



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA**

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE O RECEPTOR DE ESTROGÊNIO E CICLO  
CELULAR DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

**BRASÍLIA**

**2021**

**MARCELA MARTINS DE PAULA OLIVEIRA**

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE O RECEPTOR DE ESTROGÊNIO E CICLO  
CELULAR DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia, da Universidade de Brasília como requisito parcial à obtenção do título de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Coorientadora: Me. Amanda Évelin Silva de Carvalho

**BRASÍLIA**

**2021**

**MARCELA MARTINS DE PAULA OLIVEIRA**

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE O RECEPTOR DE ESTROGÊNIO E CICLO  
CELULAR DE CÉLULAS DE CÂNCER DE ENDOMÉTRIO**

**BANCA EXAMINADORA**

---

PRESIDENTE: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni  
(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

---

MEMBRO: Prof. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto  
(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

---

MEMBRO: Dra. Cinthia Gabriel Meireles  
(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA)

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais e irmão**, que estiveram ao meu lado em momentos de alegria, me oferecendo suporte e todas as condições para que eu alcançasse os meus objetivos.

**À minha família**, que sempre apoiou minhas decisões e educação. Vocês são meus grandes exemplos. Com todo amor e incentivo, pude acreditar nos meus sonhos e conquistar minhas metas.

**Aos meus amigos queridos**, que são verdadeiros parceiros de vida. Serei eternamente grata por todos os momentos de amizade e conquistas ao longo desses anos de graduação.

**Ao meu orientador Luiz Alberto Simeoni**, por todo apoio e incentivo. A oportunidade e toda confiança me permitiram ir além da graduação e encontrar uma paixão.

**À minha coorientadora Amandda**, pela confiança depositada em mim e sua dedicação. Seus conhecimentos fizeram grande diferença no resultado final deste trabalho.

**Aos grandes amigos/colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol)**, o apoio e carinho de vocês foi essencial ao longo da minha caminhada.

**À minha querida amiga Cinthia**, por todo companheirismo e confiança em mim e nas minhas ideias sem juízo. Muito obrigada pelos ensinamentos e dedicação à minha educação.

Agradeço à Universidade de Brasília e todos os grandes pesquisadores que fizeram parte dessa história, o apoio e a solidariedade dessa comunidade me permitiram ir além dos limites propostos.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Fases do ciclo celular .....	21
<b>Figura 2</b> – Ensaio colorimétrico de viabilidade celular com MTT .....	35
<b>Figura 3</b> – Metformina causa alterações no ciclo celular de células Ishikawa de CE. 36	
<b>Figura 4</b> – Integridade do RNA extraído.....	38
<b>Figura 5</b> - Expressão do gene ESR1 em células Ishikawa. ....	40
<b>Figura 6</b> - Expressão do gene ESR2 em células Ishikawa. ....	41
<b>Figura 7</b> - Expressão do gene HIF1 $\alpha$ em células Ishikawa. ....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Concentrações e tempo de tratamento com metformina .....	25
<b>Tabela 2</b> - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real .....	33
<b>Tabela 3</b> – Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído .....	37

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

BCRJ – Banco de Células do Rio de Janeiro

CDKs – *Cyclin-dependent kinases* - Cinases Dependentes de Ciclina

Ct - *Cycle Threshold* - Ciclo Limiar

DEPC - Dietilpirocarbonato 0,1% (v/v)

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

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - *Deoxyribonucleic acid* – Ácido Deoxiribonucleico

CE - Câncer de Endométrio

RE - Receptor de Estrogênio

RE $\alpha$  - Receptor de Estrogênio alfa

RE $\beta$  - Receptor de Estrogênio beta

EREs – Elemento Responsivo ao Estrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

ESR1 - *Estrogen Receptor 1* - Receptor de Estrogênio 1

ESR2 - *Estrogen Receptor 2* - Receptor de Estrogênio 2

FIGO - Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

HIF - *Hypoxia-Inducible Factor* - Fator Induzível por Hipóxia

HIF1 $\alpha$  - *Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha* - Fator Induzível por Hipóxia 1 alfa

PTEN - *Phosphatase and Tensin Homolog* - Fosfatase e Homologo de Tensina

PCOS - *Polycystic ovary syndrome* - Síndrome do Ovário Policístico

RNA - *Ribonucleic acid* - Ácido Ribonucleico

RPMI-1640 - *Roswell Park Memorial Institute*

RT – *Reverse Transcriptase* - Transcriptase Reversa

RT-qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa

SEER - *Surveillance, Epidemiology, and End Results* - Vigilância, Epidemiologia e Resultados

Finais

SFB – Soro Fetal Bovino



## RESUMO

O câncer de endométrio é um dos tumores ginecológicos mais recorrentes em mulheres, com taxas significativas de mortalidade e morbidade. Quando descoberto nos estágios iniciais, apresenta bom prognóstico, mas nos casos metastáticos o tratamento é limitado e leva a um mal prognóstico com baixas taxas de sobrevida, indicando a necessidade de opções terapêuticas mais eficazes. Nesse cenário, a metformina surgiu como uma nova estratégia adjuvante para diferentes tipos de tumores, incluindo o câncer de endométrio. Os mecanismos deste fármaco não são totalmente compreendidos, portanto, este estudo tem como objetivo investigar o efeito da metformina na viabilidade, ciclo celular e expressão de genes em linhagens de células de câncer de endométrio. No ensaio de MTT, as concentrações de metformina 30, 40 e 50mM, em tratamento de 24 horas, causaram um efeito citotóxico significativo nessas células. Esse efeito intensificou-se com o tempo: com tratamento do composto por 48 horas, houve redução da viabilidade nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50mM. Além disso, a metformina levou a um número reduzido de células na fase G0 / G1 e parada do ciclo celular na fase S, indicando possíveis efeitos na proliferação celular. Não foram encontradas alterações nos níveis transcricionais dos receptores de estrogênio, nem do fator 1-alfa induzível por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ). Embora mais estudos sejam necessários para validar esses achados, estes resultados sugerem que a metformina reduz a viabilidade de linhagens de células de câncer de endométrio, induz alterações no ciclo celular e não afeta a expressão gênica de RE $\alpha$ , RE $\beta$  e HIF1 $\alpha$ .

**Palavras-chave:** Câncer de endométrio; Metformina, Receptor de estrogênio; RE $\alpha$ , RE $\beta$ , HIF1 $\alpha$

## **ABSTRACT**

Endometrial cancer is one of the most recurrent gynecological tumors in women, with significant rates of mortality and morbidity. This tumor seems to be associated with hormonal and metabolic factors, such as obesity and type II diabetes mellitus. When discovered in the earliest stages, it presents a good prognosis, but in metastatic cases, the treatment is limited and leads to a poor prognosis with low survival rates, indicating the need for more effective therapeutic options. In this scenario, metformin has emerged as a new adjunctive strategy for different cancer types, including endometrial cancer. However, the mechanisms are not fully understood. Therefore, this study aims to investigate the effect of metformin on viability, cell cycle, and expression of crucial genes for estrogen signaling in endometrial cancer cell lines. After MTT assay analysis, we observed a significant cytotoxic effect in these cells after treatment with 30, 40, and 50mM of metformin for 24 hours. This effect intensified over time, with viability reduction at concentrations of 10, 20, 30, 40, and 50 on a 48-hour treatment. Additionally, metformin led to a reduced number of cells in G0/G1 phase and cell cycle arrest in the S phase, indicating possible outcomes on cell proliferation. No alterations were found in transcriptional levels of estrogen receptors, neither the hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1 $\alpha$ ). Although further studies are necessary to validate these findings, our results suggest that metformin reduces the viability of endometrial cancer cell lines, induces alterations in the cell cycle, and does not affect the gene expression of RE $\alpha$ , RE $\beta$ , and HIF1 $\alpha$ .

**Keywords:** Endometrial cancer; Metformin, Estrogen receptor; RE $\alpha$ , RE $\beta$ , HIF1 $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>8</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>9</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>13</b>
2.1 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO.....	13
2.2 DIAGNÓSTICO, CLASSIFICAÇÃO E TRATAMENTO .....	14
2.3 CLORIDRATO DE METFORMINA.....	16
2.4 VIAS TUMORAIS E AÇÃO DA METFORMINA SOBRE OS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO.....	18
2.5 VIAS TUMORAIS E AÇÃO DA METFORMINA SOBRE A HIF1A .....	19
2.6 O CICLO CELULAR DAS CÉLULAS DE CÂNCER.....	20
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>24</b>
4.1 LINHAGEM E CULTURA CELULAR .....	24
4.2 COMPOSTOS E CONTROLES TESTADOS .....	25
4.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR POR ENSAIO DE MTT.....	26
4.3.1 <i>Análise do MTT</i> .....	26
4.4 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	27
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MÉTODO DE PCR.....	29
4.5.1 <i>Fase de Extração de RNA</i> .....	30
4.5.2 <i>Fase de Quantificação e Determinação da Pureza e Integridade do RNA</i> .....	31
4.5.3 <i>Fase de Tratamento das Amostras de RNA Total com DNase</i> .....	32
4.5.4 <i>Fase de RT-qPCR e Análise</i> .....	32
4.6 ESTATÍSTICA .....	34

<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5.1 METFORMINA REDUZ A VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS DE CE .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2 METFORMINA ALTERA O CICLO CELULAR DE CÉLULAS DE CE .....</b>	<b>36</b>
<b>5.3 PCR.....</b>	<b>36</b>
<i>5.3.1 Quantificação, Determinação da Pureza e Integridade do RNA Extraído .....</i>	<i>36</i>
<i>5.3.2 Expressão Gênica .....</i>	<i>39</i>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>47</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>48</b>
<b>9 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Câncer é uma doença multifatorial e complexa, caracterizada pelo crescimento desorientado e anormal de células, de maneira rápida e em geral agressiva, com potencial de invadir outros tecidos e órgãos. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, 626.030 novos casos foram detectados em 2020. Neste mesmo ano, essa doença teve um índice significativo de mortalidade, com 232.030 óbitos no Brasil (INCA, 2020), e com cerca de 10 milhões de óbitos no cenário mundial (SUNG et al., 2021), valor que representou um aumento de 15,2% em relação ao ano de 2012 (FERLAY et al., 2015).

Nesse cenário, o câncer de endométrio (CE) foi responsável por 6.596 óbitos no Brasil (INCA, 2020) e 97.370 mortes no cenário mundial, ocupando a posição de sexto tumor maligno mais frequente (SUNG et al., 2021). Apesar dos avanços no campo da oncologia, as opções terapêuticas para tratamento desse câncer são limitadas e as opções medicamentosas são pouco efetivas. Em geral, o tratamento com maior eficácia é a intervenção cirúrgica, afetando diretamente a reprodução feminina. Com isso, há uma busca constante por novos fármacos que sejam efetivos no tratamento de CE, como por exemplo a metformina (MEIRELES et al., 2017).

Metformina é um hipoglicemiante oral amplamente utilizado para o tratamento de Diabetes Mellitus tipo II e, na última década, diversos estudos clínicos apontaram um potencial efeito benéfico no tratamento e prevenção de diversos tipos de câncer tais como fígado, mama, pâncreas e endométrio (MEIRELES et al., 2017; TANDON et al., 2016; WANG et al., 2014; ZHANG et al., 2012). Entretanto, a toxicidade e os mecanismos envolvidos na ação da metformina sobre o CE ainda não foram completamente elucidados (PERNICOVA; KORBONITS, 2014). O objetivo desse trabalho é investigar o efeito da metformina sobre o comportamento das células de CE.

## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Câncer de Endométrio**

O CE se destaca por ser o tumor ginecológico mais frequente e o sexto câncer mais incidente de modo geral. No cenário mundial, houve aproximadamente 417.367 novos casos de CE em 2020 (SUNG et al., 2021). Neste mesmo período, o Brasil apresentou cerca de 16.710 novos casos (INCA, 2020).

De acordo com dados levantados pelo “Surveillance, Epidemiology, and End Results” (SEER), o CE é diagnosticado principalmente em mulheres em período pós-menopausa, de 55 a 74 anos, com índices de morte maiores para mulheres de 65 a 74 anos (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019). A maior incidência é vista em países desenvolvidos como Europa, América do Norte e Oceania. (LORTET-TIEULENT et al., 2018), com um índice de mortalidade mais acentuado em mulheres negras (NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2019).

O CE possui uma grande relação com obesidade, sendo este um dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento câncer (ONSTAD; SCHMANDT; LU, 2016). Além disso, outras condições associadas a doenças metabólicas também estão interligadas, como Diabetes Mellitus Tipo II, síndrome do ovário policístico e as condições relacionadas ao excesso de estrogênio, como reposição hormonal sem oposição de progesterona, anovulação, menopausa tardia e menarca precoce (LU; BROADDUS, 2020). Há ainda uma correlação com a nuliparidade, hiperplasia endometrial, fatores hereditários e idade (SOLIMAN et al., 2005).

Dentre essas condições, o diabetes mellitus tipo II apresenta algumas características específicas que podem influenciar no desenvolvimento de tumores, principalmente aqueles relacionados a disfunções hormonais (FRIBERG et al., 2007). Fatores como uma concentração

maior de glicose e insulina no sangue, aumento do processo inflamatório e regulação indireta da síntese de estrogênio exercem ação negativa e, em conjunto, aumentam os danos ao DNA, à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), promovem a proliferação, crescimento, metástase, migração e diferenciação celular, além de fornecer fonte alternativa de energia para sobrevivência celular (WANG; YANG; LIAO, 2020).

## **2.2 Diagnóstico, Classificação e Tratamento**

As manifestações clínicas do CE variam de acordo com a gravidade da doença. O sintoma mais comum é o sangramento vaginal anormal como hipermenorreia, metrorragia e sangramento pós-menopausa, que acomete cerca de 90% das pacientes. Outros sintomas frequentes são a infertilidade, a leucorreia e dores pélvicas (PURDIE; GREEN, 2001).

A partir do aparecimento de sintomas e visita ao médico, alguns exames são solicitados para confirmar o diagnóstico da doença. Esses exames podem incluir a ultrassonografia, a colposcopia, a histeroscopia, a curetagem uterina e biópsias, que permitirão a avaliação visual quanto à presença de massa, de pólipos ou lesões e quanto ao espessamento do endométrio, e ainda, a coleta de amostras biológicas para análise histopatológica em laboratório especializado. Quando diagnosticado precocemente, o prognóstico da maioria dos casos é favorável com uma taxa de sobrevida de 80% (AMANT et al., 2005). Caso a suspeita de câncer seja confirmada, exames adicionais são realizados para avaliar a classificação e extensão da doença, o que orientará a definição do tratamento (AMANT et al., 2018).

Apesar de ser considerada uma doença heterogênea (BRINTON et al., 2013), o CE pode ser dividido em duas categorias principais com base na histopatologia e expressão de receptores

de hormônios: O tipo I, ou estrogênio dependente e o tipo II, estrogênio independente (BOKHMAN, 1983). O tipo I, representado pelo adenocarcinoma endometriode de baixo grau (G1 e G2), corresponde a cerca de 80% dos casos, possui melhor prognóstico e é mais recorrente em mulheres em idade pré ou peri menopausa (AMANT et al., 2005; DUONG et al., 2011).

Já o tipo II - que engloba os carcinomas não endometrioides como carcinoma seroso, carcinosarcoma e carcinoma de células claras - é mais frequente em mulheres pós-menopausadas e está associado com um pior prognóstico (DUONG et al., 2011).

O grau de diferenciação histopatológica é realizado com base na classificação da Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), que varia de G1, menos agressivo, a G3, mais agressivo, parâmetros determinados em relação ao crescimento epitelial sólido nos tumores (AMANT et al., 2018; PECORELLI, 2009).

Após classificação e avaliação do caso, é realizado o estadiamento do câncer, processo que permite determinar a disseminação, a localização, as manifestações sistêmicas e o tamanho do tumor. O estadiamento pode ser clínico, realizado para determinar o tratamento inicial com auxílio de ressonâncias magnéticas, tomografias, entre outros, e pode ser patológico, realizado após a cirurgia para determinar o grau da doença no órgão, por meio de análise patológica de material biológico coletado (PECORELLI, 2009).

Reunindo todas essas informações, o curso de tratamento é estabelecido, o que deve ocorrer de maneira rápida para atingir melhores resultados. As principais linhas de tratamento incluem quimioterapia, radioterapia, cirurgia, terapia hormonal ou uma combinação dessas opções (AMANT et al., 2018). Para todos os tipos de CE as terapias convencionais são limitadas, os tratamentos medicamentosos são poucos efetivos e a quimioterapia e radioterapia



são utilizadas, em geral, como tratamento adjuvante. Neste contexto, a cirurgia é a primeira linha de tratamento, predominando a histerectomia total extra-fascial, com salpingo-ooforectomia bilateral e linfadenectomias pélvica e retroperitoneal (PECORELLI, 2009).

Ainda que a incidência seja maior em mulheres em período pós-menopausa, o CE acomete também mulheres em idade fértil. Nesse último grupo, a intervenção cirúrgica pode ser um limitante, pois impacta diretamente na fertilidade. Para mulheres que desejam preservar sua fertilidade, o uso de progesterona oral pode ser uma alternativa (RODOLAKIS et al., 2015). Entretanto, esse tipo de abordagem só é possível em poucos estágios desse câncer e nem sempre é suficiente para interromper a progressão do CE, além do fato de que altas doses podem causar tromboembolismo, hiperglicemia e edema (SHAO et al., 2014).

A limitação dos tratamentos reforça a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias, principalmente com o potencial de preservação da fertilidade (BRASSEUR; GÉVRY; ASSELIN, 2017). Nessa linha, uma metanálise mostrou que a metformina pode ser um importante adjuvante no tratamento do CE, podendo auxiliar tanto na reversão da histologia normal do endométrio quanto impactar diretamente na sobrevida desses pacientes (MEIRELES et al, 2017).

### **2.3 Cloridrato de Metformina**

A metformina é um fármaco associado à resistência insulínica da classe das biguanidas, aprovado para uso na Europa em 1950. Desde então, se tornou um dos principais tratamentos de escolha para o Diabetes Mellitus II por apresentar baixa toxicidade e grande eficácia com poucos efeitos adversos. O fármaco é administrado por via oral, absorvido principalmente pelo intestino delgado e apresenta biodisponibilidade de 70% a 80%. Este fármaco circula de forma

livre, é pouco metabolizado e apresenta excreção de forma inalterada pela urina (BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018).

Ainda que os mecanismos são estejam totalmente elucidados, a redução glicêmica provocada pela metformina ocorre em geral por meio da inibição de gliconeogênese e glicogenólise, aumento da glicólise e glicogênese, redução de absorção gastrointestinal de glicose, aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos muscular e adiposo e inibição da lipólise. A metformina atua inibindo o complexo 1 da cadeia respiratória mitocondrial, com consequente bloqueio na fosforilação oxidativa e redução da gliconeogênese e melhoria nos receptores insulínicos (PERNICOVA; KORBONITS, 2014).

Apesar de ser amplamente utilizado como hipoglicemiante oral, já foi relatado que pacientes diabéticos em uso de metformina apresentam um risco reduzido de desenvolvimento de cânceres (EVANS et al., 2005). Investigações mais aprofundadas comprovaram esses achados ao demonstrarem os efeitos da metformina em diversos cânceres, além de doenças cardiovasculares, hepáticas e renais, em obesidade e na síndrome do ovário policístico (PCOS) (DOWLING et al., 2012; HAN et al., 2019; SHAO et al., 2014). Estudos *in vitro* e ensaios clínicos mostraram que a metformina pode influenciar na proliferação, viabilidade celular, no ciclo celular e reduzir a agressividade de alguns tipos de carcinomas (SESEN et al., 2015; URPILAINEN et al., 2020), dentre eles o câncer de endométrio (CANTRELL et al., 2010; TULLEDGE-SCHEITEL et al., 2021).

A ação da metformina sobre as células cancerígenas parece ocorrer tanto de maneira direta quanto indireta. Os efeitos diretos são vistos principalmente na sinalização de AMPK/mTOR, estabilizando genes supressores tumorais, que implicam na regulação do ciclo

celular e indução de apoptose (SU et al., 2017), enquanto os efeitos indiretos estão relacionados à redução de insulina sérica e à inibição da síntese proteica. (KOURELIS; SIEGEL, 2011). No que diz respeito ao câncer de endométrio, a metformina também parece afetar a expressão de receptores de estrogênio.

## **2.4 Vias Tumorais e Ação da Metformina Sobre os Receptores de Estrogênio**

O receptor de estrogênio (RE) é um membro da família de receptores nucleares, proteínas que realizam transcrição gênica quando ativado por uma molécula específica. No caso de RE, seu principal ativador é o estrogênio. Os RE apresentam duas isoformas conhecidas, RE $\alpha$  e RE $\beta$  codificadas respectivamente pelos genes ESR1 e ESR2. O ESR1 é expresso majoritariamente no útero, ovário, testículos, fígado, rim e coração, enquanto o ESR2 é expresso principalmente no ovário, útero, testículos, próstata, trato gastrointestinal, bexiga e sistema nervoso central (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003).

Estes receptores apresentam algumas funções distintas: o RE $\alpha$  está relacionado à promoção da proliferação celular e progressão do ciclo celular, enquanto o RE $\beta$  pode ser relacionado com um efeito compensatório, muitas vezes com ações que podem ser opostas as do receptor tipo alfa. Ambos os receptores encontram-se presentes no endométrio, porém RE $\alpha$  parece ser o mediador primário da ação estrogênica neste tecido (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003).

A alta concentração de estrogênio no endométrio aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de CE, isso porque induz mutações no DNA. A concentração RE $\alpha$  é elevada durante o desenvolvimento do CE e quando ligado com estradiol aciona uma cascata de

sinalização com elementos responsivos de estrogênio (EREs) e aumenta a proliferação celular de células de tumor, causando ainda outros erros de transcrição na replicação (ZHANG et al., 2017).

Embora já tenha sido relatado que pacientes em uso de metformina apresentam uma redução na expressão de receptores de estrogênio, os mecanismos e desfechos envolvidos não estão completamente elucidados (MARKOWSKA et al., 2013). O efeito da metformina sobre o receptor de estrogênio não foi ainda completamente elucidado, porém diversos estudos mostraram um efeito inibitório sobre a expressão gênica  $RE\alpha$  e ativador sobre o  $RE\beta$  (ZHANG et al., 2017).

## **2.5 Vias Tumorais e Ação da Metformina Sobre a HIF1 $\alpha$**

O Fator Induzível por Hipóxia Tipo 1 (HIF1) é um fator transcricional que participa da resposta adaptativa a alterações na oxigenação dos tecidos, principalmente em casos de diminuição de oxigênio ou hipóxia. A HIF1 é um heterodímero constituído de duas subunidades: HIF1 $\beta$  expresso constitutivamente e HIF1 $\alpha$  que possui atividade altamente controlada (SEMENZA, 2003).

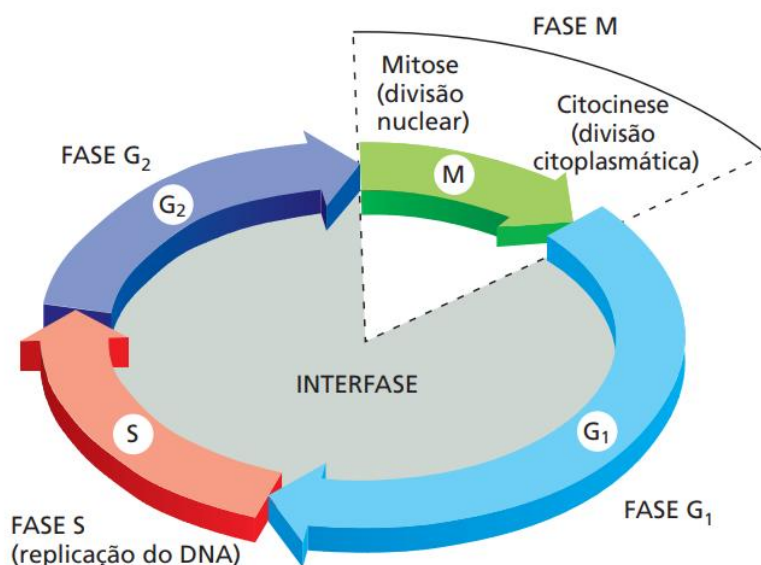
Em situações de normoxia, a HIF1 $\alpha$  é hidroxilada e permanece inativa até sua degradação por proteases. Ao contrário, em situações de hipóxia ou aumento de intermediários do ciclo de Krebs, a hidroxilação é inibida estabilizando a proteína que é ativada e interage com cofatores. Ao realizar sua atividade transcricional, regula a transcrição de inúmeros genes que atuam na adaptação metabólica a situações de hipóxia, na liberação de  $O_2$ , no metabolismo de glicose, na angiogênese, na proliferação celular e, conseqüentemente, podem estar relacionados ao desenvolvimento de câncer (NAKAZAWA; KEITH; SIMON, 2016).

O crescimento desenfreado de tumores altera o metabolismo e comportamento normal das células e tecidos, uma vez que a multiplicação celular supera os níveis normais. O consumo de oxigênio também extrapola e desencadeia um processo de sinalização angiogênica exacerbada e hipóxia, o que requer adaptação do tumor a estas condições utilizando caminhos relacionados ao  $O_2$  (SEMENZA, 2002). Essa alteração metabólica gerada pela hipóxia está diretamente relacionada com a HIF1 $\alpha$ , que contribui para o crescimento tumoral e com respostas adaptativas aos baixos níveis de  $O_2$ , aumento da disponibilidade de glicose e glutamina, glicólise e síntese de glicogênio e redução do consumo de  $O_2$  pela mitocôndria (LEE; SIMON, 2015).

Devido à atuação da metformina em vias semelhantes à da HIF1 $\alpha$ , estudos sugerem que ela possa atuar como antiproliferativo e anticarcinogênico, pela inibição desse fator. É sugerido que esse processo ocorra por meio da ativação do AMPK pela metformina, que consequentemente inibe o mTOR, que é responsável pela atuação da HIF1 $\alpha$  (MEIRELES et al., 2021). Com base na relevância da relação entre a metformina e a HIF1 $\alpha$ , mais estudos são necessários para melhor elucidar esse mecanismo e avaliar a influência da glicose e níveis de oxigênio.

## 2.6 O Ciclo Celular das Células de Câncer

A divisão celular é um processo dinâmico e que ocorre de forma ordenada em células normais. A função primordial do ciclo celular é dar origem a novas células idênticas a partir da duplicação do DNA das células progenitoras, evento que é dividido nas fases interfase e mitose (ALBERTS et al., 2010) (**Figura 1**).



**Figura 1 – Fases do ciclo celular.** Ciclo celular dividido em 4 etapas, fases de intervalo G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> intercalam com as principais fases, a fase S e a fase M. Adaptado de: ALBERTS et al., 2010

A fase de interfase compreende 3 etapas: G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>, com o objetivo de preparar a célula para o processo de divisão. Na etapa G<sub>1</sub> ocorre o crescimento celular, síntese de moléculas que estimulam ou inibem a duplicação de DNA, determinando a progressão do ciclo. Caso haja inibição, a célula pode entrar na fase G<sub>0</sub>, estado de baixa atividade metabólica e repouso, e caso haja estímulo, a célula seguirá para a etapa S, na qual haverá síntese e replicação de DNA nuclear. Após replicação de todo DNA genômico, ocorre a etapa G<sub>2</sub> de crescimento, produção de moléculas e organelas e preparo para divisão. Ao completar a fase de interfase, entra na fase de mitose quando ocorre a divisão celular propriamente dita (ALBERTS et al., 2010).

Este ciclo dita o desenvolvimento da célula e dos tecidos e é controlado por diversos *checkpoints*. Inúmeros fatores estão envolvidos em sua regulação, mas principalmente as cinases dependentes de ciclina (CDKs) e as ciclinas, que regulam a progressão da célula pelas fases da

divisão. Dessa forma, a atividade normal da célula depende da integração perfeita de várias vias metabólicas (BLOOM; CROSS, 2007; SCHAFER, 1998).

A desregulação do ciclo celular é uma característica comum a diversos tipos de câncer, principalmente por sua maior consequência ser a proliferação celular exacerbada. Esse desequilíbrio pode ser promovido de diversas formas, por exemplo por meio da secreção descontrolada de hormônios, agentes exógenos ou alterações nos fatores de regulação (MALUMBRES; BARBACID, 2009) e mecanismos epigenéticos (SVOTELIS; GÉVRY; GAUDREAU, 2009).

O controle da taxa de proliferação celular é um dos grandes desafios no campo da oncologia, estimulando a busca e desenvolvimento de fármacos que possam atuar nesse processo. Nesse aspecto, diversos estudos mostram um efeito antiproliferativo da metformina sobre o ciclo celular de células de câncer de endométrio (CANTRELL et al., 2010; HANNA et al., 2012; SCHAFER, 1998).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O presente estudo tem como principal objetivo avaliar o efeito da metformina sobre a viabilidade, ciclo celular e a expressão de RE $\alpha$ , RE $\beta$  e HIF1 $\alpha$  em linhagem celular de câncer de endométrio.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Realizar o cultivo de células da linhagem Ishikawa de câncer de endométrio humano;
- Avaliar o efeito da metformina sobre a viabilidade celular de células Ishikawa;
- Avaliar o efeito da metformina sobre ciclo celular de células Ishikawa;
- Realizar a extração de RNA de células Ishikawa e quantificá-las;
- Avaliar o efeito da metformina sobre a expressão dos genes ESR1 e ESR2, com objetivo de avaliar os receptores RE $\alpha$  e RE $\beta$ , e fator de transcrição nuclear HIF1 $\alpha$ ;



## 4 METODOLOGIA

Nesta seção estão descritas as linhagens celulares, materiais utilizados e os métodos experimentais testados. Esta pesquisa fez análises de Citometria de Fluxo para avaliar o Ciclo Celular, e de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (RT-qPCR) para avaliar a expressão gênica do composto metformina em linhagem celular de câncer de endométrio.

### 4.1 Linhagem e Cultura Celular

Neste trabalho, foram utilizadas células Ishikawa (código 0364) provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Essa é uma linhagem de adenocarcinoma endometriode humano, proveniente de tecido epitelial da espécie *homo sapiens* (LESSEY et al., 1996). As células Ishikawa são originadas de uma paciente japonesa de 39 anos que apresentava adenocarcinoma estágio 2 bem diferenciado (NISHIDA, 2002).

As células foram cultivadas de acordo com as especificações do BCRJ do qual foram adquiridas, em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Sigma Aldrich®) Low Glucose suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina.

A cultura celular foi realizada em condições ideais, de acordo com o preconizado pelo BCRJ. Durante o período de cultivo, as células foram semeadas em placas de 143,0 cm<sup>2</sup> e mantidas em incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). A troca de meio era realizada a cada 48 horas e, quando essas células atingiam o nível de confluência de 80%, elas eram dissociadas das placas com tripsina 0,5% e utilizadas para os experimentos

propostos, acrescentando-se uma passagem (quantidade de subculturas). Neste trabalho, foram utilizadas células entre as passagens 5 e 15. A criopreservação foi realizada em criotubos com 95% de SFB e 5% de DMSO (Dimetilsulfóxido - Sigma Aldrich®).

## 4.2 Compostos e Controles Testados

Os ensaios foram realizados com o composto cloridrato de metformina (Sigma Aldrich®) diluído em meio DMEM Low Glucose suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Para preparo dos tratamentos foi utilizada uma solução mãe de 100 mM, que foi então diluída até atingir as concentrações de trabalho.

As concentrações de trabalho utilizadas para ambos os ensaios de Ciclo Celular e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (RT-qPCR) foram estabelecidas por meio de ensaio de viabilidade celular de MTT. O controle utilizado foi o meio DMEM. Os tempos e concentrações utilizados estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** - Concentrações e tempo de tratamento com metformina

<b>Teste</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Tempo de Tratamento</b>
MTT	Controle metformina: 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mM	24h e 48h
Ciclo celular	Controle metformina: 0,5 e 15 mM	24h
RT-qPCR	Controle metformina: 0,5 e 15 mM	6h, 12h, 24h

### **4.3 Avaliação da Viabilidade Celular por ensaio de MTT**

Os ensaios de viabilidade têm como objetivo avaliar a atividade citotóxica de compostos para as células. Neste estudo foi utilizado o ensaio de viabilidade por MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], que é um ensaio colorimétrico que avalia a atividade mitocondrial celular. O MTT é um sal de tetrazólio que pode ser reduzido pela enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias de células viáveis, sendo transformado em cristais de formazan, composto de coloração arroxeada. Estes cristais são dissolvidos e é realizada uma leitura espectrofotométrica, onde a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional à quantidade de células com mitocôndrias viáveis (BERRIDGE; TAN, 1993).

#### **4.3.1 Análise do MTT**

Para este ensaio, aproximadamente 5.000 células foram semeadas por poço, em duas placas de 96 poços. Após um intervalo de 24 horas do plaqueamento, foram adicionados em ambas as placas e por poço, 100 µL de tratamento com controle e com metformina nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mM por 24 horas e 48 horas.

O tempo de incubação foi diferente para cada placa, sendo de 24 e 48 horas. Após este período, foi realizado um procedimento idêntico de remoção do meio de cultura com tratamento, adição de 50 µL de MTT por poço, na concentração de 5 mg/mL diluído em meio DMEM, seguida de incubação de 4 horas para que houvesse a redução do MTT em cristais de formazan. Após a incubação, para dissolução do sal de formazan, 150 µL de isopropanol acidificado (HCL 0,04 M em isopropanol absoluto) foram adicionados por poço. Uma diluição manual foi realizada e, após completa solubilização dos cristais, a absorbância foi mensurada em um

espectrofotômetro de placas (Beckman Coulter DTX 800 Multimode Detector), com comprimento de onda de 570 nm.

A viabilidade das células tratadas com os compostos foi comparada com a viabilidade dos seus respectivos controles, considerada como 100%. Os resultados foram expressos pela porcentagem de células viáveis nos poços tratados com compostos em relação aos controles. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

#### **4.4 Avaliação do Ciclo Celular por Citometria de Fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica que permite avaliar características físicas, químicas e biológicas de diversos tipos celulares, como células animais, bactérias e fungos. A sua aplicação é realizada com um equipamento denominado Citômetro de Fluxo e com o auxílio de *softwares* específicos para análises e obtenção de resultados.

A adoção desta técnica para avaliação do ciclo celular se dá pela quantificação de ácido desoxirribonucleico (DNA) no interior das células, o que permite distinguir em qual fase do ciclo celular elas se encontram: G0/G1, S ou G2/M. Células em fase G2/M do ciclo celular apresentam o dobro de DNA do que células em fase G0/G1, enquanto a quantidade de DNA de células em fase S estão em um intervalo entre as duas fases anteriormente citadas. Para a quantificação do DNA é necessário realizar uma marcação dessa molécula com um intercalante. Estas substâncias apresentam diferentes especificidades e, ao intercalarem com a fita dupla de DNA, emitem fluorescência quando são excitadas por uma fonte de luz.

A forma de realização consiste em uma marcação com um agente fluorescente no momento de preparo da amostra e, então, introdução da suspensão de células dispersas e

dissociadas no equipamento. Uma vez no equipamento, a suspensão é aspirada lentamente e as células são levadas a uma câmara, onde passarão por uma abertura e serão transportadas individualmente por fluxo contínuo até atravessar um feixe de luz laser. Ao ser interceptada, a célula dispersa a luz e emite fluorescência em determinado comprimento de onda, e ambos serão captados por filtros específicos convertidos em pulsos elétricos e enviados para o *software* em computador.

Neste trabalho, foi utilizado o método de citometria de fluxo com o intercalante de DNA de iodeto de propídeo (Invitrogen), para avaliar o efeito da metformina nas características do ciclo celular de linhagem de câncer de endométrio Ishikawa.

#### **4.4.1 Análise do Ciclo Celular**

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo após a marcação com iodeto de propídeo. Cerca de 1.000.000 de células foram plaqueadas em 4 mL de meio específico para a linhagem celular em placas de 21 cm<sup>2</sup> cada e deixadas em incubadora de 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após 24 horas, as células foram tratadas com controle e com metformina nas concentrações de 0,5 mM, 15 mM por 24 horas, nas mesmas condições de incubação. No fim desse período foi iniciado o preparo das amostras. Inicialmente o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com PBS, seguido do processo de tripsinização. As células foram então recolhidas, centrifugadas, lavadas 3 vezes com PBS e fixadas em 5mL de metanol gelado por 1 hora no gelo. O metanol foi adicionado gota a gota enquanto os tubos eram mantidos em vórtex contínuo, de forma a evitar a formação de grumos celulares. Para marcação com iodeto

de propídeo as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 5 minutos para remoção do metanol e posteriormente lavadas com 500 $\mu$ L de PBS gelado. Para a marcação as células foram incubadas com 50 $\mu$ g/mL de iodeto de propídeo por 20 minutos no escuro.

Concluída a preparação das amostras, as análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur mediante a aquisição de 100.000 eventos no canal FL2. A determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo foi realizada utilizando-se o *software* FCS Express 7. Foram realizados 3 experimentos independentes.

#### **4.5 Avaliação da Expressão Gênica por Método de PCR**

O efeito da metformina sobre a expressão dos genes ESR1 e ESR2 (genes relacionados ao mecanismo dos receptores RE $\alpha$  e RE $\beta$ , respectivamente) e HIF1 $\alpha$  (fator de transcrição nuclear) em linhagem celular Ishikawa foi analisado por ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa (RT-qPCR).

A RT-qPCR é uma técnica amplamente utilizada na pesquisa básica que permite a amplificação seletiva de determinada região de materiais genéticos. Seu princípio básico é o uso de ciclos de frio e calor para estimular a amplificação das regiões de interesse. Este tipo de PCR utiliza o ácido ribonucleico (RNA) como material genético inicial, juntamente com a enzima transcriptase reversa (RT) para transcrever o RNA em DNA. Outra característica dessa técnica é o uso de agente fluorescente que permite avaliação do material genético gerado a cada ciclo da PCR. Os fluorocromos se intercalam com a dupla fita de DNA e emitem fluorescência quando irradiados com luz, cuja intensidade é diretamente proporcional à quantidade do produto amplificado.

Neste trabalho, foi utilizado o método de RT-qPCR com fita de mRNA em uma etapa, para avaliar o efeito da metformina sobre a expressão gênica dos receptores RE $\alpha$ , RE $\beta$  e HIF1 $\alpha$ .

#### **4.5.1 Fase de Extração de RNA**

Cerca de 1.000.000 de células Ishikawa foram plaqueadas em 4 mL de meio DMEM em placas de 21 cm<sup>2</sup> cada e mantidas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após 24 horas as células foram tratadas com controle e com metformina nas concentrações de 0,5 mM e 15 mM por 6, 12 e 24 horas, nas mesmas condições de incubação.

Para o processo de extração de RNA foi utilizado o reagente TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, CA, EUA). Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado 1mL de TRIzol a cada um dos poços, realizando movimentos de *up/down* com uma pipeta P1000 até que não houvesse mais células aderidas. As células foram então coletadas dos poços com auxílio de um espalhador de células e o conteúdo adicionado em tubo livre de RNases previamente identificado.

Com objetivo de obter o RNA total presente nas amostras, foram adicionados 200 $\mu$ L de clorofórmio (Sigma Aldrich®) concentrado aos tubos, que foram então agitados em vórtex por 15 segundos, incubados por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugados a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após esse processo, foi possível observar a formação de 3 fases no tubo, a fase incolor, parte superior do tubo contendo RNA, foi transferida para um novo tubo ao qual foram adicionados 500  $\mu$ L de isopropanol absoluto para precipitação do RNA (J.T.Baker®, Avantor Performance Materials, Center Valley, PA, EUA).

Os tubos foram agitados em vórtex durante 15 segundos, incubados a temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao tubo foi adicionado 1 mL de etanol 75% (v/v) gelado (J.T.Baker®). Estes foram então agitados em vórtex durante 15 segundos e centrifugados a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. Este processo foi realizado 3 vezes e então o *pellet* foi ressuspendido em água MilliQ com dietilpirocarbonato 0,1% (v/v) - DEPC (Sigma-Aldrich®).

#### **4.5.2 Fase de Quantificação e Determinação da Pureza e Integridade do RNA**

A avaliação da pureza e da quantificação das amostras foi realizada em espectrofotômetro de microvolume *NanoVue Plus* (GE Health Sciences®, Life Sciences, Buckinghamshire, UK) no comprimento de onda de 260 nm e expressa em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Duas análises foram realizadas para avaliação da pureza: a razão entre os comprimentos de onda 260nm e 280nm ( $A_{260}/A_{280}$ ), dado que indica contaminação por DNA e proteínas, e a razão entre os comprimentos de onda 260nm e 230nm ( $A_{260}/A_{230}$ ), que mostra contaminação por sais, álcool e outros reagentes. A pureza foi considerada adequada quando a razão  $A_{260}/A_{280}$  encontrava-se entre 1,7 e 2,0 e a razão  $A_{260}/A_{230}$  acima ou próxima de 2,0.

A integridade do RNA total foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% (m/v) em tampão TBE 1x (890mM de Tris, 890 mM de borato e 0,5M de EDTA, pH 8,0) e brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  em H<sub>2</sub>O destilada). A avaliação do gel foi realizada em aparelho fotodocumentador (Amersham imager 600 GE, Inglaterra) sob luz ultravioleta (UV). As amostras foram consideradas adequadas para utilização em ensaios quando apresentaram bandas 18S e 28S bem definidas, sem presença de rastros.



#### 4.5.3 Fase de Tratamento das Amostras de RNA Total com DNase

Com objetivo de eliminar possíveis contaminações na amostra com DNA genômico, 1µg de RNA total de cada amostra foi tratado com 1 unidade/µL da enzima DNase I (Sigma-Aldrich) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a enzima foi inativada com tampão de inativação a 70°C em termociclador (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) por 10 minutos.

#### 4.5.4 Fase de RT-qPCR e Análise

A expressão dos genes ESR1, ESR2, HIF1 $\alpha$  e  $\beta$ -ACTINA (controle utilizado para normalizar os dados) em células Ishikawa tratadas com metformina foi avaliada por meio do método RT-qPCR, em equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* e as reações de transcrição reversa e amplificação foram realizadas em uma única etapa com o kit *Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

As reações foram preparadas para um volume final de 10 µL, dos quais 5,5 µL são de *Power SYBR® Green*, de enzima transcriptase reversa (RT) e de *primers forward* e *reverse* (tabela 2) (5,0 pMol/µL) e 4,5 µL de amostra de RNA total (5,0 ng/4,5 µL). Foram realizados 3 experimentos independentes, e cada amostra foi pipetada em duplicata.

**Tabela 2** - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real

Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos (5' - 3')
ERS1	Forward: GGTGGGATACGAAAAGACCGA
	Reverse: GGTTGGCAGCTCTCATGTCT
ERS2	Forward: GCAGACCACAAGCCCAAATG
	Reverse: AGCGATCTTGCTTCACACCA
HIF1 $\alpha$	Forward: GAACGTCGAAAAGAAAAGTCTCG
	Reverse: CTTTATCAAGATGCGAACTCACCA
$\beta$ -actina	Forward: TCACCCACACTGTGCCCATCTACG
	Reverse: CAGCGGAACCGCTCATTTGCCAATG

As condições de termociclagem utilizadas para análise foram: 30 minutos a 48°C para transcrição reversa; 10 minutos a 95°C para ativação do *Power SYBR® Green*; quarenta ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação a 95°C durante 15 segundos (desnaturação), 60°C durante 1 minuto (anelamento e extensão).

Com objetivo de verificar a especificidade da reação, foi utilizado o programa de dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*), que consiste na exposição das amostras a aumentos gradativos de temperatura variando entre 60°C e 95°C. Como o aumento da temperatura é diretamente proporcional à diminuição da fluorescência e esse ponto é particular para cada sequência de DNA amplificada, é possível avaliar a presença de produtos inespecíficos da amplificação e/ou formação de dímeros de primers. Ambos estavam ausentes no presente trabalho, demonstrando que houve especificidade na amplificação.

O primeiro passo para análise da RT-qPCR foi a definição do Ct (ciclo limiar ou *cycle threshold*), valor que equivale ao número de ciclos necessários para a amplificação atingir a fase exponencial.

Após a definição do valor do Ct, os dados foram extraídos e avaliados da seguinte forma: os dados do gene alvo foram normalizados pelo gene constitutivo  $\beta$ -ACTINA (Ct do gene de interesse menos Ct  $\beta$ -ACTINA resulta no  $\Delta$ Ct) e o resultado foi normalizado pelo controle ( $\Delta$ Ct do gene de interesse menos a média do Ct do grupo controle resulta no  $\Delta\Delta$ Ct). Os dados foram representados por  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

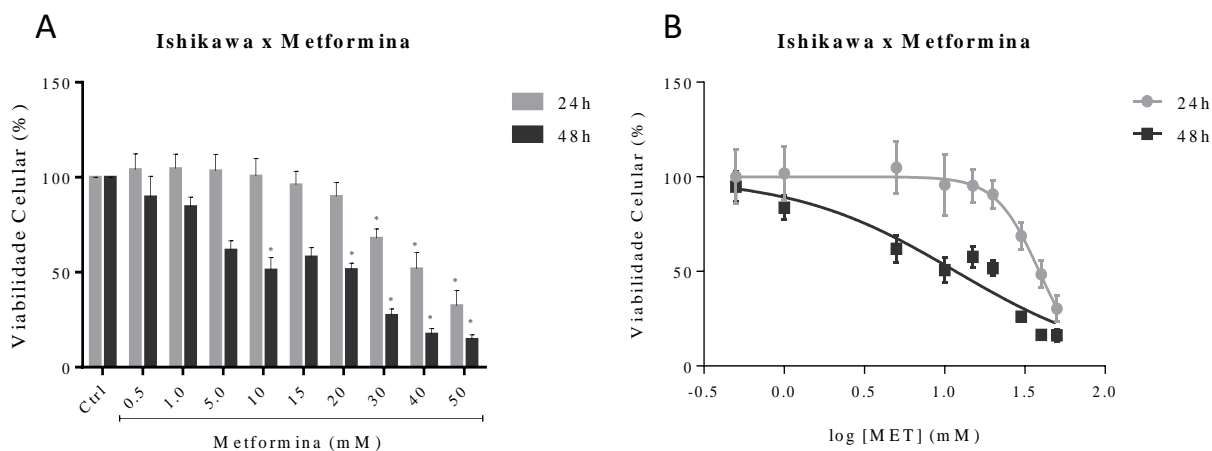
#### **4.6 Estatística**

A análise estatística do ensaio de viabilidade MTT foi realizada por meio do software GraphPad prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. Com base na confirmação ou não da distribuição Gaussiana, foram aplicados os testes One-Way ANOVA ou Kruskal-Walis, com pós-teste de Dunnet para comparação entre os grupos independentes em relação ao controle. Os resultados foram expressos como média $\pm$ DP. O critério de significância estatística foi o valor inferior a 0,05.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Metformina Reduz a Viabilidade Celular de Células de CE

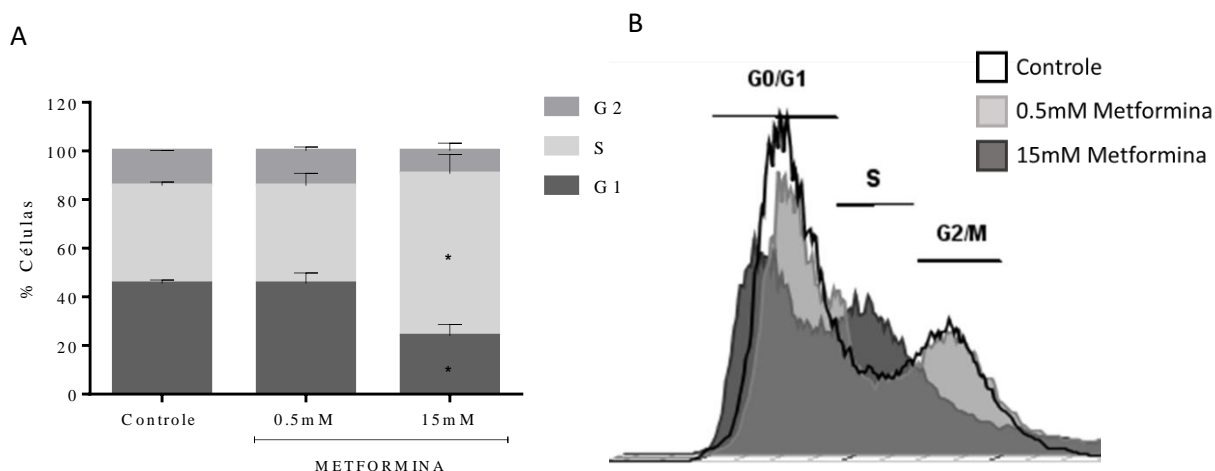
A primeira etapa foi investigar o efeito da metformina sobre a viabilidade celular das células Ishikawa e, com base nos resultados, avaliar quais concentrações de trabalho seriam utilizadas para continuidade dos experimentos. A metformina nas células Ishikawa em 24 horas apresentou concentrações tóxicas de 30, 40 e 50 mM e em 48 horas de 10, 20, 30, 40 e 50 mM, conforme representado na **figura 2**. Uma curva dose-resposta foi realizada para esse composto e por meio dela o IC50 foi determinado para o tratamento de 24 h (IC50 = 38 mM) e para o de 48 h (IC50 = 11 mM).



**Figura 2 – Ensaio colorimétrico de viabilidade celular com MTT: A)** Células Ishikawa tratadas com controle e metformina nas concentrações de 0,5, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 40 e 50 mM, por 24 h e 48 h; **B)** Curva dose resposta de células Ishikawa tratadas com controle e metformina. \*  $p < 0,05$  vs controle (meio DMEM)

## 5.2 Metformina Altera o Ciclo Celular de Células de CE

O perfil do ciclo celular de células tratadas com metformina foi avaliado e não foram observadas diferenças entre as fases do ciclo entre o grupo controle e o grupo tratado com 0,5mM de metformina, entretanto havia uma diminuição da fase G1 ( $p=0,002$ ) e aumento da fase S ( $p=0,003$ ) no grupo tratado com 15mM quando comparado com o controle. Estes resultados podem ser observados na **figura 3**.



**Figura 3 – Metformina causa alterações no ciclo celular de células Ishikawa de CE.** A) Avaliação do ciclo celular de células Ishikawa tratadas com controle e metformina nas concentrações de 0,5 e 15 mM, por 24 h; B) Histogramas representativos das fases do ciclo celular após a marcação com iodeto de propídeo. \*  $p < 0,05$  vs controle (meio DMEM)

## 5.3 PCR

### 5.3.1 Quantificação, Determinação da Pureza e Integridade do RNA Extraído

Os dados obtidos da quantificação e pureza em equipamento espectrofotômetro, exibidos na tabela 3, foram avaliados e considerados satisfatórios, com base nos padrões estabelecidos na metodologia.

**Tabela 3** – Quantificação e determinação da pureza do RNA extraído

<b>N1</b>			
	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
6h - Controle	224,8	1,855	1,764
6h - 0,5 mM	230,0	1,831	2,032
6h - 15 mM	192,8	1,812	2,252
12h - Controle	268,4	1,838	2,117
12h - 0,5 mM	214,8	1,814	2,065
12h - 15 mM	188,4	1,833	2,151
24h - Controle	458,4	1,848	2,278
24h - 0,5 mM	319,6	1,845	2,343
24h - 15 mM	257,2	1,811	2,233

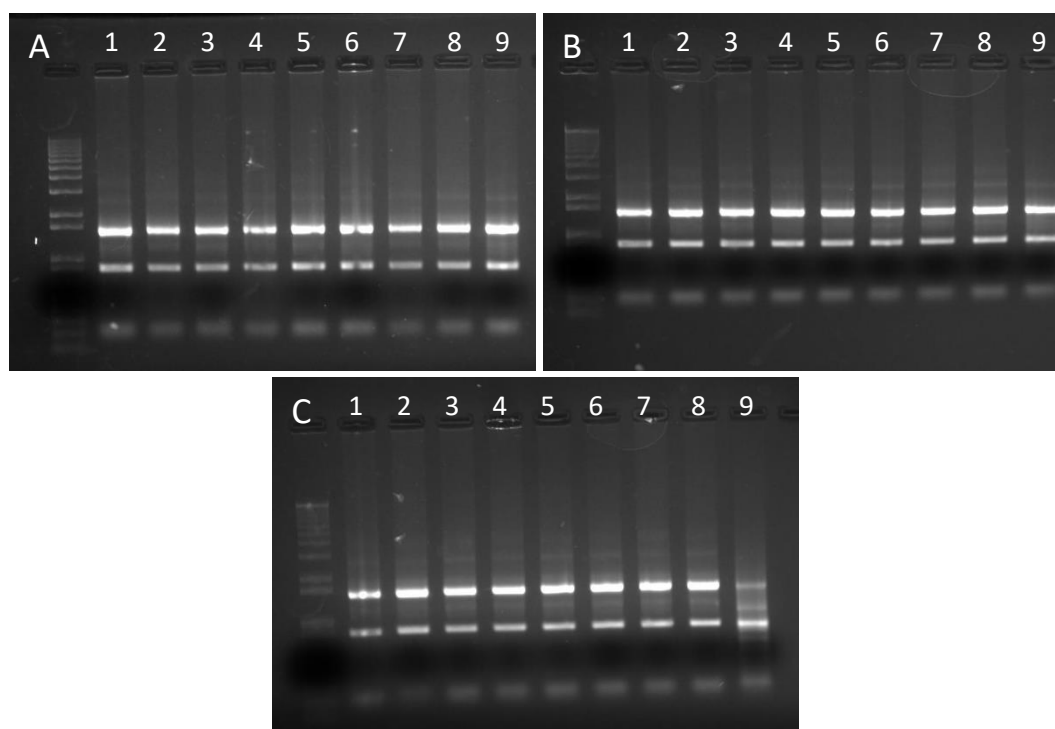
  

<b>N2</b>			
	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
6h - Controle	361,6	1,845	1,887
6h - 0,5 mM	354,4	1,816	2,301
6h - 15 mM	332,8	1,813	2,337
12h - Controle	391,6	1,826	2,325
12h - 0,5 mM	379,2	1,802	1,852
12h - 15 mM	380,4	1,815	2,320
24h - Controle	557,6	1,859	2,263
24h - 0,5 mM	537,6	1,806	2,113
24h - 15 mM	292,0	1,829	1,826

<b>N3</b>			
	<b>Concentração (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>A260/A280</b>	<b>A260/A230</b>
6h - Controle	570,8	1,860	2,185
6h - 0,5 mM	699,2	1,888	2,111
6h - 15 mM	523,2	1,858	2,267
12h - Controle	657,2	1,854	2,229
12h - 0,5 mM	707,6	1,892	2,222
12h - 15 mM	616,0	1,862	2,235
24h - Controle	696,0	1,887	2,104
24h - 0,5 mM	802,4	1,877	2,239
24h - 15 mM	298,0	1,826	2,105

A avaliação da integridade do RNA foi realizada por meio de gel de agarose e os resultados foram considerados adequados para os N1 e N2. Para o N3 foi observada uma alteração no tratamento de metformina na concentração 15 mM em 24 horas, conforme mostrado na **figura 4**.

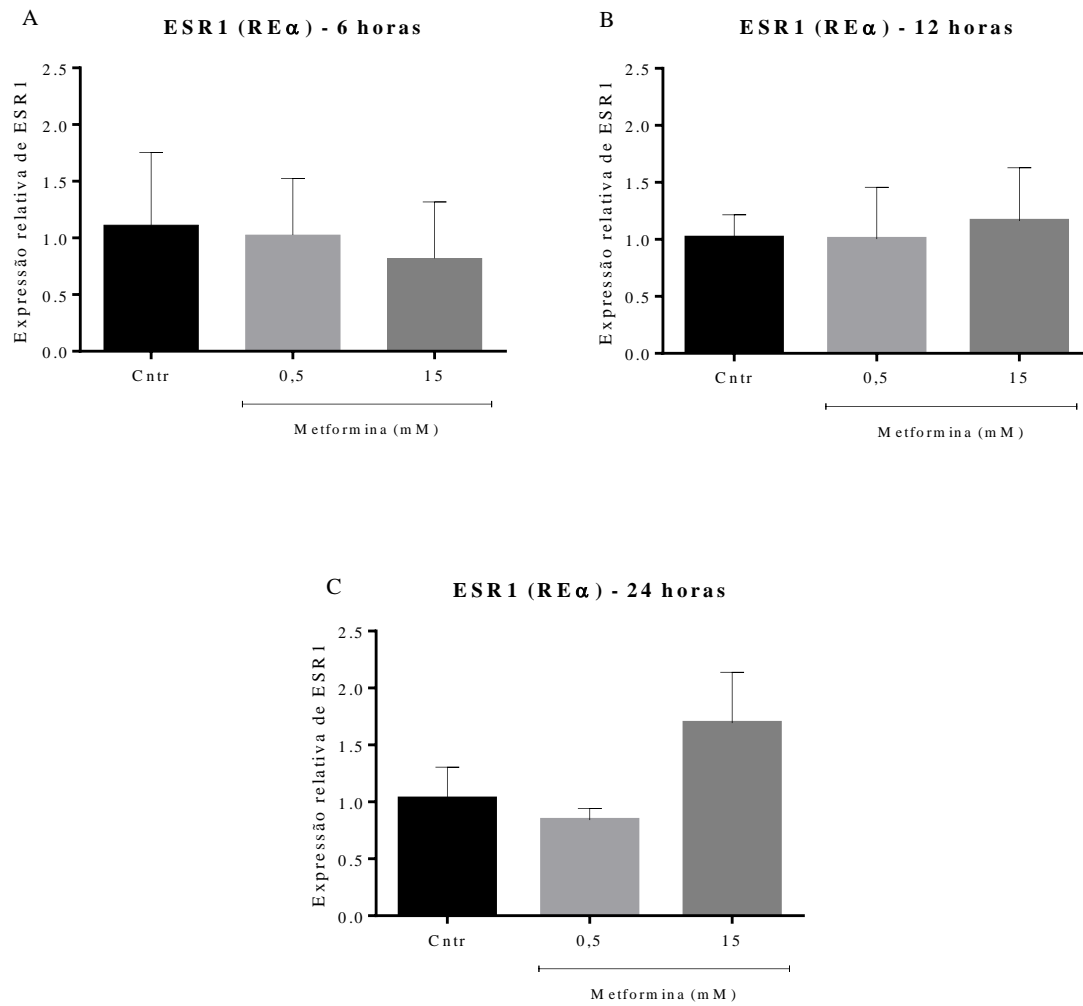


**Figura 4 – Integridade do RNA extraído.** Amostras: marcador, **1)** 6h-controle, **2)** 6h-0,5mM, **3)** 6h-15mM, **4)** 12h-controle, **5)** 12h-0,5mM, **6)** 12h-15mM, **7)** 24h-controle, **8)** 24h-0,5mM, **9)** 24h-15mM. **A)** Gel de amostras do N1; **B)** Gel de amostras do N2; **C)** Gel de amostras do N3.

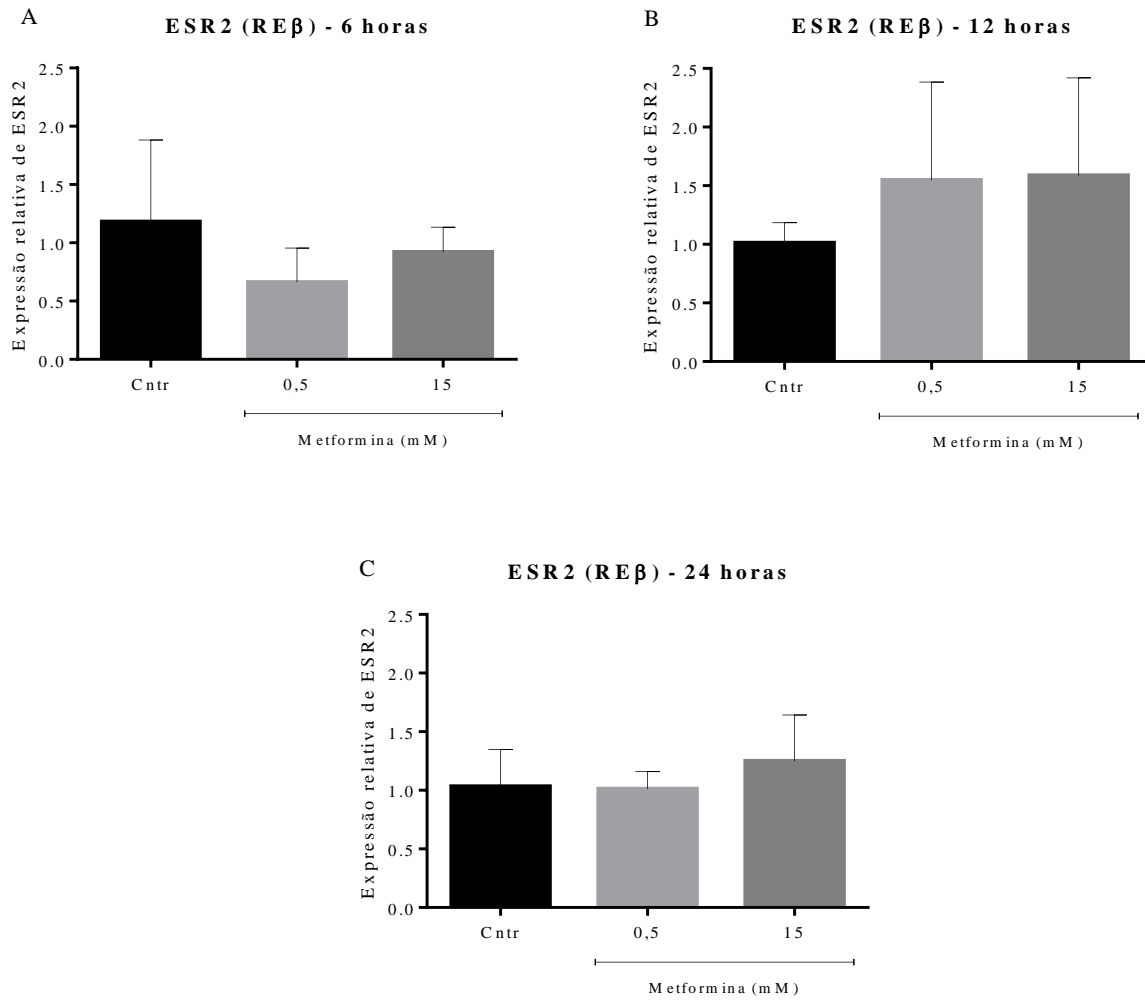
### 5.3.2 Expressão Gênica

A técnica de RT-qPCR foi utilizada para avaliar a expressão gênica de ESR1, ESR2, HIF1 $\alpha$  e  $\beta$ -ACTINA. Os valores de  $\beta$ -ACTINA foram utilizados para normalizar os dados, conforme metodologia. Não foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com metformina para ESR1 (**Figura 5**), para ESR2 (**Figura 6**), e nem para HIF1 $\alpha$  (**Figura 7**) em nenhum dos 3 tempos analisados.

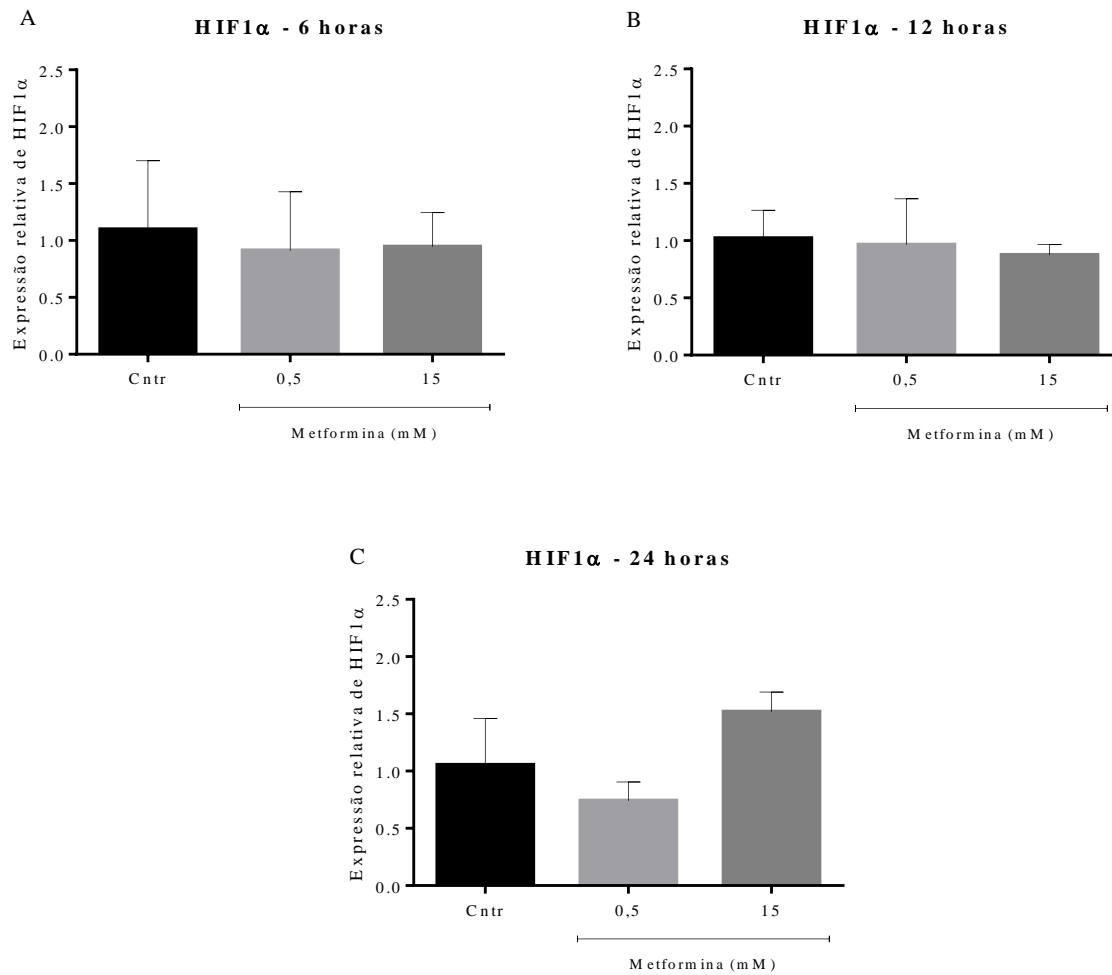




**Figura 5 - Expressão gene ESR1 em células Ishikawa.** Expressão do gene ESR1 em células Ishikawa tratadas com controle e com metformina nas concentrações de 0,5 e 15 mM por **A)** 6 horas, **B)** 12 horas e **C)** 24 horas.



**Figura 6 - Expressão do gene ESR2 em células Ishikawa.** Expressão do gene ESR2 em células Ishikawa tratadas com controle e com metformina nas concentrações de 0,5 e 15 mM por **A)** 6 horas, **B)** 12 horas e **C)** 24 horas.



**Figura 7 – Expressão do gene HIF1 $\alpha$  em células Ishikawa.** Expressão do gene HIF1 $\alpha$  em células Ishikawa tratadas com controle e com metformina nas concentrações de 0,5 e 15 mM por **A)** 6 horas, **B)** 12 horas e **C)** 24 horas.

## 6. DISCUSSÃO

O câncer de endométrio é um dos tumores ginecológicos mais recorrentes em mulheres, com altas taxas de mortalidade e morbidade. A exposição do endométrio ao estrogênio em níveis elevados e sem a oposição de progesterona está relacionada ao desenvolvimento e progressão do CE tipo I, sendo considerado, por este motivo, um câncer hormonal (HENDERSON; ROSS; PIKE, 1991). Como consequência, seus principais fatores de risco estão relacionados a problemas que afetam os níveis de hormônios, como o diabetes mellitus tipo II, a obesidade e a PCOS (LU; BROADDUS, 2020).

Nessa linha, diversos trabalhos já demonstraram que a metformina pode exercer efeitos diretos e indiretos sobre células de câncer, sendo uma medida terapêutica promissora principalmente no câncer de endométrio. (HANNA et al., 2012; ZHANG et al., 2017)

Tendo em vista os efeitos predominantemente metabólicos e indiretamente hormonais da metformina (AMANT et al., 2005) e de forma a melhor compreender seus mecanismos antitumorais, este trabalho avaliou os efeitos desse fármaco sobre a viabilidade celular, o ciclo celular e a expressão gênica de células de câncer de endométrio. A hipótese foi embasada por estudos anteriores que relacionam este fármaco com efeitos preventivos e antiproliferativos de diversos tipos de câncer. Até o momento, os efeitos da metformina em linhagens de células de câncer de endométrio foram vistos principalmente em estudos clínicos (MEIRELES et al., 2017), entretanto os mecanismos envolvidos ainda precisam ser elucidados.

De acordo com os resultados obtidos no ensaio de MTT, a metformina mostrou-se tóxica de maneira dose dependente nas concentrações de 30mM a 50mM e com tratamento de 24 horas, com um IC50 de 38mM. O tratamento prolongado parece tornar as células de CE mais sensíveis

à ação da metformina, nas quais foram verificadas citotoxicidade nas doses de 10 mM a 50mM com tratamento de 48 horas, com IC50 de 11mM. Estes resultados corroboram com os achados de Takahashi et al. (2014), onde eles observaram morte celular em células Ishikawa tratadas com metformina com concentração de 20 mM para 24 horas e 5 mM para 48 horas, com IC50 de 6,78Mm (TAKAHASHI et al., 2014).

Cantrell et al. (2010) descreveram em seus estudos concentrações tóxicas ainda mais baixas, com redução da viabilidade a partir de 0,5 mM e com IC50 de 1,0 mM após tratamento com metformina por 72 horas (CANTRELL et al., 2010). É importante levar em consideração a variação de tempo de tratamento entre os estudos pois esta pode gerar diferenças de desfecho. É interessante notar o impacto do tempo de tratamento sobre a morte celular, visto que esse fator pode reduzir consideravelmente a concentração necessária de metformina para atingir uma redução da viabilidade celular estatisticamente significativa.

O próximo passo foi avaliar se havia interferência da metformina sobre o ciclo celular de células de câncer de endométrio. Cantrell et al. (2010) também avaliaram este aspecto, e encontraram interrupção do ciclo celular na fase G1 e consequente redução de células na fase S para as concentrações de 1,0mM e 5,0mM de metformina (CANTRELL et al., 2010). De maneira divergente, os resultados encontrados neste trabalho indicam uma redução de fase G1 e aumento na fase S, na concentração de 15mM, sugerindo que a metformina pode prevenir a replicação do DNA e estagnar as células na fase S, inibindo o processo de divisão celular.

Apesar de vários estudos demonstrarem que a metformina leva a um aumento no percentual de células na fase G0/G1 (CANTRELL et al., 2010; WANG et al., 2018; ZHAO et al., 2011) um estudo conduzido por Yasmeen et al (2011), semelhantemente ao que foi

observado neste trabalho, relataram um aumento de células na fase S após tratamento com metformina em linhagem de células de ovário (YASMEEN et al., 2011). Algumas hipóteses para tais diferenças entre todos resultados podem estar relacionadas às variações entre os meios utilizados, protocolos e tempos de experimento, características que podem impactar no ciclo celular (ZHONG et al., 2015). Dentre as principais diferenças experimentais estão o percentual de SFB utilizado das culturas, adição de insulina bovina, o tempo de cultura e a sincronização do ciclo celular que foi realizado com retirada do SFB da cultura *overnight* e posterior adição de 15% de SFB (CANTRELL et al., 2010).

Tendo em vista a correlação de ESR1, ESR2 e HIF1 $\alpha$  no desenvolvimento de tumores (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003; NAKAZAWA; KEITH; SIMON, 2016), foi avaliado se a metformina poderia impactar na expressão desses transcritos. Os genes ESR1 e ESR2, codificadores dos receptores de estrogênio RE $\alpha$  e RE $\beta$  respectivamente, estão ligados à regulação de EC pelo hormônio estrogênio, que apresenta um papel determinante no desenvolvimento deste tumor (ZHANG et al., 2017).

Neste estudo, não foram identificadas alterações no que tange a expressão transcricional de ESR1 e ESR2 nas células Ishikawa após tratamento com metformina 0,5 e 15 mM nos tempos de 6, 12 e 24 horas quando comparados com o grupo controle. Da mesma forma, Pabona et al (2020), não detectaram alterações na expressão gênica desses genes em células tratadas com 60 $\mu$ M de metformina por 2 horas e 24 horas (PABONA et al., 2020). De maneira controversa, Zhang et al (2017) mostraram redução da expressão gênica para ESR1 e aumento para ESR2, ambos com alteração estatisticamente significativa nas concentrações de 1,0mM, 5,0mM e 15mM com tratamento por 24 horas (ZHANG et al., 2017). Semelhante ao ciclo celular é importante levar em consideração as diferenças experimentais entre os estudos, como por

exemplo a combinação de diferentes meios de cultura como RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) e McCoy's 5A suplementado com 10% de SFB.

A HIF1 $\alpha$  em situações de normoxia é hidroxilada e permanece inativada até o momento que ocorre redução nos níveis de oxigênio, então ela é estabilizada e passa a interagir com cofatores, realizando atividade transcricional interligada à transcrição de genes relacionados com angiogênese, proliferação celular e metabolismo da glicose, o que faz com que a HIF1 $\alpha$  seja um potencial beneficiador do processo tumorigênico (NAKAZAWA; KEITH; SIMON, 2016). Com intuito de verificar se a metformina influencia nesse fator, a expressão gênica de genes que codificam a HIF1 $\alpha$  foi avaliada.

No presente estudo não foram verificadas alterações na expressão gênica de HIF1 $\alpha$  em células tratadas com metformina nas concentrações de 0,5mM e 15 mM por 6 horas, 12 horas e 24 horas, quando comparadas ao controle. Tadakawa et al (2015) avaliaram a expressão deste gene sob condições simuladas de hipóxia, comparando um tratamento de 0,5mM a 2,5 mM de metformina por 24 horas com o controle. Nesse estudo, Tadakawa não observou alterações na expressão gênica de HIF1 $\alpha$ , porém verificou uma redução da expressão proteica, sugerindo que os impactos da metformina sobre este gene podem acontecer a nível pós transcricional (TADAKAWA et al., 2015).

Apesar de demonstrar um desfecho positivo no tratamento do CE, os mecanismos pelos quais a metformina exerce suas funções sobre essas células ainda precisam ser elucidados. Os resultados apresentados reforçam os relatos da literatura de que a metformina pode influenciar diretamente na viabilidade e proliferação de células de câncer de endométrio. Ainda que não tenham sido investigados de maneira tão profunda os mecanismos envolvidos, vários estudos

sugerem que as ações da metformina envolvem vias que culminam com a inibição de mTOR (BEN SAHRA et al., 2011), redução de angiogênese (TADAKAWA et al., 2015), modulação de p53 (GONG et al., 2014), dentre outros, mas ainda há resultados controversos tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KITSON et al., 2019). Este cenário demonstra a necessidade da realização de mais estudos que possam comprovar o benefício da metformina na prevenção, no aumento da sobrevida e na redução da proliferação do câncer de endométrio.

## 7 CONCLUSÕES

O câncer de endométrio possui taxas significativas de mortalidade e morbidade. Suas principais opções de tratamento são invasivas e os fármacos, pouco eficazes. Neste cenário, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da metformina sobre a viabilidade, ciclo celular e a expressão de RE $\alpha$ , RE $\beta$  e HIF1 $\alpha$  em linhagem celular de câncer de endométrio.

Os resultados obtidos neste estudo indicam que a metformina exerce um potencial efeito citotóxico sobre células de câncer de endométrio, que as concentrações de 15mM de metformina causam alterações do ciclo celular, ocasionando redução de células em fase G1 e aumento de células em fase S e que o fármaco não causa alterações na expressão gênica de ESR1, ESR2 e HIF1 $\alpha$  em células de câncer de endométrio.

O valor das informações obtidas é suficiente para motivar a realização de mais estudos que verifiquem o mecanismo de ação desses compostos nas células analisando em diferentes condições e que certifiquem a relevância do uso destes compostos.



## **8 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Foi observado um impacto direto da metformina sobre a viabilidade e sobre o ciclo celular na linhagem de células de câncer de endométrio, porém não foi possível identificar quais mecanismos poderiam estar levando a estes desfechos. Diversos estudos sugerem que os maiores impactos da metformina sobre as células de câncer estão intimamente relacionados com a ativação de AMPK e, conseqüentemente, inibição de mTOR. Entretanto, também existem relatos de uma inibição independente de AMPK.

Tendo em vista os resultados dos estudos clínicos demonstrando a ação promissora da metformina no tratamento do câncer de endométrio e de forma a melhor elucidar os efeitos da metformina nesse câncer, este grupo de pesquisa irá realizar novos ensaios sobre os possíveis mecanismos envolvidos neste trabalho, explorando outras vias que podem ser moduladas pela metformina.

## 9 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. [s.l.] : Artmed Editora, 2010.

AMANT, F.; MIRZA, M.; KOSKAS, M.; CREUTZBERG, C. L. Cancer of the corpus uteri. **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**, United States, v. 143 Suppl, p. 37–50, 2018.

AMANT, F. et al. Endometrial cancer. **The Lancet**, [S. l.], v. 366, n. 9484, p. 491–505, 2005.

BEN SAHRA, I. et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. **Cancer research**, United States, v. 71, n. 13, p. 4366–4372, 2011.

BERRIDGE, M. V; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, United States, v. 303, n. 2, p. 474–482, 1993.

BLOOM, J.; CROSS, F. R. Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 8, n. 2, p. 149–160, 2007.

BOKHMAN, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. **Gynecologic oncology**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 10–17, 1983.

BRASSEUR, K.; GÉVRY, N.; ASSELIN, E. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. 4008, 2017.

BRINTON, L. A. et al. Etiologic heterogeneity in endometrial cancer: Evidence from a Gynecologic Oncology Group trial. **Gynecologic Oncology**, [S. l.], v. 129, n. 2, p. 277–284, 2013.

BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13**. [s.l.] : Artmed Editora, 2018.

CANTRELL, L. A. et al Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation-implications for a novel treatment strategy. **Gynecologic oncology**, [S. l.], v. 116, n. 1, p. 92–98, 2010.

DOWLING, R. J.; NIRLAULA, S.; STAMBOLIC, V.; GOODWIN, P. J. Metformin in cancer: translational challenges. **Journal of molecular endocrinology**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. R31, 2012.

DUONG, L. M. et al Trends in endometrial cancer incidence rates in the United States, 1999-2006. **Journal of women's health (2002)**, United States, v. 20, n. 8, p. 1157–1163, 2011.

EVANS, J. M. M.; DONNELLY, L. A.; EMSLIE-SMITH, A. M.; ALESSI, D. R.; MORRIS, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. **BMJ (Clinical research ed.)**, [S. l.], v. 330, n. 7503, p. 1304–1305, 2005.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, United States, v. 136, n. 5, p. E359-86, 2015.

FRIBERG, E.; ORSINI, N.; MANTZOROS, C. S.; WOLK, A. Diabetes mellitus and risk of endometrial cancer: a meta-analysis. **Diabetologia**, [S. l.], v. 50, n. 7, p. 1365–1374, 2007.

GONG, J. et al. Diabetes, pancreatic cancer, and metformin therapy. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 5, p. 426, 2014.

HAN, Y. et al. Effect of metformin on all-cause and cardiovascular mortality in patients with coronary artery diseases: a systematic review and an updated meta-analysis. **Cardiovascular Diabetology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 96, 2019.

HANNA, R. K. et al. Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway. **Gynecologic oncology**, [S. l.], v. 125, n. 2, p. 458–469, 2012.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K.; PIKE, M. C. Toward the primary prevention of cancer. **Science (New York, N.Y.)**, United States, v. 254, n. 5035, p. 1131–1138, 1991.

INCA, Estimativa. Incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional do Câncer**, [S. l.], 2018.

KITSON, S. J. et al. PRE-surgical Metformin In Uterine Malignancy (PREMIUM): a Multi-Center, Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Trial. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 25, n. 8, p. 2424–2432, 2019.

KOURELIS, T.; SIEGEL, R. Metformin and cancer: New applications for an old drug. **Medical oncology (Northwood, London, England)**, [S. l.], v. 29, p. 1314–1327, 2011.

LEE, K. E.; SIMON, M. C. SnapShot: Hypoxia-Inducible Factors. **Cell**, United States, v. 163, n. 5, p. 1288- 1288.e1, 2015.

LESSEY, B. A. et al. Characterization of the functional progesterone receptor in an endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa): progesterone-induced expression of the alpha1 integrin. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, [S. l.], v. 59, n. 1, p. 31–39, 1996.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, United States, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LORTET-TIEULENT, J. et al. International Patterns and Trends in Endometrial Cancer Incidence, 1978–2013. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, [S. l.], v. 110, n. 4, p. 354–361, 2018.

LU, K. H.; BROADDUS, R. R. Endometrial Cancer. **The New England journal of medicine**, United States, v. 383, n. 21, p. 2053–2064, 2020.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 153–166, 2009.

MARKOWSKA, A. et al. Does Metformin affect ER, PR, IGF-1R,  $\beta$ -catenin and PAX-2 expression in women with diabetes mellitus and endometrial cancer? **Diabetology & metabolic syndrome**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 76, 2013.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. **Molecular interventions**, United States, v. 3, n. 5, p. 281–292, 2003.

MEIRELES, C. G. et al. Effects of metformin on endometrial cancer: systematic review and meta-analysis. **Gynecologic oncology**, [S. l.], v. 147, n. 1, p. 167–180, 2017.

MEIRELES, C. G. et al. Antiproliferative effects of metformin in cellular models of pheochromocytoma. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], p. 111484, 2021.

NAKAZAWA, M. S.; KEITH, B.; SIMON, M. C. Oxygen availability and metabolic adaptations. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 16, n. 10, p. 663–673, 2016.

NISHIDA, M. The Ishikawa cells from birth to the present. **Human cell**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 104–117, 2002.

ONSTAD, M. A.; SCHMANDT, R. E.; LU, K. H. Addressing the Role of Obesity in Endometrial Cancer Risk, Prevention, and Treatment. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 34, n. 35, p. 4225–4230, 2016.

PABONA, J. M. et al. Metformin Promotes Anti-tumor Biomarkers in Human Endometrial Cancer Cells. **Reproductive Sciences**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 267–277, 2020.

PECORELLI, S. **Revised FIGO staging for carcinoma of the vulva, cervix, and endometrium.** **International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics**. United States, 2009.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 143, 2014.

PURDIE, D. M.; GREEN, A. C. Epidemiology of endometrial cancer. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, Netherlands, v. 15, n. 3, p. 341–354, 2001.

RODOLAKIS, A. et al. European Society of Gynecological Oncology Task Force for Fertility Preservation: Clinical Recommendations for Fertility-Sparing Management in Young Endometrial Cancer Patients. **International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society**, England, v. 25, n. 7, p. 1258–1265, 2015.

SCHAFER, K. A. The cell cycle: a review. **Veterinary pathology**, United States, v. 35, n. 6, p. 461–478, 1998.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.

SEMENZA, G. L. HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. **Trends in Molecular Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. S62–S67, 2002.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, England, v. 3, n. 10, p. 721–732, 2003.

SESEN, J. et al. Metformin Inhibits Growth of Human Glioblastoma Cells and Enhances Therapeutic Response. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. e0123721, 2015.

SHAO, R. et al. Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma. **Journal of experimental & clinical cancer research**, [S. l.], v. 33, n. 1, p. 1–11, 2014.

SOLIMAN, P. T. et al. Risk factors for young premenopausal women with endometrial cancer. **Obstetrics and gynecology**, United States, v. 105, n. 3, p. 575–580, 2005.

SU, T. et al. Effect of metformin on colorectal carcinoma in type 2 diabetes mellitus patients: a Markov model analysis. **Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery**, China, v. 20, n. 6, p. 689–693, 2017.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SVOTELIS, A.; GÉVRY, N.; GAUDREAU, L. Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. **Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire**, Canada, v. 87, n. 1, p. 179–188, 2009.

TADAKAWA, M. et al. The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  signaling pathway in ELT-3 cells. **Molecular and cellular endocrinology**, Ireland, v. 399, p. 1–8, 2015.

TAKAHASHI, A. et al. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. **Cancer cell international**, [S. l.], v. 14, p. 53, 2014.

TANDON, M. et al. Role of Runx2 in IGF-1R $\beta$ /Akt- and AMPK/Erk-dependent growth, survival and sensitivity towards metformin in breast cancer bone metastasis. **Oncogene**, [S. l.],

v. 35, n. 36, p. 4730–4740, 2016.

TULLEDGE-SCHEITEL, S. et al. A mobile unit overcomes the challenges to monoclonal antibody infusion for COVID-19 in skilled care facilities. **J. Am. Geriatr. Soc.**, R.R. Razonable, Division of Infectious Diseases, Mayo Clinic, Rochester, MN, United States, v. 69, n. 4, p. 868–873, 2021.

URPILAINEN, E. et al. Metformin and ovarian cancer: the evidence. **Annals of Translational Medicine**, [S. l.], v. 8, 2020.

WANG, M.; YANG, Y.; LIAO, Z. Diabetes and cancer: Epidemiological and biological links. **World journal of diabetes**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 227–238, 2020.

WANG, Y. et al. Metformin induces autophagy and G0/G1 phase cell cycle arrest in myeloma by targeting the AMPK/mTORC1 and mTORC2 pathways. **Journal of experimental & clinical cancer research : CR**, [S. l.], v. 37, n. 1, p. 63, 2018.

WANG, Zheng. et al. Metformin is associated with reduced risk of pancreatic cancer in patients with type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. **Diabetes research and clinical practice**, Ireland, v. 106, n. 1, p. 19–26, 2014.

YASMEEN, A. et al. Induction of apoptosis by metformin in epithelial ovarian cancer: involvement of the Bcl-2 family proteins. **Gynecologic oncology**, United States, v. 121, n. 3, p. 492–498, 2011.

ZHANG, J. et al. Role of metformin in inhibiting estrogen-induced proliferation and regulating ER $\alpha$  and ER $\beta$  expression in human endometrial cancer cells. **Oncology letters**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 4949–4956, 2017.

ZHANG, Z. et al. Metformin for Liver Cancer Prevention in Patients with Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 97, n. 7, p. 2347–2353, 2012.

ZHAO, L. et al. Metformin induces G1 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. **Anatomical record (Hoboken, N.J. : 2007)**, United States, v. 294, n. 8, p. 1337–1343, 2011.

ZHONG, Z. et al. Anti-proliferative activity and cell cycle arrest induced by evodiamine on paclitaxel-sensitive and -resistant human ovarian cancer cells. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 16415, 2015.