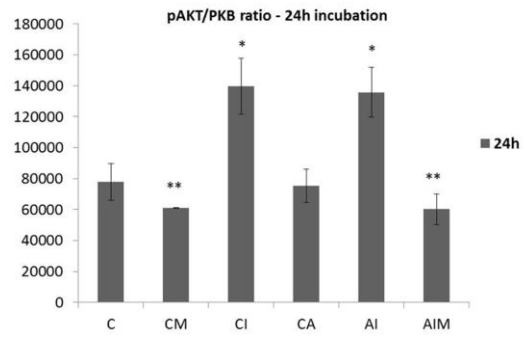
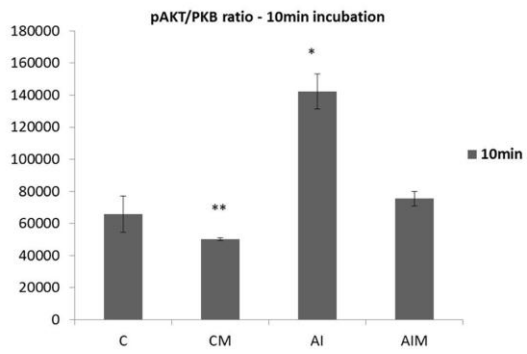
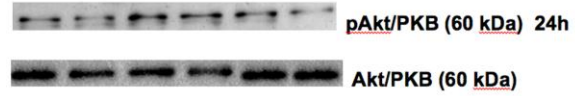
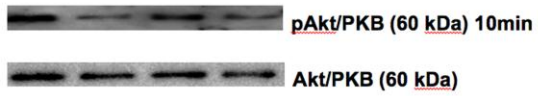
Figure 3: a) Akt/PKB phosphorylation after 10 minutes of metformin treatment in human endometrial stromal cells after stimulation with androgen and insulin. * $p < 0.001$ ** $p < 0.05$. b) Akt/PKB phosphorylation of after 24 hours of metformin treatment * $p < 0.001$ ** $p < 0.05$. C ($E_2 + P$), CM ($E_2 + P + \text{metformin}$), CI ($E_2 + P + \text{insulin}$), CA ($E_2 + P + \text{DHT}$), AI ($E_2 + P + \text{insulin} + \text{DHT}$), AIM ($E_2 + P + \text{insulin} + \text{DHT} + \text{metformin}$).

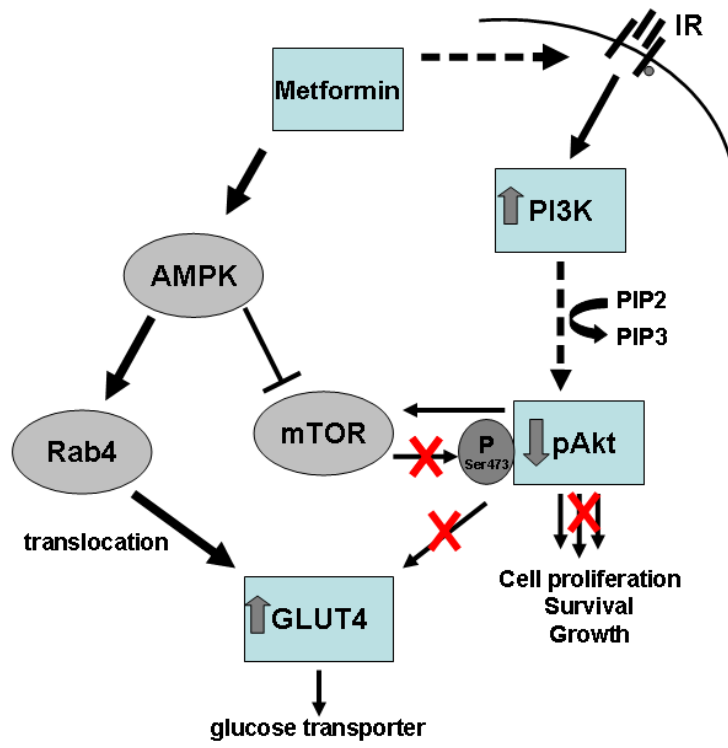
Figure 4: IR autophosphorylation activates PI3K, which phosphorylates PIP2 to PIP3. Akt is activated when its connection with PIP3 allows the threonine 308 and serine 473 phosphorylation by PDK1 and mTOR complex, respectively. GLUT4 can be activated by Akt and Rab4. Metformin activates AMPK, which activates Rab4 and inhibits the mTOR complex, which phosphorylates and activates Akt. pAkt and mTOR are involved in cell proliferation. IR: insulin receptor; PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; mTOR: mammalian target of rapamycin complex; Rab4: Ras family of monomeric G proteins; GLUT4: glucose transporter-4; Akt: Protein Kinase B; AMPK: AMP-activated Protein Kinase; PIP2: phosphorylate phosphatidylinositol-di-phosphate; PIP3: phosphatidylinositol-tri-phosphate; PDK1: 3-phosphohinisitide-dependent Protein Kinase.

DAPI

antivimentinantivimentin/DAPI







ANEXO 4 – Artigo 3

“Expression of semaphorin class 3 is higher in the proliferative phase on the human endometrium” (ainda não submetido).

**Expression of semaphorin class 3 is higher in the proliferative phase
on the human endometrium**

Gustavo Dias Ferreira^{1,2}, Edison Capp^{1,2,3,4}, Julia Jauckus³, Ilma Brum da Silva^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{1,2,4}, Thomas Strowitzki³, Ariane Germeyer³

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

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

³Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

⁴Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003.

Corresponding author:

Prof. Dr. Edison Capp

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar

Porto Alegre, RS, CEP 90035-903, Brazil

Telephone/FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: edcapp@ufrgs.br

Abstract

Objective: to assess gene expression of class 3 semaphorin (SEMA3A-F) and protein expression of semaphorin 3A (SEMA3A) on the cycle phases of human endometrium. **Study Design:** Gene expression of SEMA3A-F was analyzed by real-time PCR (qRT-PCR) and protein expression of SEMA3A was analyzed by ELISA technics in endometrial biopsies in the proliferative and secretory of menstrual cycle phases. **Results:** Gene expression of SEMA3A, SEMA3C, SEMA3D and SEMA3E was statistically significant decreased in secretory compared to proliferative phase endometrium ($p < 0.05$). Accordingly, SEMA3A protein expression in the proliferative was higher compared to secretory phase ($p \leq 0.05$). **Conclusion:** SEMA3A, 3C, 3D and 3E are possibly related to cell proliferation in the endometrium, being more expressed in the proliferative phase of the cycle.

Keywords: endometrium, semaphorin, menstrual cycle, SEMA3

Introduction

Initially, the semaphorins were characterized by their importance in repulsive axon guidance, but now are known as critical regulators of morphogenesis and homeostasis in various systems and tissues (1). They may influence a variety of biological processes, including activation of cytokines and in cell migration. Furthermore, semaphorins and their receptors are associated with cytosolic signaling susceptibility of various diseases such as schizophrenia, neurodegenerative diseases and particularly cancer (2, 3).

Of the 8 known classes of semaphorins classes 3-7 are vertebrate semaphorin. The semaphorins class 3 (SEMA3A-Sema3G) were primary known for their axonal guidance functions within brain (4-6). However Sema3A-F are also expressed in non-neuronal tissues and regulate cardiac morphogenesis, angiogenesis and cancer through its effects on migration, survival, growth and cell proliferation (1).

Semaphorin receptors are generally plexin proteins. There plexins members related of invertebrate species (PlexA and PlexB), and vertebrates (plexinA1-plexinA4, plexinB1-plexinB3, plexinC1 and plexinD1) (7). In addition to plexins, there are many semaphorin co-receptors. These co-receptors may serve as linkers (Neuropilins or Npns), or subunits modulators (Ig of cell adhesion molecules, or IgCAMs). Sema3s not interact directly with receptors plexin, but instead bind Npn-1 or Npn-2 to activate the complex Npn-plexin. In neurons in vivo, complex Npn-1-plexinA4 are the principal ligands for SEMA3A, while complex Npn-2-plexinA3 in

response to Sema3F (8). In rhesus macaque endometrium, Npn-1 mRNA was expressed in the luminal epithelium (not the glands), and its expression in these cells was elevated during the mid- to late proliferative phase and completely suppressed during the secretory phase (9).

Studies have advanced to understanding of the biology of semaphorin and their intracellular signaling mechanisms. Recent results show that different semaphorins subfamilies binding the same plexins receptors to trigger various cellular effects (4, 6, 10, 11). Studies about semaphorins are recent, with different action tissue dependent, their analysis is important in endometrial tissue.

The focus of our study was to assess gene expression of class 3 semaphorin (SEMA3A-F) and protein expression of semaphorin 3A (SEMA3A) on the cycle phases of human endometrium biopsies.

Material and methods

Patients

Endometrial biopsies of the proliferative (n=8) and the secretory (n=6) phases were collected from healthy, regularly cycling women undergoing hysterectomy or laparoscopy surgery for non-endometrial reasons, after informed consent under the approved Ethics protocol of the Ruprecht-Karls University, Heidelberg. Exclusion criteria were postmenopausal, endocrinopathies or other uterine diseases, hormonal stimulation in the three months before to surgery and

irregular menstrual bleeding. The histological analysis was performed to confirm the adequate cycle phase by the Department of Pathology, Heidelberg University.

Analysis of tissues

Whenever collected, the biopsy was immediately stored at -80°C for future RNA and protein isolation, using 1 ml of Trizol (Gibco, Karlsruhe, Germany) and 300ul of RIPA solution - lysis buffer (50 mM Tris-HCl; 150 mM sodium chloride; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); 3% Triton X-100; 0.25% sodium deoxycholate; 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, 1 mM sodium fluoride) respectively, to homogenize the tissue.

Isolation of total RNA and cDNA Synthesis

Isolation of total RNA was performed according to the Trizol protocol using 1 mL of trizol/10cm². In the solution containing the cell lysate was added 0.2mL of chloroform, shaken vigorously and centrifuged at 12,000g for 15 minutes at 4°C . The aqueous phase was transferred to new tubes and RNA precipitated by the addition of isopropyl alcohol (0.5mL /ml Trizol). After 2 hours at -20°C , the tubes were centrifuged at 12,000xg for 10 minutes at 4°C and the RNA precipitate washed with 1mL of 75% ethanol. The RNA was dissolved in ultra pure water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC) and quantified for cDNA synthesis.

The cDNA synthesis was held from 1 mg of total RNA per 20 ml solution of RT-PCR 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany).

Real-Time Polymerase Chain Reaction from Reverse Transcription (qRT-qPCR)

The gene expression for SEMA3A-F were evaluated by real-time PCR using Taqman primers from Applied Biosystems (Darmstadt, Germany) (Table 1), with 40 cycles (10 min at 95°C, 15s at 95°C, 1 min at 60°C) on a 7500 Fast real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's protocol. Quantitative values were obtained from threshold cycle (Ct), where the increase in the fluorescent signal associated with an exponential increase of the product of qRT-PCR.

Sandwich-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

The protein expression of SEMA3A was evaluated by ELISA using a anti-SEMA3A antibody (cat.1250-S3-025 R&D Systems). According to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Data are shown as fold change and mean \pm SEM. Student's t-test was used for statistical evaluation of proliferative compared with secretory phase. The significance level however was determined at $p \leq 0.05$.

Results

SEMA3A-F gene expression on the proliferative and secretory phases of human endometrial biopsies

mRNA expression was statistically significant decreased in the mid-secretory compared to the late-proliferative phase for SEMA3A (8.76 fold change $p < 0.01$), SEMA3C (4.45 fold change $p < 0.01$), SEMA3D (16 fold change $p < 0.01$) and SEMA3E (3.07 fold change $p < 0.05$) (Figure 1).

SEMA3B and SEMA3F showed no difference in gene expression between the proliferative and secretory phase samples (Figure 1).

SEMA3A protein expression on the proliferative and secretory phases of human endometrial biopsies

SEMA3A levels of homogenized proteins was higher expression in the proliferative (1.035 ± 0.18) compared to secretory phase (0.669 ± 0.23) ($p \leq 0.05$) (Figure 2).

Discussion

This study aimed to characterize the class 3 semaphorins in human endometrium.

Semaphorins were characterized in 1993 in repulsive axon guidance, but are currently known other important effects for regulating cell ([2](#), [3](#)). There are recent advances of studies on the relationship of membrane integrins and semaphorin signaling pathways, identifying interactions in intracellular signaling. These findings could lead to therapeutic advances in axonal regeneration, in cancer and other diseases. The signaling of semaphorin and its relationship to disease has aroused interest in the study of its receptor and intracellular signaling mechanisms. Recent results show that individual semaphorins are bifunctional and can exert attractive or repulsive, depending on the biological context in which they operate ([12](#)).

The semaphorin receptors are generally plexins proteins and their co-receptors such as Neuropilins. Germeyer et al. showed in the primata endometrium high expression Npn-1 mRNA in stromal cells, but in these cells, Npn-1 expression did not change during the menstrual cycle. However, Npn-1 mRNA was also expressed in the luminal epithelium, and its expression in these cells was elevated during the mid- to late proliferative phase and decreased during the secretory phase. Npn-1 expression in the luminal epithelium was highly correlated with the degree of proliferation in these cells. However, NP-2 mRNA expression was very

low during the proliferative phase and high during the secretory phase (9). Our results demonstrated that SEMA3A, which is related to Npn-1, is expressed more in proliferative phase, and SEMA3F, which is related to Npn-2 have no difference during the menstrual cycle.

Plexins belonging to classes A and D are as receptors for Sema3A-F. This class acts as a repulsive axon and axon attractive, are also expressed in non-neuronal tissues in importance in the regulation of cell proliferation and migration (12). In some repulsion cases, plexins inactivate the PI3K/Akt pathway or regulating PTEN (phosphatase negative regulator of AKT-PI3K) or inhibits VEGF by competition with the same receptor (13). Suggesting that depending on the tissue and specific ligand, the SEMA3A-F may play an important role in tumor growth and potentially used as therapeutic targets acting on survival, migration, tumor cell invasion and development of metastases (14-16). In the case of attractive action, SEMA3A-F are related to several other intracellular proteins, including the MAPKs activation and mitotic pathways (17).

SEMA3B and SEMA3F were first evaluated with the inhibition of tumor cell proliferation in lung cancer, acting as a tumor suppressor (18-21). SEMA3B was used in vitro to inhibit the growth of tumor cells and induce apoptosis in cancer cells in lung and breast (22). In ovarian cancer, the SEMA3B has been correlated with decreased cell growth in vitro and tumor formation in vivo (20). SEMA3F is expressed in many human tumor cell lines, but little is expressed in metastasis tumor cells in vivo (23). Tumors overexpressing SEMA3F are highly encapsulated and poorly vascularized. Histological analysis revealed that SEMA3F induces the

formation of a barrier around the capsule or tumors and prevents invasion of blood vessels ([24](#)).

In this study SEMA3B and 3F showed no difference in gene expression between the proliferative and secretory phases. Possibly the action of Sema3B and 3F on endometrium is similar to other tissues, not acting in increased cell proliferation.

SEMA3A has been related in the inhibition of tumor cell migration and chemotaxis of breast cancer cells ([25](#)). In prostate cancer, SEMA3A regulate adhesion and cell invasion ([26](#)). These actions are dependent on the tissue, for example, high levels of SEMA3A have been correlated with poor prognosis in pancreatic cancer patients ([27](#)). Our results, in endometrial tissue, SEMA3A was more expressed in the proliferative phase in comparison with the secretory phase.

SEMA3E in contrast to Sema3B and 3F provides for axon growth and migration of endothelial cells. In the embryonic nervous system SEMA3E controls the formation of the front brain ([4](#)). Sema3E is more expressed in the proliferative phase in comparison to secretory phase, similar to its action on endothelial cells ([28](#)). The same happened with the Sema3D.

In conclusion, SEMA3B and 3F demonstrated no difference in gene expression between the phases of the menstrual cycle, while SEMA3A, 3C, 3D and 3E are possibly related to cell proliferation in the endometrium, being more expressed in the proliferative phase in comparison with the secretory phase of the cycle.

Acknowledgement

This work had financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proc. 470636/2012-2), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da UFRGS (PPGFISIO) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Gustavo Dias Ferreira is scholarship recipient from CAPES – process number 18471-12-9. Edison Capp is scholarship recipient from CNPq.

References

1. Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. *Genome Biol.* 2006;7(3):211.
2. Mann F, Chauvet S, Rougon G. Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Prog Neurobiol.* 2007 Jun;82(2):57-79.
3. Tamagnone L, Comoglio PM. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *EMBO Rep.* 2004 Apr;5(4):356-61.
4. Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, et al. Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron.* 2007 Dec 6;56(5):807-22.
5. Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, et al. Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron.* 2005 Oct 6;48(1):63-75.
6. Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Klein H, Behar O. Modulation of semaphorin3A activity by p75 neurotrophin receptor influences peripheral axon patterning. *J Neurosci.* 2007 Nov 21;27(47):13000-11.
7. Suto F, Ito K, Uemura M, Shimizu M, Shinkawa Y, Sanbo M, et al. Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J Neurosci.* 2005 Apr 6;25(14):3628-37.
8. Yaron A, Huang PH, Cheng HJ, Tessier-Lavigne M. Differential requirement for Plexin-A3 and -A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron.* 2005 Feb 17;45(4):513-23.
9. Germeyer A, Hamilton AE, Laughlin LS, Lasley BL, Brenner RM, Giudice LC, et al. Cellular expression and hormonal regulation of neuropilin-1 and -2 messenger ribonucleic Acid in the human and rhesus macaque endometrium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1783-90.
10. Swiercz JM, Worzfeld T, Offermanns S. ErbB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1. *J Biol Chem.* 2008 Jan 25;283(4):1893-901.
11. Toyofuku T, Zhang H, Kumanogoh A, Takegahara N, Suto F, Kamei J, et al. Dual roles of Sema6D in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, Plexin-A1, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* 2004 Feb 15;18(4):435-47.

12. Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci.* 2008 Apr;33(4):161-70.
13. Chadborn NH, Ahmed AI, Holt MR, Prinjha R, Dunn GA, Jones GE, et al. PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse. *J Cell Sci.* 2006 Mar 1;119(Pt 5):951-7.
14. Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer.* 2005 Jul 15;104(2):427-38.
15. Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2005 Apr 14;24(16):2647-53.
16. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):46-51.
17. Kruger RP, Aurandt J, Guan KL. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Oct;6(10):789-800.
18. Xiang RH, Hensel CH, Garcia DK, Carlson HC, Kok K, Daly MC, et al. Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics.* 1996 Feb 15;32(1):39-48.
19. Roche J, Boldog F, Robinson M, Robinson L, Varella-Garcia M, Swanton M, et al. Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene.* 1996 Mar 21;12(6):1289-97.
20. Tse C, Xiang RH, Bracht T, Naylor SL. Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res.* 2002 Jan 15;62(2):542-6.
21. Xiang R, Davalos AR, Hensel CH, Zhou XJ, Tse C, Naylor SL. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res.* 2002 May 1;62(9):2637-43.
22. Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, Minna JD. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 3;101(31):11432-7.
23. Bielenberg DR, Hida Y, Shimizu A, Kaipainen A, Kreuter M, Kim CC, et al. Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(9):1260-71.

24. Bielenberg DR, Klagsbrun M. Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec;26(3-4):421-31.
25. Bachelder RE, Lipscomb EA, Lin X, Wendt MA, Chadborn NH, Eickholt BJ, et al. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5230-3.
26. Herman JG, Meadows GG. Increased class 3 semaphorin expression modulates the invasive and adhesive properties of prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2007 May;30(5):1231-8.
27. Muller MW, Giese NA, Swiercz JM, Ceyhan GO, Esposito I, Hinz U, et al. Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2007 Dec 1;121(11):2421-33.
28. Gaur P, Bielenberg DR, Samuel S, Bose D, Zhou Y, Gray MJ, et al. Role of class 3 semaphorins and their receptors in tumor growth and angiogenesis. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 15;15(22):6763-70.

Table legends

Table 1: Taqman primers for class 3 semaphorin

Figure legends

Figure 1. SEMA3A-F gene expression on the proliferative and secretory phases of human endometrial biopsies using real time PCR. (A) SEMA3A, (B) SEMA3B, (C) SEMA3C, (D) SEMA3D, (E) SEMA3E, (F) SEMA3F (* $p < 0.05$)

Figure 2. SEMA3A protein expression on the proliferative and secretory phases of human endometrial biopsies measured by ELISA (* $p < 0.05$)

Table 1

Primers*	Lot-Nr.
Sema3A	Hs00173810_m1
Sema3B	Hs00190328_m1
Sema3C	Hs00989373_m1
Sema3D	Hs00380877_m1
Sema3E	Hs00180842_m1
Sema3F	Hs00188273_m1
RPLO**	Hs99999902_m1

*** Life Technologies ** Reference Gene**

Figure 1

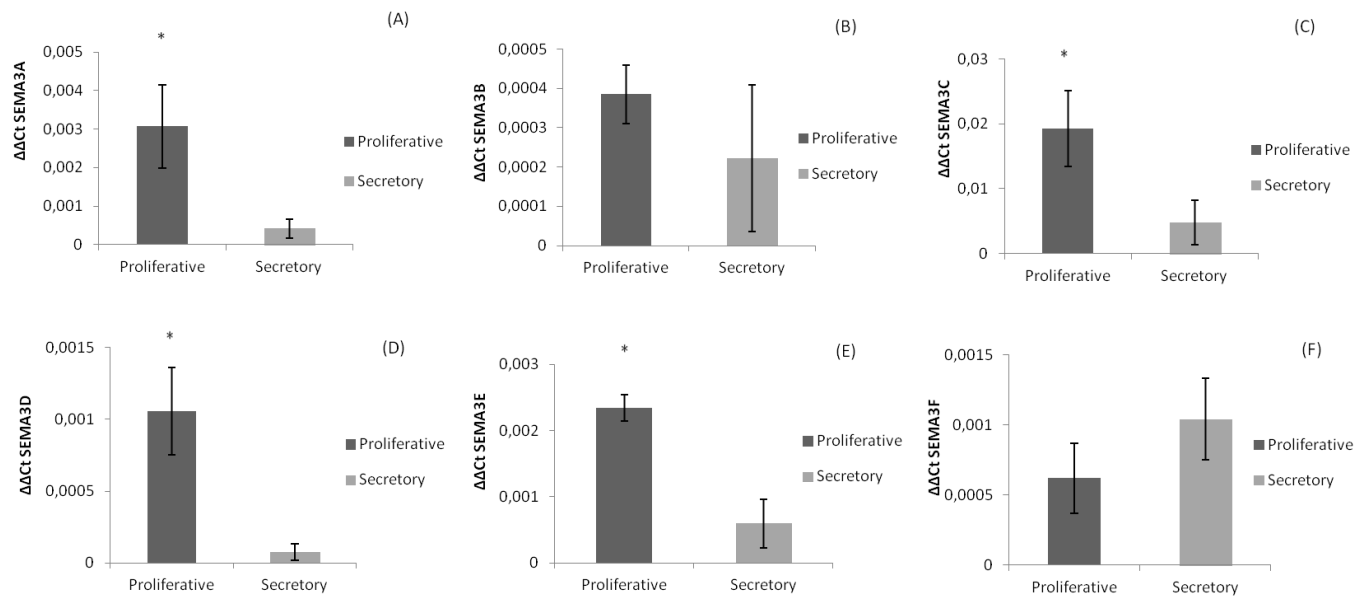
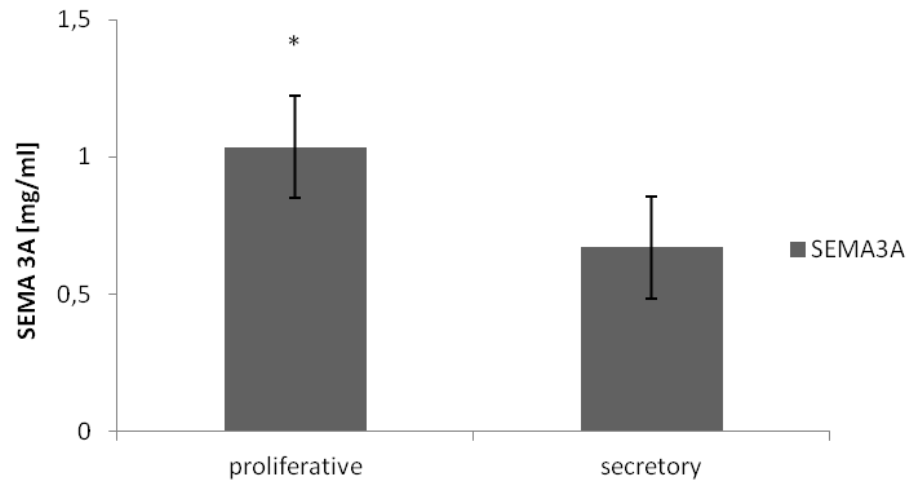


Figure 2



ANEXO 5 – Artigo 4

“Effect of metformin on gene expression of semaphorin class 3 in endometrial stromal cells” (ainda não submetido).

Effect of metformin on gene expression of semaphorin class 3 in endometrial stromal cells.

Gustavo Dias Ferreira^{1,2}, Edison Capp^{1,2,3,4}, Julia Jauckus³, Ilma Brum da Silva^{1,2}, Helena von Eye Corleta^{1,2,4}, Thomas Strowitzki³, Ariane Germeyer³

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

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

³Department of Gynecological Endocrinology and Reproductive Medicine, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany

⁴Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90035-003.

Corresponding author:

Prof. Dr. Edison Capp

Serviço de Ginecologia e Obstetrícia - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350/11º andar

Porto Alegre, RS, CEP 90035-903, Brazil

Telephone/FAX: 0055 51 33598117 - e-mail: edcapp@ufrgs.br

Abstract

Objective: to assess effects of metformin in different concentration on gene expression of class 3 semaphorin (SEMA3A-F) and on the decidualization process.

Study Design: Gene expression of SEMA3A-F was analyzed by real-time PCR (qRT-PCR) in primary endometrial stromal cells decidualized for 14 days with different concentrations of metformin. The action of metformin on decidualization was analysed by prolactin determination in the cell culture supernatant. **Results:**

Decidualization was significantly diminished in cells incubated with high doses of metformin ($p < 0.05$). High doses of metformin lead to a statistically significant decrease of SEMA3A, SEMA3D and SEMA3E gene expression ($p \leq 0.05$).

Conclusion: High doses of metformin decreased the decidualization and gene expression of SEMA3A, SEMA3D and SEMA3E for therefore potentially its antiproliferative action.

Keywords: endometrium, semaphorin, metformin, SEMA3

Introduction

Semaphorins were characterized by their importance in repulsive axon guidance, also as critical regulators of homeostasis in various tissues, influencing variety of biological processes, including activation of cytokines and in cell migration (1). They are associated with cytosolic signaling susceptibility of neurodegenerative diseases and cancer (2, 3).

The semaphorins class 3 (SEMA3A-3G) were primary known for their axonal guidance functions within brain (4-6). However Sema3s are also expressed in non-neuronal tissues and regulate angiogenesis and cancer through its effects on migration, survival, growth and cell proliferation (1).

Metformin (1, 1-dimethylbiguanide hydrochloride), an antidiabetic agent of the biguanide class, is widely used to improve insulin sensitivity in the treatment of Type II Diabetes Mellitus and Polycystic ovary syndrome (PCOS) (7, 8). In recent studies, metformin is also suggested as a possible medicine to inhibit cell proliferation in cancer (9). It is assumed that the mechanism related to this action is the activation of adenosine mono-phosphate-activated protein kinase (AMPK). Activation of AMPK suppresses processes high consumption of ATP dependent, such as gluconeogenesis and protein synthesis, and inhibit complex mammalian target of rapamycin (mTOR) which associated with cell growth and proliferation (10). In endometrial cells this action of metformin is dose-dependent, and at high doses the best effect in the inhibition of cell proliferation (11, 12).

The use of metformin has been proposed as a preventative agent for endometrial cancer patients with PCOS, because factors related to the syndrome, as chronic hyperinsulinemia, metabolic syndrome, diabetes, may influence endometrial proliferation ([13](#)). The antiproliferative effect of metformin has also been demonstrated experimentally in different cancer types, such as breast and prostate cancer, by inhibiting the Akt pathway ([10](#), [14](#), [15](#)). However, the effects of long-term treatment with metformin has no a conclusion about for the prevention of endometrial hyperplasia and cancer.

The objective of our study was to assess effects of metformin in 4 different concentrations on gene expression of class 3 semaphorin (SEMA3A-F) and on the decidualization process *in vitro*.

Material and methods

Patients

Endometrial biopsies of the proliferative phase (n=8) was collected from healthy, regularly cycling women undergoing hysterectomy or laparoscopy surgery for non-endometrial reasons, after informed consent under the approved Ethics protocol of the Ruprecht-Karls University, Heidelberg. Exclusion criteria were postmenopausal, endocrinopathies or other uterine diseases, hormonal stimulation in the three months before to surgery and irregular menstrual bleeding.

Endometrial stromal cells culture

Human endometrial tissues were dissociated with collagenase type IA (Gibco, Karlsruhe, Germany) for 2 hours at 37°C with shaking. Stromal cells and epithelial cells were separated by a 40 µm filter (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA). The stromal cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Karlsruhe, Germany), MCDB-105 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany), with 10% fetal bovine serum (FBS) medium (Perbio Science Deutschland, Thermo Fischer, Bonn, Germany) and 1% of penicillin/streptomycin antibiotic. Cells were cultured until confluency and passaged twice to further remove contaminating cells. At the second passage cells were placed either in 6 well plates for mRNA expression studies in the same medium.

Decidualization and stimulation

After achieving about 80% confluency, cells were treated with serum-free DMEM/MCDB-105 medium and EGF (20 ng/mL, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) in 6 groups: E₂P₄ (17β-estradiol 10⁻⁸ M, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany, plus progesterone 10⁻⁶ M, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) (control group); E₂ (17β-estradiol); and in the presence of metformin in 4 different concentrations (10⁻⁵M, 10⁻⁴M, 10⁻³M, 10⁻²M, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) for 14 days, until decidualized. The decidualization was confirmed in the

collected supernatant on day 12 via measurement of prolactin levels in all groups with a sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a polyclonal goat anti-prolactin antibody and a monoclonal mouse anti-prolactin antibody (solid phase, 09505871; Siemens Diagnostics, Eschborn, Germany).

After 14 days of incubation, the supernatant was collected and the mRNA isolation was performed using Trizol (Gibco, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer standard protocol.

Isolation of total RNA and cDNA Synthesis

Isolation of total RNA was performed according to the Trizol protocol using 1 mL of trizol/10cm². In the solution containing the cell lysate was added 0.2mL of chloroform, shaken vigorously and centrifuged at 12,000xg for 15 minutes at 4°C. The aqueous phase was transferred to new tubes and RNA precipitated by the addition of isopropyl alcohol (0.5mL /ml Trizol). After 2 hours at -20°C, the tubes were centrifuged at 12,000xg for 10 minutes at 4°C and the RNA precipitate washed with 1mL of 75% ethanol. The RNA was dissolved in ultra pure water treated with diethylpyrocarbonate (DEPC) and quantified for cDNA synthesis.

The cDNA synthesis was held from 1 mg of total RNA per 20 ml solution of RT-PCR 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany).

Real-Time Polymerase Chain Reaction from Reverse Transcription (qRT-qPCR)

The gene expression for SEMA3s were evaluated by real-time PCR using Taqman primers from Applied Biosystems (Darmstadt, Germany) (Table 1), with 40 cycles (10 min at 95°C, 15s at 95°C, 1 min at 60°C) on a 7500 Fast real-time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer's protocol. Quantitative values were obtained from threshold cycle (Ct), where the increase in the fluorescent signal associated with an exponential increase of the product of qRT-PCR.

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SEM and fold change. Student's t-test was used for statistical evaluation of changes in gene expression compared with control group. The significance level however was determined at $p \leq 0.05$.

Results

Effect of metformin on decidualization of human endometrial stromal cells

Prolactin levels of the supernatant were analyzed by ELISA to evaluate the decidualization process. After 14 days of treatment, a statistical significant reduction in prolactin secretion was present under the influence of high doses of metformin, similar to the nondecidualized stage imitated by estrogen only treatment (control E₂P₄ 382.4 ± 123 vs. metformin 10⁻³M 130.8 ± 30, metformin 10⁻²M 104.4 ± 21 and E₂ 65 ± 35, p < 0.05, Figure 1).

Effect of metformin on SEMA3s gene expression after 4 different concentration of metformin on culture of endometrial stromal cells

SEMA3A expression was decreased when high doses of metformin (10⁻³M = 0.43 fold, p < 0.05, and 10⁻²M = 0.5 fold, p < 0.05) in relation to the control group (E₂P₄) (Figure 2.A).

In regards of SEMA3B and SEMA3C expression, metformin had no effect whatsoever. However the estrogen only group had a 5.46 fold increased expression of SEMA3B compared to control (Figure 2.B and 2.C).

High metformin doses lead to a decrease in expression of SEMA3D (10⁻³M = 0.29 fold, p < 0.05, and 10⁻²M = 0.17 fold, p < 0.01) and SEMA3E (10⁻³M = 0.3 fold, p < 0.01, and 10⁻²M = 0.23 fold, p < 0.05) in relation to the control group (Figure 2.D and 2.E). Still, in SEMA3D, the E₂ group (7 fold, p < 0.05) was up regulated over the control group. E₂ group increased expression of SEMA3F compared with E₂P₄ (Figure 2.F).

Discussion

This study aimed to characterize the class 3 semaphorins in human endometrium and demonstrate the effect of metformin on gene expression this class and on the decidualization process.

Decidualization is a process which is characterized by functional and morphological changes in the endometrial glandular tissues and includes several phases, including tissue and vascular remodelling to prepare the endometrium for implantation. Prolactin is an important marker of decidualization ([16](#)).

The present study demonstrates a dose-dependent effect of metformin to reduction endometrium stromal cell decidualization (higher dose decreases prolactin secretion) after 14 day of treatment. A previous study demonstrated that metformin had effects in decidualization, decreasing prolactin secretion in endometrial stromal cells ([17](#)).

Semaphorins are currently known other important effects for regulating cell ([2](#), [3](#)). There are recent advances of studies on the relationship of membrane integrins and semaphorin signaling pathways, identifying interactions in intracellular signaling. These findings could lead to therapeutic advances in axonal regeneration, in cancer and other diseases. Recent results show that individual semaphorins are bifunctional and can exert attractive or repulsive, depending on the biological context in which they operate ([18](#)).

The semaphorin receptors are generally plexins proteins and their co-receptors such as Neuropilins. Plexins belonging to classes A and D serve as receptors for Sema3s. This class acts as a repulsive axon and axon attractive, are also expressed in non-neuronal tissues in importance in the regulation of cell proliferation and migration ([18](#)).

In repulsion cases, plexins inactivate the PI3K/Akt pathway or inhibits VEGF by competition with the same receptor ([19](#)), suggesting that depending on the tissue and specific ligand, the SEMA3s may play an important role in tumor growth and potentially used as therapeutic targets ([20-22](#)). In attractive action, SEMA3s are related to several other intracellular proteins, including the MAPKs activation and mitotic pathways ([23](#)).

Metformin (1, 1-dimethylbiguanide hydrochloride) is widely used because it improves insulin sensitivity acting in various tissues such as liver, skeletal muscle, adipose tissue, endometrium and ovaries ([7](#), [8](#)). In human reproduction, this medicine has been used with success in the treatment of polycystic ovary syndrome (PCOS), whose etiology appears to be involved with insulin resistance ([24](#), [25](#)). In PCOS women, metformin treatment restores cyclic menstruation and ovulation (improvement follicular), reduces androgen levels, and improves fertilization and pregnancy rates ([26](#), [27](#)). As shown, metformin may act directly in the decidualization process on stromal cells in vitro, affecting several genes and proteins involved in implantation ([28](#)).

Moreover, metformin is also suggested as a potential medicine for cancer

cell proliferation (9). It is assumed that the mechanism related to this action is the AMPK activation, which inhibits the mTOR complex, which together with Akt is involved in cell growth and proliferation in cancer (10). High doses metformin (10^{-3} M) increased rate of inhibition of cell proliferation in ectopic endometrial stromal cells (12). Campagnoli et al. proposed the use of metformin can inhibit endometrial proliferation (13).

SEMA3B and SEMA3F were associated with the inhibition of tumor cell proliferation in lung cancer, acting as a tumor suppressor (29-32). SEMA3B was used in vitro to induce apoptosis in lung cancer (33). SEMA3B has been correlated with decreased cell growth in ovarian cancer (31). SEMA3F is expressed in many human tumor cell lines, but little is expressed in metastasis tumor cells in vivo (34). Tumors overexpressing SEMA3F are highly encapsulated and poorly vascularized (35). Studies of our group showed no difference in gene expression of SEMA3B and 3F between the proliferative and secretory phases of menstrual cycle (data not published yet). Metformin had no action this semaphorins, possibly the action of Sema3B and 3F on endometrium is similar to other tissues, not acting in increased cell proliferation.

SEMA3A has been related in the inhibition of tumor cell migration and chemotaxis of breast cancer cells (36). SEMA3A regulate adhesion and cell invasion in prostate cancer (37). However, high levels of SEMA3A have been correlated with poor prognosis in pancreatic cancer patients (38). SEMA3E in contrast to Sema3B and 3F provides for axon growth and migration of endothelial cells. SEMA3E controls the formation of the front brain in the embryonic nervous

system (4). In endometrial stromal cell, SEMA3A, 3C, 3D and 3E were more expressed in the proliferative phase in comparison with the secretory phase (data not published yet). Metformin (high dose) decreased the expression of SEMA3A, 3C and 3D compared with control group (E_2P_4), possibly related to its inhibitory action on cell migration and proliferation, as in the analysis of the tissue. However, metformin showed no action in Sema3C despite this being more expressed in the proliferative phase in comparison to the secretory phase.

In Conclusion, SEMA3A, 3D and 3E are possibly related to cell proliferation in the endometrium, being more expressed in the proliferative phase and high dose of metformin had antiproliferative action decreasing this expression.

Acknowledgement

This work had financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, proc. 470636/2012-2), Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia da UFRGS (PPGFISIO) and Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Gustavo Dias Ferreira is scholarship recipient from CAPES – process number 18471-12-9. Edison Capp is scholarship recipient from CNPq.

References

1. Yazdani U, Terman JR. The semaphorins. *Genome Biol.* 2006;7(3):211.
2. Mann F, Chauvet S, Rougon G. Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Prog Neurobiol.* 2007 Jun;82(2):57-79.
3. Tamagnone L, Comoglio PM. To move or not to move? Semaphorin signalling in cell migration. *EMBO Rep.* 2004 Apr;5(4):356-61.
4. Chauvet S, Cohen S, Yoshida Y, Fekrane L, Livet J, Gayet O, et al. Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron.* 2007 Dec 6;56(5):807-22.
5. Falk J, Bechara A, Fiore R, Nawabi H, Zhou H, Hoyo-Becerra C, et al. Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron.* 2005 Oct 6;48(1):63-75.
6. Ben-Zvi A, Ben-Gigi L, Klein H, Behar O. Modulation of semaphorin3A activity by p75 neurotrophin receptor influences peripheral axon patterning. *J Neurosci.* 2007 Nov 21;27(47):13000-11.
7. Palomba S, Falbo A, Orio F, Jr., Zullo F. Effect of preconceptional metformin on abortion risk in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril.* 2009 Nov;92(5):1646-58.

8. Goodarzi MO, Bryer-Ash M. Metformin revisited: re-evaluation of its properties and role in the pharmacopoeia of modern antidiabetic agents. *Diabetes Obes Metab.* 2005 Nov;7(6):654-65.
9. Landriscina M, Esposito F. Insulin-resistant conditions: A favorable milieu for aggressive drug-resistant malignancies. *J Gastrointest Oncol.* 2011 Mar;2(1):11-2.
10. Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F. Metformin: a therapeutic opportunity in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010 Mar 15;16(6):1695-700.
11. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol.* 2010 Jan;116(1):92-8.
12. Takemura Y, Osuga Y, Yoshino O, Hasegawa A, Hirata T, Hirota Y, et al. Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Aug;92(8):3213-8.
13. Campagnoli C, Abba C, Ambroggio S, Brucato T, Pasanisi P. Lifestyle and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women. *Gynecol Endocrinol.* 2013 Feb;29(2):119-24.
14. Wurth R, Pattarozzi A, Gatti M, Bajetto A, Corsaro A, Parodi A, et al. Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt. *Cell Cycle.* 2013 Jan 1;12(1):145-56.

15. Wysocki PJ, Wierusz-Wysocka B. Obesity, hyperinsulinemia and breast cancer: novel targets and a novel role for metformin. *Expert Rev Mol Diagn.* 2010 May;10(4):509-19.
16. Tsutsumi R, Hiroi H, Momoeda M, Hosokawa Y, Nakazawa F, Yano T, et al. Induction of early decidualization by cadmium, a major contaminant of cigarette smoke. *Fertil Steril.* 2009 Apr;91(4 Suppl):1614-7.
17. Capp E, Jauckus J, von Eye Corleta H, Toth B, Strowitzki T, Germeyer A. Does metformin influence the insulin-, IGF I- and IGF II-receptor gene expression and Akt phosphorylation in human decidualized endometrial stromal cells? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2011 Oct;158(2):248-53.
18. Zhou Y, Gunput RA, Pasterkamp RJ. Semaphorin signaling: progress made and promises ahead. *Trends Biochem Sci.* 2008 Apr;33(4):161-70.
19. Chadborn NH, Ahmed AI, Holt MR, Prinjha R, Dunn GA, Jones GE, et al. PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse. *J Cell Sci.* 2006 Mar 1;119(Pt 5):951-7.
20. Wey JS, Fan F, Gray MJ, Bauer TW, McCarty MF, Somcio R, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 promotes migration and invasion in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer.* 2005 Jul 15;104(2):427-38.
21. Fan F, Wey JS, McCarty MF, Belcheva A, Liu W, Bauer TW, et al. Expression and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 on human colorectal cancer cells. *Oncogene.* 2005 Apr 14;24(16):2647-53.

22. Yang AD, Camp ER, Fan F, Shen L, Gray MJ, Liu W, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):46-51.
23. Kruger RP, Aurandt J, Guan KL. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Oct;6(10):789-800.
24. Lord JM, Flight IH, Norman RJ. Insulin-sensitising drugs (metformin, troglitazone, rosiglitazone, pioglitazone, D-chiro-inositol) for polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003(3):CD003053.
25. Eisenhardt S, Schwarzmann N, Henschel V, Germeyer A, von Wolff M, Hamann A, et al. Early effects of metformin in women with polycystic ovary syndrome: a prospective randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Mar;91(3):946-52.
26. Katsiki N, Hatzitolios AI. Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010 Dec;22(6):466-76.
27. Tosca L, Solnais P, Ferre P, Fougelle F, Dupont J. Metformin-induced stimulation of adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase (PRKA) impairs progesterone secretion in rat granulosa cells. *Biol Reprod.* 2006 Sep;75(3):342-51.
28. Germeyer A, Jauckus J, Zorn M, Toth B, Capp E, Strowitzki T.

Metformin modulates IL-8, IL-1beta, ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells. *Reprod Biomed Online*. 2011 Apr;22(4):327-34.

29. Xiang RH, Hensel CH, Garcia DK, Carlson HC, Kok K, Daly MC, et al. Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer. *Genomics*. 1996 Feb 15;32(1):39-48.

30. Roche J, Boldog F, Robinson M, Robinson L, Varella-Garcia M, Swanton M, et al. Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin. *Oncogene*. 1996 Mar 21;12(6):1289-97.

31. Tse C, Xiang RH, Bracht T, Naylor SL. Human Semaphorin 3B (SEMA3B) located at chromosome 3p21.3 suppresses tumor formation in an adenocarcinoma cell line. *Cancer Res*. 2002 Jan 15;62(2):542-6.

32. Xiang R, Davalos AR, Hensel CH, Zhou XJ, Tse C, Naylor SL. Semaphorin 3F gene from human 3p21.3 suppresses tumor formation in nude mice. *Cancer Res*. 2002 May 1;62(9):2637-43.

33. Castro-Rivera E, Ran S, Thorpe P, Minna JD. Semaphorin 3B (SEMA3B) induces apoptosis in lung and breast cancer, whereas VEGF165 antagonizes this effect. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Aug 3;101(31):11432-7.

34. Bielenberg DR, Hida Y, Shimizu A, Kaipainen A, Kreuter M, Kim CC, et al. Semaphorin 3F, a chemorepellent for endothelial cells, induces a poorly vascularized, encapsulated, nonmetastatic tumor phenotype. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(9):1260-71.

35. Bielenberg DR, Klagsbrun M. Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Dec;26(3-4):421-31.
36. Bachelder RE, Lipscomb EA, Lin X, Wendt MA, Chadborn NH, Eickholt BJ, et al. Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5230-3.
37. Herman JG, Meadows GG. Increased class 3 semaphorin expression modulates the invasive and adhesive properties of prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 2007 May;30(5):1231-8.
38. Muller MW, Giese NA, Swiercz JM, Ceyhan GO, Esposito I, Hinz U, et al. Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer.* 2007 Dec 1;121(11):2421-33.

Table legends

Table 1: Taqman primers for class 3 semaphorin

Figure legends

Figure 1. Prolactin concentration measured by ELISA in supernatants of human endometrial stromal cells in 4 different concentrations of metformin at 14 days of hormonal decidualization. Values represent the mean \pm SEM (*p < 0.02).

Figure 2. SEMA3s gene expression after 4 different concentrations of metformin on culture of endometrial stromal cells using real time PCR. E₂P₄ = control group, -5 = metformin 10⁻⁵M, -4 = metformin 10⁻⁴M, -3 = metformin 10⁻³M, -2 = metformin 10⁻²M. (A) = SEMA3A, (B) = SEMA3B, (C) = SEMA3C, (D) = SEMA3D, (E) = SEMA3E, (F) = SEMA3F.

Table 1

Primers*	Lot-Nr.
Sema3A	Hs00173810_m1
Sema3B	Hs00190328_m1
Sema3C	Hs00989373_m1
Sema3D	Hs00380877_m1
Sema3E	Hs00180842_m1
Sema3F	Hs00188273_m1
RPLO**	Hs99999902_m1

*** Life Technologies ** Reference Gene**

Figure 1

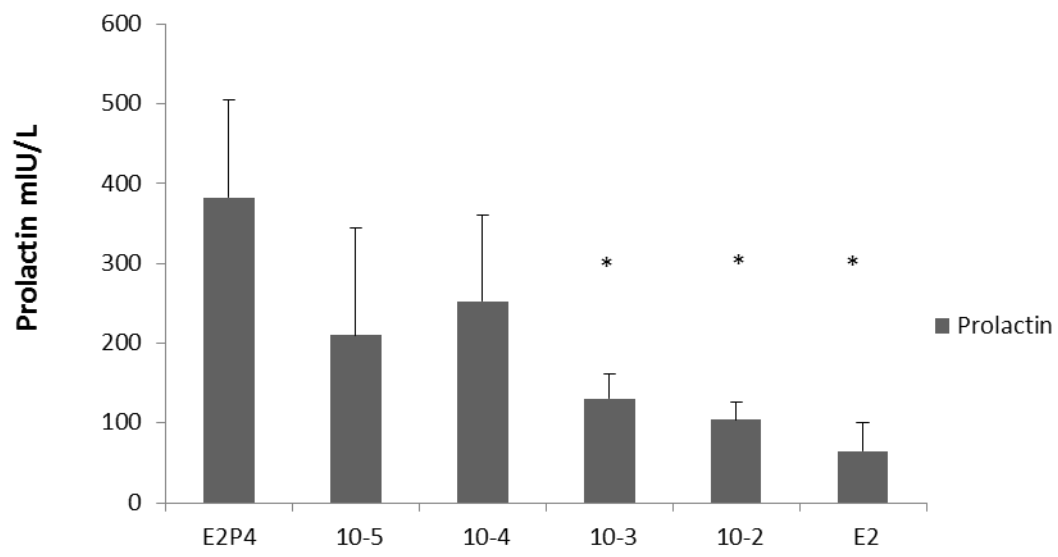


Figure 2

