

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo do efeito da metformina nas vias de sinalização
relacionadas à sobrevivência e proliferação celular em linhagens
de Feocromocitoma**

Brasília
2018

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Estudo do efeito da metformina nas vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação celular em linhagens de Feocromocitoma

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Brasília
2018

CINTHIA GABRIEL MEIRELES

Estudo do efeito da metformina nas vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação celular em linhagens de Feocromocitoma

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni - Universidade de Brasília

Membro interno ao PPGCF

Prof. Dra. Angélica Amorim Amato - Universidade de Brasília

Membro externo ao PPGCF

Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari - Universidade de Brasília

Membro externo à UnB

Prof. Dr. Mário José Abdalla Saad - Universidade Estadual de Campinas

Dedico este trabalho...

...Aos meus pais, Antônio e Maize, que sempre apoiaram as minhas decisões, me oferecendo todas as condições para que eu alcançasse os meus objetivos.

...Às famílias acometidas por mutações nos genes relacionados à patogênese do feocromocitoma. A força de vocês é a minha inspiração!

Agradecimentos

A Deus, minha força maior. Não conseguiria ter dado todos esses passos na ausência Dele. Nesse caminho difícil e de muitos sacrifícios, Ele nunca me faltou. Muito obrigada por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para sempre seguir em frente. À minha querida santinha, Nossa Senhora do Carmo, minha guia e protetora, minha mãe! Que mesmo eu sendo uma filha tão ausente, ela nunca me faltou!

Ao meu querido orientador Professor Luiz, quanta coisa aprendi nesses últimos anos com o senhor, como cresci! Levarei sempre esse exemplo de pessoa e de professor para a vida! Muito obrigada por ter compartilhado comigo o seu conhecimento, o seu tempo, suas aulas (não é à toa que os seus alunos da graduação amam suas aulas de Química Farmacêutica), os chocolatinhos, os pistaches e as marmitas (e que comida boa!). Muito obrigada por me orientar, me incentivar e me ensinar valores para a vida! Serei eternamente grata e sua admiradora!

À minha querida coorientadora Professora Adriana, que exemplo de ser humano! Como sou grata por cada instante de compartilhamento de ideias, de conhecimento, de lições, das risadas... Obrigada por acreditar nos meus sonhos (às vezes mais que eu mesma) e por cada palavra de incentivo. Pode acreditar que muitas vezes, quando nos falta forças para continuar, essa força incrível vem de você (não foi à toa que no passado apelidaram-lhe de “mulher-maravilha”)! Sempre será minha grande inspiração como pessoa e profissional!

Aos meus amados pais, Antônio e Maize, meus alicerces em todos os momentos da minha vida. Sempre presentes, nunca pouparam esforços para que eu e minhas irmãs pudéssemos alcançar uma boa posição na vida. Obrigada por serem tão presentes, prestativos, por sempre me motivar a seguir em frente nas minhas escolhas e por compreender minha ausência nesses últimos anos que eu me dediquei à pós-graduação. Vocês são meus tesouros!!!

Às minhas queridas irmãs, Camila e Carina, minhas cúmplices e amigas! À Camila, que me recebeu com todo carinho do mundo quando cheguei em Brasília, deu-me todo suporte para

iniciar minha vida naquele período. Não teria chegado até aqui sem a sua ajuda! À Carina, que mesmo tão longe, está tão perto, obrigada por tudo!

À minha querida vizinha Teresinha, muito obrigada pelos incentivos, carinho e amor incondicional. Obrigada ainda pelas ajudas quando precisei e pela compreensão da minha ausência. A senhora foi muito importante nessa caminhada!

Aos meus tios e tias, primos e primas, meu muito obrigada por estarem sempre presentes e pelas palavras de incentivo!

À querida Professora Eliete, a qual considero também minha orientadora! Quanta coisa boa aprendi com a senhora, quanto conhecimento compartilhado. Além de termos um grande amor em comum (Londres), foi a senhora quem me apresentou o fantástico mundo das revisões sistemáticas e por ele me apaixonei. Fazer minha primeira revisão não foi nada fácil, um caminho cheio de obstáculos, mas a senhora com o seu otimismo contagiante, conhecimento e força de vontade fez com que ao final tudo desse certo (e como deu certo)! Muito obrigada pelos incentivos, colaborações, momentos inesquecíveis e, acima de tudo, pela amizade!

Ao Professor Francisco Neves, grande incentivador da pesquisa e do conhecimento, o meu muito obrigada! Obrigada por ser um coordenador presente, prestativo, sempre disposto à ajudar e a compartilhar conhecimento! O senhor é um grande exemplo de pesquisador e uma grande inspiração! Muito obrigada pela oportunidade de trabalhar com pessoas incríveis!

À querida Professora Fátima, o meu muito obrigada por toda ajuda! Quantas vezes esteve presente, quantas vezes tirou minhas dúvidas, quantas vezes preocupou-se, quanta conversa boa, quantos bolos maravilhosos você fez e compartilhou conosco (o de banana é o melhor)! Muito obrigada pelo carinho e dedicação!

Ao Professor Paul Chapple da Queen Mary University of London, que me recebeu com todo carinho do mundo. Instruiu-me e deu-me a oportunidade de conhecer um mundo

completamente diferente ao qual eu estava acostumada. Muito obrigada pelo carinho e pela atenção!

À querida Professora Djane, pela alegria que contagiava, pelas lições, compartilhamento de ideias e pela amizade!

Aos grandes e queridos amigos/colegas do Laboratório de Farmacologia Molecular (FarMol) e do Laboratório de Histologia Bucal:

À Carolzinha Lourenço, minha grande amiga, minha grande inspiração como pessoa e pesquisadora! Agradeço a Deus sempre por ter colocado você no meu caminho! Você sabe o quanto foi importante durante todo o meu percurso na pós-graduação (mestrado e doutorado). Muito obrigada por ter dedicado o seu tempo a ensinar-me e ajudar-me nos momentos que mais precisava. Quando me sentia perdida, quando um resultado era completamente incompreensível, você era quem me salvava! Obrigada pela amizade fraterna, pelas risadas contagiantes, pelos conselhos de amiga e pela dedicação! Tenho certeza que será uma amizade para a vida!

Ao meu irmão, presente que a vida me deu durante a pós-graduação, Sidney ou Sidzinho! Quanta gratidão tenho por ter você como amigo, colega/pesquisador. Quantas coisas vivemos juntos nesse período: sofremos juntos, rimos muito juntos, brigamos muito e segundos depois já estávamos rindo de novo! Nossa relação é realmente uma relação de irmandade! Obrigada por tudo, por me ajudar nos experimentos, por compartilhar conhecimento, pelas idas ao Mendes (o nosso bar copo sujo) e ao RU, pelo companherismo e pela preocupação. Certeza que nossa irmandade veio de outras vidas e seguirá sempre em frente!

À Ana Elizia, grande amiga que ganhei nesses últimos anos! Como você foi importante nesse período, como nossa amizade cresceu! Foram muitos momentos, muitas risadas e descontração, muitas idas à biblioteca, muitas angústias compartilhadas, tudo para fortalecer nossa amizade que eu tenho certeza que perdurará por anos!

À minha grande amiga que a pós me deu, Dani Fortunato! Começamos juntas a investigação sobre os efeitos da metformina no câncer, vivemos momentos memoráveis juntas, crescemos juntas na pesquisa! Minha querida amiga, nossa amizade se perpetuará por anos e anos!

Ao meu amiguinho Henrique, meu fiel escudeiro! Quantas vezes salvou-me, quantas vezes brigamos e desbrigamos, quantas vezes estive presente durante essa caminhada! Muito obrigada por tudo, e acima de tudo, pela amizade!

À Bia e à Olívia, companheiras do início dessa jornada! Vocês duas apresentaram-me a vida real de um pós-graduando, me acompanharam em experimentos, compartilharam conhecimento e risadas! Muito obrigada por cada momento vivido! A amizade de vocês foi muito importante por todo esse tempo!

À Dani Gurgel, minha querida amiga viajada! Quantos momentos passamos juntas, quanta conversa boa, quanta cumplicidade! Nunca me esquecerei da nossa viagem (a minha primeira viagem dos sonhos), quando fomos para o meu primeiro congresso internacional, quando chegamos ao celeiro da ciência e vimos onde tudo começou (Universidade de Oxford), foi realmente um grande momento vivido durante o doutorado! Muito obrigada por tudo!

À Gleice, minha querida amiga (só porque está longe – brincadeira!)? Muito obrigada pelas ajudas, pela amizade, pelas brigas e reconciliações! Pode não parecer, mas eu gosto muito de você!

À minha querida amiga Simone! Muito obrigada pela amizade, por estar presente quando precisei de ajuda, pela paciência, pelas conversas e risadas! Foi muito bom os momentos que compartilhamos!

À minha querida amiga Carol Martins, minha conterrânea! Muito obrigada pela amizade incondicional, pelas ajudas sempre que precisei e pela paciência! Você foi muito importante durante esses últimos anos!

Ao Gabriel Borges, meu grande amigo e professor de inglês, presente que a pós-graduação me

deu! Muito obrigada pelas inúmeras ajudas, conselhos, dicas de experimentos e pela amizade!

À minha amiga Bel, minha companheira de bancada! Quantas coisas você me ensinou (os primeiros géis), quantos momentos vivemos, quantas risadas! Obrigada por tudo!

À minha querida amiga Luciana Valadares, minha companheira de revisão! Lu, não tenho palavras para expressar a gratidão que sinto por você, pela ajuda gigantesca que você deu na nossa revisão, foi difícil mas conseguimos! Obrigada pelo companheirismo e pela amizade!

Às minhas queridas amigas, Fernanda, Bruna, Nady e Louise! Muito obrigada por toda ajuda, pelo companheirismo e pela amizade!

Ao meu grande amigo Rafa, como sou grata pela nossa amizade, que começou logo quando eu cheguei ao FarMol e ela só se fortalece! Muito obrigada por tudo!

À minha querida Nara, quanto eu sou grata à você! Muito obrigada por tudo, pelo carinho, pelo amor incondicional ao FarMol, pelos cafés, pães e roscas deliciosos de todo dia de tarde! Você sabe que eu devo muito à você! Muito obrigada!

À querida Maria Isadora, que mesmo sendo assim, desligada da vida, foi muito importante nessa caminhada! Muito obrigada por tudo!

Aos meus alunos de TCC, Anyk Martins e Rafael Miranda, muito obrigada pelas ajudas na condução dos experimentos e pelo tempo de dedicação. Esse trabalho também é de vocês.

À minha amiga Laiza, muito obrigada por toda ajuda e disposição! Você foi muito importante nessa caminhada!

À minha amiga Sarah Caixeta, muito obrigada pelas ajudas, pela amizade e pela paciência!

À todos os alunos do FarMol que de certa forma contribuíram para que esse trabalho se concretizasse, o meu muito obrigada à (ao): Stela, Mariella, Kaian, Camylla, Alexandre,

Michelly, Pedro, Adria, Marielly, Amanda, Palloma Soares, Paloma Almeida, Hanna, Sarah, Luís Alberto, Raiza e Alessandra.

Aos professores do FarMol: Professora Angélica, Professora Marília, Professor Guilherme e Professora Marie! Muito obrigada pela ajuda, pelas dúvidas sanadas, pelos momentos juntos!

À todos os alunos do Laboratório de Histopatologia Bucal que de certa forma contribuíram para que esse trabalho se concretizasse: Bruna, Dani Assad, Cláudio, Isabela, Andreinha, Andreiona, Ana Gabriela e Augusto.

À Professora Ana Carolina, muito obrigada pelos incentivos e pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Histopatologia Bucal com pessoas tão incríveis.

À minha amiga Lídia, muito obrigada por toda ajuda, pela amizade e pelo cuidado que tem com todos nós do laboratório!

À minha amiga italiana, Lisa Romano! Sou muito grata pela sua amizade, ajuda e preocupação!

À Teisha por toda ajuda e suporte dado quando estive no Centro de Endocrinologia da QMUL pela primeira vez.

Às mãezinhas dos meus amigos, que com todo amor do mundo mimaram-me com deliciosas comidinhas durante o meu doutorado. Muito obrigada, dona Angelice (mãe do Henrique), dona Célia (mãe do Rafa), dona Edna (mãe da Isadora) e a dona Cândida (mãe da Carol)!

À Rilva, ao Luciano e aos estagiários por toda dedicação!

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF) inicialmente pela concessão dos recursos de Demanda Espontânea para realização dos experimentos (Edital 03/2015) e pelo auxílio concedido para realização de dois Congressos Internacionais e duas Visitas técnicas internacionais ao Centro de Endocrinologia da Queen Mary University of London.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

*“Coragem! Mais vale errar, se arrebatando, do que
poupar-se por nada!”*

Darcy Ribeiro

Resumo

MEIRELES, Cinthia Gabriel. **Estudo do efeito da metformina nas vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação celular em linhagens de Feocromocitoma.** Brasília, 2018. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Os feocromocitomas são tumores neuroendócrinos raros, derivados de células cromafins que se localizam na medula das glândulas adrenais, sendo responsáveis pelo armazenamento, síntese e secreção de catecolaminas. Pacientes acometidos por este tipo de tumor apresentam alto risco de doenças cardiovasculares e as opções terapêuticas são pouco efetivas. Pensando nisso, o objetivo desse estudo foi investigar o efeito da metformina nas vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação celular em linhagens celulares de feocromocitoma. Os métodos selecionados para este estudo foram: viabilidade das células de feocromocitoma, por MTT, exclusão por azul de tripan; ensaio de proliferação das células de feocromocitoma com incorporação de BrDu; coloração com cristal de violeta. Ensaio de western blot para avaliar: caspase 3, via de proliferação celular AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α e inibição do proteassoma em células de feocromocitoma de ratos; Ensaio de expressão dos genes: isoformas da *HIF*, *VEGFA* e *VEGFR*, *ADM* e *ANGP* em cultura primária de feocromocitoma; Imunofluorescência para KI-67, DAPI e DRP-1; Ensaio de peroxidação lipídica; ensaio de respiração celular. Os resultados mostraram que o sunitinibe (fármaco padrão) e a metformina reduzem a viabilidade das células de fibroblasto em 60% pelo método de MTT, mas não altera pelo ensaio de azul de tripan, em contrapartida, nas células de feocromocitoma, a viabilidade é reduzida em aproximadamente 50% e 60%, respectivamente. A redução da proliferação chega a 40% tanto com sunitinibe quanto com metformina nas células de feocromocitoma. A metformina parece alterar a viabilidade das células tumorais com efeito agudo. A clivagem da caspase 3 e a modificação da via AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α , ocorreu apenas quando as células foram tratadas com metformina. Tanto a metformina quanto o sunitinibe promovem alterações nucleares que sugerem apoptose. A metformina só altera a expressão do gene VEGFR e induz a degradação da HIF pelo proteassoma das células de feocromocitoma. Metformina modifica a dinâmica mitocondrial de células silenciadas para o gene VHL via Drp-1. Os resultados sugerem que a metformina induz a peroxidação lipídica, inibe e altera todos os parâmetros da respiração celular e, em concentrações baixas reduz a respiração de células silenciadas para os genes VHL

e SDHB. Como conclusão, os resultados deste estudo sugerem que a metformina: a. regular a viabilidade de células de feocromocitoma e de fibroblastos de pele humana, mas esse efeito seletivo ocorre em condições agudas; b. induz a apoptose celular via caspase 3 e inibe a proliferação celular via AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α ; a metformina não modifica a via AMPK/PTEN/AKT nas células da cultura primária, mas modifica mTOR/p70S6K/HIF1 α ; a metformina aumenta a degradação da HIF e diminui o recrutamento de DRP-1 pela mitocôndria de células de feocromocitoma; a metformina reduz o consumo de oxigênio nas células PC-12 Adh normais e silenciadas para os genes VHL e SBHB.

Palavras-chaves: Feocromocitoma; cultura primária de feocromocitoma; metformina; sunitinibe; VHL; SDHB.

Abstract

MEIRELES, Cinthia Gabriel. **The effect of metformin in survival and proliferation partway in pheochromocytoma cell line.** Brasília, 2018. Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Pheochromocytomas are rare neuroendocrine tumours derived from chromaffin cells of the adrenal medulla. They are responsible for catecholamines synthesis and secretion. The hypersecretion of catecholamines is associated with a high risk of cardiovascular complications. Malignancy and recurrence are rare but still demands effective treatment. Accordingly, the aim of this work was evaluate the effects of metformin on the survival and proliferation of pheochromocytoma cells. The selected methods were: PC12-Adh pheochromocytoma viability evaluated by MTT after treatment of metformin; viability by tripan blue exclusion; proliferation assays with BrDU incorporation; proliferation by violet crystal staining. The western blot was used to evaluate the caspase 3 cleavage; the activity/expression of AMPK/ PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α partway and the proteasome inhibition. The mRNA of *HIF*, *VEGFA* e *VEGFR*, *ADM* and *ANGP* expression were evaluated in pheochromocytoma primary culture by qPCR. Immunofluorescences of KI-67, DAPI e DRP-1 were conducted in PC-12 Adh cells. The determination of O₂ consumption was evaluated in PC-12 Adh scramble and VHL and SDHB silencing using a respirometer. A lipid peroxidation assay was performed to evaluate cellular stress. The results show that sunitinib 8 μ M and metformin 20mM reduced the fibroblast viability in 60% by MTT assay and did not modify in the tripan exclusion assay, however sunitinib and metformin reduced the pheochromocytoma cell viability in 50 and 60% by tripan blue exclusion. The pheochromocytoma cells proliferation was reduced by 40% with a both, sunitinib and metformin and the effect of metformin in pheochromocytoma cells was might acute. Metformin 20mM in 48h reduced the caspase 3 cleavage while sunitinib did not however sunitinib and metformin modified the nucleus structure. Metformin reduced the activation of proteins of the AMPK/PTEN/AKT/mTOR pathway in PC-12 Adh, which suggests impairment of growth and cell proliferation and decreased the *VEGFR* mRNA levels of pheochromocytoma primary culture. The proteasome of PC-12 Adh was inhibited by metformin treatment, as well as the Drp-1 recruitment by mitochondria. In metformin-treated PC12-Adh PHEO cell, the cellular lipid peroxidation was also increased, and the O₂

consumption decreased in the same cells as well as in PC-12 Adh silencing for SDHB and VHL with metformin 10mM. Finally, the results suggest that metformin has a moderate inhibitory effect on the viability of PC12-Adh PHEO cells and in fibroblast cells, and this effect might be acute in pheochromocytoma cells.

Moreover, metformin treatment induced the apoptosis and positive modulation of the AMPK/PTEN/AKT/mTOR signaling pathway in PC-12 Adh cells, and modify the activity/expression of mTOR, p70S6K and HIF1 α in primary culture. Metformin might modify the mitochondria dynamic and increased the HIF degradation by proteasome. This effect is associated with enhanced lipid peroxidation and decreased O₂ consumption by those cells, which are both suggestive of increased cellular stress. Altogether our results corroborate the hypothesis of an inhibitory effect of metformin on PHEO cellular proliferation *in vitro*.

Key-words: Pheocramocytoma; primary cultura of pheochromocytoma; metformin; sunitinib; VHL; SDHB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da síntese de catecolaminas nas células cromafins e reações de hidroxilação e descarboxilação na síntese de catecolaminas.....	29
Figura 2. Estrutura química do sunitinibe.....	33
Figura 3. Estrutura química da metformina.....	34
Figura 4. Mecanismo molecular da metformina com efeito antineoplásico.....	38
Figura 5. Ensaio de viabilidade por MTT nas células PC-12 Adh.....	48
Figura 6. Bloqueio dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e curva de consumo de oxigênio.....	63
Figura 7. Viabilidade das células de pele humana tratadas com sunitinibe e metformina avaliada pelo método MTT.....	67
Figura 8. Viabilidade das células de pele humana e de feocromocitoma tratadas com sunitinibe e metformina avaliada pelo método de exclusão celular.....	69
Figura 9. Proliferação das células de feocromocitoma tratadas com sunitinibe e metformina avaliada pelo método de incorporação cpm BrDu.....	70
Figura 10. Proliferação das células de feocromocitoma e de pele humana tratadas com metformina avaliada pelo método de coloração com cristal de violeta.....	71
Figura 11. Proliferação das células de feocromocitoma tratadas com metformina avaliada por marcação com KI-67.....	72
Figura 12. Clivagem da caspase 3 das células de feocromocitoma tratadas com sunitinibe avaliada por Western Blot e imunomarcação com DAPI.....	73
Figura 13. Clivagem da caspase 3 das células de feocromocitoma tratadas com metformina avaliada por Western Blot e imunomarcação com DAPI.....	74
Figura 14. Expressão e atividade de proteínas da via PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α de células de feocromocitoma tratadas com sunitinibe.....	76
Figura 15. Expressão e atividade de proteínas da via PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α de células de feocromocitoma tratadas com metformina.....	77
Figura 16. Expressão e atividade de proteínas da via PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α de células de cultura primária de feocromocitoma tratadas com metformina.....	79
Figura 17. Expressão genes relacionados à angiogênese em células de cultura primária tratadas com metformina.....	81
Figura 18. Inibição do proteassoma promovido pela metformina em células de feocromocitoma tratadas com metformina.....	82

Figura 19. Imunomarcação com Drp-1 em células de feocromocitoma tratadas com metformina.....	84
Figura 20. Estresse das células de feocromocitoma tratadas com metformina.....	85
Figura 21. Respiração celular nas células de feocromocitoma e de pele humana tratadas com metformina.....	88
Figura 22. Respiração celular nas células de feocromocitoma tratadas com metformina.....	89
Figura 23. Respiração celular nas células de feocromocitoma mutadas para o gene VHL tratadas com metformina.....	92
Figura 24. Respiração celular nas células de feocromocitoma mutadas para o gene SDHB tratadas com metformina.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características de diferentes linhagens de células de feocromocitoma.....	47
Tabela 2. Concentrações de anticorpos primários e secundários utilizados no Western Blot	53
Tabela 3. Concentrações de anticorpos primários e secundários utilizados na Imunofluorescência.....	54
Tabela 4. Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	58
Tabela 5. Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq) por <i>TaqMan</i> ®.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - difosfato de adenosina
ADM - adrenomedulina
AKT - *serine/threonine protein kinase Akt*
AMP - monofosfato de adenosina
AMPK - proteína quinase ativada por AMP
ANGP - angiopoetina
ARNT – ou HIF1 β - *hypoxia-inducible factor 1-beta* - fator indutor de hipóxia 1 beta
ATP - *adenosine monophosphate* - trifosfato de adenosina
BSA - albumina do soro bovino
CaMKK2 - proteína quinase 2 dependente de cálcio calmodulina
c-kit - *stem cell factor* - receptores de células-tronco
CHGA - cromogranina A
CI₅₀ - 50% da concentração inibitória máxima
COMT - catecol O-metiltransferase
CoQ - *coenzima Q* - coenzima Q
DAPI - diidrocloreto de 4',6-diamidina-2'-fenilindol
DBH - dopamina β -hidroxilase
DDC - dopadescarboxilase
DMSO - dimetilsufóxido
DNA - *deoxyribonucleic acid* – ácido deoxiribonucleico
Drp1- *dynamic-related protein* –proteína relacionada à dinâmica
EPM - erro padrão médio
ERK - *extracellular signal-regulated kinases* - quinase que regula o sinal extracelular
FADH₂ - *flavin adenine dinucleotide* - dinucleótido de flavina e adenina Reduzida
FEO - feocromocitoma
FCS - soro neonatal
FLT3 - *fetal liver tyrosine kinase receptor 3*
GAPDH - *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*
GDP - *guanosine diphosphate* - guanosina difosfato
GLP1 - *glucagon-like peptide-1* - peptídeo semelhante ao glucagon 1
GLUT 1 - *glucose transporter 1* - transportador de glicose 1
GLUT 4 - *glucose transporter 4* - transportador de glicose 4
GPCR - *G protein-coupled receptors* - receptor acoplado a proteína G
HIF1 α - *hypoxia-inducible factor 1-alpha* - fator indutor de hipóxia 1 alfa
HIF2 α - *hypoxia-inducible factor 2-alpha* - fator indutor de hipóxia 2 alfa

HMGC_oA - *3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase* - coenzima A 3-hidroxi-3-metilglutaril

hPheo - *human pheochromocytome*

HRE - *hormone response element*

IGF-1- *insulin-like growth factor 1* - fator de crescimento 1 semelhante a insulina

IGF1R- *insulin-like growth factor 1 receptor* - receptor 1 do fator de crescimento semelhante à insulina

IGF-BP3 - *insulin-like growth factor-binding protein 3* - fator de crescimento ligada a proteína 3 semelhante a insulina

IR - *insulin receptor* - receptor de insulina

IRS1 - *insulin receptor substrate 1* - substrato 1 do receptor de insulina

LKB1 - *liver kinase B1* - proteína quinase B1 do fígado

MATE - *aluminum-activated citrate transporter*

MAX - *MYC associated fator X*

MCT4 - *monocarboxylate transporter 4*

MPC - *mouse pheochromocytoma*

MYC - *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

mTOR - *mammalian target of rapamycin* - alvo da rapamicina em mamíferos

MTT - *3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* - brometo de difeniltetrazolium

MTT - *mouse tumor tissue*

NADH - *nicotinamide adenine dinucleotide reduced* - dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida

nfl - *neurofibromatose 1 gene*

NGF – *nerve growth factor*

NGFR – receptor do fator de crescimento do nervo

OCT1- *organic cation transporter 1*

OCTN1- *organic cation transporter 1*

P53- *protein 53* - proteína 53

PGL - paraganglioma

PKA - *protein Kinase A* - proteína quinase A

PMAT - *plasma membrane monoamine transporter*

PNMT-*feniletanolamina-N-metiltransferase (phenylethanolamine-N-methyltransferase.*

PTEN - *phosphatase and tensin homolog* - fosfatase e homólogo de tensina

Raf - *fibrosarcoma rapidly accelerated*- fibrosarcoma rapidamente acelerado

RagGTPase - *enzyme Ras-related GTP*

RAPTOR - *regulatory-associated protein of mTOR* - proteína regulatória associada ao mTOR

PDGFR - *platelet-derived growth factor receptor* - receptores de fator de crescimento derivado de plaquetas

RET - *rearranged during transfection protooncogene*

RHE - *Ras homolog enriched in brain* - proteína homóloga do Ras enriquecida do cérebro

S6K - *ribosomal protein S6 kinase* - proteína ribossomal 6 quinase

SBF - soro bovino fetal

SDHX - succinato desidrogenase

SLC22A - *amphiphilic Solute Transporter branch*

TAK1- *TGF- β activated kinase 1* - quinase 1 ativada por TGF- β

TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances*

TBST – tampão Tris adicionado Tween 20

TH- tirosina hidroxilase

TMEM127- *transmembrane protein 127* - proteína transmembrana 127

TSC1/ TSC2- *tuberous sclerosis 1/ tuberous sclerosis 2*

VEGFA – *vascular endothelial growth factor A*- fator de crescimento A relacionado ao endotélio

VEGFR - *vascular endothelial growth factor A receptor*- receptor do fator de crescimento A relacionado ao endotélio

VHL-*Von Hippel-Lindau*

SUMÁRIO

Resumo	13
1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DA LITERATURA	28
2.1 GLÂNDULAS ADRENAIS.....	28
2.2 FEOCROMOCITOMAS	30
2.2.1 Maleato de Sunitinibe	33
2.2.2 Hidrocloridrato de Metformina	34
2.2.3 Estudos clínicos que avaliaram o efeito antitumoral da metformina	36
2.2.4 Estudos moleculares propostos para o efeito antitumoral da metformina	37
3. OBJETIVO	45
3.1 Objetivo Geral	45
3.2 Objetivos Específicos.....	45
4. MÉTODOS	46
4.1 LINHAGENS CELULARES	46
4.2 COMPOSTOS E CONTROLES TESTADOS.....	47
4.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	48
4.3.1 Ensaio de viabilidade celular com base na atividade mitocondrial – método MTT	48
4.3.2 Ensaio de viabilidade celular com base na integridade da membrana celular – Método de coloração com azul de Tripán	49
4.3.3 Ensaio de proliferação celular – Método de incorporação por BrDU.....	50
4.3.4 Ensaio de proliferação celular – Método coloração com cristal de violeta.....	50
4.4 EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS – MÉTODO WESTERN BLOT	51
4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA – MARCAÇÃO COM KI-67, DRP-1 E DAPI	54
4.6 CULTURA PRIMÁRIA DE FEOCROMOCITOMA	55
4.6.1 Caso clínico	55
4.6.2 Transporte do tumor e cultivo celular	55
4.6.3 Caracterização da cultura primária	56
4.6.4 Expressão relativa de genes relacionados à angiogênese em cultura primária de feocromocitoma.....	56
4.7 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS).....	61
4.8 ENSAIO DE RESPIRAÇÃO CELULAR.....	62

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DADOS EXPERIMENTAIS	64
5 RESULTADOS	65
5.1 ENSAIOS DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	65
5.1.1 Ensaio de viabilidade celular baseado na atividade mitocondrial – Método MTT..	65
5.1.2 Ensaio de viabilidade celular baseada na integridade da membrana celular – Método de coloração com azul de Tripán.....	67
5.1.3 Ensaio de proliferação celular – Método de incorporação por BrDu.....	68
5.1.4 Ensaio de proliferação celular – Método coloração com cristal de violeta.....	69
5.1.5 Ensaio de proliferação celular – Marcação com KI-67.....	69
5.2 EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE VIAS APOPTÓTICAS E PROLIFERATIVAS – MÉTODO WESTERN BLOT.....	72
5.2.1 Avaliação da expressão da clivagem da Caspase 3 e sinais apoptóticos nas células PC12-Adh.....	72
5.2.2 Avaliação da expressão e da atividade das proteínas da via AMPK/PTEN/AKT ...	75
/mTOR/p70S6K/HIF1 α	75
5.2.3 Avaliação da expressão e da atividade das proteínas da via AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α da cultura primária	78
5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA CULTURA PRIMÁRIA	79
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NA DEGRADAÇÃO PROMOVIDA PELO PROTEASSOMA.....	82
5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NA DINÂMICA MITOCONDRIAL	83
5.6 ESTRESSE CELULAR E RESPIRAÇÃO DAS CÉLULAS PC12-ADH	85
5.6.1 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS)	85
5.6.2 Ensaio de respiração celular	86
5.6.3 Avaliação da respiração celular em células silenciadas para os genes VHL e SDHB..	90
6. DISCUSSÃO	95
7. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	108
ANEXO A	117
ANEXO B	131
APÊNDICE A	132
APÊNDICE B	134

1. INTRODUÇÃO

Os feocromocitomas (FEO) são tumores neuroendócrinos raros, derivados de células cromafins do eixo simpático adrenomedular. Localizam-se na medula das glândulas adrenais sendo responsáveis pelo armazenamento, síntese e secreção de catecolaminas, mais precisamente, epinefrina, norepinefrina e dopamina (LENDERS e col., 2014). Mais raramente, podem ser encontradas em paragânglios da base do crânio chegando até a bifurcação das artérias ilíacas, podendo estar presente em: cérebro, abdômen, pelve, cabeça, pescoço e tórax. Tumores derivados de células cromafins dessa região são denominados feocromocitomas extra-adrenais ou paragangliomas (PGL) (MELMED e col., 2011).

A incidência do feocromocitoma e paraganglioma (FEO/PGL) é de 2 a 5 pacientes por milhão por ano (PILLAI e col., 2016) e na maioria dos casos apresentam comportamento benigno (DE WAILLY e col., 2012; THAI e col., 2015). Entretanto, (FEO/PGL) estão associados à elevada morbi-mortalidade devido à autonomia na hipersecreção desregulada das catecolaminas, estando relacionadas às emergências cardiovasculares resultantes (LENDERS e col., 2014). Os FEO de comportamento maligno representam cerca de 10%, enquanto que os PGL malignos podem variar de 20-40% do total (DE WAILLY e col., 2012).

As manifestações clínicas mais comuns observadas em pacientes com FEO são hipertensão arterial sistêmica - que pode ser paroxística ou não -, cefaleia, diaforese e palpitações (PARENTI e col., 2012). O tratamento é feito com base na situação clínica do paciente e no comportamento do tumor, visando inicialmente a remoção cirúrgica e a supressão da secreção endócrina de catecolaminas (DE WAILLY e col., 2012; PAPPACHAN e col., 2014).

Recentemente, novas terapias alvo-dirigidas vêm sendo estudadas e indicadas para o tratamento do FEO, tais como os inibidores multialvo de receptores tirosina-quinase (sunitinibe e sorafenibe). Os mecanismos de ação desses fármacos envolvem inibição de fatores de crescimento, entretanto, seus efeitos ainda são variáveis e parecem depender de outras vias intracelulares envolvidas na tumorigênese (PAPPACHAN e col., 2014). Desta forma, embora raros, a grande limitação no tratamento de FEO/PGL malignos gera suporte na

busca por novos alvos-farmacológicos que, principalmente, tenham baixo risco de efeitos adversos, seguridade comprovada e alta efetividade.

A metformina ou dimetilbiguanida é um fármaco classificado como antidiabético oral, amplamente utilizado no tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2. Seu principal efeito envolve aumento da glicólise e glicogênese e diminuição da glicogenólise e gliconeogênese (PERNICOVA & KORBONITS, 2014) podendo, ainda, aumentar o consumo da glicose no músculo esquelético e no fígado (DENORME e col., 2014).

Nos últimos anos, foi observado em estudos clínicos e epidemiológicos, um potencial efeito da metformina sobre a sobrevida global, redução de marcadores biológicos de vias tumorigênicas e prevenção de diversos tipos de câncer, tais como: tireoide (TSENG, 2014), mama (MARTINEZ e col., 2016), fígado (ZHANG e col., 2012), pâncreas (WANG e col., 2014), próstata (HWANG e col., 2015), dentre outros.

Recente revisão sistemática realizada pela autora do presente estudo e colaboradores incluiu 19 estudos (coortes prospectivas e retrospectivas, estudos clínicos, serie de casos e relato de caso) que correlacionaram os efeitos da metformina sobre o câncer de endométrio e hiperplasia endometrial atípica. Apesar de representarem baixa evidência científica, diversos relatos e series de casos mostraram reversão da hiperplasia endometrial atípica em pacientes tratadas com metformina. Já os estudos prospectivos que avaliaram expressão em tecido removido por biópsia de marcadores de proliferação, por imunohistoquímica, antes e depois do tratamento dos pacientes com metformina demonstraram, de modo geral e de acordo com a metáanálise de proporção, que a imunomarcção desses marcadores reduziram após tratamento. Apesar da heterogeneidade das coortes retrospectivas, nesses estudos a metformina também melhorou a sobrevida global de pacientes quando comparados com grupos que não faziam o uso de metformina (ANEXO A) (MEIRELES e col., 2017).

Os efeitos da metformina nestes tumores podem estar relacionados a mecanismos moleculares que envolvam estimulação de vias de apoptose ou vias supressoras tumorais e inibição de vias de proliferação e crescimento celular (DOWLING e col., 2012). Entretanto, estes mecanismos encontram-se em investigação inicial e necessitam ainda ser melhor elucidados em uma variedade de tumores com comportamento distinto e não justificam, até o momento, o uso clínico da metformina com a finalidade terapêutica no câncer.

Os mecanismos que levam a um efeito da metformina sobre o crescimento de células de FEO/PGL ou de outros tumores neuroendócrinos ainda não estão completamente esclarecidos. Por outro lado, os efeitos antiproliferativos e apoptóticos foram explorados em células de mesma origem embrionária que os feocromocitomas, como as células de neuroblastoma, glioma e glioblastoma. Estes estudos mostraram que a metformina induziu à apoptose (KUMAR e col., 2014; LEVESLEY e col., 2013) e inibiu a proliferação celular, principalmente pela modulação negativa de vias relacionadas a AMPK/mTOR (5' AMP-activated protein kinase/ mammalian target of rapamycin) (COSTA e col., 2014; SESEN e col., 2015).

Um estudo conduzido por Min Li e colaboradores (2017) utilizando células de feocromocitoma de ratos (PC12-Adh) mostrou que a metformina modulou negativamente a via de proliferação celular AMPK/mTOR/ERK. Neste trabalho, o tratamento foi conduzido com concentrações progressivas de metformina (concentração máxima de 50mM), sugerindo um efeito dose-dependente. Além de inibir a proliferação celular pela via AMPK/ERK, o trabalho de Min Li mostrou que a metformina induziu a apoptose e a parada do ciclo celular (MIN LI e col., 2017).

A ativação de AMPK e, conseqüentemente, a modulação negativa do mTOR compreendem uma via de sinalização intracelular que está relacionada à regulação do metabolismo energético celular. A metformina atua como um inibidor do Complexo I ou NADH desidrogenase da cadeia de transporte de elétrons (PERNICOVA & KORBONITS, 2014). Como resposta à inibição do Complexo 1, a ATP sintase reduz a síntese ATP e conseqüentemente gera aumento dos níveis de seus precursores AMP e ADP. Essas duas moléculas aumentadas em relação ao ATP dentro da célula ativam AMPK, uma enzima que funciona como o principal “sensor” do estado metabólico da célula. Adicionalmente, o aumento do AMPK resulta em fosforilação de uma cadeia de moléculas sinalizadoras que resultam em redução da proliferação celular concomitantemente aos ajustes metabólicos induzidos pelo estado de estresse energético celular. De forma geral, relativamente pouco se sabe a respeito dos mecanismos pelos quais a metformina regula a respiração celular e conseqüentemente o metabolismo energético, e tendo como consequência a modulação de vias que podem inibir o crescimento de tumores.

Interessantemente, a fisiopatologia de FEO/PGL envolve fatores genéticos em número significativo dos casos, os quais estão relacionados à progressão e à recorrência tumoral. Mutações germinativas nos genes *VHL* (*Von Hippel-Lindau*) e *SDHX* (*Succinato Desidrogenase*) geram hipóxia e pseudo-hipóxia, respectivamente, o que favorece o crescimento de FEO/PGL devido ao aumento de transcrição de genes associados à angiogênese. Até o momento não existem estudos que esclareçam os efeitos da metformina na respiração e metabolismo celular desse tipo de tumor, bem como os possíveis defechos na proliferação celular especificamente em tumores *VHL* e *SDHX*.

Nesse sentido, o estudo do efeito da metformina nas vias de sinalização relacionadas à sobrevivência e proliferação das células de FEO é relevante para entendimento dos processos que levam à inibição de proliferação, principalmente aos relacionados à redução do metabolismo e respiração celular. Este trabalho justifica-se ainda pela ausência de estudos que avaliam os efeitos da metformina em células humanas com as características tumorais preservadas, cultura primária, essenciais para conclusão sobre eficácia de medicamentos. Além disto, este trabalho gera suporte para busca de novos alvos farmacológicos para o tratamento do câncer em geral, em especial, o câncer de origem neuroendócrina.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GLÂNDULAS ADRENAIS

As glândulas adrenais localizam-se no polo superior dos rins e dividem-se em córtex e medula - duas partes distintas, tanto em estrutura celular quanto em funcionalidade. Enquanto o córtex é regulado pelo estímulo do eixo hipotálamo/hipófise/adrenal, a medula é regulada pelo sistema nervoso simpático, mais precisamente, por axônios de neurônios pré-ganglionares lombar e torácico, via nervos esplânicos, que inervam diretamente células da medula adrenal (MELMED e col., 2011).

Histologicamente as glândulas possuem uma cápsula externa conjuntiva, chamada de cápsula fibrosa, abaixo está o córtex que se divide em três zonas e é responsável pela síntese e secreção de diversos hormônios tais como: zona glomerulosa (mineralocorticoides); zona fasciculada (glicocorticoides) e zona reticulada (esteroides) (MELMED e col, 2011). Por outro lado, a parte medular é composta por fibroblastos estruturais (JUNQUEIRA, 2013) e por células cromafins (MELMED e col., 2011).

As células cromafins são células de origem neuroendócrina, sendo estas derivadas da crista neural. Na medula da adrenal as células cromafins estão dispostas na forma de cordões ao redor dos capilares (GREENSPAN, 1997). Estas células podem ter ainda localização extra-adrenal, sendo chamadas de paragânglios, podendo ser encontradas perto do nível inferior da artéria mesentérica em neurônios simpático pré-ganglionares localizados na entrada do baço, na medula e no hipotálamo (MELMED e col., 2011).

As células cromafins secretam as catecolaminas dopamina, norepinefrina e epinefrina (LENDERS e col., 2014) e apresentam citoplasma escurecido devido à oxidação desses mediadores químicos, mais precisamente, epinefrina e norepinefrina (GREENSPAN, 1997; MELMED e col., 2011). Possuem ainda vesículas secretoras ou grânulos cromafins, onde ocorrem a síntese e armazenamento dos seus mediadores químicos. Esses grânulos possuem substâncias que são liberadas no citoplasma e na circulação sistêmica em conjunto com mediadores. Dentre estas substâncias, encontram-se neuropeptídeo Y, somatostatina,

neurotensina, vasopressina, fator de necrose tumoral, interleucinas e cromograninas A, B e C (SALGADO, 2007).

A síntese dos mediadores químicos ocorre em resposta ao estímulo neuronal das fibras pré-ganglionares que inervam a medula das glândulas adrenais (MELMED e col., 2011). A resposta a este estímulo são reações enzimáticas de hidroxilação e descarboxilação que irão ocorrer no citoplasma e nos grânulos cromafins.

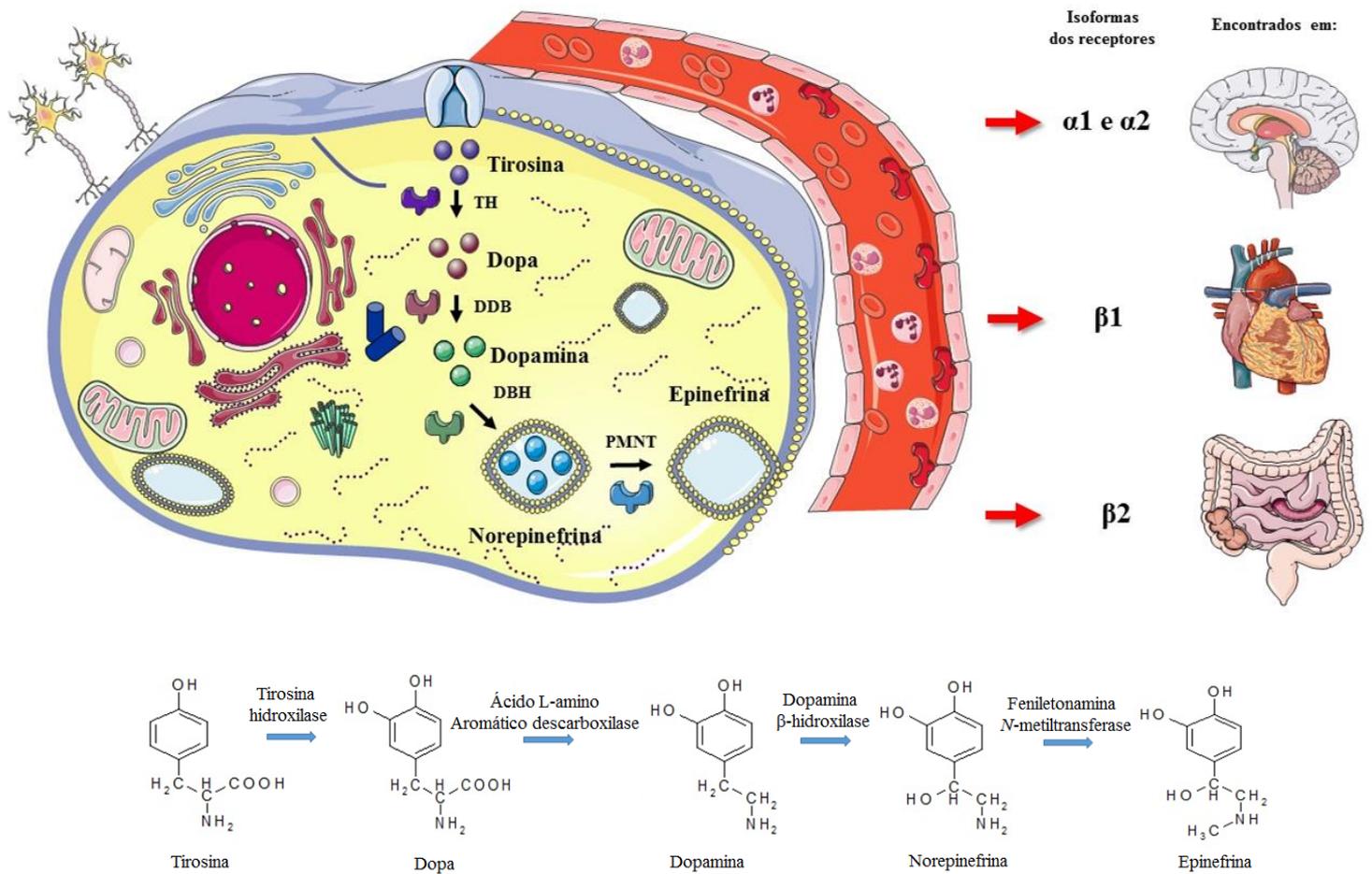


Figura 1. Ilustração da síntese de catecolaminas nas células cromafins e reações de hidroxilação e descarboxilação na síntese de catecolaminas.

Fonte: Servier Medical Art e adaptado de MEMED e col (2011).

A *L*-tirosina, presente na circulação sistêmica, entra na célula cromafin por transporte ativo e é convertida a dopa por um processo de hidroxilação. Em seguida, a dopa sofre descarboxilação pela enzima ácido *L*-amino aromático descarboxilase formando a dopamina. Todas estas etapas do processo de síntese de catecolaminas ocorrem no citoplasma das células. A dopamina formada é então internalizada para os grânulos cromafins e sofre hidroxilação pela dopamina β -hidroxilase sendo convertida a norepinefrina, que por sua vez é transportada para o citoplasma da célula e, em seguida, é convertida a epinefrina por ação da enzima feniletanamina *N*-metiltransferase. A epinefrina, que ao final da síntese apresenta o grupo catecol (orto-diidroxiobenzeno), é liberada na circulação sistêmica para mediar a ativação de receptores adrenérgicos (GREENSPAN, 1997; MELMED e col., 2011) (Figura 1).

Os receptores adrenérgicos são encontrados nas isoformas β e α e a distribuição e efeitos variam de tecido para tecido. O receptor β_1 quando estimulados apresentam efeitos cronotrópico e inotrópico positivos no coração, isto é, aumento da frequência cardíaca e força de contração, respectivamente, enquanto a isoforma β_2 regula o relaxamento dos músculos lisos, brônquios, vasos e útero; já a ativação de β_3 está relacionada a gasto energético e lipólise. Em contraste, α_1 é um receptor pós-sináptico que medeia a contração do músculo liso e dos vasos sanguíneos, promovendo vasoconstrição e aumento da pressão sanguínea e α_2 é um receptor pré-ganglionar que está relacionado à vasodilatação (COSTANZO, 1998).

Esses efeitos, em conjunto, mostram que os mediadores sintetizados nas células cromafins exercem, em geral, ação direta em receptores que regulam a frequência, a força de contração cardíaca, a resistência vascular periférica e, conseqüentemente, a pressão arterial sistêmica.

Em condições fisiológicas as células cromafins não secretam níveis de catecolaminas necessários para manutenção homeostásica do organismo, entretanto, em condições patológicas, estas células estão associadas à hipersecreção de catecolaminas o que justifica o risco de doenças cardiovasculares (LENDERS e col., 2014).

2.2 FEOCROMOCITOMAS

Os FEO são tumores neuroendócrinos raros derivados de células cromafins caracterizados pela hipersecreção de catecolaminas na circulação sistêmica. São designados feocromocitomas quando estão localizados nas medulas das adrenais, porém, quando a localização é extra-adrenal são denominados paragangliomas (LENDERS e col., 2014). Os feocromocitomas e paragangliomas (FEO/PGL) juntos, podem apresentar incidência de 1 a cada 100.000 – 300.000 na população geral (PILLAI e col., 2016) e a prevalência varia de 0,6% a aproximadamente 1,7% em crianças com hipertensão arterial sistêmica (LENDERS e col., 2014).

Os FEO, em sua maioria, apresentam comportamento benigno (THAI e col., 2015), embora estejam associados à alta morbimortalidade devido a doenças cardiovasculares e cerebrovasculares resultantes da hiperestimulação dos receptores adrenérgicos. Aproximadamente 15% dos feocromocitomas e paragangliomas evoluem para doença de comportamento maligno ou metastático e são pouco responsivos ao tratamento quimioterápico convencional (LENDERS e col., 2014).

A hipertensão arterial é a manifestação clínica mais frequente, podendo ser paroxística ou sustentada. Podem ainda ocorrer cefaleia, sudorese, palpitações, tremores, náuseas e ansiedade. O diagnóstico é feito com base na história clínica do paciente e a confirmação é feita por dosagem de catecolaminas (plasmática e urinária) e localização do tumor, que é feita por diagnóstico por imagem (WELANDER e col., 2011).

Enquanto a maior parte dos feocromocitomas desenvolve-se esporadicamente (FAVIER et al., 2015), aproximadamente 40% estão associados à herança genética com mutações em genes específicos (VICHA e col., 2013). Os genes que, quando mutados, mais frequentemente estão relacionados à patogênese do feocromocitoma podem ser divididos em dois grupos (*clusters*).

O *cluster 1* engloba fatores relacionados à hipóxia ou pseudo-hipóxia promovidos pela perda de função da proteína relacionada à mutação. Dentro deste primeiro grupo encontra-se o gene *VHL* (*Von Hippel-Lindau*), o qual codifica uma ubiquitina ligase que, dentre várias outras funções, é responsável pela ubiquitinação dos HIFs (*Hypoxia-inducible factors*). A perda da função da proteína VHL resulta em falha na ubiquitinação de HIF e, conseqüentemente, a regulação negativa por degradação dessa proteína no proteossoma em condição de normóxia fica comprometida (FAVIER e col., 2015). Nessa situação, ocorre

acúmulo de HIF α (1 e 2), caracterizando assim o estado de pseudo-hipóxia, o que favorece a angiogênese. Mutações dominantes autossômicas nos genes que codificam as subunidades do complexo enzimático mitocondrial succinato desidrogenase (SDH). Esses genes também compõem o primeiro cluster e são identificados em conjunto como *SDHx*, isto é, o conjunto formado pelos genes que codificam as subunidades da succinato desidrogenase, a saber: A (*SDHA*), B (*SDHB*), C (*SDHC*), D (*SDHD*) e AF2 (*SDHAF2*). Mutações em todos esses genes que compõem o chamado complexo II da cadeia de transporte de elétrons já foram associadas ao desenvolvimento de FEO/PGL (PILLAI e col., 2016). A inatividade das subunidades da enzima (SDHx) leva ao acúmulo de succinato e conseqüentemente ao acúmulo de HIF. Mutações *SDHx* frequentemente associam-se a comportamento maligno em FEO/PGL, principalmente as mutações no *SDHB*, e hipotetiza-se que mutações mais graves favorecem malignidade devido à maior capacidade de desenvolver pseudo-hipoxia, condição favorável para o desenvolvimento tumoral (FAVIER e col., 2015; VICHA e col. 2013).

Já as mutações relacionadas ao *cluster 2* estão associadas à sinalização anormal de quinases intracelulares, culminado em hiperatividade das proteínas relacionadas a estas mutações. O gene *RET* (*rearranged during transfection*) por exemplo, codifica um receptor transmembrana que atua por meio da ativação de tirosina quinase, e está associado ao desenvolvimento de Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2A e 2B (VICHA e col., 2013). Ainda, o gene *MAX* (*MYC-associated factor X*) codifica uma proteína supressora tumoral e, no FEO, parece estar relacionado ao aumento da transcrição de genes que ativam o oncogene *MYC* (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) promovendo aumento do crescimento celular, da angiogênese e do metabolismo (FAVIER e col., 2015). Mutações em *RAS/MAPK* e *TMEM-127* são menos frequentes e também podem ser incluídas neste segundo grupo (PILLAI e col., 2016).

O tratamento dos FEO/PGL baseia-se no comportamento do tumor e o principal objetivo imediato é a normalização da pressão da arterial e da frequência cardíaca, sendo a ressecção cirúrgica o tratamento mais indicado (LENDERS e col., 2014).

Novos tratamentos que visam a redução do crescimento do tumor e conseqüentemente a redução da hipersecreção de catecolaminas vêm sendo explorados e indicados para o tratamento do FEO/PGL principalmente os que apresentam comportamento

maligno. Tais tratamentos incluem os inibidores multialvo de receptores do tipo tirosina-quinase, o sunitinibe e o sorafenibe (PAPPACHAN e col., 2014).

2.2.1 Maleato de sunitinibe

O sunitinibe (estrutura química mostrada na figura 2) é um antagonista de múltiplos receptores do tipo tirosina-quinase que atualmente vem sendo indicado para o tratamento de diversos tipos de câncer, principalmente, carcinomas com alta capacidade angiogênica, tais como carcinoma renal metastático (MOTZER e col., 2013), carcinoma pancreático de origem neuroendócrina (RAYMOND e col., 2011) e feocromocitoma (PAPPACHAN e col., 2014). O efeito principal antiangiogênico e antitumoral ocorre via antagonismo da via VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1 (*vascular endothelial growth factor receptor 2/ serine/threonine protein kinase Akt/ mammalian target of rapamycin/ ribosomal protein S6 kinase*) entretanto, outras vias parecem ser antagonizadas pelo sunitinibe como: PDGF (Fator de crescimento derivados de plaquetas), c-kit (*Stem cell fator*) (RAYMOND e col., 2011) e FLT3 (fetal liver tyrosine kinase receptor 3) (FAIVRE e col., 2006).

A farmacocinética do sunitinibe envolve metabolização no fígado, por ação da enzima CYP3A4 (*Cytochrome P450 3A4*) e sua excreção é predominantemente fecal (KATZUNG, 2012). Os principais efeitos adversos observados com uso do sunitinibe são astenia e toxicidade gastrointestinal. Podendo ser observados também complicações mais raras e graves tais como hemorrágicas, proteinúria e mielossupressão (OLIVO e col., 2016).

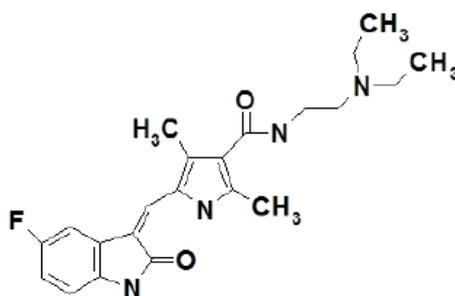


Figura 2. Estrutura química do sunitinibe.

Fonte: Imagem da autora (software ISIS/ Draw).

De forma geral, os efeitos do sunitinibe geram regulação negativa no crescimento das células tumorais via inibição da angiogênese. Nas neoplasias, em geral, esse efeito é importante, pois a alta vascularização confere resistência e progressão do tumor. Por outro lado, o sunitinibe parece inibir outras vias intracelulares importantes para homeostase, promovendo efeitos adversos graves o que gera suporte para estudo de novas terapias efetivas com baixo potencial de toxicidade.

2.2.2 Hidrocloridrato de metformina

A metformina (estrutura química representada na figura 3) é um fármaco da classe das biguanidas amplamente utilizado para o tratamento do Diabetes Mellitus tipo 2 associado à resistência insulínica (DIABETES, 2018). Foi obtida pela primeira vez nos anos 1950 na Europa, quando foi inserida no tratamento do diabetes. Neste mesmo período, fenformina e buformina também foram sintetizadas e comercializadas, entretanto, foram retiradas do mercado devido à associação à acidose láctica. Apenas nos anos 1990 o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a segurança da metformina e esta foi inserida no tratamento do Diabetes nos Estados Unidos da América (PERNICOVA & KORBONITS, 2014).

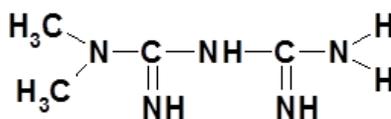


Figura 3. Estrutura química da metformina.

Fonte: Imagem da autora (software ISIS/ Draw).

A farmacocinética da metformina envolve absorção principalmente no seguimento superior do intestino delgado, passa pela circulação porta e acumula-se nos hepatócitos, seu primeiro sítio de ação (CLAUDIO, 2005). Não se liga a proteínas plasmáticas, isto é, desloca-

se livremente pela circulação e é excretada predominantemente pelos rins por secreção tubular (DIABETES, 2018).

A metformina entra nas células por meio de um transportador ativo de membrana chamado SLC22A (*Amphiphilic Solute Transporter branch*). Outros transportadores que parecem participar do deslocamento da metformina para o interior das células são: OCTN1 (*organic cation transporter 1*), MATE (*aluminum-activated citrate transporter*) e PMAT (*Plasma membrane monoamine transporter*) (CLAUDIO, 2005).

No controle da glicemia, os efeitos intracelulares da metformina são predominantemente metabólicos, o que leva à sensibilização insulínica gerando aumento da captação de glicose e redução da glicemia (FERRANNINI, 2014), tudo isto em virtude da inibição da glicogenólise/gliconeogênese (MILLER e col., 2013) e aumento da glicólise/glicogênese, no entanto, o mecanismo da metformina no metabolismo das células não está totalmente esclarecido.

A sensibilização insulínica promovida pela metformina ocorre por melhorar a função de receptores insulínicos, o que acarreta em aumento da transposição de canais GLUT1 (*Glucose transporter 1*) e GLUT4 (*Glucose transporter 4*) do citoplasma da célula para a membrana, e por aumentar a captação de glicose para dentro da célula (DEL BARCO e col., 2011). A metformina pode ainda inibir a lipólise, por inibir a HMGCoA redutase (*3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzyme A reductase*), enzima que participa da síntese do colesterol e assim reduz substratos para gliconeogênese (ALJADA & MOUSA, 2012).

Recentemente, Miller e colaboradores (2013) demonstraram em estudo *in vitro* e *in vivo* que a metformina poderia apresentar ação antagonista ao glucagon, hormônio que em condições de hipoglicemia promove a quebra do glicogênio no fígado. Isto ocorreria em virtude do aumento de AMP (*adenosine monophosphate*) induzido por metformina, o que levaria à redução de cAMP (*Cyclic adenosine monophosphate*) e aumento de PKA (*protein Kinase A*) promovendo a redução de glicogenólise e gliconeogênese (MILLER e col., 2013).

Em virtude de seus efeitos sistêmicos que favorecem a sensibilização à insulina, a metformina é utilizada em diversas enfermidades além do diabetes mellitus, principalmente aquelas relacionadas à resistência insulínica, diabetes gestacional, síndrome dos ovários policísticos (EL-SHARKAWY e col., 2014), esteatose hepática (BUT e col., 2014) e síndrome metabólica (NASRI & RAFIEIAN-KOPAEI, 2014). Há evidências de que o uso de

metformina está relacionado ao risco diminuído de doenças cardiovasculares, à redução das complicações microvasculares no paciente diabético, redução da aterogênese, redução das concentrações plasmáticas de colesterol total e de triglicerídeos e à redistribuição de adipócitos viscerais (NASRI & RAFIEIAN-KOPAEI, 2014).

Os efeitos adversos observados com o uso da metformina são predominantemente gastrintestinais (BRIETZKE, 2015). A acidose láctica é um efeito adverso pouco frequente ocorrendo predominantemente em pacientes com hepatopatia, insuficiência renal e abuso do álcool (SALPETER e col., 2010). O uso crônico da metformina pode estar associado à deficiência de vitamina B12, provavelmente devido à diminuição de sua absorção, o que predispõe à anemia megaloblástica (PERON e col., 2015).

2.2.3 Estudos clínicos que avaliaram o efeito antitumoral da metformina

Os efeitos antitumorais atribuídos à metformina foram observados inicialmente em estudos epidemiológicos nos quais pacientes diabéticos que apresentavam algum tipo de neoplasia eram tratados com metformina. Nestes pacientes, foram observados redução da progressão do câncer e aumento da sobrevida quando comparados com pacientes que faziam uso de outros antidiabéticos orais (FRANCIOSI e col., 2013; YIN e col., 2013). A partir de então, estudos clínicos em diversos tipos de câncer e metanálises vêm mostrando evidência clínica dos benefícios que a metformina pode promover no paciente oncológico.

Em revisão sistemática, com 11 trabalhos inclusos, Wang e colaboradores (2014) observaram que a metformina possivelmente estava associada ao baixo risco de desenvolver câncer pancreático em pacientes diabéticos quando comparados com pacientes que não usaram metformina. Da mesma forma, Rego e colaboradores (2015) avaliaram, em revisão sistemática com 3 artigos inclusos, os efeitos da metformina em câncer de cabeça e pescoço e observaram que a metformina possivelmente aumenta a sobrevida global desses pacientes quando comparado com grupo que não recebeu tratamento com metformina (REGO e col., 2015).

Em coorte retrospectiva com 95.820 participantes, Tsilidis e colaboradores (2014) não encontram diferença no risco de desenvolver câncer (próstata, mama, coloretal, pulmão,

esôfago, endométrio, fígado) entre pacientes diabéticos que usavam metformina e pacientes diabéticos que usavam sulfonilureias (TSILIDIS e col., 2014). Entretanto, Zhang e colaboradores (2012) observaram, em revisão sistemática com 5 artigos inclusos, que pacientes diabéticos que usaram metformina, possivelmente, tinha baixo risco de desenvolver câncer de fígado que pacientes que não usavam metformina (ZHANG e col., 2012).

Em recente revisão sistemática realizada pela autora do presente estudo, observou-se que o uso de metformina melhorou a sobrevida global de pacientes com câncer de endométrio quando comparados aos que não faziam uso de metformina (ANEXO A) (MEIRELES e col., 2017).

2.2.4 Estudos que avaliaram mecanismos moleculares para o efeito antitumoral da metformina

Diversos mecanismos têm sido propostos com base em estudos que avaliaram efeitos pontuais da metformina sobre células cancerígenas (COLQUHOUN e col., 2012; KISFALVI e col., 2009; KUMAR e col. 2014). O mecanismo principal envolve interrupção parcial da formação de energia gerada ao final da terceira rota metabólica, a fosforilação oxidativa (PIEROTTI e col., 2013).

Em condições normais, a energia é gerada na forma de ATP (*adenosine monophosphate*), a partir de três rotas metabólicas: a) glicólise; b) ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs; c) cadeia de transporte de elétrons ou cadeia respiratória, seguida de fosforilação oxidativa. Na primeira etapa ocorre conversão de glicose a piruvato no citoplasma. Neste processo também são formados NADH e ATP em pequenas quantidades. O piruvato formado nesta via aeróbia, isto é, em condições de elevada disponibilidade de oxigênio, entra na matriz mitocondrial, onde é convertido a Acetil CoA (*Acetil coenzime A*). Esta, por sua vez, é utilizada no ciclo do ácido cítrico, onde são produzidos NADH (*Nicotinamide adenine dinucleotide*), FADH₂ (*Flavin adenine dinucleotide*), GDP (*Guanosine diphosphate*) e ATP (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Resumidamente, as reações da glicólise aeróbia e do ciclo do ácido cítrico resultam principalmente em acúmulo do intermediário NADH e FADH₂.

As moléculas de NADH e FADH₂ formadas nas duas primeiras rotas seguem para a terceira rota metabólica que é conhecida como cadeia de transporte de elétrons. Esta é composta por cinco complexos enzimáticos: NADH desidrogenase (complexo 1), succinato desidrogenase (complexo 2), ubiquinol oxidoreductase (complexo 3), citocromo oxidase (complexo 4) e ATP sintase (complexo 5). O complexo 1 atua juntamente com o complexo 3 e 4, assim como o complexo 2 (NELSON e col., 2008; SMEITINK e col., 2001).

Na cadeia de transporte de elétrons as enzimas do complexo 1 oxidam o NADH gerando NAD, H⁺ e um elétron para cada molécula de NADH formada. O acúmulo de NADH ativa mecanismos de transporte de elétrons através da membrana interna da mitocôndria em uma série de reações em cadeia mediadas pelas enzimas dos complexos 1, 3 e 4. O Complexo 2 atua da mesma forma, porém oxida o FADH₂ ao invés de NADH, e converte succinato a fumarato (SMEITINK e col., 2001).

Essa série de reações em cadeia mediada pelos complexos 1, 3, 4 e complexos 1, 2, 4 promovem o aumento do gradiente de prótons (H⁺) no espaço intermembrana das mitocôndrias e ativa a enzima ATP sintase que é a responsável final pela fosforilação oxidativa, assim, AMP (*adenosine monophosphate*) é convertido a ADP (*adenosine diphosphate*) e este é convertido a ATP, culminando com a disponibilização de energia à célula (SMEITINK e col., 2001).

Interessante notar que a metformina parece interromper parcialmente o processo de obtenção de energia por inibir o complexo 1 da cadeia de transporte de elétrons, culminando em redução do gradiente de prótons no espaço intermembrana da mitocôndria e reduzindo a atividade de ATP sintase. Desta forma, os precursores do ATP, o AMP e ADP, ficam aumentados nas células em detrimento da síntese de ATP (BRIDGES e col., 2014; PERNICOVA & KORBONITS, 2014), como ilustrado na Figura 4.

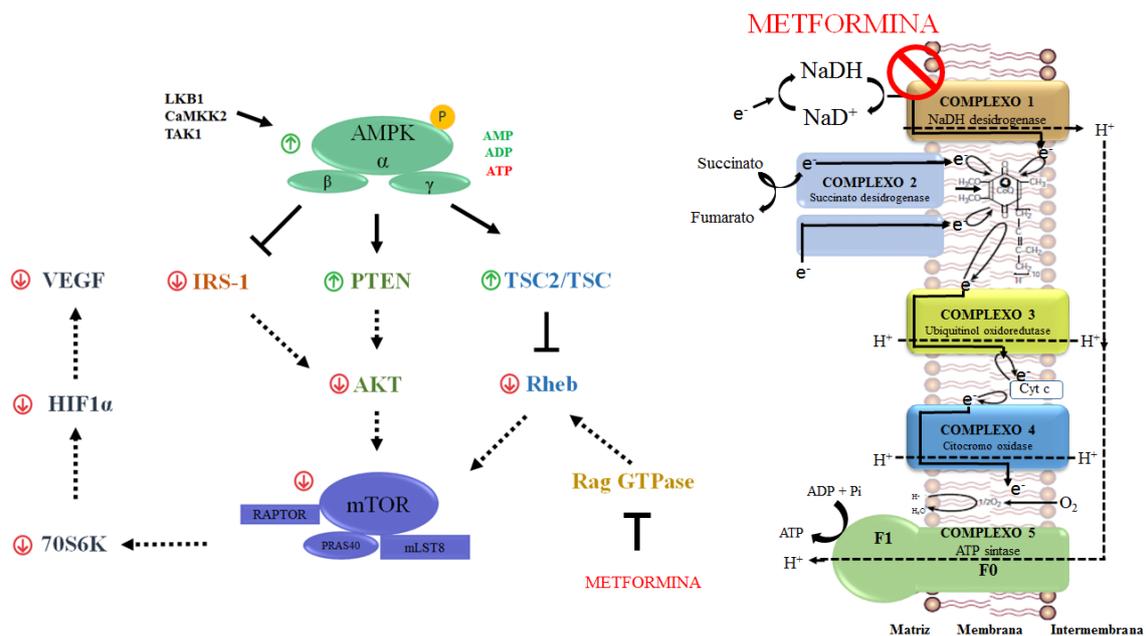


Figura 4. Mecanismo molecular da metformina com efeito antineoplásico.

Adaptado de Smeitink e colaboradores (2001) e de Pierotti e col. (2013).

Nas células tumorais observam-se alterações metabólicas que as distinguem de células normais e que favorecem a alta capacidade de proliferação, processo que requer alto aporte de energia. Nestas células há predomínio das reações da primeira rota metabólica, a glicólise e, conseqüentemente, a redução da fosforilação oxidativa. Desta forma, ocorre o aumento da oxidação do piruvato formado e mesmo sob condições aeróbias, aumenta a síntese de ácido láctico (PIEROTTI e col., 2013). Esse processo é conhecido como efeito Warburg, tipicamente observado em células com transformação maligna, que também é caracterizado pelo aumento da gliconeogênese. Um dos mediadores principais desse processo de reprogramação metabólica de alta eficiência no câncer é o HIF1α (*Hypoxia-inducible factor 1-alpha*), um fator de transcrição ativado por mTORC1, que promove aumento da expressão de enzimas glicolíticas, de transportadores de glicose (GLUT-1) e de MCT4 (*monocarboxylate transporter 4*), um transportador de ácido láctico nas células (PERNICOVA & KORBONITS, 2014).

Dentro do contexto fisiopatológico, onde o desenvolvimento do câncer envolve as alterações características no metabolismo energético da célula neoplásica, os mecanismos propostos para a metformina reduzir a sobrevida de células de câncer estão relacionados

basicamente à supressão da energia e conseqüentemente interrupção ou redução da proliferação celular e indução da apoptose. O comprometimento da síntese de ATP e aumento dos seus precursores culminam em ativação de diversas vias relacionadas à proliferação celular e apoptose. Vários modelos de mecanismos têm sido propostos em diferentes tipos de células neoplásicas, como será descrito a seguir.

Inibição de mTOR por vias dependentes da ativação de AMPK

Via AMPK/PTEN/AKT/mTOR

O aumento dos níveis de AMP/ADP em relação ao ATP, promovido pela ação da metformina em inibir o primeiro complexo da cadeia de transporte de elétrons, favorece a fosforilação da AMPK. Esta proteína é um complexo heterotrimérico, pois é composta por 3 subunidades, γ , β (subunidades regulatórias) e α (subunidade catalítica) e é caracterizada como centro da regulação energética intracelular. A subunidade γ possui domínios de cistationina beta-sintetase que tem habilidade em detectar alterações nos níveis de AMP/ADP. Ao detectar aumento de AMP/ADP em detrimento de ATP, a subunidade γ tem sua conformação modificada e isto favorece a fosforilação da subunidade α nos resíduos de treonina 172 (ADMS e col., 2004), justificando assim, sua capacidade alostérica. Além disto, outros complexos proteicos como LKB1 (*liver kinase B1*), CaMKK2 (*calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2*) e TAK1 (*TGF- β activated kinase 1*) auxiliam na ativação da AMPK (PIEROTTI e col., 2013).

A AMPK fosforilada em sua subunidade catalítica, pode ativar o PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*), proteína reguladora negativa do crescimento celular. Em sua ação supressora tumoral, o PTEN ativado parece ser capaz de remover um grupo fosfato do PIP₃ (fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato), resultando no produto PIP₂ (fosfatidilinositol (3,4,5)-difosfato). Assim, o PTEN ativado parece catalisar a defosforilação da proteína AKT (LEE e col., 2011) nos resíduos de serina 473, pois a AKT se associa ao PIP₃ para promover o crescimento celular, assim, PTEN reduzindo os níveis de PIP₃ e aumentando do seu precursor PIP₂, promove regulação negativa do AKT. A proteína AKT, uma vez defosforilada, tem sua via interrompida em função da ativação de AMPK e PTEN e isso acarreta redução da sinalização positiva para mTOR (LEE e col., 2011; PIEROTTI e col., 2013).

O mTOR é a subunidade catalítica central de dois complexos proteicos (mTORC1 e mTORC2), os quais têm papel central na promoção do crescimento celular. O mTORC1 está associado ao RAPTOR e apresentam função essencial na síntese proteica que sinaliza para ativação de outras proteínas como S6K (*ribosomal protein S6 kinase*) e a proteína 4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E*), que controla RNA mensageiros (mRNAs). O mTORC2 está associado ao RIPTOR, porém sua função celular é pouco elucidada. Supostamente o complexo mTROC2 participa da regulação e sobrevivência celular, progressão no ciclo celular e anabolismo (ZONCU e col., 2011).

Resumidamente, AMPK ativa PTEN, ação que favorece a inibição do AKT, que por sua vez deixa de induzir complexo mTOR. Assim, o crescimento celular mediado por ativação do mTOR é comprometido.

VIA AMPK/TSC2/TSC1/Rheb/mTOR

A AMPK ativada pela metformina pode ainda ativar a proteína TSC2, que na sua forma ativa se associa ao TSC1 formando um complexo inibitório. Assim, a ativação AMPK parece ativar o complexo TSC2/TSC1 que favorece o acúmulo de Rheb ligado a guanosina-5'-trifosfato (GTP). O Rheb acumulado na célula desloca RAPTOR do complexo mTOR, o que compromete a ativação desta proteína, culminando na inibição o crescimento celular (GWINN e col., 2008) (Figura 4).

VIA AMPK/IRS-1/AKT/mTOR/GPCR/Raf/MEK/ERK

A AMPK ativada bloqueia os produtos gerados pelos fatores de crescimento relacionados à insulina quando liga-se a seus receptores (IRS-1). Este bloqueio gera uma regulação negativa na AKT que, por consequência, inibe mTOR. A proteína mTOR inibida gera cross-talk com receptor de membrana acoplado à proteína G (GPCR), que sinalizam por meio de uma cascata de proteínas de crescimento epitelial Raf/MEK/ERK (*fibrosarcoma rapidly accelerated/ MAP kinase ERK kinase/extracellular signal-regulated kinases*). Assim, a metformina gera diminuição do crescimento celular por inibir a via Raf/MEK/ERK (KISFALVI e col., 2009). Em conjunto, tem-se que a metformina altera o cross-talk entre as vias de sinalização induzidas por fatores de crescimento, mediadas por IRS-1 e por GPCRs (Figura 4).

Inibição de mTOR por vias independentes de AMPK

VIA HIF1 α /VEGF

Os HIFs são proteínas responsivas à deficiência de oxigênio atuando como fatores transcrpcionais. São compostas por subunidades α (sensível a oxigênio) e β (reativa à ubiquitina). Em condições fisiológicas, a presença de oxigênio nas células conserva os resíduos de prolina nas proteínas HIFs, o que favorece a degradação por hidroxilação promovida por prolil-4-hidroxilase (PHDs). A subunidade α é então reconhecida pela proteína VHL (*Von Hippel-Lindau*), uma proteína supressora tumoral que adiciona ubiquitina à HIF α , condição indispensável para degradação promovida pelo proteassoma. Em condições de hipóxia, PHDs não podem hidroxilar a subunidade α , com isso HIF1 α fica estável, transloca-se para o núcleo e dimeriza-se com HIF1 β formando o fator transcrpcional HIF (WIGERUP e col., 2016). Este fator transcrpcional liga-se ao elemento responsivo à hipóxia (HRE) no DNA recrutando co-ativadores que participam da regulação da expressão de genes envolvidos na angiogênese, metabolismo, apoptose, metástase e diferenciação celular (Figura 4). No estudo de Tadakawa e colaboradores (2015) foi possível comprovar que na presença de metformina os níveis de HIF1 α nas células de leiomioma estão diminuídos, em associação à diminuição da sinalização do mTOR/p70S6K, o que resulta em inibição de VEGF e redução da angiogênese (TADAKAWA e col., 2015).

VIA DRP-1/ Fissão mitocondrial

A dinâmica mitocondrial é um movimento essencial para o controle e manutenção da respiração e metabolismo celular. Existem dois mecanismos relacionados à dinâmica, a fusão e a fissão mitocondrial, mecanismos que ocorrem cuidadosamente em equilíbrio para manutenção da função mitocondrial (WESTERMANN e col., 2010) As GTPases são intermediadoras desses dois processos.

As GTPases transmembranas chamadas mitofusinas 1 e 2 junto com a OPA-1 (optic atrophy protein-1) auxiliam na fusão mitocondrial e no remodelamento da crista mitocondrial. Este processo está relacionado com a maior dissipação de energia, ao aumento da produção de ATP, do consumo de oxigênio e do potencial mitocondrial, e mantem a mitocôndria com uma morfologia tubular (CHIONG e col., 2014).

No processo chamado fissão as mitocôndrias ficam na forma mais fragmentada, pois a GTPase proteína 1 relacionada à dinâmica (Drp11) - presente no citoplasma -, quando é

fosforilada nos resíduos de serina 616, é translocada para a membrana mitocondrial e é reconhecida por um receptor transiente chamado proteína 1 de fissão (FIS-1). Juntas, DRP-1 fosforilada e FIS-1 formam uma espiral que é capaz de fragmentar a mitocôndria. Esse processo está relacionado à diminuição da produção de ATP, do consumo de oxigênio e do potencial mitocondrial (WESTERMANN e col., 2010).

O desequilíbrio em um desses mecanismos da dinâmica mitocondrial leva à disfunção mitocondrial e ao comprometimento do funcionamento normal da célula. Estudo de Aiyun Li e colaboradores (2016), mostrou que a ativação da AMPK promovida pela metformina pode levar à inibição da fosforilação de DRP-1 e, conseqüentemente, comprometimento da fissão mitocondrial (AIYUN LI e col., 2016), processo importante para divisão celular (MARSBOOM e col., 2015).

Via relacionada à apoptose

Além dos efeitos positivos sobre a redução da proliferação, diversos estudos vêm mostrando que a metformina interfere em vias que induzem a apoptose da célula (COLQUHOUN e col., 2012; KISFALVI e col., 2009; ZHANG e col., 2014). A apoptose ou morte celular programada é um mecanismo importante em diversas fases do desenvolvimento do organismo, participando ativamente da regulação do sistema imune e homeostase nos indivíduos multicelulares. Falhas no controle deste mecanismo desencadeiam diversas doenças neurodegenerativas, autoimunes e neoplasias. Como as neoplasias, em grande maioria, são causadas por disfunção do processo apoptótico, o objetivo dos agentes antineoplásicos convencionais é a indução de morte das células malignas por ativação desse processo.

A fase inicial da apoptose pode ser detectada pela exposição das fosfatidilserina na membrana celular. As fosfatidilserinas são predominantemente observadas na superfície interna da bicamada lipídica, voltada para o citosol. Quando as células são induzidas à apoptose, onde a membrana celular ainda permanece intacta mas sofre uma desorganização, as fosfatidilserinas são translocadas para a superfície exterior da membrana. A segunda fase da apoptose é marcada por duas etapas proteolíticas, sendo a primeira a ativação de caspases iniciadoras (2, 8, 9, 10 e 12) que são responsáveis pela execução da próxima fase que é a ativação de caspases efetoras (3, 6, 7, 14) que irão mediar a fragmentação do DNA e condensação da cromatina (BEST, 2008). Estudos mostraram em células tumorais que a

metformina induziu a externalização das fosfatidilserinas da membrana e ativaram a caspases gerando fragmentação do DNA genômico (COSTA e col., 2014; KUMAR e col., 2014).

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

O presente estudo tem como principal objetivo investigar o efeito da metformina em diversas vias de sinalização relacionadas à sobrevivência, proliferação celular e apoptose em linhagens de feocromocitoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar os efeitos da metformina sobre a viabilidade celular em linhagem de feocromocitoma de rato e comparar com a viabilidade de fibroblastos;
- Investigar os efeitos da metformina sobre apoptose em linhagem celular de feocromocitoma de rato;
- Investigar os efeitos da metformina na expressão de proteínas envolvidas em vias relacionadas à sobrevivência e crescimento em linhagem celular de feocromocitoma de rato e em cultura primária de feocromocitoma humano;
- Investigar os efeitos da metformina na expressão de genes que codificam proteínas envolvidas em diversas vias relacionadas à angiogênese de células de feocromocitoma;
- Investigar os efeitos da metformina na dinâmica mitocondrial em linhagem celular de feocromocitoma de rato;
- Comparar os efeitos da metformina sobre a respiração e estresse celular em linhagens de feocromocitoma em condições normais e com inativação de VHL e SDHB por silenciamento gênico;

4. METÓDOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

O cultivo celular das duas linhagens abaixo descritas segue especificações do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) do qual foram adquiridas as células. As células foram mantidas em condições ideais em incubadora a 37°C / 5% CO₂.

Células PC-12 Adh (BCRJ 0202) - linhagem celular de feocromocitoma proveniente de *Ratus norvegicus* (GREENE; TISCHLER,1976). Estas células foram cultivadas em meio de cultura HAM-F12 (*Sigma-Aldrich*®) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 15% de soro de cavalo (*Sigma-Aldrich*®), penicilina 100UI/mL e estreptomicina 100µg/mL.

Células CCD-1059Sk (BCRJ 0061) - fibroblastos de pele humana, foram cultivadas em meio de cultura DMEM (*Sigma-Aldrich*®, St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina 100UI/mL e estreptomicina 100µg/mL.

Além das células PC-12 Adh, existem outras linhagens de células de feocromocitomas, com características distintas e algumas delas estão descritas na Tabela 1. Para o presente estudo, os experimentos foram realizados na linhagem celular PC-12 Adh, por indisponibilidade comercial das outras linhagens.

Tabela 1. Características de diferentes linhagens de células de feocromocitoma.

Linhagem celular	Referências	Origem	Características inerentes das Células	Mediadores secretados	Expressão (+)	Expressão (-)
PC-12 Adh	(GREENE; TISCHLER,1976)	<i>Ratus norvegicus</i>	Não sintetiza epinefrina	Dopamina Norepinefrina	NGFR	PMNT
hPHEO	(GRAYEE e col., 2013)	Humano	Imortalização pode ter comprometido a expressão de genes	Dopamina Norepinefrina Epinefrina	COMT, PMNT, CHGA	TH, DDC, DBH
MTT	(MARTINIOVA e col., 2009)	Camundongos	Proveniente de metástase	Dopamina Norepinefrina Epinefrina	TH, PMNT	
MPC	(POWERS; BRACHOLD; TISCHLER, 2003)	Camundongos	Níveis de catecolaminas comparável à PC12	Dopamina Norepinefrina Epinefrina	RET, PNMT	NGFR

Abreviaturas: NGFR – receptor do fator de crescimento do nervo; COMT - Catecol O-Metiltransferase; PMNT - feniletanolamina-*N*-metiltransferase; CHGA – cromograninas A; TH – tirosina hidroxilase; RET - rearranged during transfection; DDC - dopadescarboxilase; DBH – dopamina beta-hidroxilase.

4.2 COMPOSTOS E CONTROLES TESTADOS

Os ensaios foram realizados com os seguintes compostos:

- Hidrocloridrato de metformina (*Sigma-Aldrich*®) - diluído em meio de cultura específico para as linhagens de células PC-12 Adh e CCD-1059Sk; Como controle foi usado o próprio meio de cultura.
- Maleato de sunitinibe (*Sigma-Aldrich*®) – foi feita uma solução-mãe de 10⁻²M diluído em DMSO de maleato de sunitinibe e, a partir dessa concentração, as soluções de trabalho foram diluídas em meio de cultura próprio para cada linhagem celular. O controle usado foi o DMSO diluído em meio de cultura. Com base nos resultados do estudo de Saito e colaboradores (2011) este composto foi selecionado como controle dos ensaios selecionados.(SAITO e col., 2011)

4.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

Atualmente, existem diversos ensaios comerciais utilizados para avaliar a viabilidade de células. As limitações técnicas dos ensaios de viabilidade celular devem ser consideradas na escolha do teste e pensando nisso, para minimizar o viés nos resultados obtidos, foram selecionados dois ensaios de viabilidade celular e três ensaios de proliferação celular. A viabilidade foi medida de forma indireta por meio da atividade mitocondrial e de forma direta por meio da integridade da membrana celular. A proliferação foi avaliada com base na capacidade das células formarem novas fitas de DNA, do número de núcleos celulares marcados com cristal de violeta e do aumento da expressão do marcador KI-67. Cada técnica foi empregada com o intuito de avaliar diferentes etapas dos processos que podem interferir na viabilidade e proliferação das células.

4.3.1 Ensaio de viabilidade celular com base na atividade mitocondrial – método MTT

Trata-se de um ensaio colorimétrico que é utilizado para medir indiretamente a viabilidade celular, fundamentando-se na capacidade funcional das mitocôndrias. O MTT (brometo de 3- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) (*Sigma-Aldrich*®) é um sal de tetrazólio que pode ser reduzido por enzimas oxidoreductase dependente de NAD(P)H, presentes na matriz mitocondrial. Como resultado da atividade dessas enzimas, o sal é convertido a formazan - substância de cor arroxeadada, insolúvel em água e solúvel em solvente alcoólico. Quando as células estão em condições normais de metabolização, o formazan é formado e a viabilidade é inferida indiretamente de acordo com a coloração formada, isto é, quanto mais formazan mais roxa a solução ficará e mais células viáveis estarão presentes (BERRIDGE, 1993).

Esta investigação iniciou-se durante o mestrado da autora (Meireles, 2015), nesse período foi realizado o ensaio de atividade mitocondrial por MTT para avaliar indiretamente a viabilidade das células de feocromocitomas de ratos, as PC-12 Adh tratadas com concentrações crescentes de sunitinibe (2 μ M a 10 μ M) e metformina (1mM a 30mM) (Figura 5).

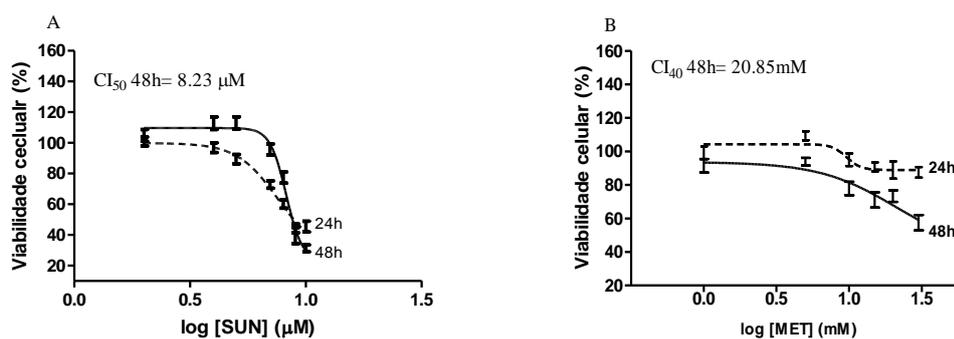


Figura 5. Ensaio de viabilidade por MTT nas células PC-12 Adh. (Meireles, 2015).

Os resultados mostraram que o sunitinibe reduziu 60% da viabilidade com CI_{50} igual a $8,23\mu\text{M}$, enquanto a concentração máxima de metformina reduziu a viabilidade das células em 40% com o $CI_{40}=20,85\text{mM}$. As mesmas concentrações de sunitinibe e metformina foram utilizadas para tratar células normais de pele humana – células CCD-1059Sk -, com o objetivo de avaliar se o efeito antiproliferativo a seletividade destes compostos em células de feocromocitoma. Para este experimento, 5×10^3 de células foram plaqueadas, tratadas com as mesmas concentrações de sunitinibe e metformina utilizadas nas células PC-12 Adh e após 24 e 48h os cristais formados foram solubilizados com isopropanol acidificado. A leitura foi feita em espectrofotômetro (*Beckman Coulter*, Wals, Austria) no comprimento de onda de 595nm e o valor da leitura encontrada foi comparada com a média do controle.

4.3.2 Ensaio de viabilidade celular com base na integridade da membrana celular – Método de coloração com azul de Tripán

O método de exclusão celular utilizando o corante azul de tripan para avaliação da viabilidade celular é feito com base na integridade da membrana celular. As células que apresentam membrana íntegra, ou seja, viáveis permanecem brilhantes. Ao passo que as células que tiveram a membrana degradada, tornam-se azuis devido à entrada do corante, ou seja, células inviáveis (OLIVEIRA, 2010).

Para tal experimento 5×10^4 células, tanto de PC-12 Adh quanto de CCD-1059Sk, foram plaqueadas e tratadas nas seguintes concentrações: sunitinibe – 2, 4, 5, 7, 8, 9 e $10\mu\text{M}$ e controle com dimetilsulfóxido (DMSO); metformina – 1, 5, 10, 15, 20 e 30mM e controle (meio de cultura específico de cada célula). Após os tratamentos durante 24 e 48h, as células

foram lavadas com PBS, tripsinizadas e coletadas para tubo de 1.5mL. As células foram centrifugadas a 2000rpm por 5 minutos e em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensão em 200µL de PBS e mantidas em gelo. Desta solução de células foram retirados 18µL e colocados em contato com 2µL solução de azul de tripan (0,5% dH₂O) (*Sigma-Aldrich*®), em seguida 10µL desta solução foram colocados em hemocítmetro e as células foram contadas. Foram contados os quatro quadrantes do hemocítmetro. Desta forma, o valor obtido foi dividido por quatro para obter-se a média de cada ponto, que por sua vez foi multiplicado pelo fator de correção do hemocítmetro (1×10^4) e pelo volume (200µL), o qual o *pellet* de célula foi solubilizado, para descobrir o total de células. A porcentagem foi encontrada comparando o tratamento com média do controle. Foram feitos seis experimentos independentes em duplicata biológica.

4.3.3 Ensaio de proliferação celular – Método de incorporação por BrdU

A bromo-deoxiuridina (BrdU) é um análogo sintético da timidina, isto é, um nucleosídeo utilizado na construção de novas fitas de DNA. O BrdU quando em contato com as células tem capacidade de incorporá-las e participar da síntese das fitas de DNA em processo de replicação substituindo a timina. Assim, a incorporação do BrdU é proporcional à proliferação das células (CARVALHO, 2010).

Para o ensaio de incorporação de BrdU (*Abcam*®), 5×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 poços. Foram feitos dois controles, o primeiro somente com meio e células e o segundo contendo células, meio de cultura e DMSO. As concentrações selecionadas foram: metformina 20mM e sunitinibe 8µM. Os tempos de tratamentos foram 24 e 48h, e 24h antes do fim do tratamento o BrdU foi adicionado. Em seguida, as células foram fixadas e incubadas primeiramente com anticorpo primário que reconhece o BrdU, depois com anticorpo secundário associado à enzima peroxidase. O próximo passo foi a adição do substrato que gera uma reação colorimétrica que foi mensurada em espectrofotômetro (*Beckman Coulter*, Wals, Austria) com comprimento de onda de 450nm. Do resultado obtido foi subtraído o branco de cada valor e a porcentagem foi obtida comparando-se o tratamento com o controle. Foram feitos três experimentos independentes em triplicata biológica.

4.3.4 Ensaio de proliferação celular – Método coloração com cristal de violeta

A coloração com cristal de violeta é um método colorimétrico qualitativo para avaliar a proliferação celular ou formação de colônias de células. O cristal de violeta tem afinidade pelo núcleo das células aderidas intactas, o que permite ao final do ensaio medir a densidade de células na placa.

Neste ensaio 1×10^3 de células foram plaqueadas em placas de 6 poços, após 24h os poços foram tratados com controle (meio de cultura) e metformina 20mM. Após 5 dias de tratamento as células CCD-1059Sk e PC-12 Adh foram lavadas com PBS 1X, fixadas com metanol absoluto por 20 minutos, lavadas novamente com PBS 1X, incubadas com cristal de violeta (*Sigma-Aldrich*®) por 10 minutos e lavadas 5 vezes com PBS 1X. A densidade de células foi analisada em Microscópio (*Zeiss, Primo Vert, Göttingen, Alemanha*).

4.4 EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS – MÉTODO WESTERN BLOT

O ensaio de Western Blot foi selecionado para avaliar a expressão e a atividade de proteínas relacionadas à via apoptótica e às vias de proliferação celular. Foram utilizados os anticorpos anticaspases (*Santa Cruz Biotechnology*®) que reconhece proteínas caspase 3 íntegras (procaspase – massa molecular 33kD) e clivadas (caspase 3 – massa molecular 17kD). Além da avaliação da via apoptótica, foi avaliada também a via de proliferação celular AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α . Para avaliação desta via foram utilizados os anticorpos: anti-AMPK (*Cell signaling*®) que reconhece a proteína AMPK (60kD), anti-PTEN (*Cell signaling*®) que reconhece a proteína PTEN (54kD), anti-AKT (*Cell signaling*®) total e fosforilada que reconhece a proteína AKT (60Kd - *Cell signaling*®), anti-mTOR total e fosforilado (*Cell signaling*®) que reconhece a proteína mTOR (289kD), anti-p70S6K (*Cell signaling*®) que reconhece a proteína p70S6K e anti-HIF1 α (*Cell signaling*®) que reconhece a proteína HIF1 α . Para o controle interno do Western Blot foi utilizado o anticorpo anti-GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (*Abcam*®) e anti- β -actina que reconhece as proteínas constitutivas das células, GAPDH (37kD) e β -actina (45kD). Esta mesma técnica foi utilizada para avaliar os efeitos da metformina sobre o

proteassoma e para comprovar o silenciamento da proteína VHL. Para esses ensaios foram utilizados os anticorpo anti-VHL (*Santa Cruz Biotechnology*®) e anti-ubiquitina (*Abcam*®).

Para obter as proteínas, foram plaqueadas 4×10^5 células em placas de 6 poços, 24h depois foi feito o tratamento com a metformina 20mM e sunitinibe 8 μ M. Para a metformina foi utilizado um controle em um poço que continha células e meio de cultura e para o sunitinibe foi utilizado um controle em um poço que continha células, meio de cultura e DMSO.

Após 48h, o meio de cultura contendo os tratamentos foi aspirado e as células foram lavadas com PBS. Logo em seguida, foi adicionado o tampão de lise (10% de sacarose, 1% NP40, 20mM de Tris – pH 8,0, 137mM de NaCl, 10% de glicerol, 2mM de EDTA, 10nM de NaF) acrescidos de coquetel de inibidores de protease (*Sigma-Aldrich*®) e inibidores de fosfatase (ortovanadato de sódio e pirofosfato de sódio – *Sigma-Aldrich*®). As células foram lisadas e centrifugadas novamente a 12000rpm por 20 minutos.

As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (*Sigma-Aldrich*®) (LOWRY e col., 1951). Uma curva-padrão foi construída com BSA. As absorbâncias encontradas das proteínas foram interpoladas com a curva de BSA, determinando assim a concentração de proteínas totais em cada amostra.

Após a determinação da concentração dessas proteínas, uma amostra foi preparada (40 μ g de proteínas + tampão de amostra com betamercaptoetanol e água destilada suficiente para completar 20 μ L), as proteínas foram desnaturadas a uma temperatura de 95°C por 5 minutos, prontas para serem aplicadas em um gel de acrilamida. Esse gel foi previamente hidratado com tampão de corrida, submetido a uma corrente de 110V por 15 minutos. Em seguidas, foram aplicados 20 μ L de amostra em cada poço e submetida a uma corrente de 110V por aproximadamente 2 horas.

Após a corrida o gel de acrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF, previamente ativada com metanol. Essa transferência ocorreu após a submissão a uma corrente de 24V por 1 hora e 30 minutos (condição utilizada para proteínas menores que 100kD, para proteínas maiores a transferência foi overnight com voltagem igual a 6). Nesse processo, as proteínas que estão separadas no gel por massa molecular passam então para a membrana. Essa membrana foi submetida a bloqueio, com solução bloqueadora

5% (leite) por 12h para western da caspase 3 e 1h para as demais. Após o bloqueio as membranas foram incubadas conforme a Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de anticorpos primários e secundários utilizados no Western Blot.

	Anticorpo primário	Tempo (horas)	Anticorpo secundário	Tempo (horas)	Marca do anticorpo
Caspase 3	1:500	12	1:5000	1	Santa Cruz
AMPK	1:1000	12	1:5000	1	Cell signaling
PTEN	1:1000	12	1:5000	1	Cell signaling
AKT*	1:1000	12	1:5000	1	Cell signaling
mTOR*	1:1000	12	1:5000	1	Cell signaling
P70S6K	1:1000	12	1:5000	1	Cell signaling
HIF1 α	1:1000	12	1:5000	1	Cell signaling
VHL	1:500	12	1:6000	1	Cell signaling
Ubiquitina	1:1000	12	1:5000	1	Abcam

* Total e fosforilado

Após a incubação com anticorpos secundários, foi aplicado ECLPRIME (GE) por 5 minutos (esse reagente contém o substrato para enzima peroxidase ligada ao anticorpo secundário). As exposições foram feitas em foto-documentador (*Amersham imager 600 GE*, Inglaterra).

A segunda incubação com anticorpos primários, as mesmas membranas foram lavadas com tampão de stripping - glicina, SDS, Tween 20 e pH=2,2 – para retirar os anticorpos -, e reencubadas com anticorpos primários, secundários e, em seguida, foi feita a exposição (procedimento feito para avaliar proteínas fosforiladas, total e GAPDH, nessa ordem). A quantificação das bandas do Western Blot foi feita utilizando o software imageJ®. Os valores de cada banda correspondente à caspase 3, AMPK, PTEN, AKT, mTOR, p70S6K e HIF-1 α foram normalizados com os valores de GAPDH, em seguida foi encontrada a razão para cada ensaio procaspase/caspase 3, tAKT/pAKT, tmTOR/pmTOR. Foram feitos 3 experimentos independentes.

4.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA – MARCAÇÃO COM KI-67, DRP-1 E DAPI

O KI-67 é uma proteína nuclear altamente expressa em células em proliferação (WEI SHI e col., 2015). As células PC-12 Adh foram plaqueadas e tratadas com metformina 20mM. As lamínulas foram lavadas com PBS 1X, fixadas com paraformaldeído 4% e permeabilizada com 0,2% de Triton X-100. Em seguida, as células foram bloqueadas com solução bloqueadora (0,02% de Triton X-100, 10% soro de cabra e 1% Albumina do Soro Bovino - BSA) por 45 minutos. Nesta mesma solução de bloqueio os anticorpos primários foram diluídos e as células foram incubadas nesta solução por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 1X e incubadas com anticorpo secundário e faloidina. Finalmente as células foram lavadas com PBS 1X e água ultra pura. Além de KI-67 esse mesmo protocolo foi utilizado para marcar Drp-1 e TOM20 que foi analisado em microscópio confocal (Zeiss, Confocal, Göttingen, Alemanha).

A marcação do núcleo das células com diidrocloreto de 4',6-diamidina-2'-fenilindol (DAPI) (Sigma-Aldrich®) permite a visualização superficial de sua integridade. A partir dessa marcação em células podem ser observadas alterações que sugerem apoptose, como formação de vacúolos, integridade da membrana nuclear, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (BEST, 2008).

Para marcar o núcleo das células PC-12 Adh, 5×10^4 células foram plaqueadas em placas de 24 poços contendo lamínula. Essas células foram tratadas com metformina 20mM e controle (meio de cultura), sunitinibe $8 \mu\text{M}$ e controle (DMSO) por 48h. As lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 minutos e em seguida incubadas com DAPI (1:4000) por 10 minutos. A lamínula foi colocada sobre a lâmina contendo meio de montagem (Fluoromount-G) e foram levadas ao microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Imager 2, ApoTome 2, Göttingen, Alemanha). Foram feitas imagens nos aumentos 40 e 63x.

Tabela 3. Concentrações de anticorpos primários e secundários utilizados na Imunofluorescência.

	Anticorpo primário	Tempo (horas)	Anticorpo secundário	Tempo (horas)	Marca do anticorpo
KI-67	1:200	2	1:5000	1	Santa Cruz
DAPI	1:4000	10min	1:5000	1	Sigma
DRP-1	1:100	2	1:5000	1	Biosciences
TOM-20	1:500	2	1:5000	1	Santa Cruz

4.6 CULTURA PRIMÁRIA DE FEOCROMOCITOMA

4.6.1 Caso clínico

O projeto foi aprovado sob o número 061/12 pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília (UnB) (ANEXO B). A aprovação teve como base a resolução 196/96 do Conselho Nacional da Saúde, Ministério da Saúde. A participação do paciente na pesquisa ocorreu mediante assinatura, por seu responsável legal, do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A).

Paciente com idade de 10 anos e 6 meses, masculino. Sinais e sintomas: iniciou com cefaleia e foi constatada hipertensão arterial sistêmica (144X122 / 188X153 / 220X150 / 194X158 / 183X143). Tomografia computadorizada do abdome evidenciou lesão heterogênea de calcificação central em adrenal esquerda, de 6,1 x 4,2cm, compatível com feocromocitoma. História familiar: tia materna - falecida aos 29 anos devido a tumor cerebral; tia materna - falecida aos 32 anos devido à hipertensão maligna; prima materna - falecida aos 20 anos devido a tumor cerebelar; avó materna: falecida devido a câncer; avô materno - falecido aos 44 anos devido a AVC e HAS. Diagnóstico genético feito por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de sequenciamento genético apontou mutação missense no gene VHL p.Arg 167 Gln.

4.6.2 Transporte do tumor e cultivo celular

Após a adrenalectomia o tumor foi transportado até o Laboratório de Patologia do Hospital para identificação da parte neoplásica. A parte central do tumor, distante da cápsula, foi retirada e colocada em tubo de 15mL contendo tampão Locker (NaCl, KCl, NaHCO₃, glicose, HEPES, fungizona) pH= 7,4, sendo o transporte realizado em gelo.

O tecido isolado foi transferido para um tubo de 15mL e o material foi pesado, em seguida, foi lavado várias vezes com tampão Locker até ficar livre de hemácias. O tecido foi centrifugado e em seguida foi seccionado com bisturi. Logo após, foi adicionada colagenase (1,25mg/mL) e foi incubado por 60 minutos a 37°C / 5% CO₂. O material foi centrifugado e ressuspenso em meio de cultura DMEM/F12, suplementado com soro neonatal (FCS) 10%,

21mg/L de uridina; Foi feito *updown* várias vezes até dissociar o tecido e ao final as células foram contadas usando azul de tripan (0,5%). Parte do material foi congelada em solução de congelamento (DMEM+ DMSO+SFB).

4.6.3 Caracterização da cultura primária

Morfologia celular

As células foram plaqueadas em lamínulas, 24h depois foram fixadas com paraformaldeído 4%, incubadas por 1h com faloidina (1:200), em seguida, foram incubadas com de DAPI (1:4000) por 10 minutos e levadas ao microscópio de fluorescência (*Zeiss Axio Imager 2*, ApoTome 2, Göttingen, Alemanha). Foram feitas imagens nos aumentos 20x e 63x (Os resultados encontram-se no APÊNDICE B).

Perfil de expressão gênica da cultura primária de feocromocitoma

Para caracterizar as células primárias de feocromocitoma, estas foram cultivadas em placas de cultura de 10 cm por aproximadamente 8 dias e, em seguida, coletadas para análise do perfil de expressão de genes que codificam enzimas relacionadas com a síntese de catecolaminas e cromogranina A: cromogranina A (*CHGA*), tirosina hidroxilase (*TH*), dopamina (β)-hidroxilase (*DBH*) e feniletanolamina N-metiltransferase (*PNMT*). Estes genes foram escolhidos por não existirem marcadores específicos de malignidade para feocromocitoma. As sequências dos oligonucleotídeos para determinação da expressão desses genes estão descritas na Tabela 1A do APÊNDICE B. Culturas de fibroblastos humanos CCD-1059sk foram utilizadas como controle.

4.6.4 Expressão relativa de genes relacionados à angiogênese em cultura primária de feocromocitoma

A fim de se verificar o efeito da metformina sobre a expressão de genes relacionados com angiogênese, células primárias de feocromocitoma foram cultivadas em 6 placas de 10 cm por aproximadamente 8 dias e, em seguida, tratadas com 20 mM de metformina (3 placas) ou mantidas somente em meio de cultura (3 placas) para serem utilizadas como controle.

Após 48 horas, as células foram coletadas para expressão dos genes *HIF1 α* , *EPAS*, *HIF3 α* , *VEGFA*, *VEGFR*, *ADM*, *ARNT* e *ANGF*.

Extração de RNA total

Após o tratamento (as placas estavam com confluência de aproximadamente 70%), 1 mL de TRIzol® (*Invitrogen*, Life Technologies) foi adicionado em cada placa e movimentos de *updown* foram realizados com a pipeta até que as células se soltassem completamente, esse procedimento foi feito em gelo. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 5 minutos e, em seguida, foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (*Sigma Aldrich*®). Os tubos foram agitados em vórtex por 15 segundos, incubados a temperatura ambiente durante 3 minutos e centrifugados a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C. A fase superior (transparente) contendo RNA foi transferida para outro tubo de 1,5mL, onde foram adicionados 500 μ L de isopropanol absoluto (*J.T.Baker*®, *Avantor Performance Materials*, Center Valley, PA, EUA). Os tubos foram agitados em vórtex durante 15 segundos, incubados por 10 minutos a temperatura ambiente e centrifugados a 14000rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1mL de etanol gelado 75% (v/v) (*J.T.Baker*®). Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 9000 rpm durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os tubos vertidos sobre gaze estéril para secagem do *pellet*. O *pellet* foi ressuspensão em água ultra pura tratada com dietilpirocarbonato 0,1% (v/v) - DEPC (*Sigma-Aldrich*®). As amostras obtidas foram mantidas a -80°C até a sua utilização.

Quantificação e determinação da pureza e qualidade do RNA extraído

A 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 μ g/ μ L. O grau de contaminação por proteínas foi verificado por meio da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm e a contaminação por sais, álcool ou outros reagentes da reação foi verificada por meio da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 230 nm. A pureza foi considerada adequada quando as razões se encontravam entre 1,7 e 2,2.

Além disso, foi avaliada a integridade do RNA total 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 µg/mL em H₂O destilada). A qualidade das subunidades 18S e 28S do RNA ribossômico foi examinada sob luz ultravioleta (UV) em aparelho fotodocumentador (Amersham imager 600 GE, Inglaterra). As amostras que apresentaram bandas de RNA 18S e 28S bem definidas (sem presença de rastros) foram consideradas adequadas para serem utilizadas nos ensaios (Figura 1A, APÊNDICE B).

Tratamento das amostras de RNA total com DNase

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

Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa – RT-PCRq

No presente trabalho, dois sistemas de RT-PCRq em tempo real foram utilizados. Para caracterização do perfil gênico da cultura primária, o sistema *SYBR® Green* foi utilizado e as reações de transcrição reversa e amplificação foram realizadas em uma única etapa por meio do kit *Power SYBR® Green RNA-to-C_T 1-Step* (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), o qual se utiliza de fluoróforos que se intercalam na dupla fita de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência, sendo a intensidade desta proporcional à quantidade do produto amplificado. A fluorescência detectada é representada por meio do Ct (ciclo limiar, *cycle threshold*), que equivale ao número de ciclos de reação suficiente para a amplificação atingir o limiar da fase exponencial (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

As reações foram realizadas em triplicata técnica/amostra em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical*, *Applied Biosystems*) para um volume final de 10µL (Tabela 4). Uma reação sem amostra de RNA (controle negativo) foi realizada para cada par de oligonucleotídeo (sense e anti-sense), com a finalidade de verificar possíveis contaminações ou amplificações inespecíficas.

Tabela 4. Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq) por SYBR® Green.

Reagentes	Volumes
Mix Power SYBR® Green RT-PCR (2x)	5,0 µL
Transcriptase reversa	0,08 µL
RNA (5 ng/4,5 µL)	4,5 µL
Primer forward (5 pmol/L)	0,2 µL
Primer reverse (5 pmol/L)	0,2 µL
Água ultra pura	0,02 µL
Volume total	10,0 µL

As condições de termociclagem para este sistema foram: transcrição reversa a 48°C durante 30 minutos; ativação da Taq DNA polimerase a 95°C durante 10 minutos; quarenta ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação a 95°C durante 15 segundos (desnaturação), 60°C durante 1 minuto (anelamento e extensão). Foi utilizado ainda o programa de dissociação do produto de amplificação (curvas de *melting*) após cada reação, para se verificar a especificidade da reação, confirmando a ausência de produtos inespecíficos da amplificação e/ou formação de dímeros de *primers*. Nesta etapa, as amostras foram submetidas a aumentos gradativos de temperatura variando entre 60°C para 95°C. O aumento da temperatura é diretamente proporcional à diminuição da fluorescência. A temperatura de dissociação Tm (*melting temperature*) corresponde ao ponto de decaimento mais acelerado do sinal de fluorescência e esse ponto é específico para cada sequência de DNA amplificada.

Os dados encontrados foram normalizados pelo gene constitutivo β -ACTINA (Ct gene de interesse menos Ct constitutivo = Δ Ct) e representados por $2^{-\Delta\text{CT}}$ (SCHMITTGEN & LIVAK, 2008).

Para avaliar a expressão de genes relacionados à angiogênese em amostras de células da cultura primária, tratadas ou não com metformina, foi utilizado o sistema *TaqMan*® e as reações de transcrição reversa e amplificação foram realizadas em duas etapas distintas com

os kits *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems Carlsbad, CA, EUA) e *Master Mix (TaqMan® Gene Expression Master Mix fast)*, respectivamente.

O sistema *TaqMan®* utiliza sondas de hidrólises complementares a sequências a codante das regiões de anelamento dos *primers*. Esta sonda possui dois fluoróforos, um denominado repórter presente na extremidade 5' da fita e um silenciador, também chamado de *quencher*, na extremidade 3'. Quando a sequência alvo estiver presente, a sonda anela-se ao seu sítio complementar e durante a elongação da fita a sonda é clivada pela enzima Taq DNA polimerase. Isto faz com que o fluoróforo *quencher* se afaste do repórter resultando, assim, em um aumento da fluorescência. A intensidade desta é proporcional ao produto amplificado, uma vez que o aumento de fluorescência ocorre apenas quando a sonda hibridiza (SHINTANI-ISHIDA e col., 2014). A fluorescência emitida é então detectada pelo equipamento e pode ser representada por meio do Ct. Da mesma forma, as reações foram feitas em triplicata técnica em placas de 96 poços para um volume final de 10 µL (Tabela 5) e, novamente, uma reação sem amostra de cDNA (controle negativo) foi realizada para cada sonda/*primers* com o objetivo de identificar possíveis contaminações. As sondas utilizadas (*TaqMan® Gene Expression Assay*) são inventoriadas e, por esse motivo, as sequências dos nucleotídeos não são fornecidas, mas a especificidade e eficiência da reação são garantidas pelo fornecedor. O código identificador (*ID*) de cada sonda encontra-se especificado na Tabela 2A do APÊNDICE B.

Tabela 5. Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq) por *TaqMan®*.

Reagentes	Volumes
TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x)	5,0 µL
Sonda/ <i>primers</i>	0,5 µL
Água ultra pura	3,5 µL
cDNA	1,0 µL
Volume total	10,0 µL

Para a análise dos dados da expressão dos genes relacionados à angiogênese, os valores dos Ct obtidos foram normalizados pelo controle endógeno (β -ACTINA) e a quantificação relativa dos RNA mensageiros de interesse foi feita utilizando-se o método de comparação $\Delta\Delta Ct$, que corresponde ao valor obtido pela fórmula aritmética $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostras – ΔCt calibrador (amostra sem tratamento) (LIVAK, 2001).

Os experimentos de PCRq pelos dois sistemas foram realizados no equipamento *Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* e os dados foram gerados pelo *Software StepOne*.

4.7 ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (TBARS)

O processo de peroxidação lipídica é um dos indicadores de estresse oxidativo que ocorre nas células quando estas são induzidas ao estresse. Nesse processo, os lipídeos podem sofrer degradação, em particular os fosfolípidos de membrana, tendo como produto final ácidos graxos ou produtos da peroxidação lipídica. Esses ácidos graxos reagem com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) e na presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) e ácido acético forma um complexo capaz de emitir fluorescência (LIMA e col., 2004).

Para esse experimento 4×10^5 células PC-12 Adh foram plaqueadas e tratadas com metformina 20mM, peróxido de hidrogênio 300mM e controle (meio de cultura). Após 24h, as células foram coletadas em solução KCl e lisadas. Em seguida, 25 μ L da solução de lisado celular foram adicionados nos seguintes reagentes: água miliQ, dodecilsulfato de sódio 8,1% (SDS), ácido acético 20% e ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa reação foi incubada a 95°C ao abrigo da luz por 1 hora. Foi feita a leitura da fluorescência em espectrofotômetro (*Shimadzu Corporation*, Japan) com comprimento de excitação de 520nm e de emissão de 550nm. Concomitantemente, foi construída uma curva padrão de MDA (malondialdeído), que foi utilizada para interpolar os dados encontrados no teste, inferindo no final a proporção de MDA formado. Ao final, foi feita a quantificação das proteínas do lisado celular pelo método de Lowry (*Sigma-Aldrich*®) (LOWRY e col., 1951) para normalizar os valores encontrados em cada amostra.

4.8 ENSAIO DE RESPIRAÇÃO CELULAR

Os ensaios de respiração celular das células PC-12 Adh foram realizados em dois aparelhos distintos. O aparelho Mitocell MT200 respirometer (Strathkelvin instruments limited, North Lanarkshire, Scotland) possui um eletrodo catiônico/aniônico que mensura o oxigênio presente na cuba de respiração e o segundo foi realizado no Agilent Seahorse XFp (Agilent Technologies, Wilmington, USA).

Para o primeiro experimento, 3×10^6 células foram plaqueadas em placa de 10cm, após 24h foram tratadas com metformina 20mM e controle (meio de cultura) por 6h. As células foram tripsinizadas, contadas, quantidades fixas de células tratadas e não tratadas, foram separadas em tubos de 15mL diferentes e em seguida foram centrifugadas. O sobrenadante foi então descartado e os *pellets* de células foram ressuspensos em tampão de respiração aquecido a 37°C que era composto por DPBS (CaCl₂, KCl, KH₂PO₂, NaCl, NaHPO₂, MgCl₂), glicose 25mM, BSA 2% e piruvato de sódio 1mM. Essa solução de células (500μL) foi colocada da cuba de respiração que foi imediatamente fechada para medir o oxigênio que havia no meio. O resultado da quantidade de O₂ foi obtido entre os tempos de 0 a 15 segundos na concentração uMOL/L. Dessa forma, do tempo zero foram subtraídos os outros tempos, obtendo assim o consumo de O₂.

Durante uma visita realizada no Centro de Endocrinologia da Queen Mary University of London, uma segunda análise foi feita com o aparelho Agilent Seahorse XFp (Agilent Technologies, Wilmington, USA) para avaliar a função da mitocondrial. Esse aparelho possui um sistema de sensores que mensura o oxigênio presente no poço da placa de cultura e calcula ao final a razão do consumo de oxigênio. À medida que as análises pelo aparelho progridem, compostos são adicionados, como a Oligomicina (bloqueador da ATPsintase), FCCP (indutor do gradiente de prótons) e Rotenone (bloqueador do Complexo I da cadeia de transporte de elétrons). Ao final do ensaio é possível analisar a respiração basal, a produção de ATP, a respiração máxima e a troca de prótons.

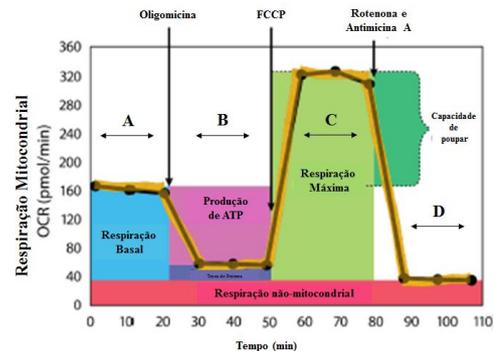
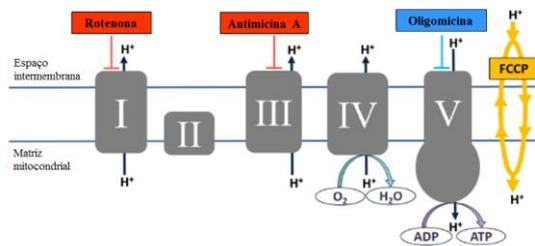


Figura 6. Bloqueio dos complexos da cadeia de transporte de elétrons e curva de consumo de oxigênio.

Pontos no gráfico representam cada medição feita pelo aparelho, sendo 12 medições no final.

Fonte: Adaptado do manual Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit (2017).

Esse ensaio foi conduzido nas células PC-12 Adh em diversas condições. Para isso 5×10^4 células foram plaqueadas em placas específicas, após 24h as células foram silenciadas para os genes VHL e SDHB utilizando o sistema lipofectamina. Foram utilizados 75ng de *VHL1+VHL2* e 75ng de *SDHB* em 0,2 μL de lipofectamina. Os efeitos dos silenciamentos foram mais efetivos em 48h, assim 6h antes de finalizar este tempo, metformina 10 e 20mM foram adicionados aos poços. Foram feitos controles para os genes sem metformina e controle sem os silenciamentos. Todos os poços continham lipofectamina e ao final do experimento, proteínas foram dosadas pelo método de Bradford a fim de normalizar os dados.

Após 48h, o meio das células foi substituído por meio específico para o experimento (HAM-12 suplementado com piruvato 1 mM, glutamina 2 mM e glicose 10 mM). Os compostos foram diluídos neste mesmo meio nas seguintes concentrações: oligomicina 4 μM , rotenona 1 μM e FCCP 1 μM .

Os sensores foram incubados a 37°C no calibrador Agilent Seahorse XF por 24h antes de se iniciar o experimento. Ao finalizar esse tempo o sistema sensores e placas foram montados no equipamento. Este foi programado para mensurar o consumo de oxigênio em 12 tempos diferentes, a cada 3 tempos os compostos eram adicionados na seguinte ordem: oligomicina, FCCP e rotenona. A respiração basal foi obtida pela média de A subtraída pela média de D; respiração máxima obtida pela média de C subtraída pela média de D; a produção de ATP obtida pela média de A subtraído pela média de B; a troca de prótons

obtidos pela média de B subtraída pela média de D e a capacidade de troca obtido pela média de C subtraída pela média de A, de acordo com a esquematização da Figura 6.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA E DADOS EXPERIMENTAIS

A análise estatística foi feita com base na distribuição das amostras. Para experimentos com mais de seis amostras foram aplicados teste de normalidade dos dados: KS, D'Agostino & Pearson omnibus e Shapiro-Wilk. Admitiu-se como dados normais quando era aprovado em pelo menos um destes testes. Assim, para estes dados foram utilizados teste t de Student quando eram comparadas duas variáveis e One-way ANOVA para mais de duas variáveis.

Quando a amostra era menor que 6, admitiu-se que os dados experimentos eram de distribuição não Gaussiana ou não paramétricos, uma vez que o número de experimentos realizados ou (n) foi considerado pequeno para avaliação de distribuição dos dados. Desta forma, para análise de duas variáveis foi selecionado o teste Mann-Whitney e para avaliar mais de 2 variáveis, o teste estatístico selecionado foi Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns comparando todas as colunas. O critério de significância estatística foi o valor inferior a 0,05, ou seja, acima de 95% de chance de não ocorrer ao acaso. Quando aplicável, isto é, quando era calculada a média, o Erro Padrão Médio (EPM) foi utilizado e quando a mediana foi calculada foi aplicado o Desvio Padrão.

Os ensaios foram conduzidos ou em duplicata ou em triplicata e foram repetidos pelo menos três vezes.

5 RESULTADOS

5.1 ENSAIOS DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO CELULAR

5.1.1 Ensaio de viabilidade celular com base na atividade mitocondrial – Método MTT

A etapa inicial deste estudo consiste em investigar o efeito da metformina sobre a viabilidade das células de feocromocitoma. Uma investigação que teve início no período do mestrado mostrou que tanto o sunitinibe quanto a metformina reduziram a viabilidade das células de feocromocitoma de ratos em 60% e 40%, respectivamente nas concentrações máximas (10 μ M e 30mM respectivamente). A partir dessas curvas foram obtidos os CI₄₀ da metformina de 20mM em 48h e o CI₅₀ do sunitinibe 8 μ M em 48h. As concentrações máximas de metformina e sunitinibe reduziram a viabilidade em 40% e 60% respectivamente (Figura 5) (MEIRELES, 2015).

Com base nestes resultados, o mesmo ensaio foi realizado em cultura de células de fibroblato de pele humana normal com o objetivo de investigar se o efeito era ou não seletivo para as células do tumor. Os resultados mostraram que as doses máximas tanto do sunitinibe quanto da metformina reduziram 40% da viabilidade das células de pele humana, isto é, com base nesse ensaio, o efeito da metformina não é seletivo para células de feocromocitoma (Figura 7) (MEIRELES, 2015).

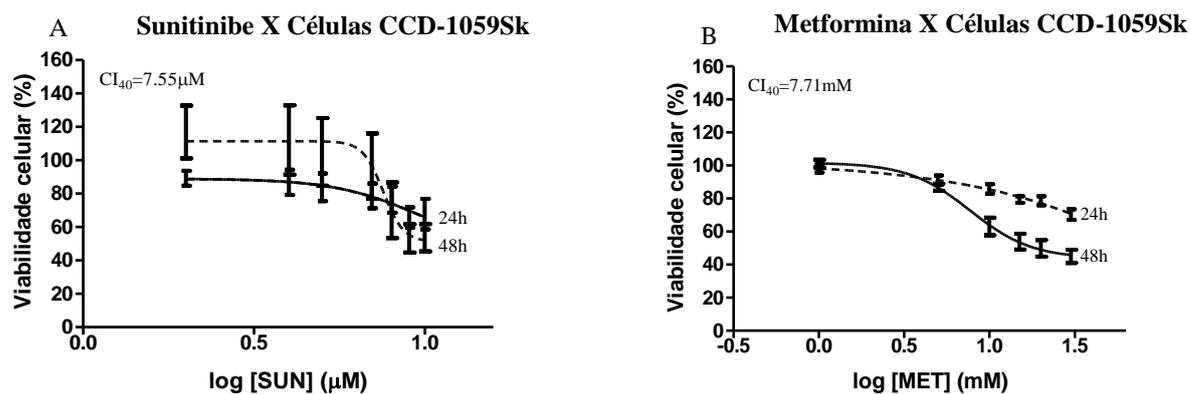


Figura 7. Viabilidade das células de pele humana tratadas com sunitinibe e metformina avaliada pelo método MTT: A) CCD1059sk tratadas com sunitinibe nas concentrações 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 10 μM em 24 e 48h; B) CCD-1059Sk tratadas com metformina nas concentrações 1, 5, 10, 15, 20, 30mM em 24 e 48h. Dados analisados por regressão não-linear e variável slope expresso em E.P.M.; sunitinibe $CI_{40}=7,55\mu M$ e metformina $CI_{40}=7,71Mm$, (MEIRELES, 2015).

5.1.2 Ensaio de viabilidade celular com base na integridade da membrana celular – Método de coloração com azul de Tripán

O fundamento do ensaio de MTT baseia-se na atividade das enzimas mitocondriais. Pensando nisso, a próxima pergunta a ser respondida é se de fato a metformina reduziu a viabilidade celular ou apenas modulou negativamente o metabolismo das células. O ensaio de exclusão celular utilizando o corante azul de tripan foi feito e o sunitinibe foi utilizado como padrão do experimento. As concentrações utilizadas variaram entre 2 μ M e 10 μ M e o que se observa na Figura 8A é a diminuição progressiva da viabilidade das células PC-12 Adh em relação ao aumento da concentração, e uma redução de aproximadamente 60% da viabilidade na concentração de 8 μ M, corroborando com os achados no ensaio de MTT. Assim, esta foi a concentração selecionada para realização dos próximos ensaios.

O ensaio de MTT mostrou indiretamente a redução da viabilidade das células PC-12 Adh, o que foi confirmado com o ensaio de exclusão celular. O tratamento com metformina foi feito utilizando-se as concentrações entre 1mM a 30mM por 48h e o que se observa na Figura 7B é a redução em 70% da viabilidade celular ($p < 0,05$), na concentração máxima. A concentração de 20mM reduziu a viabilidade das células de feocromocitoma em aproximadamente 60%, achado semelhante ao encontrado no ensaio de MTT ($CI_{40} = 20mM$), desta forma, essas concentrações foram selecionadas para os ensaios posteriores. As imagens representam controles e tratamentos com metformina 20mM por 48h nas células PC-12 Adh e CCD-1059Sk (Figura 8E).

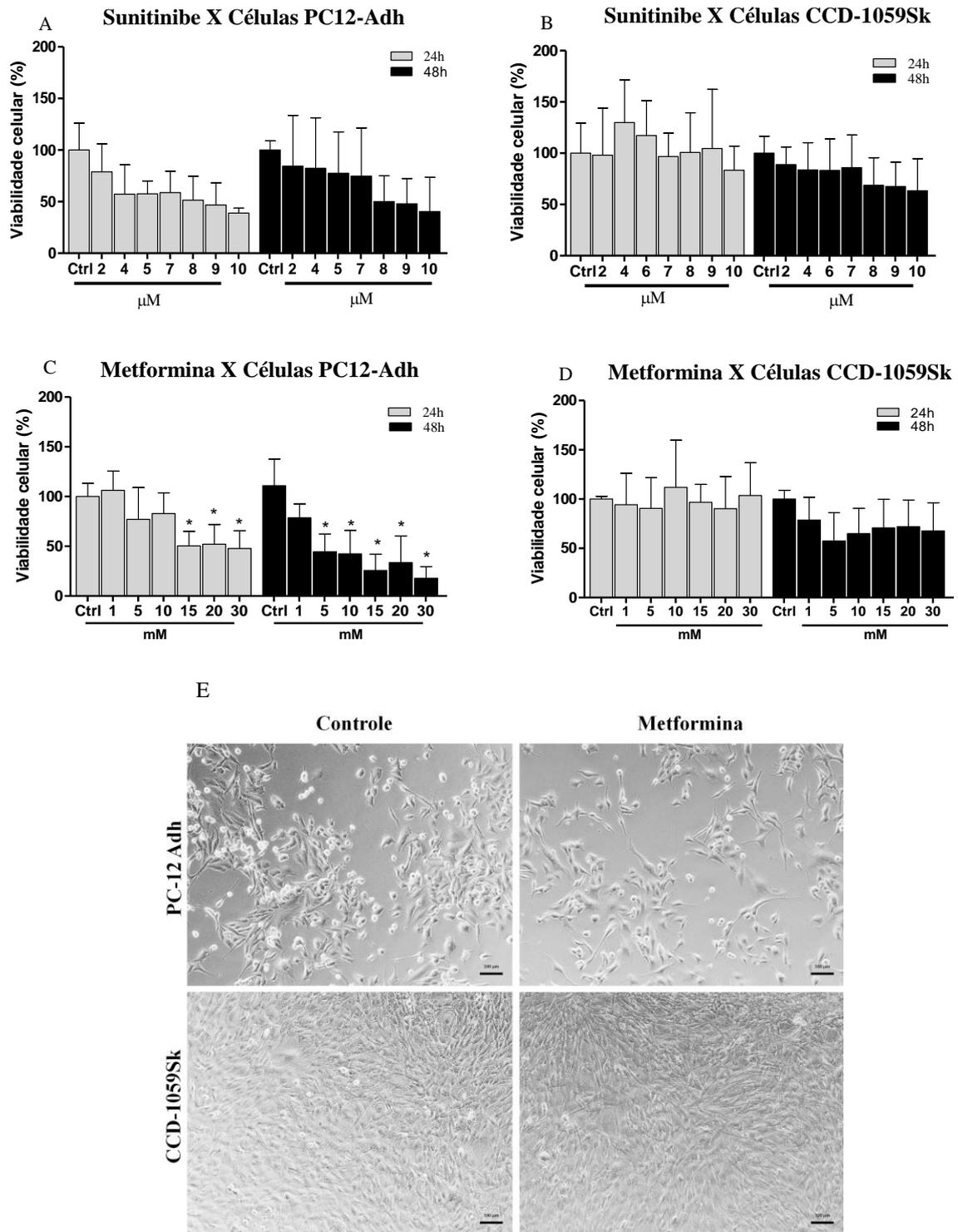


Figura 8. Viabilidade das células de pele humana e de feocromocitoma tratadas com sunitinibe e metformina avaliada pelo método de exclusão celular: Células A) PC-12 Adh e B) CCD-1059Sk tratadas com sunitinibe nas concentrações 2, 4, 6, 7, 8, 9 e 10μM em 24 e 48h; B) Células PC-12 Adh e CCD-1059Sk tratadas com metformina nas concentrações 1, 5, 10, 15, 20, 30mM em 24 e 48h. Dados apresentados em média ±D.P. e analisados por teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey vs controle, *p<0,05. E) Visualização dos tratamentos com metformina 20mM 48h nas células PC-12 Adh e CCD-1059sk nos aumento de 20X.

5.1.3 Ensaio de proliferação celular – Método de incorporação por BrdU

De fato, houve redução da viabilidade das células PC-12 Adh promovida pelo tratamento com metformina. Uma hipótese para tal achado seria a redução da proliferação celular e para comprovar esse efeito, o ensaio de incorporação de BrdU foi conduzido. Como mostrado na Figura 9A, o sunitinibe $8\mu\text{M}$ por 48h reduziu a viabilidade em 40%, bem como a metformina 20mM (Figura 9B).

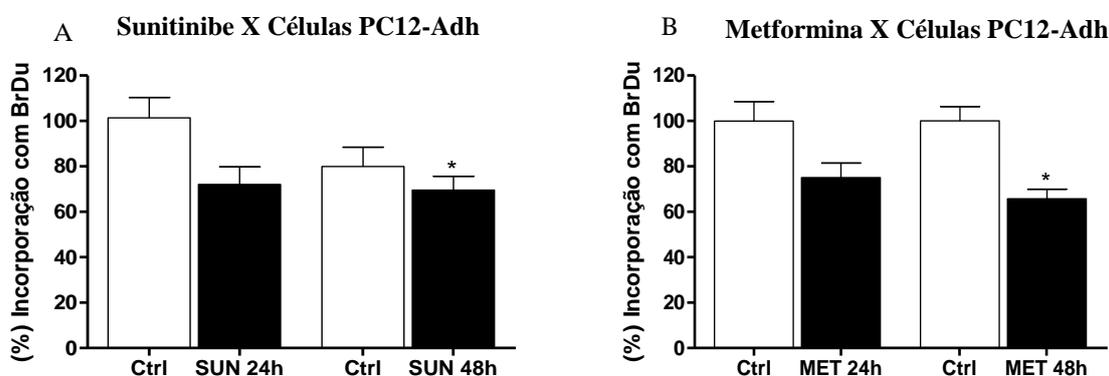


Figura 9. Proliferação das células de feocromocitoma tratadas com sunitinibe e metformina avaliada pelo método de incorporação cpm BrdU: A) Células PC-12 Adh tratadas com sunitinibe nas concentrações $8\mu\text{M}$ em 24 e 48h; B) Células PC12-Adh tratadas com metformina nas concentrações 20mM em 24 e 48h. Dados apresentados em média \pm E.P.M. e analisados por teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey vs controle, * $p < 0,05$.

5.1.4 Ensaio de proliferação celular – Método coloração com cristal de violeta

O efeito crônico do tratamento com metformina foi avaliado pelo método de coloração com cristal de violeta para reforçar os achados encontrados nos outros ensaios de viabilidade e proliferação celular. Em 5 dias de tratamento com metformina 20mM é visível a redução da formação de colônia de células PC-12 Adh, fenômeno observado tanto nas células de pele humana quanto nas células de feocromocitoma de ratos, nesta última, a redução do número de colônias /células foi mais intenso (Figura 10).

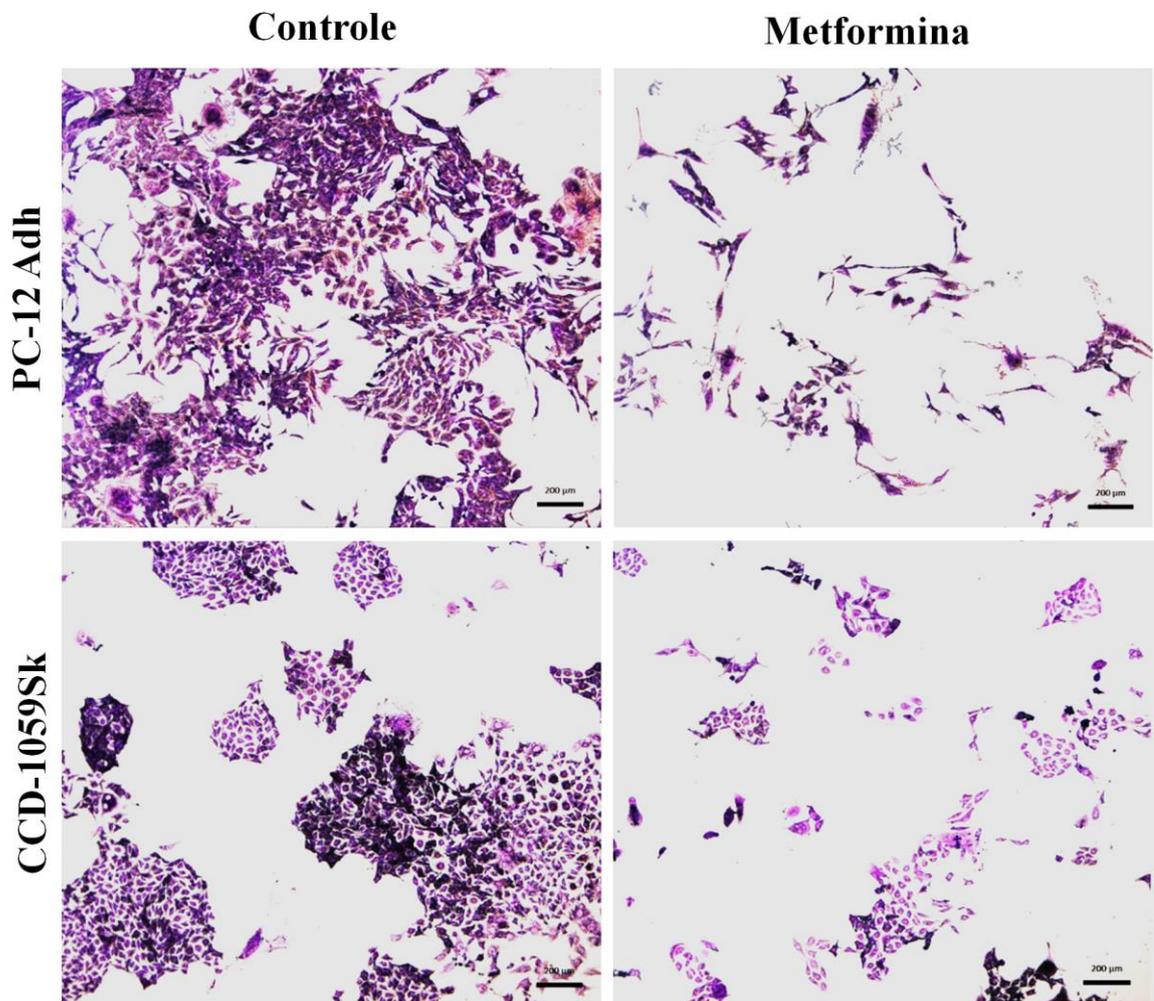


Figura 10. Proliferação das células de feocromocitoma e de pele humana tratadas com metformina avaliada pelo método de coloração com cristal de violeta: Células PC-12 Adh e CCD-1059Sk tratadas com metformina 20mM e controle (meio de cultura) por 5 dias. Visualizadas no aumento de 20X.

5.1.5 Ensaio de proliferação celular – Marcação com KI-67

O KI-67 é um marcador de proliferação celular muito utilizado na prática clínica. A figura a seguir mostra, em células de feocromocitoma (PC-12 Adh), o controle com maior porcentagem de células marcadas com KI-67 quando comparadas com as células tratadas com metformina 20mM por 48h (Figura 11).

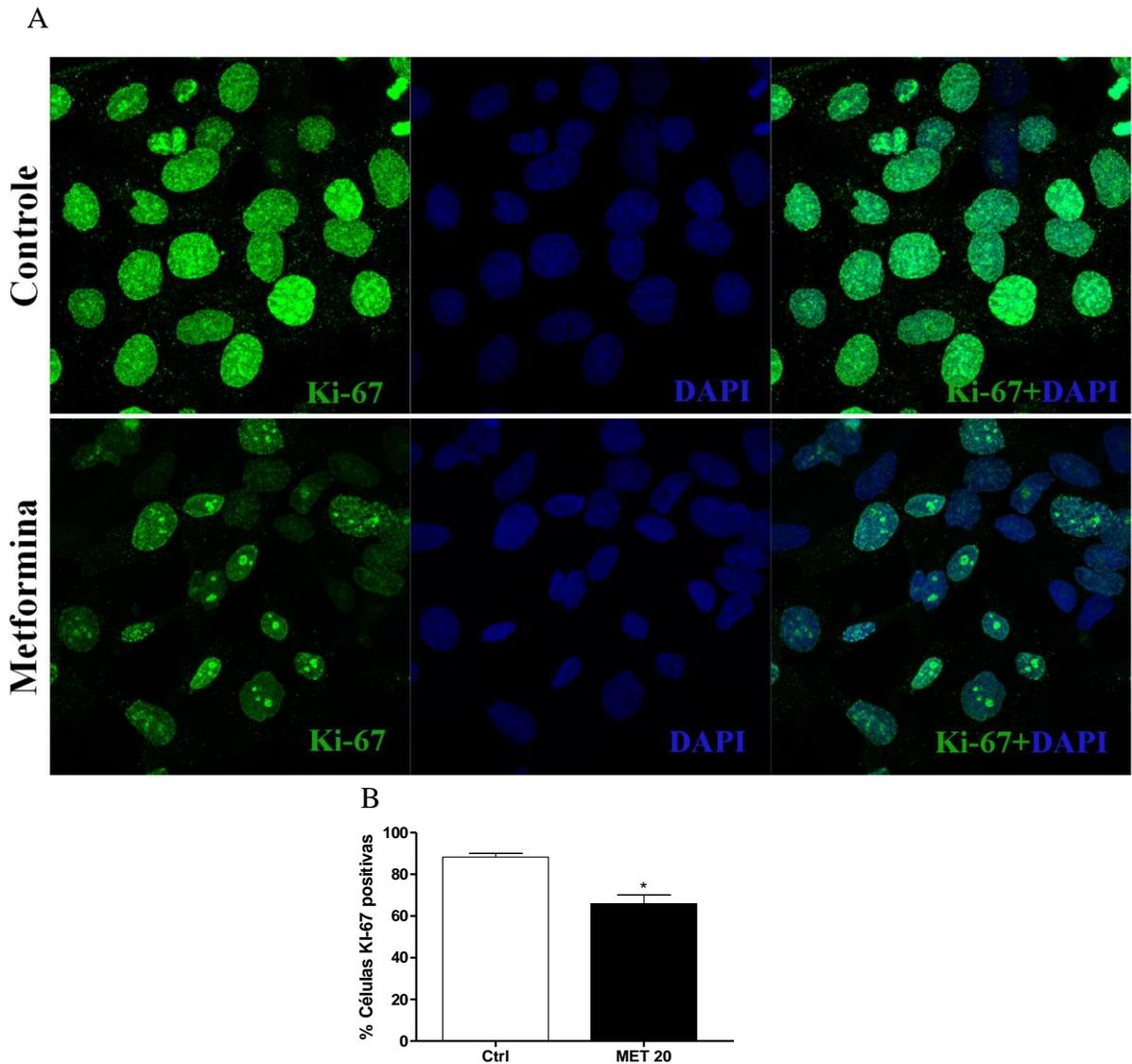


Figura 11. Proliferação das células de feocromocitoma tratadas com metformina avaliada por marcação com KI-67: A) Células PC-12 Adh tratadas com metformina 20mM por 48h e visualizadas no aumento de 20X. B) Porcentagem de células tratadas e não tratadas com metformina 20mM marcadas com KI-67 comparadas com a quantidade de núcleos, média obtida de 20 imagens. Dados apresentados em média \pm E.P.M. e analisados por teste *t de Student* vs controle, * $p < 0.05$.

5.2 EXPRESSÃO E ATIVIDADE DE PROTEÍNAS DE VIAS APOPTÓTICAS E PROLIFERATIVAS – MÉTODO WESTERN BLOT

5.2.1 Avaliação da expressão da clivagem da Caspase 3 e sinais apoptóticos nas células PC12-Adh

A caspase 3 é uma proteína que possui atividade efetora na via da apoptose, e quando apresenta-se na sua forma clivada, sinaliza positivamente para apoptose. A investigação dos efeitos da metformina na clivagem da proteína caspase 3 teve início no mestrado e os resultados obtidos neste período foram parciais. Desta forma, para confirmar os efeitos da metformina nas células PC-12 Adh, dois novos ensaios foram realizados utilizando metformina 20mM por 48h e os resultados mostrados na Figura 13 sugerem o aumento da clivagem da caspase 3 nas amostras tratadas ($p < 0,05$). Por outro lado, as células PC-12 Adh tratadas com sunitinibe 8 μ M por 48h não apresentaram alteração estatisticamente significativa na clivagem da caspase 3.

Outros parâmetros avaliados foram as alterações nucleares que sugerem apoptose celular, para isto, as células PC-12 Adh tratadas com sunitinibe 8 μ M por 48h foram marcadas com DAPI e foi possível observar a formação de vacúolos nos núcleos das células (Figura 12). Já no tratamento com metformina 20mM por 48h observamos pontos com fluorescência mais acentuada sugerindo fragmentação do DNA (Figura 13).

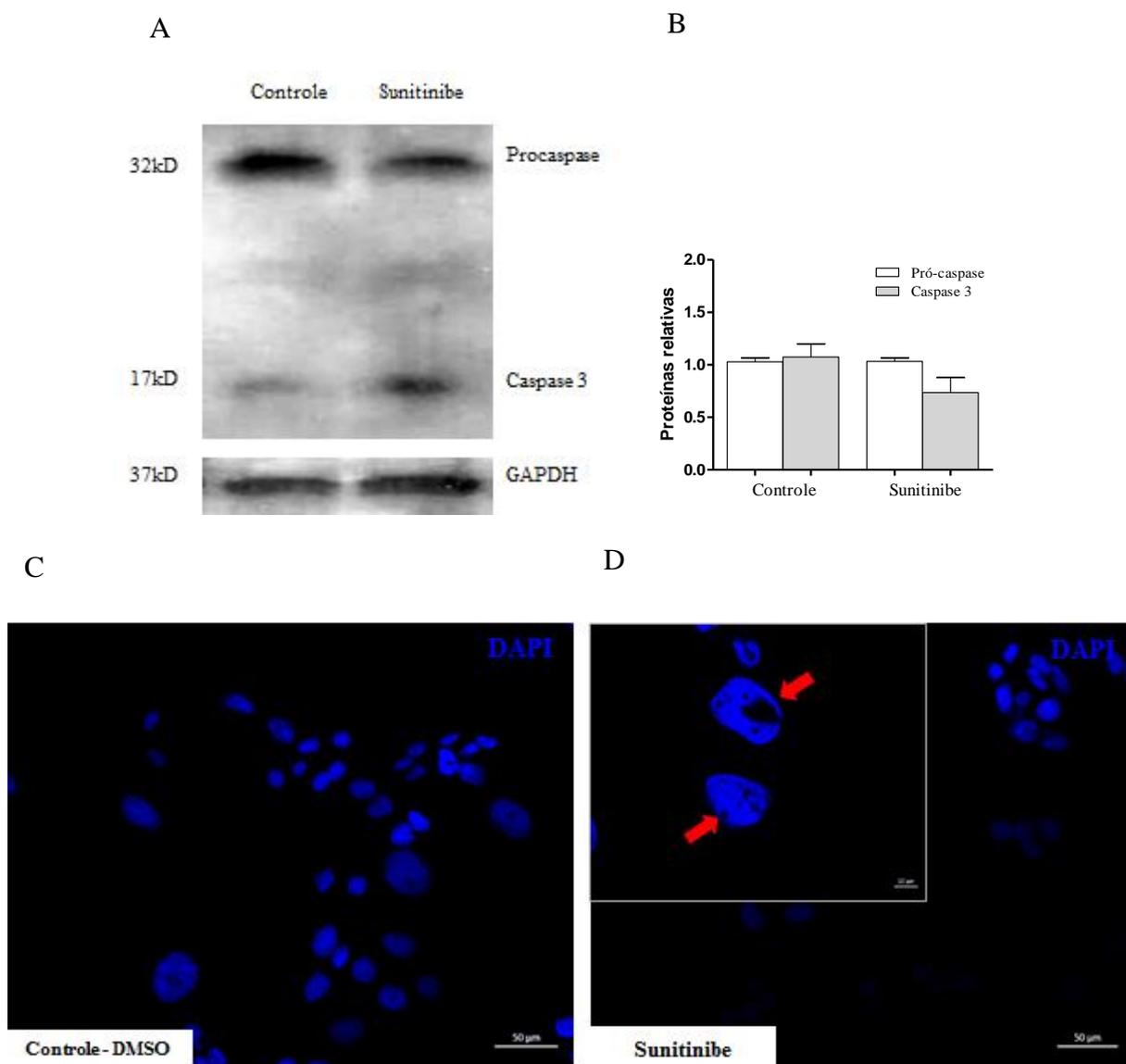


Figura 12. Clivagem da caspase 3 das células de feocromocitoma tratadas com sunitinibe avaliada por Western Blot e imunomarcção com DAPI: A) Células PC-12 Adh tratadas com sunitinibe 8 μ M por 48h; bandas de pró-caspase e caspase 3 (40 μ g de proteínas). B) Razão controle/tratado com sunitinibe das bandas de pró-caspase e caspase 3; C) Imagem representativa de 1 experimento do controle imunomarcado com DAPI no aumento de 20X; D) Imagem representativa de 1 experimento do tratamento com sunitinibe 8 μ M por 48h imunomarcado com DAPI no aumento 20X e 63X. Dados apresentados em média \pm D.P. e analisados por teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey vs controle, *p<0,05.

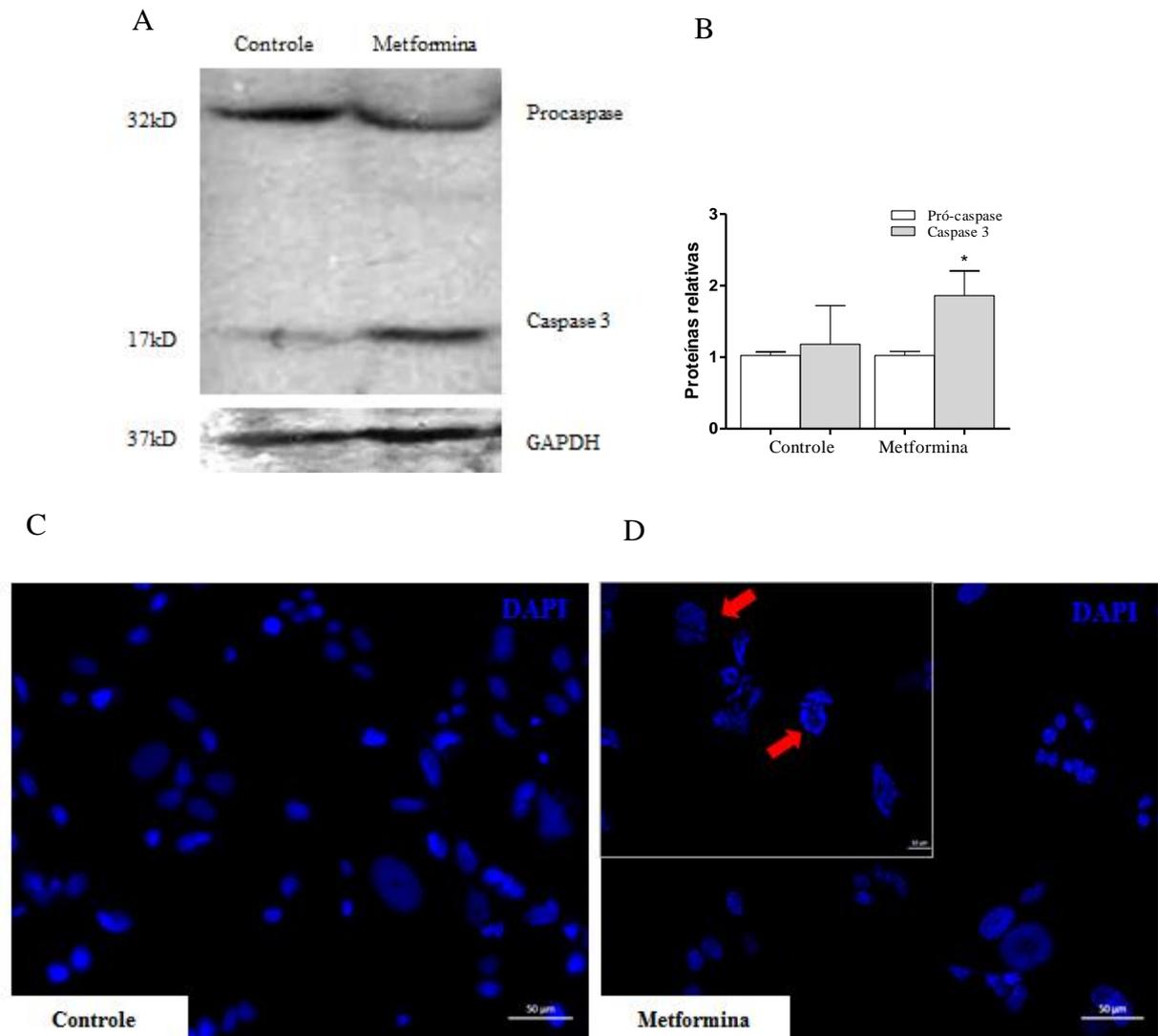


Figura 13. Clivagem da caspase 3 das células de feocromocitoma tratadas com metformina avaliada por Western Blot e imunomarcção com DAPI: A) Células PC-12 Adh tratadas com metformina 20mM por 48h; bandas de pró-caspase e caspase 3 (40µg de proteínas). B) Razão controle/tratado com metformina 20mM das bandas de pró-caspase e caspase 3; C) Imagem representativa de 1 experimento do controle imunomarcado com DAPI no aumento de 20X; D) Imagem representativa de 1 experimento do tratamento com metformina 20mM por 48h imunomarcado com DAPI no aumento 20X e 63X. Dados apresentados em média ±D.P. e analisados por teste One-way ANOVA com pós-teste de Tukey vs controle, *p<0,05.

5.2.2 Avaliação da expressão e da atividade das proteínas da via AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a expressão e a atividade de proteínas da via AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α de proliferação celular. Para tal, as células PC-12 Adh foram tratadas com sunitinibe 8 μ M e metformina 20mM por 48h.

Os resultados sugerem que a inibição da viabilidade das células PC-12 Adh promovida pelo sunitinibe parece aumentar a atividade de AMPK (painel esquerdo) e mTOR (painel direito) mas não altera as outras proteínas da via (Figura 14), ao contrário, a metformina 20mM aumenta a fosforilação de AMPK (painel esquerdo), favorece a desfosforilação do AKT (painel esquerdo) e, conseqüentemente, a inibição da sinalização positiva para o mTOR (painel direito), diminui p70S6K (painel direito) e HIF1 α (painel direito). A expressão da proteína mTOR da amostra de células tratadas com a metformina também está diminuída, desta forma, os resultados sugerem que a metformina reduz tanto a atividade quanto a expressão da proteína mTOR (Figura 15).

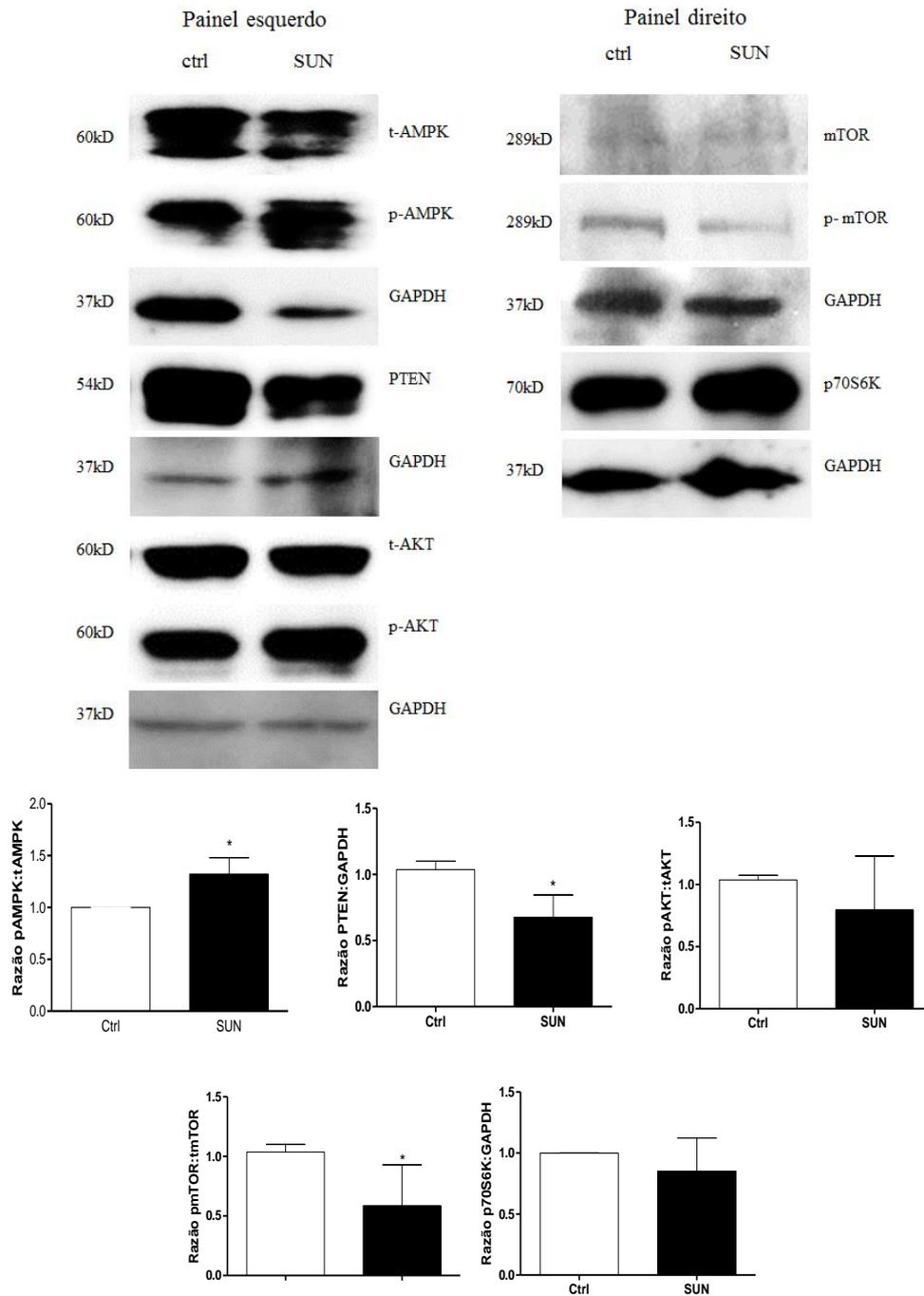


Figura 14. Expressão e atividade de proteínas da via PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α de células de feocromocitoma tratadas com sunitinibe: A) Imagem representativa de 1 experimento do tratamento com sunitinibe; Painel esquerdo: B) Expressão do PTEN; C) AKT total/fosforilada; Painel direito: D) mTOR total/fosforilada; E) p70S6K; F) HIF1 α das células PC12-Adh tratadas com sunitinibe 8 μ M por 48h (40 μ g de proteínas); Dados apresentados em média \pm D.P. e analisados por teste Mann-Whitney vs controle, * $p < 0,05$.

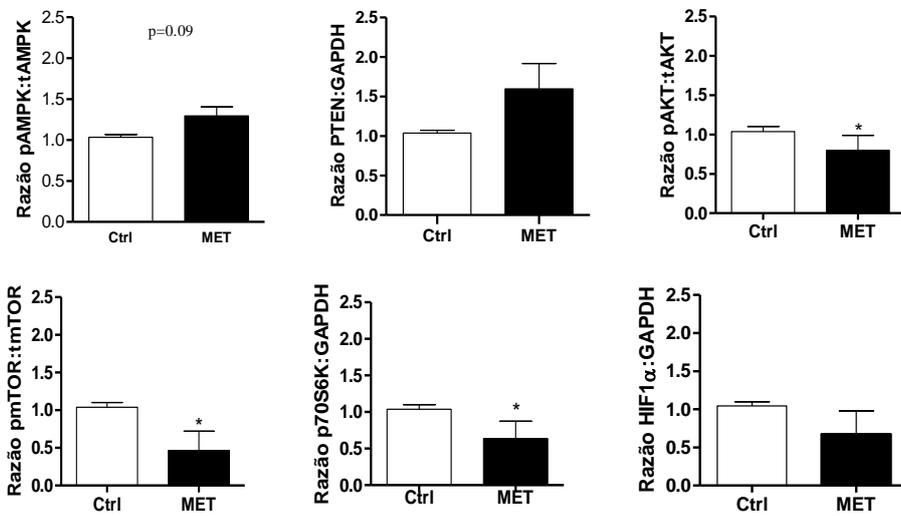
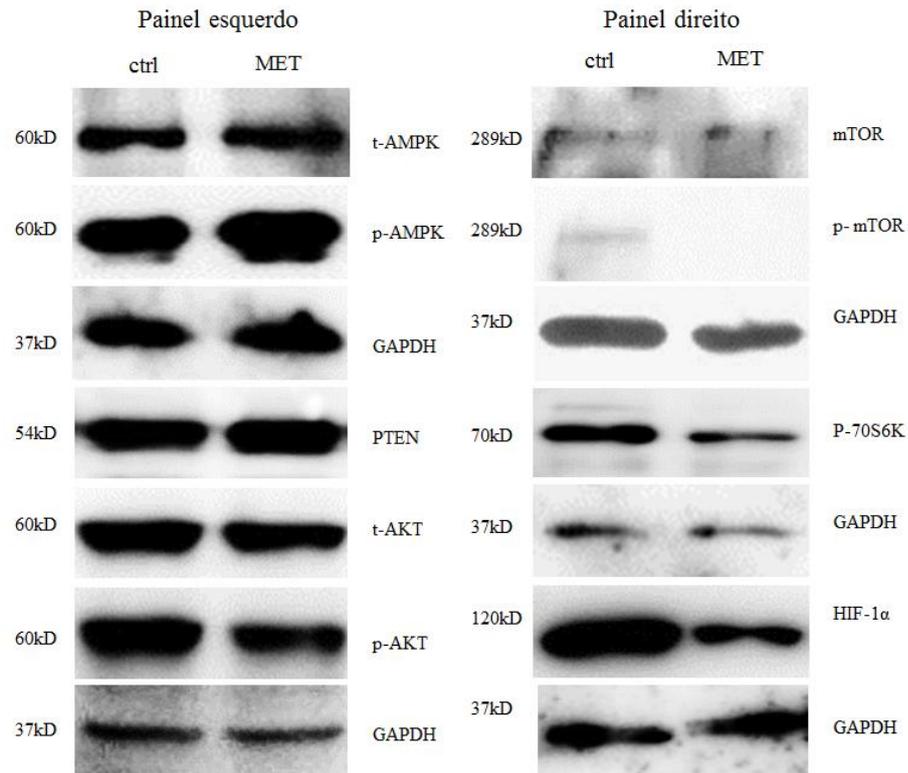


Figura 15. Expressão e atividade de proteínas da via PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α de células de feocromocitoma tratadas com metformina: A) Imagem representativa de 1 experimento do tratamento com metformina; Painel esquerdo: B) Expressão do PTEN; C) AKT total/fosforilada; Painel direito: D) mTOR total/fosforilada; E) p70S6K; F) HIF1 α das células PC12-Adh tratadas com sunitinibe 8 μ M por 48h (40 μ g de proteínas);. Dados apresentados em média \pm D.P. e analisados por teste Mann-Whitney vs controle, *p<0,05.

5.2.3 Avaliação da expressão e da atividade das proteínas da via AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α da cultura primária

A mesma via avaliada nas células PC-12 Adh também foi avaliada na células da cultura primária tratadas com metformina 20mM por 48h e os resultados sugerem que a metformina parece não interferir na fosforilação da AMPK e AKT, e na expressão do PTEN, mas parece diminuir a fosforilação e a expressão do mTOR, p70S6K e HIF1 α (Figura 16).

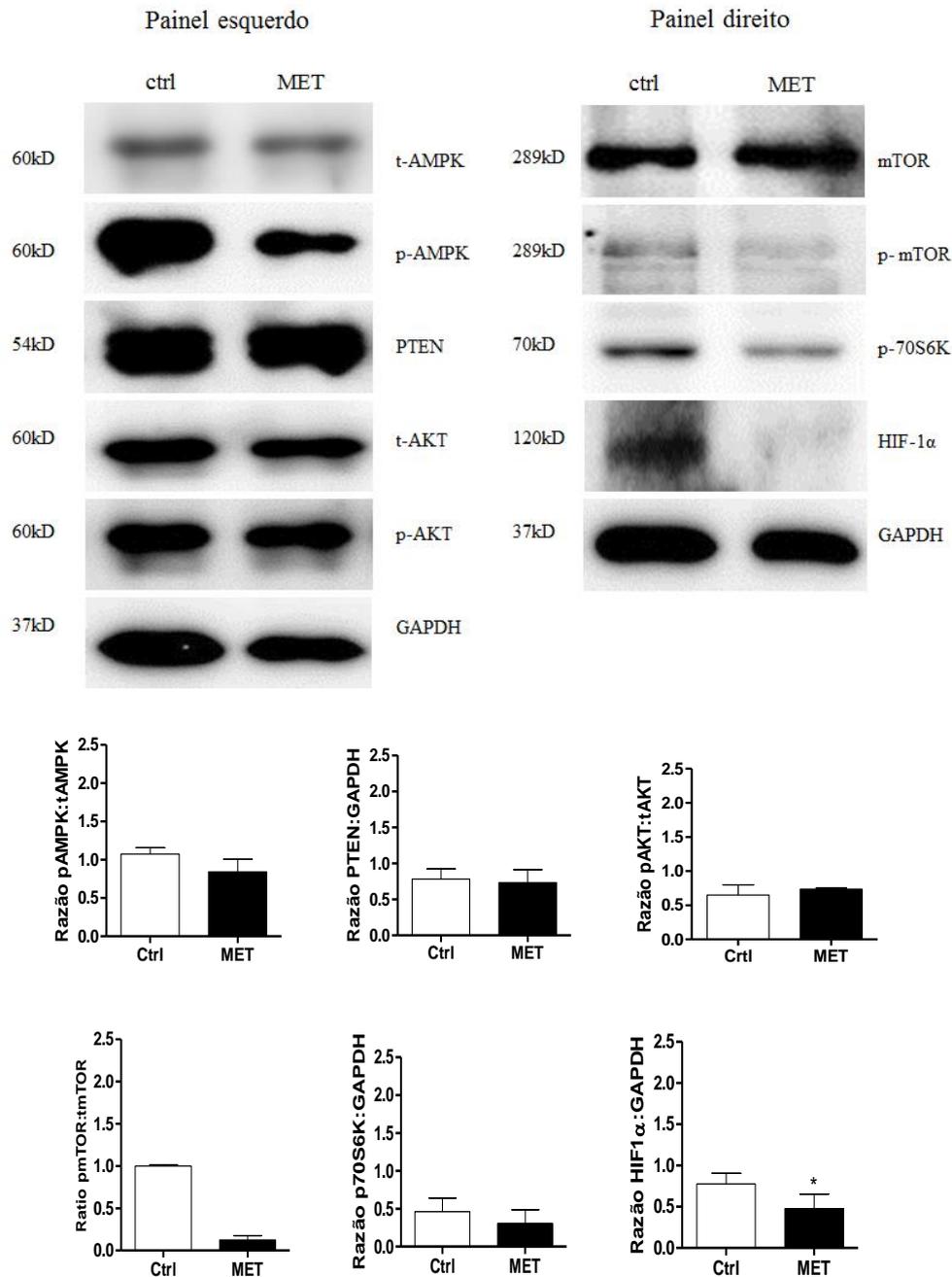


Figura 16. Expressão e atividade de proteínas da via PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α de células de cultura primária de feocromocitoma tratadas com metformina: A) Imagem representativa de 1 experimento do tratamento com metformina; Painel esquerdo: B) Expressão do PTEN; C) AKT total/fosforilada; Painel direito: D) mTOR total/fosforilada; E) p70S6K; F) HIF1 α das células PC12-Adh tratadas com sunitinibe 8 μ M por 48h (40 μ g de proteínas); Dados apresentados em média \pm D.P. e analisados por teste Mann-Whitney vs controle, *p<0,05.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DA CULTURA PRIMÁRIA

Os resultados da expressão proteica sugerem redução dos níveis de HIF1 α nas amostras tratadas com metformina. Sabe-se que o aumento dos níveis de HIF1 α e HIF2 α está relacionado à ativação da transcrição gênica de *VEGF* e aumento da angiogênese. Pensando nisso, foi avaliada a expressão gênica das isoformas de *HIF* α (1, 2 e 3) em cultura primária de feocromocitoma tratada com metformina 20mM. Os dados sugerem aumento da expressão de *HIF2* α (EPAS) enquanto a expressão das formas 1, 3 e *HIF1* β (*ARNT*) não se alteram o que não corrobora com os achados na expressão proteica.

Visando o potencial efeito da metformina em vias relacionadas à angiogênese, foram avaliados ainda os níveis de VEGFA e VEGFR e os resultados sugerem redução da expressão do receptor de VEGF e não alteração do fator VEGFA. Foram avaliados também genes *ADM* e *ANGP* - genes relacionados à angiogênese -, e os dados mostraram aumento da expressão de *ANGP* enquanto *ADM* não sofreram alteração (Figura 17).

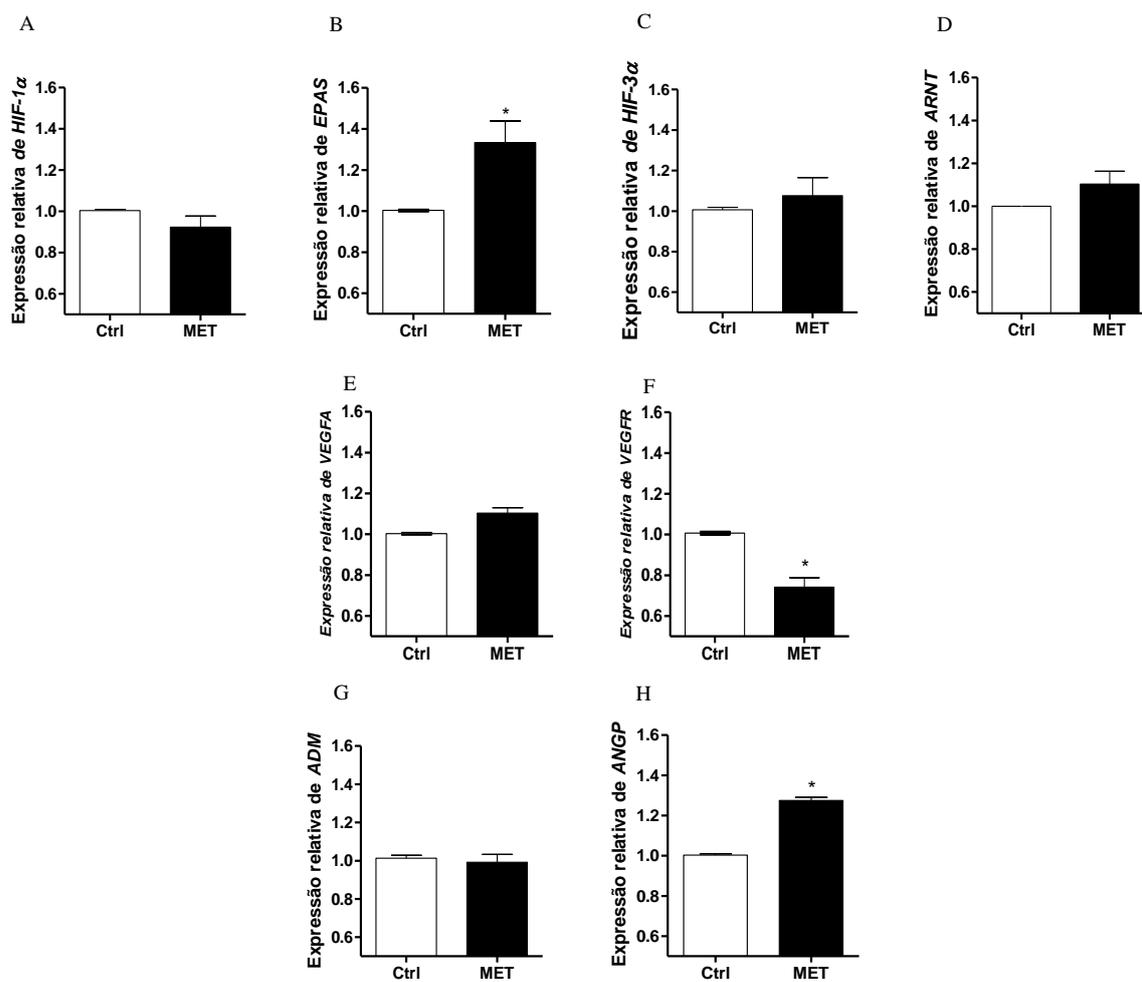


Figura 17. Expressão genes relacionados à angiogênese em células de cultura primária tratadas com metformina: Expressão dos genes A) *HIF1α*, B) *EPAS*, C) *HIF3α*, D) *ARNT*, E) *VEGFA*, F) *VEGFR*, G) *ADM* e H) *ANGP* em cultura de células não-tratadas (controle) e tratadas com metformina (CI₄₀dose= 20mM) por 48h. Dados apresentados em média ±D.P. e analisados por teste Mann-Whitney vs controle, *p<0,05.

5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NA DEGRADAÇÃO PROMOVIDA PELO PROTEASSOMA

Os dados da expressão da proteína HIF1 α nas células tratadas com metformina foram diferentes do resultado obtido na expressão gênica, logo uma dúvida que surgiu foi se a metformina reduziu a expressão da proteína ou aumentou a degradação da HIF pelo proteassoma. Para fazer esta análise as células PC-12 Adh foram tratadas com metformina 20mM e MG132 (inibidor do proteassoma) 15uM por 6h. Os resultados confirmaram que a metformina sozinha reduz a densidade da banda da proteína HIF1 α , por outro lado, a associação de metformina com o inibidor de proteassoma promoveu o acúmulo de ubiquitina e recupera a banda sugerindo inibição do proteassoma pela metformina (Figura 18).

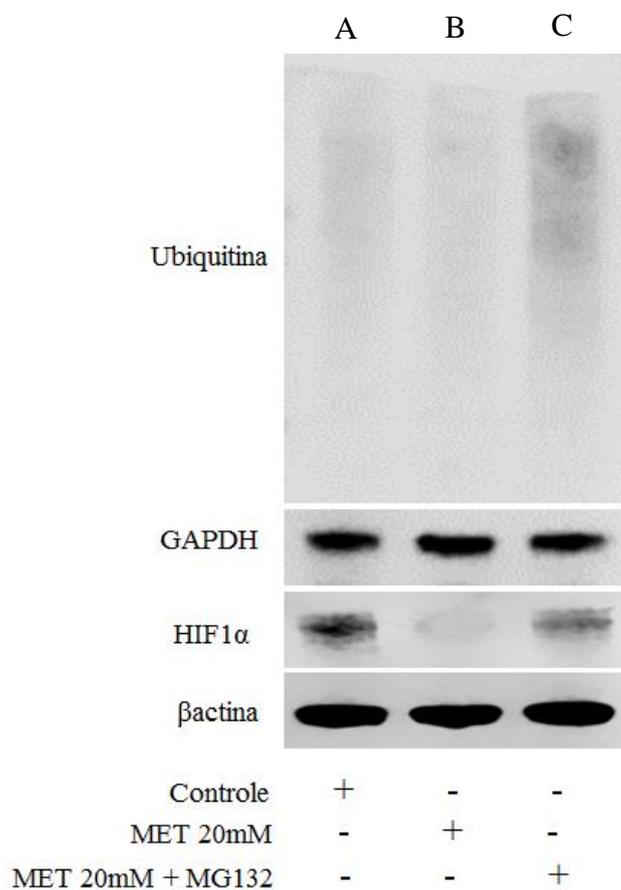


Figura 18. Inibição do proteassoma promovido pela metformina em células de feocromocitoma tratadas com metformina: Células PC-12 Adh, A) controle, B) tratamento com metformina 20Mm por 6h e C) tratamento da associação de metformina 20mM e MG132 15uM por 6h.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA NA DINÂMICA MITOCONDRIAL

O Drp-1 é uma proteína importante no processo de fissão mitocondrial, quando ocorre o aumento no recrutamento desta proteína, Drp-1 diminui, as mitocôndrias ficam mais fragmentadas, há menos consumo de oxigênio, menos ATP formado e conseqüentemente menor metabolismo. Para avaliar o recrutamento de Drp-1 em células tratadas com metformina 20mM e não-tratadas, foi realizada uma imunomarcção com Drp-1 e TOM 20 (marcador de mitocôndria) em células PC12-Adh. Foi feito ainda o silenciamento dos genes VHL e SDHB nestas mesmas células e tratadas com metformina. Os resultados são parciais e mostram redução significativa do recrutamento de Drp-1 nas células silenciadas para VHL tratadas com metformina 20mM e não há modificação entre as outras variáveis.

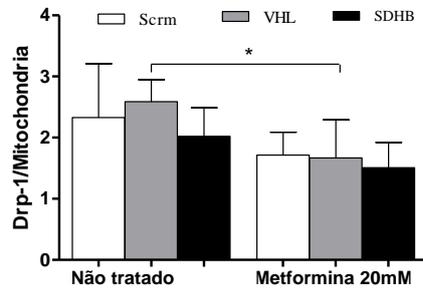
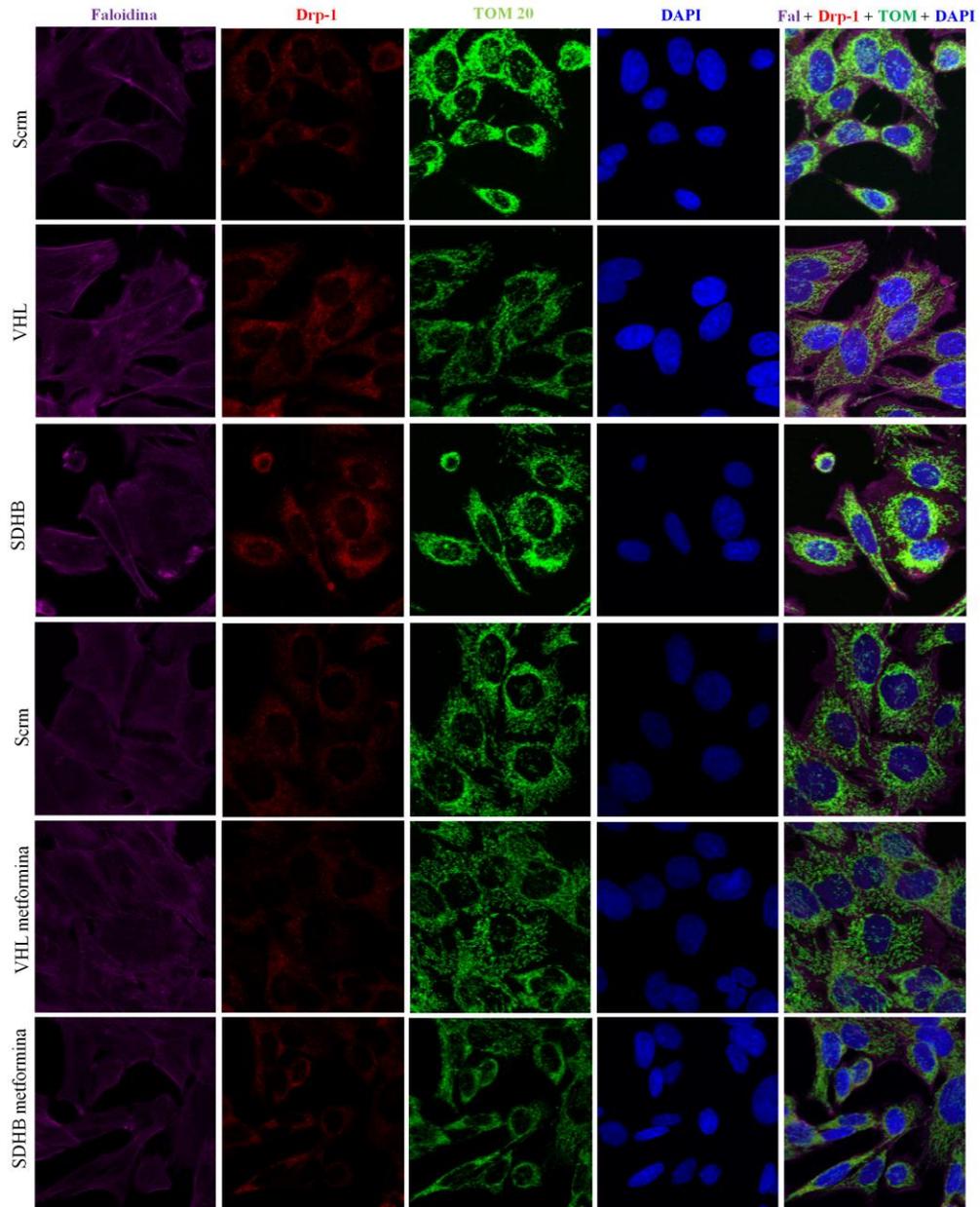


Figura 19. Imunomarcção com Drp-1 em células de feocromocitoma tratadas com metformina: Células PC12-Adh marcadas com Drp-1 e TOM20 na seguinte ordem: controle scrm, controle VHL, controle SDHB, metformina 20mM scrm, metformina 20mM VHL, metformina 20mM SDHB. Gráfico representativo de 20 imagens feitas em 1 experimento. Dados apresentados em média \pm D.P. e analisados por teste Kruskal-Wallis vs controle, * $p < 0,05$.

5.6 ESTRESSE CELULAR E RESPIRAÇÃO DAS CÉLULAS PC-12 ADH

Para justificar a redução da proliferação das células PC-12 Adh e da cultura primária, os próximos passos foram avaliar o estresse promovido pelo tratamento com metformina e a respiração celular.

5.6.1 Ensaio de peroxidação lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica é um evento que está altamente associado ao uso de substâncias oxidantes, culminando em formação de radicais livres e ácidos graxos que induz a degradação celular, no entanto, esse evento pode preceder a morte celular programada de alguns tipos celulares (CAO e col., 2016). Pensando nisso, foi realizado o ensaio de peroxidação lipídica nas células PC-12 Adh e foi observado que o tratamento com metformina 20mM por 24h induz a formação de produtos da peroxidação lipídica (Figura 20).

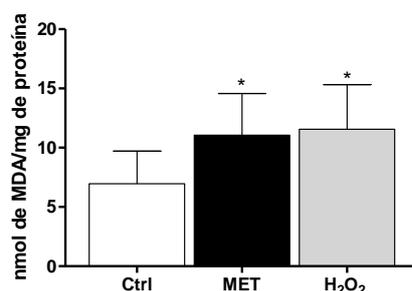


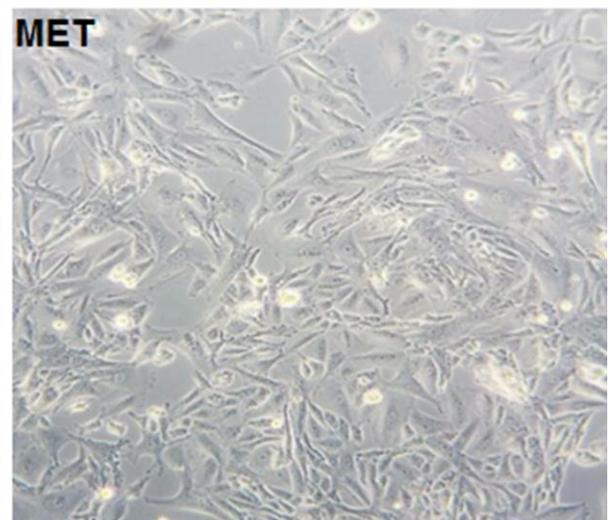
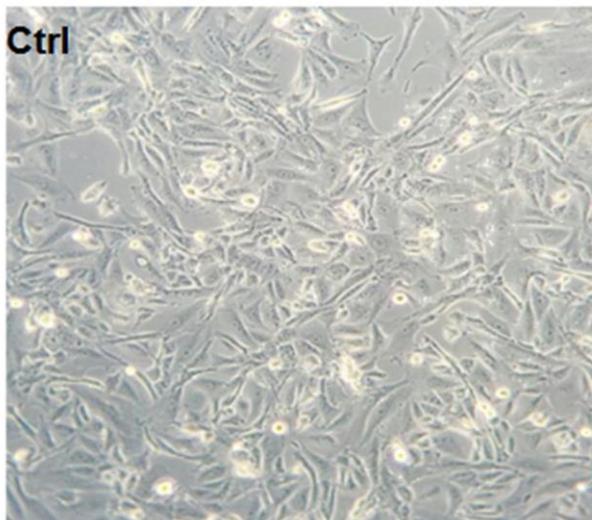
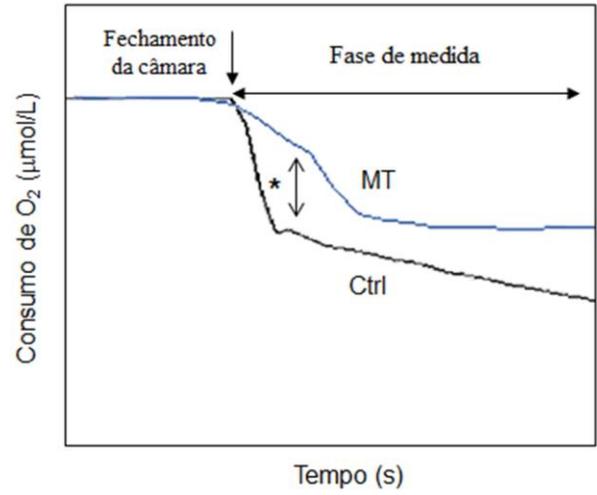
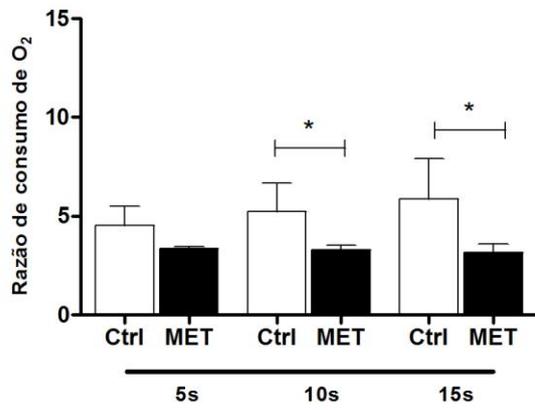
Figura 20. Estresse das células de feocromocitoma tratadas com metformina: Células PC-12 Adh não-tratadas, tratadas com metformina 20mM, e controle positivo com H₂O₂ 300μM, todos por 24h. Dados apresentados em média ±D.P. e analisados por teste Kruskal-Wallis vs controle, *p<0,05.

5.6.2 Ensaio de respiração celular

Os ensaios de viabilidade e proliferação celular confirmaram que a metformina reduz a viabilidade das células PC-12 Adh, por inibir a atividade da mitocôndria (MTT), por gerar lesão da membrana celular (azul de tripan) e diminuição da formação de novas fitas de DNA (BrdU), além de mostrar efeitos na via de Caspase 3 e AMPK/PTEN/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α e inibição do proteossoma. Foi constatado, ainda, que a metformina reduz o recrutamento de Drp-1 e induz o estresse nas células PC-12 Adh. Levando em conta estes efeitos, a próxima questão foi: como a metformina modula a respiração celular e leva a esses efeitos sobre vias tumorigênicas? Sabe-se que a metformina inibe o complexo 1 da cadeia de transporte de elétrons, reduz a atividade de ATP sintase gerando estresse celular.

Sabidamente, a metformina induz ao estresse celular de diversas linhagens de células cancerígenas, por inibir uma etapa da respiração celular. Desta forma, foi conduzido o ensaio de respiração celular, o qual avalia o consumo de oxigênio presente na cuba de respiração na qual são colocadas as células. Foi observado que em 15 segundos as células PC-12 Adh tratadas com metformina 20mM consumiram menos oxigênio que as células não tratadas de forma significativa (Figura 21A). Em contrapartida, as células de fibroblastos de pele humana não tiveram sua respiração modificada com tratameto com metformina 20mM por 6h (Figura 21B). Os histogramas gerados pelo respirômetro mostram que a metformina 20mM desloca a curva de consumo de oxigênio quando comparada com o controle (Figura 21A) nas células de feocromocitoma de ratos e não altera a curva das células CCD-1059Sk (Figura 21A). As imagens representativas dos tratamentos mostram que não há diferença entre os grupos tratados e não tratados no que diz respeito à morfologia e número de células (Figura 21A e B).

A



B

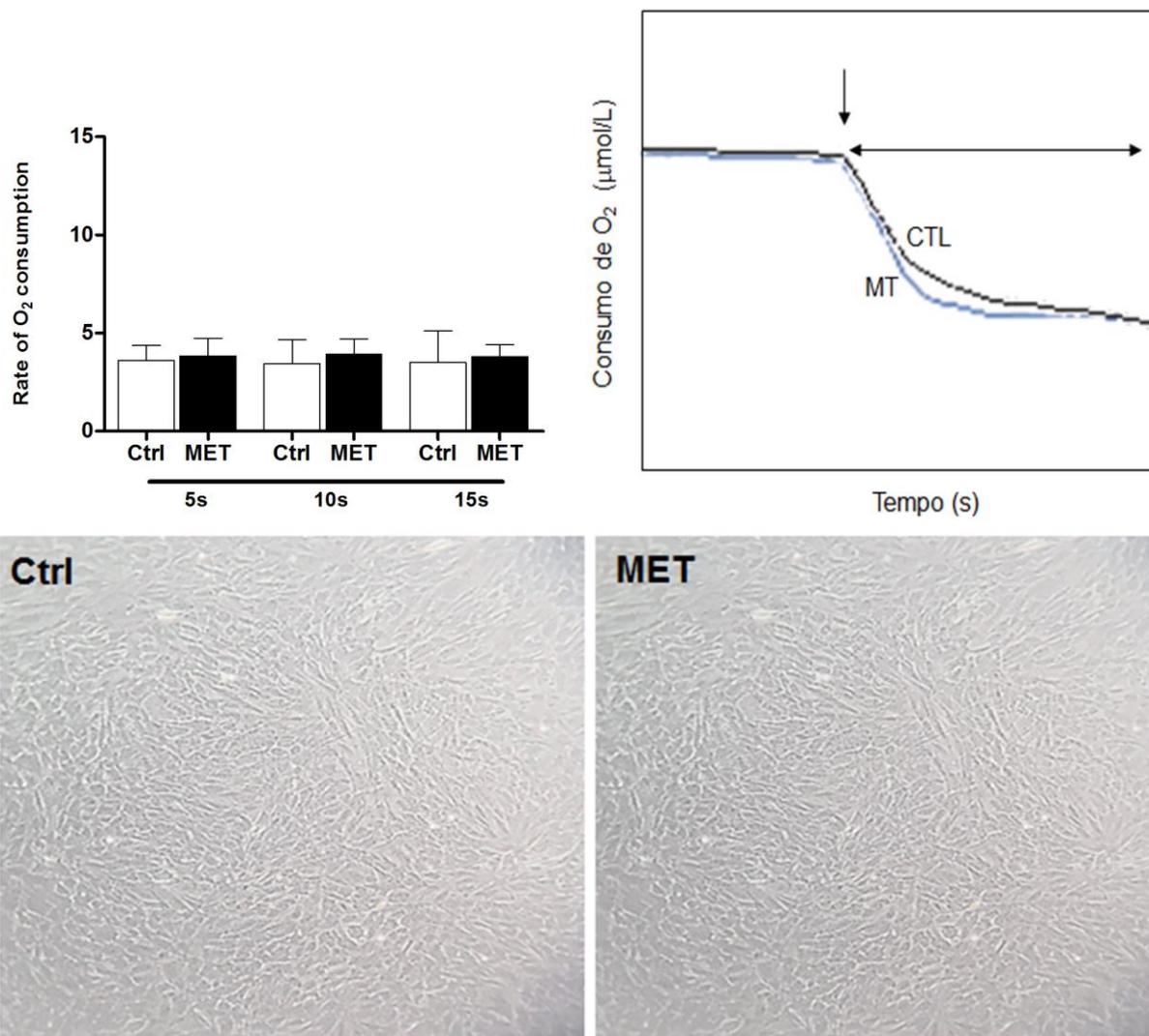


Figura 21. Respiração celular nas células de feocromocitoma e de pele humana tratadas com metformina: A) Consumo de oxigênio em 0, 5 e 10 segundos das células PC-12 Adh tratadas com metformina 20mM por 6h; Histograma do consumo de oxigênio do controle e tratamento com metformina nas células PC-12Adh; Representação da morfologia e do número de células do controle das células PC-12 Adh; Representação da morfologia e do número de células do tratamento com metformina 20mM por 6h; B) Consumo de oxigênio em 0, 5 e 10 segundos das células CCD-1059Sk tratadas com metformina 20mM por 6h; Histograma do consumo de oxigênio do controle e tratamento com metformina nas células CCD-1059Sk; Representação da morfologia e do número de células do controle das células CCD-1059Sk; Representação da morfologia e do número de células do tratamento com metformina 20mM (MET) por 6h nas células CCD-1059Sk e controles (Ctrl). Dados apresentados em mediana \pm D.P. e analisados por teste Kruskal- Wallis vs controle. * $p < 0,05$

Os efeitos da metformina foram avaliados em várias etapas da respiração celular, como a respiração basal, produção de ATP, respiração máxima e troca de prótons. Para isto, células PC-12 Adh foram tratadas com metformina 20mM. O consumo de oxigênio foi mensurado em 12 tempos diferentes. Pode-se observar na Figura 22 a redução dos parametros da respiração celular do tratamento comparado com o controle, exceto na respiração máxima, e esse efeito parece ser dose dependente, pois o consumo de oxigênio reduz gradativamente à medida que se aumenta a concentração de metformina.

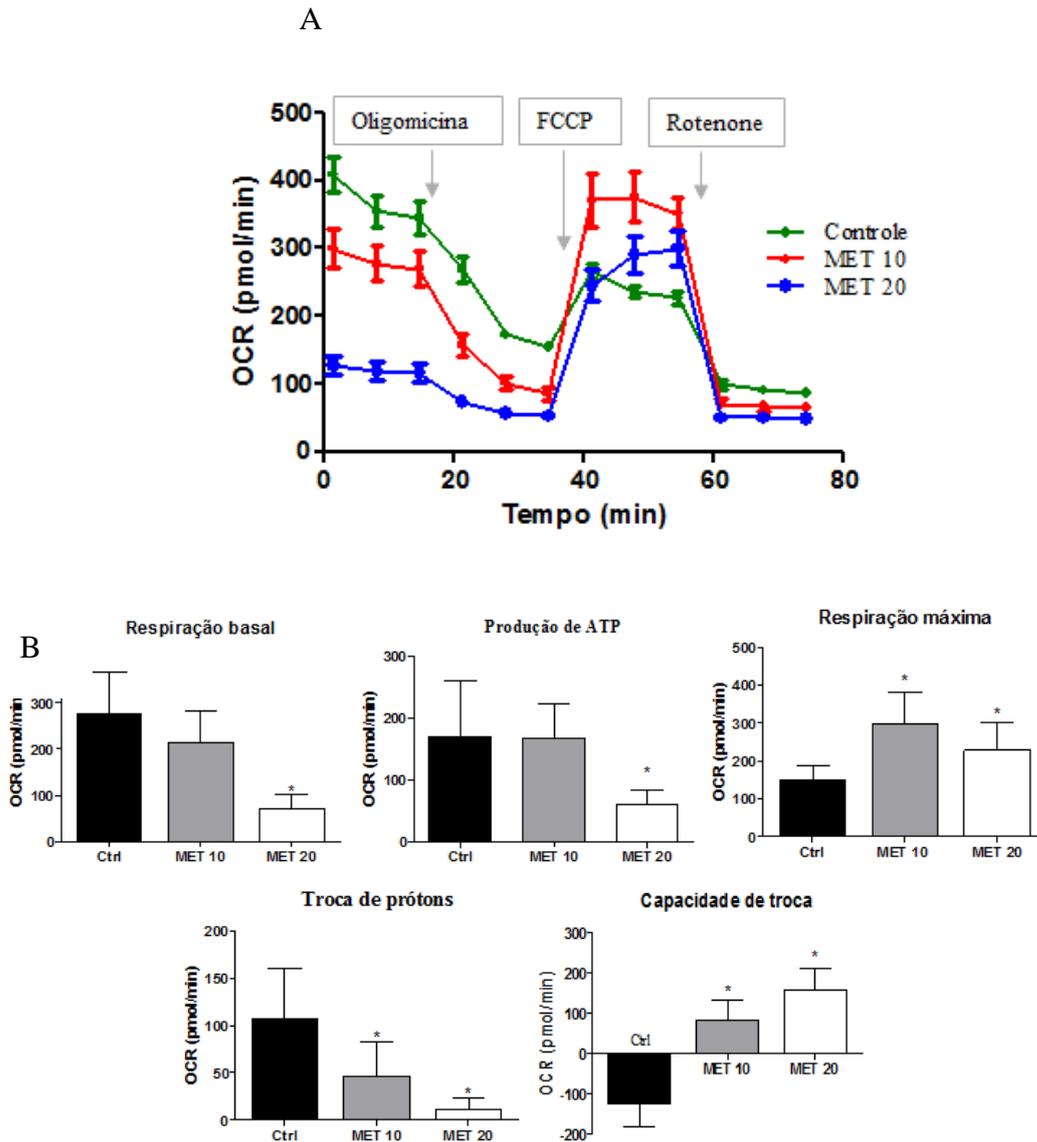
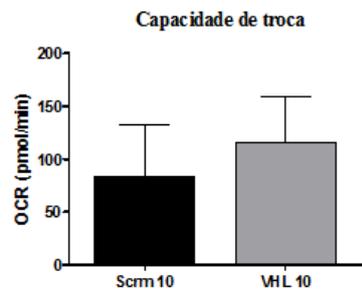
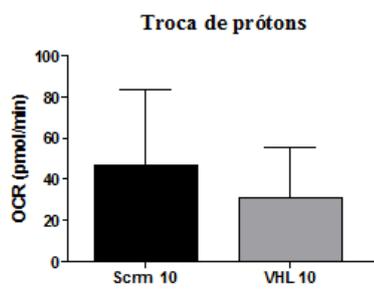
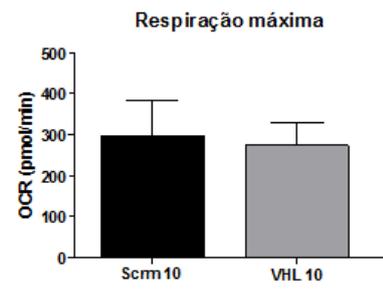
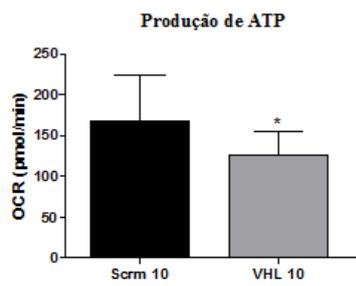
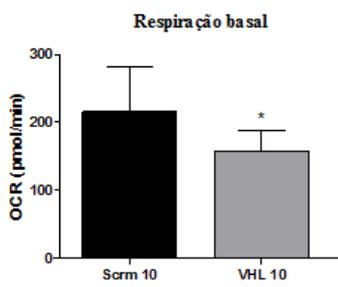
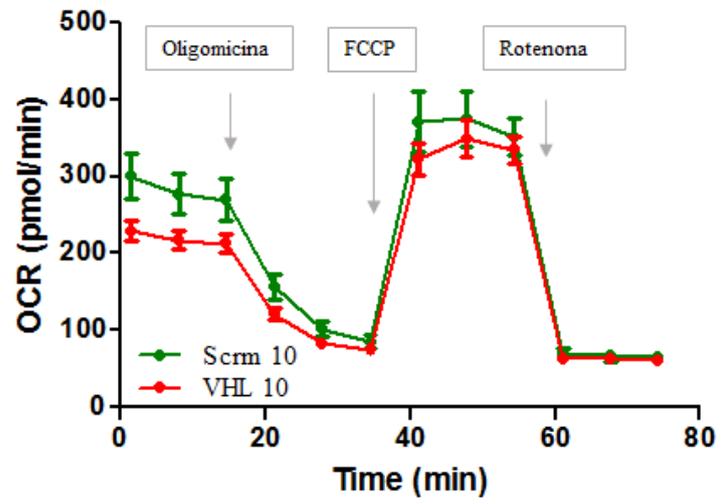
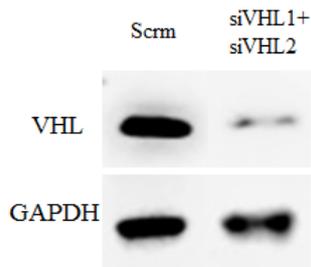


Figura 22. Respiração celular nas células de feocromocitoma tratadas com metformina: A) Consumo de oxigênio medido em 12 tempos diferentes; após 3 medidas, a oligomicina foi adicionada. Depois de outras 3 medidas FCCP foi adicionado. Por fim, após 3 medidas rotenone foi adicionado. B) Respiração basal, produção de ATP, Respiração Máxima, troca de prótons e capacidade de troca de células PC-12 Adh tratadas com metformina 10mM e 20mM por 6h vs com controle. Dados apresentadas em mediana \pm D.P. e analisados por teste Kruskal- Wallis vs controle, * $p < 0,05$.

5.6.3 Avaliação da respiração celular em células silenciadas para os genes VHL e SDHB

A mesma análise foi realizada nas células PC-12 Adh silenciadas para o gene VHL e SDHB. Inicialmente foi feito um teste para avaliar a eficiência do silenciamento tanto do VHL quanto do SDHB. Em seguida, as células silenciadas foram tratadas com metformina 10 e 20mM por 6h. Os resultados mostram que a metformina 10mM reduz os parâmetros da respiração (respiração basal, produção de ATP e troca de prótons), mas na concentração de 20mM a respiração não é modificada quando são comparados metformina vs controle. Este fenômeno é observado tanto nas células silenciadas para VHL quanto para SDHB (Figura 23 e 24).

A



B

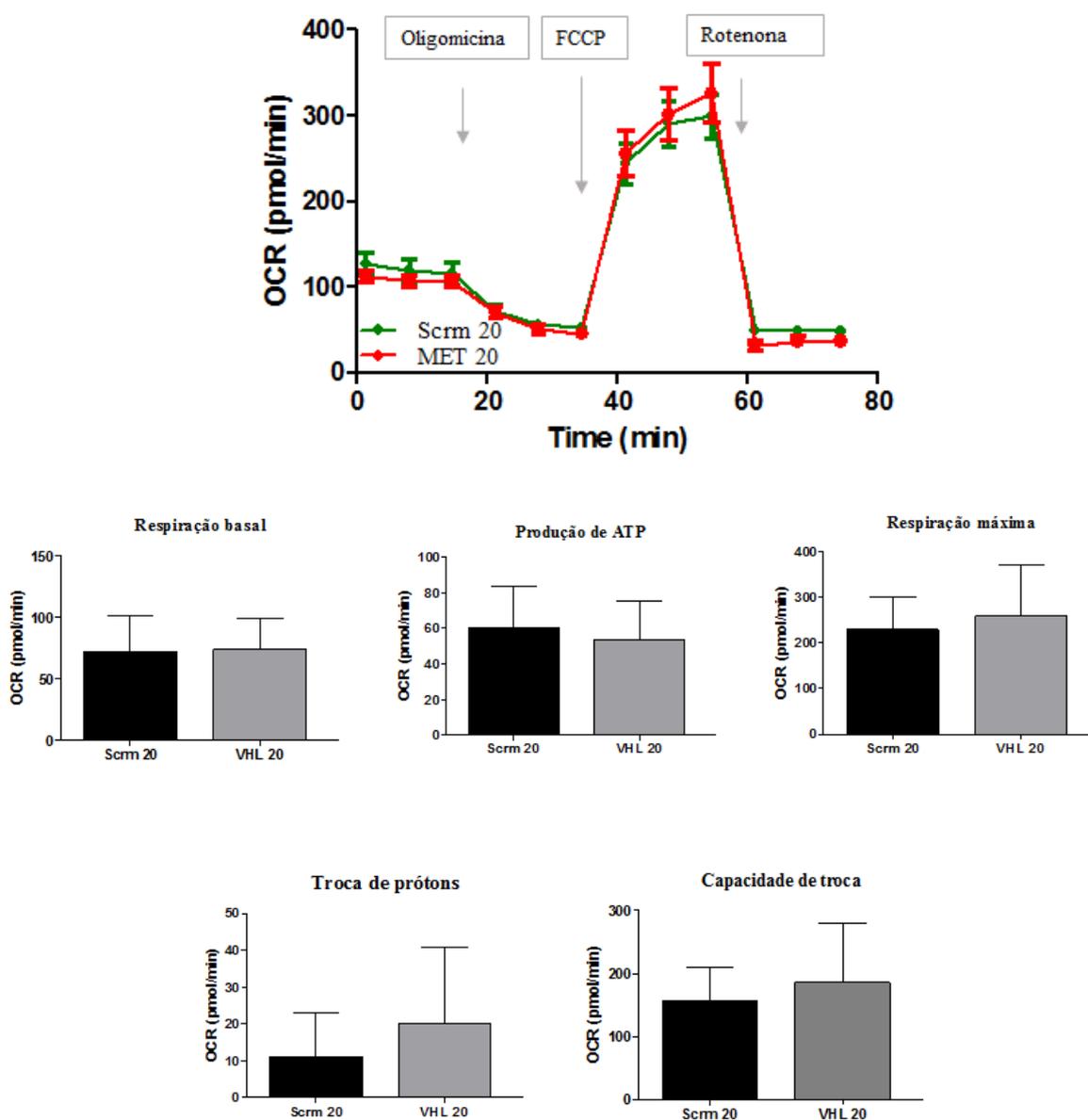
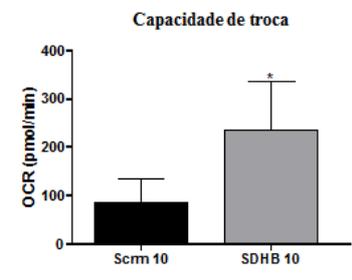
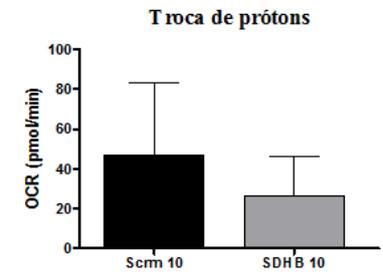
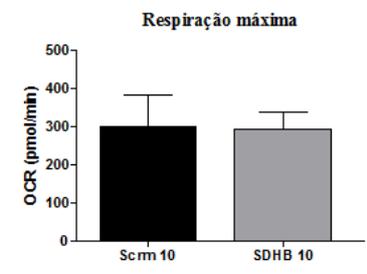
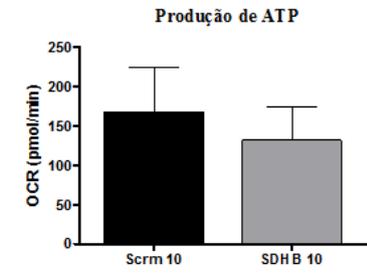
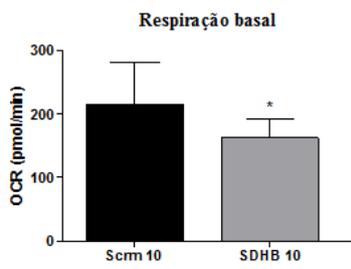
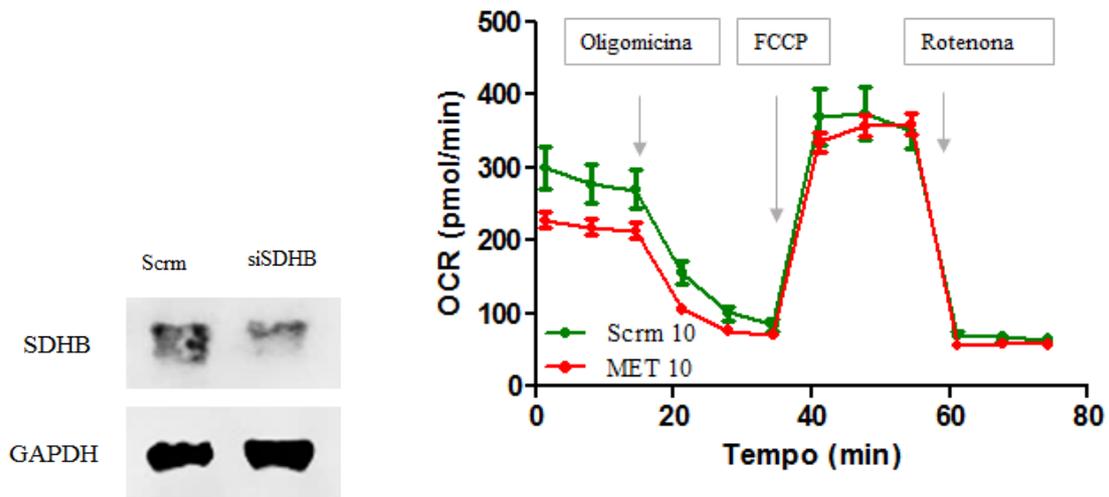


Figura 23. Respiração celular nas células de feocromocitoma mutadas para o gene VHL tratadas com metformina: A) Expressão da proteína VHL após transfecção do siRNA; Consumo de oxigênio medido em 12 tempos diferentes em células PC-12 Adh transfectadas com siVHL e tratadas com metformina 10mM; após 3 medidas, oligomicina foi adicionada, após 3 medidas FCCP foi adicionado. Por fim, após 3 outras medidas, rotenone foi adicionado; Respiração basal, produção de ATP, Respiração Máxima, troca de prótons e capacidade de troca de células PC-12 Adh tratadas com metformina 10mM e por 6h vs com controle. B) Consumo de oxigênio medido em 12 tempos diferentes em células PC12-Adh transfectadas com siVHL e tratadas com metformina 20mM; Respiração basal, produção de ATP, Respiração Máxima, troca de prótons e capacidade de troca de células PC-12 Adh tratadas com metformina 10mM e por 6h vs com controle. Dados apresentados em mediana \pm D.P. e analisados por teste Kruskal- Wallis vs controle, * $p < 0,05$.

A



B

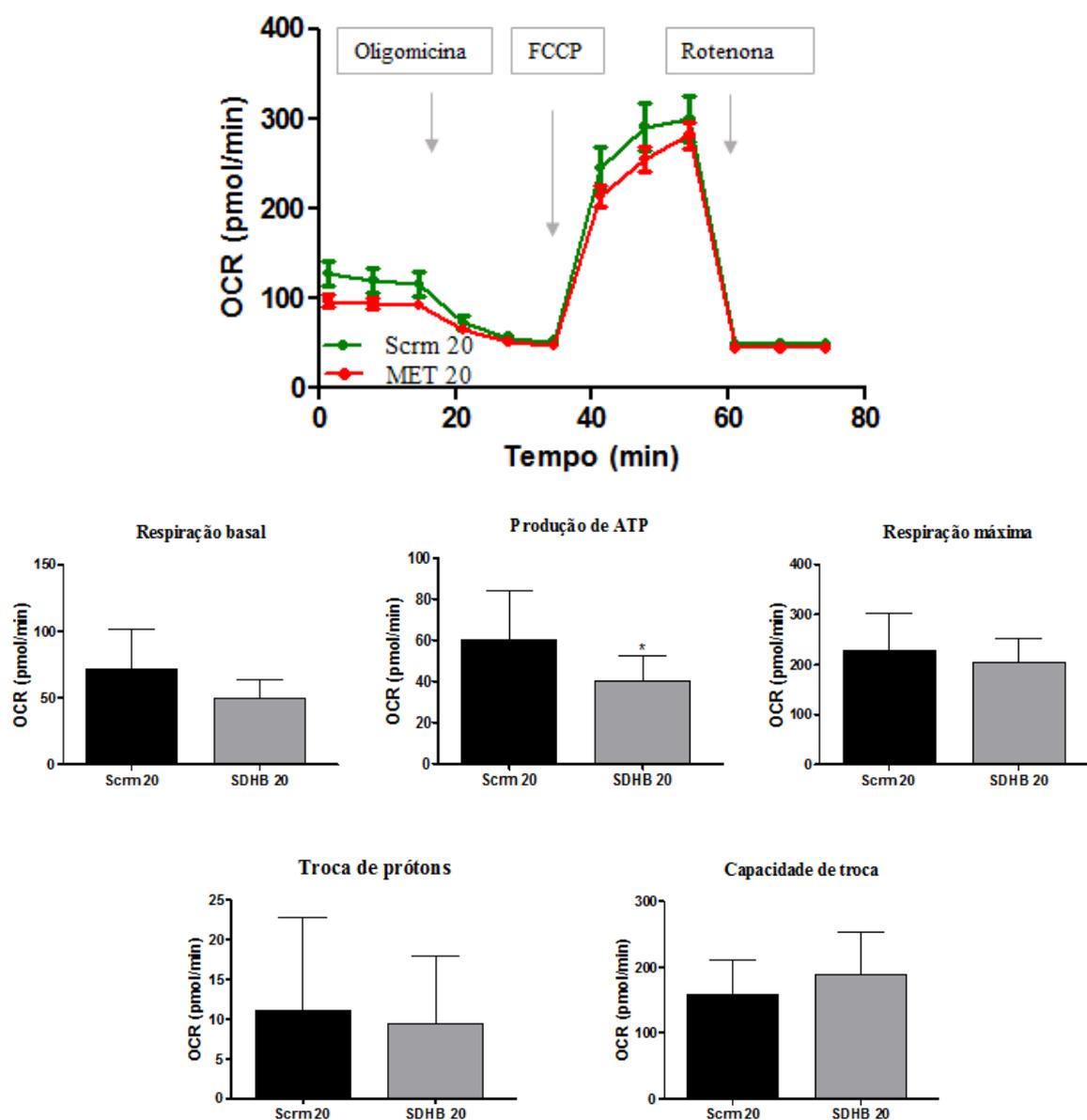


Figura 24. Respiração celular nas células de feocromocitoma mutadas para o gene SDHB tratadas com metformina: A) Expressão da proteína VHL após transfecção do siRNA; Consumo de oxigênio medido em 12 tempos diferentes em células PC-12 Adh transfectadas com siVHL e tratadas com metformina 10mM; após 3 medidas, oligomicina foi adicionado em seguida após 3 medidas FCCP foi adicionado. Por fim após 3 outras medidas rotenone foi adicionado; Respiração basal, produção de ATP, Respiração Máxima, troca de prótons e capacidade de troca de células PC-12 Adh tratadas com metformina 10mM e por 6h vs com controle. B) Consumo de oxigênio medidos em 12 tempos diferentes em células PC-12 Adh transfectadas com siVHL e tratadas com metformina 20Mm; E) Respiração basal, produção de ATP, Respiração Máxima, troca de prótons e capacidade de troca de células PC-12 Adh tratadas com metformina 10mM e por 6h vs com controle. Dados apresentadas em mediana \pm D.P. e analisados por teste Kruskal- Wallis vs controle, * $p < 0,05$.

6. DISCUSSÃO

Os primeiros casos de feocromocitoma foram descritos em 1986 por Felix Fraenkel e Max Schottelius (BAUSCH e col., 2017), no entanto, apenas nos anos 2000, com o advento de ferramentas de diagnóstico genético, algumas síndromes clássicas foram detalhadas, especificamente Síndrome de *Von Hippel Lindau*, neurofibromatose e neoplasia endócrina (ASTUTI e col., 2001) e alguns casos malignos foram associados às mutações no complexo de genes *SDHx* (NEUMANN e col., 2004). Desde então, o tratamento de recorrência do FEO/PGL e de casos malignos constituem um grande desafio no sentido de melhorar o prognóstico e a sobrevida de pacientes com feocromocitoma e paraganglioma.

Fecromocitomas e paragangliomas com características malignas são pouco responsivos à quimioterapia convencional já utilizada em alguns tipos de tumores de origem neuroendócrina. Recentemente, inibidores multialvo de receptores de tirosina quinase foram testados em células de feocromocitoma de ratos e os resultados mostraram que o sunitinibe modulou negativamente a via VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1. No entanto, na prática clínica, os efeitos do sunitinibe na redução da progressão do tumor foram contraditórios (AJALLE e col., 2013). Ainda no contexto de malignidade, estudos experimentais vêm demonstrando que inibidores de proteossoma como o bortezomibe diminuem a viabilidade e a migração, além de induzir a apoptose em células de feocromocitoma (BULLOVA e col., 2017).

Atualmente, o metabolismo representa um potencial alvo para o tratamento multifatorial na terapia do câncer no geral. No presente estudo, foram avaliados os efeitos da metformina, fármaco que apresenta ações e efeitos predominantemente metabólicos, sobre a proliferação, sobrevivência e apoptose de células imortalizadas de feocromocitoma de ratos e de células de cultura primária de feocromocitoma humano. Estudos anteriores que mostraram associação entre o tratamento com metformina e a redução da proliferação de diversos tipos de células câncer embasaram o presente trabalho (PYASKOVSKAYA e col., 2017; SELIGER e col., 2016; COSTA e col., 2014). Até o momento, os efeitos da metformina em linhagens de células de feocromocitoma estão pouco elucidados.

Foi feita uma investigação inicial utilizando células de feocromocitoma de ratos, as células PC-12 Adh. São células com características predominantemente noradrenérgicas com

estruturas morfológicas e citoquímicas semelhantes às células de feocromocitoma humano (GREENE & TISHLER, 1976) e representam novos modelos para estudo de tumores neuroendócrinos.

A hipótese inicial deste estudo foi que a metformina teria um efeito sobre a viabilidade de células de feocromocitoma, assim, os primeiros ensaios realizados foram feitos para avaliar a viabilidade e proliferação celular. De acordo com os resultados obtidos pela autora no mestrado (MEIRELES e col., 2015), a metformina e o sunitinibe diminuem a viabilidade das células PC-12 Adh em 40 e 60% respectivamente, quando avaliados pelo método MTT, o qual avalia indiretamente a viabilidade com base na atividade mitocondrial. Esse achado corrobora o estudo de Mi Li e colaboradores (2017) que mostrou redução da sobrevivência de células PC-12 Adh tratadas com metformina com concentração máxima de 50mM por 48h utilizando ensaio de viabilidade baseada na função mitocondrial (MI LI e col., 2017). Com relação ao sunitinibe, os achados encontrados corroboram os dados obtidos no estudo de Saito e colaboradores (2012) que observaram que o sunitinibe 1000 μ M reduziu a viabilidade de células PC-12 Adh em aproximadamente 30% por 24h utilizando o ensaio de MTT (SAITO e col., 2012).

Os resultados encontrados nas células de fibroblastos de pele humana mostram que os efeitos da metformina na viabilidade avaliada pelo método de MTT não são seletivos para as células tumorais, dados semelhantes aos encontrados no estudo de Weining Li e colaboradores (2013) (Figura 7). Semelhante ao presente estudo, esses autores também mostraram uma redução expressiva da viabilidade de células de queratinócitos (HaCat) quando tratadas com metformina 50mM por 72h, utilizando também teste com base na atividade mitocondrial (WEINING LI e col., 2013).

Pensando nas limitações técnicas do MTT, tais como reação com o soro fetal bovino presente no meio, medida indireta da viabilidade (não distinção entre redução do número de células e redução do metabolismo), dentre outros, foi selecionado um segundo teste de viabilidade celular com base na integridade da membrana celular. As mesmas doses e tempos de tratamento com sunitinibe e metformina foram repetidos nas células PC-12 Adh e CCD-1059Sk. Os resultados mostraram que a metformina reduziu a viabilidade das células de feocromocitoma em 60% na concentração de 20mM (CI_{40} encontrado no ensaio de MTT) (Figura 8). Não existem estudos que mostrem os efeitos da metformina em células de

feocromocitomas avaliados pela contagem com Azul de Tripán, entretanto, Kumar e colaboradores (2014), utilizando essa mesma técnica, mostraram em estudo com células de neuroblastoma (mesma origem embrionária do feocromocitoma) a redução da viabilidade em 80% quando essas células foram tratadas com metformina 20mM por 6 dias de tratamento (KUMAR e col., 2014).

Interessante notar que não foi possível visualizar modificação na viabilidade das células de fibroblastos de pele humana tratadas de forma semelhante às células de feocromocitoma e avaliadas pelo método de contagem de células utilizando azul de Tripán. Todos estes dados sugerem que a metformina reduz o metabolismo mitocondrial em ambas as linhagens celulares, não tumoral (fibroblastos de pele) e de feocromocitoma, mas os efeitos sobre a viabilidade mostraram-se seletivos para as células tumorais.

O próximo passo foi avaliar se a metformina poderia interferir na proliferação das células de feocromocitoma. Para tal, o ensaio de incorporação com BrdU foi realizado. As células PC-12 Adh foram tratadas com sunitinibe 8 μ M e metformina 20mM por 24 e 48h, e em ambos houve redução da proliferação de forma estatisticamente significativa nos tratamentos feitos em 48h (Figura 9). No estudo de Saito e colaboradores (2012) foi realizado o ensaio de proliferação em células PC-12 Adh por incorporação de BrDu e foi encontrada uma redução de proliferação de 35% com relação ao controle quando trataram com sunitinibe 1000 μ M (SAITO e col., 2012). Por outro lado, no estudo de Costa e colaboradores (2014), a metformina 20mM reduziu a proliferação de células de neuroblastoma utilizando o ensaio de incorporação com timidina (COSTA e col., 2014), dados de acordo com os achados neste presente estudo.

Para confirmar os achados encontrados no ensaio de proliferação celular, mais dois testes foram feitos com as células PC-12 Adh e CCD-1059Sk. O primeiro, para avaliar a formação de novas colônias, células tratadas e não tratadas com metformina foram coradas com cristal de violeta e após 5 dias de tratamento foram obtidas imagens das mesmas (Figura 10). Observou-se redução do número de células e colônias nas imagens das células tratadas com metformina, tanto das células normais quanto das células de feocromocitoma. Esses dados são semelhantes aos encontrados por Adeberg e colaboradores (2017) que avaliaram a sobrevivência das células de glioblastoma tratadas e não tratadas com metformina 20mM por 24h, contando as colônias coradas com azul de metileno (ADEBERG e col., 2017).

Os resultados encontrados na pesquisa desta Tese, nos ensaios de MTT, tripan e cristal de violeta, sugerem que a metformina interfere no metabolismo mitocondrial de ambas células. Entretanto, só foi possível observar redução da proliferação e do número de células tanto das células de feocromocitoma quanto nos fibroblastos de pele humana quando o tratamento foi feito de forma crônica. No tratamento agudo, isto é, em 48h, esse efeito foi seletivo e pareceu mais intenso em células tumorais.

A fim de confirmar os efeitos sobre a proliferação das células de feocromocitoma, foi conduzida a imunomarcagem com KI-67, um marcador de proliferação celular, em células PC-12 Adh tratadas e não tratadas com metformina 20mM, e foi possível observar redução de células positivas para KI-67 no grupo do tratamento (Figura 11). Esse achado foi semelhante ao de Verma e colaboradores (2018) que observaram a redução da marcação do KI-67 pelo método de imunohistoquímica em tecidos de tumores de camundongos com câncer de cabeça e pescoço tratados com metformina (VERMA e col., 2018).

Após avaliar os efeitos da metformina sobre a viabilidade e proliferação das células PC-12 Adh e concluir que a metformina pode regular negativamente estas duas variáveis, os próximos passos consistiram em avaliar os mecanismos que levam a esses efeitos. Sabe-se que a metformina pode induzir vias apoptóticas por mecanismos diversos. O estudo de Mi Li e colaboradores (2017) avaliou, em células PC-12 Adh tratadas com metformina, os primeiros sinais da apoptose, a externalização das fosfatidilserinas presentes na membrana interna das células, através da marcação com Anexina/PI e observou aumento crescente da razão de células em apoptose à medida em que se aumentava as concentrações de metformina (concentração máxima 10mM) (MI LI e col., 2017).

No presente estudo, outras etapas da apoptose foram avaliadas em células PC-12 Adh tratadas com metformina 20mM. Uma delas foi a clivagem ou atividade da proteína da procaspase e caspase 3 e a outra foi a estrutura nuclear. A procaspase é a forma constitutiva da proteína, enquanto a caspase 3, quando em sua forma clivada, sinaliza para fragmentação do DNA, levando à morte celular programada. Os resultados sugerem que a metformina 20mM por 48h aumenta a clivagem da caspase 3 e leva à formação de corpos apoptóticos em células de feocromocitoma (Figura 13), achados diferentes aos encontrados por Costa e colaboradores (2014) que não encontraram diferenças na clivagem da caspase em células de neuroblastoma tratadas e não tratadas com metformina (COSTA e col., 2014).

Na presente Tese, o tratamento com sunitinibe 8 μ M por 48h não aumentou a clivagem da caspase 3, porém induziu a formação de vacúolos nos núcleos das células PC-12 dh. A ausência de indução à clivagem da caspase 3 (Figura 12) não era esperada considerando os achados de Saito e colaboradores (2012) (SAITO e col., 2012). Ao contrário, esses autores observaram aumento da caspase 3 em PC-12 Adh tratadas com sunitinibe 1000 μ M por 24h, assim como o estudo de Denorme e colaboradores (2014) (DENORME e col., 2014) que mostraram que o sunitinibe nas concentrações de 10, 20 e 30 μ M por até 24h em células PC12-Adh, aumentam a atividade de caspase 3/7 em 6 vezes. Assim, a metodologia empregada na avaliação da apoptose do presente estudo não foi capaz de demonstrar ativação da clivagem da caspase 3, embora tenha induzido vacuolização nuclear. Os motivos para essa aparente contradição não são conhecidos e novos estudos com outros métodos de investigação da apoptose são necessários para definir o papel do sunitinibe na indução de apoptose em feocromocitomas.

Além de um possível efeito indutor de apoptose, estudos recentes vêm associando os efeitos da metformina com a inibição de vias de proliferação celular, dentre elas, a via AMPK/mTOR. Sabidamente, o estresse energético promovido pela metformina devido ao bloqueio da do complexo I da cadeia de transporte de elétrons induz o aumento dos níveis dos precursores de ATP, o AMP e o ADP, que por sua vez ativam a AMPK, sensível a esses precursores. Esta proteína, uma vez ativada, pode levar a inibição de vias que aumentam a proliferação celular ou a indução de vias de supressão tumoral. A via do mTOR está fortemente relacionada ao crescimento e proliferação celular e é regulada pela AMPK (PERNICOVA & KORBONITS, 2014).

Nesse sentido, um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a expressão e a atividade de proteínas dessa via de proliferação celular. Os resultados mostraram que as células tratadas com metformina 20mM tiveram aumento da fosforilação de AMPK, e ao mesmo tempo houve favorecimento à desfosforilação do AKT. Conseqüentemente à redução da AKT fosforilada, houve inibição da sinalização positiva para o mTOR. A expressão da proteína mTOR da amostra de células tratadas com metformina também está diminuída (Figura 15), desta forma, os resultados sugerem que a metformina reduz tanto a atividade quanto a expressão da proteína mTOR. Esta, uma vez inibida, deixa de sinalizar para outras proteínas sinalizadoras distais n essa via, diretamente envolvidas na proliferação celular, tais

como a p70S6K, uma proteína ribossomal responsável pela tradução de diversas proteínas, dentre elas a HIF1 α . Esses achados estão em acordo com os encontrados no estudo de Khallaghi e colaboradores (2016) que mostraram que a metformina pode interferir tanto na expressão gênica quanto na razão de proteínas fosforilada/total da via AKT/mTOR nas células PC12 (KHALLAGHI e col. 2016).

De fato, é aceito que células neoplásicas com comportamento maligno caracterizam-se pelo predomínio das vias energéticas da glicólise anaeróbia em detrimento da fosforilação oxidativa (efeito Warburg). Estudo de Weilin e colaboradores (2018) mostraram que a ativação da AMPK mediada por metformina 4mM, pode levar à oxidação de ácidos graxos e fosforilação oxidativa, e pode ainda regular negativamente processos anabólicos intensivos, tais como a proliferação celular e pode, ainda, inibir a glicólise anaeróbica. Esse conjunto de rearranjos no metabolismo energético pode gerar um efeito “anti-Warburg” e, assim, reprimir a tumorigênese. Esse efeito teoricamente seria muito interessante em tumores associados à perda de função de VHL e SDHB, pois são condições que podem apresentar manifestações agressivas baseadas primariamente no estado de pseudo-hipóxia e ativação potente do efeito Warburg, que poderia ser contrabalançado pelos efeitos da metformina (FLIEDNER e col., 2012).

As células PC-12 Adh são células de feocromocitoma de ratos e configuram atualmente um modelo comum para estudos de tumores neuroendócrinos. Entretanto, devido ao processo de imortalização e a plasticidade das células, acredita-se que suas características fenotípicas possam ter sofrido alterações, o que dificulta conclusões definitivas acerca do estudo de novos fármacos. Pensado nisso, foi feita uma cultura primária de feocromocitoma humano associado à mutação missense no gene *VHL*. A cultura foi previamente caracterizada, utilizando marcadores específicos de células cromafins, uma vez que não existem marcadores de malignidade para feocromocitoma (Descritos no APÊNDICE B).

A mesma via de proliferação celular avaliada em células de feocromocitomas de ratos foi avaliada em amostras de células de feocromocitoma humano tratados com metformina 20mM por 48h. Os resultados sugerem que, nesse tumor decorrente de mutação inativadora do VHL, a metformina parece não modificar a expressão/atividade de AMPK, PTEN, AKT, porém mantém sua capacidade de diminuir a atividade de mTOR e conseqüentemente de p70S6K e HIF1 α (Figura 16). Esses dados corroboram com o estudo de Zhou e colaboradores

(2016), que mostraram que a metformina reduziu os níveis de HIF1 α independentemente da ativação de AMPK em células hepáticas induzidas a hipóxia (ZHOU e col., 2016).

Sabe-se que HIF1 α na presença de baixos níveis de oxigênio deixa de ser ubiquitinada e, portanto, ao invés de ser degradada, essa molécula se torna estável e é translocada para o núcleo, onde se dimeriza à HIF1 β . Esse complexo ativa a transcrição de genes relacionados à angiogênese e, com base nessas informações, a expressão dos genes que codificam as diferentes isoformas de HIF foram avaliados. A expressão das isoformas das HIFs foi avaliada com intuito de saber se a metformina modularia a expressão de todas as isoformas de HIF α , uma vez que todas apresentam um papel importante na indução da angiogênese. Foi avaliada a expressão do mRNA das isoformas da HIF em amostras de cultura de feocromocitoma humano tratadas e não tratadas com metformina 20mM, porém não foi possível identificar alteração da expressão das isoformas 1, 3 e HIF1 β (ou ARNT) e, inesperadamente, houve aumento da expressão de HIF2 α . É importante ressaltar que esses resultados referem-se apenas à expressão do mRNA e, portanto, podem não refletir exatamente o que estaria ocorrendo no nível traducional (Figura 17). Comparativamente a esses resultados, os estudos de Zhou e colaboradores (2016) e de Wang e colaboradores (2015) mostraram correlação do tratamento com metformina e redução proteica apenas da isoforma 1 da HIF, e não há nenhum estudo que correlacionando esse efeito com as outras isoformas (ZHOU e col., 2016; WANG e col., 2016).

Ainda dentro do contexto de angiogênese, foram avaliadas as expressões do fator VEGFA e do seu receptor VEGFR. A dimerização da HIF1 α com a HIF1 β leva à transcrição desses dois genes relacionados a fator de crescimento endotelial (WIGERUP e col., 2016) . Os resultados mostraram que não houve alteração da expressão do fator VEGFA. No entanto, houve diminuição da expressão do gene relacionado ao receptor VEGFR em células de feocromocitoma humano tratadas com metformina 20mM por 48h (Figura 17), o que corrobora com os achados de Qian e colaboradores (2018) que avaliaram, por imunohistoquímica, a redução da expressão de VEGF nos tecidos dos tumores em camundongos com tumor pancreático tratados com metformina 200mg/kg. (QIAN e col., 2018)

A expressão de outros dois genes relacionados à angiogênese foram avaliados, o *ADM* codante da adrenomedulina e está relacionada à indução da angiogênese, e o *ANGP* que

codifica a angiopoetina que é um fator angiogênico estimulado por VEGF. Os resultados mostram que o tratamento com metformina não alterou a expressão de ambos genes em células de feocromocitoma humano (Figura 17), no entanto, não foi realizada a expressão proteica para confirmar esse achado.

Interessante notar que em células de feocromocitoma tratadas com metformina, os níveis da proteína HIF1 α mostraram-se diminuídos, ao contrário da expressão dos genes que não se alteraram. Uma hipótese que surge é se a metformina, ao contrário de alterar a expressão desta proteína, aumentaria a degradação desta pelo proteassoma. Pensando nisso, um novo western foi realizado com amostras de células PC-12 Adh tratadas e não tratadas com metformina 20mM por 6h e ainda, associando metformina com inibidor de proteassoma, o MG132. Os resultados mostraram que a metformina sozinha reduziu os níveis de HIF1 α , porém, quando foi associada ao inibidor de proteassoma, os níveis HIF1 α foram recuperados, mostrando que possivelmente a metformina aumenta a degradação de HIF pelo proteassoma (Figura 18). Esses dados estão em conformidade aos dados de Zhou e colaboradores (2016), que mostraram que a metformina aumentou a degradação da HIF1 α pelo proteassoma em células hepáticas induzidas à hipóxia (ZHOU e col., 2016).

Outro aspecto avaliado foram os efeitos da metformina na dinâmica mitocondrial das células PC-12 Adh. O desequilíbrio, seja na fusão quanto na fissão, leva à disfunção mitocondrial e comprometimento do funcionamento normal da célula, por alteração de seu metabolismo energético. No presente estudo, a metformina 20mM por 24h reduziu o recrutamento de Drp-1 pelas mitocôndrias das células de feocromocitoma submetidas ao silenciamento do gene VHL, quando comparadas com o controle, também com silenciamento de VHL, mas sem tratamento com metformina (Figura 19). Outros estudos comparativos com células PC-12 Adh íntegras ou outras linhagens, ou ainda, com células submetidas ao silenciamento de outros genes relacionados à patogênese de FEO/PGL ainda são necessários para investigar se a perda de função de VHL e, possivelmente o estado de pseudo-hipóxia a ela associado, poderiam tornar as células de FEO/PGL mais suscetíveis aos efeitos da metformina sobre a dinâmica e função mitocondrial, e, conseqüentemente, sobre o metabolismo energético celular. De toda forma, consistentemente com os resultados aqui apresentados, Aiyun Li e colaboradores (2016) mostraram que a ativação da AMPK promovida pela metformina pode levar à inibição da fosforilação de Drp-1 e,

consequentemente, comprometimento da fissão mitocondrial (AIYUN LI e col., 2015), o que representa processo importante para divisão e proliferação celular (MARSBOOM e col., 2015).

Outro aspecto abordado foi o estresse que a metformina gera nas células devido à modulação da síntese de ATP e aumento de precursores, AMP e ADP. Esse estresse pode desencadear a degradação dos lipídeos celulares, dentre eles, os lipídeos estruturais. Desta forma, foram avaliados os níveis de produtos da degradação de lipídeos em células PC-12 Adh tratadas com metformina 20mM por 24h e os resultados sugerem que a metformina induz a degradação de lipídeos, pois os produtos da degradação estão aumentados, assim como o controle positivo do ensaio, o peróxido de hidrogênio (Figura 20). Note-se que Zhang e colaboradores (2013) observaram que os produtos da peroxidação lipídica poderiam associar-se à regulação da proteína supressora tumoral TSC, acarretando a diminuição da sinalização do mTOR (ZHANG e col., 2013). Entretanto, Khallaghi e colaboradores (2016) mostraram que a metformina em concentrações baixas apresentou efeito antioxidante em células PC-12 sob indução do estresse por peróxido de hidrogênio (KHALLGHI e col., 2013).

No geral, todos esses eventos promovidos pela metformina parecem estar relacionados inicialmente ao bloqueio do complexo I da cadeia de transporte de elétrons, inibição da síntese de ATP e consequentemente a diminuição do consumo de oxigênio, uma vez que a produção de ATP é diretamente proporcional ao consumo de oxigênio. Foi feito então, o ensaio de consumo de oxigênio em células PC-12 Adh tratadas com metformina 20mM por 6h e foi observada a redução desse consumo quando comparados com as células controle. Interessante notar que a metformina 20mM por 6h não modificou o consumo de oxigênio nas células de fibroblastos de pele humana, sugerindo que possa ter um fator que sensibilize mais as células tumorais (Figura 21). O mesmo tratamento foi feito nas células PC-12 Adh para avaliar os parâmetros da respiração celular e foi observado que houve redução da respiração basal, produção de ATP, troca de prótons e capacidade de troca de prótons de forma dose-dependente (Figura 22). De maneira análoga, esses dados corroboram com o estudo de Hyun Kim e colaboradores (2018) (HYUN KIM, 2018) que também mostrou que a metformina reduziu expressivamente os mesmos parâmetros da respiração das células de câncer colorretal.

Buscando avaliar condições específicas aos feocromocitomas, duas situações que simulam as condições *in vivo* que favorecem o desenvolvimento tumoral foram testadas: o

silenciamento dos genes VHL e SDHB. Em seres humanos, mutações inativadoras em ambos estão relacionadas ao aumento de HIFs e consequente aumento da angiogênese. No entanto, interessante, casos malignos são pouco frequentes na primeira condição e comuns em tumores SDHx, mais especificamente naqueles com mutações na subunidade B da SDH. Para verificação dos efeitos da metformina *in vitro* em situação que simule essas alterações, as células PC-12 Adh foram silenciadas para os genes VHL e SDHB, e foram posteriormente tratada com metformina e comparadas às células nas mesmas condições porém sem tratamento.

Hipoteticamente, em células com características semelhante ao tumores com mutações no *VHL* esperaria-se redução dos parâmetros de respiração celular quando tratadas com metformina, uma vez que a condição de pseudo-hipóxia já está, por si só, relacionada à redução da produção de ATP, que é diretamente proporcional ao consumo do oxigênio. Com a inibição do Complexo I da cadeia de transporte de elétrons induzida pela metformina, esse efeito poderia ser potencializado, como de fato foi observado nos parâmetros da respiração basal e produção de ATP nas células silenciadas para VHL tratadas com metformina 10mM (Figura 23). O estudo de Zhou e colaboradores (2015) comprovou que a metformina promove uma reprogramação no consumo de oxigênio e leva a redução dos níveis de HIF1 α (ZHOU e col., 2016), achado importante em tumores do tipo VHL, que apresentam altos níveis de HIFs.

Em condições normais, ocorre formação de ATP e consumo de oxigênio por meio da fosforilação oxidativa. Os tumores relacionados ao gene SDHx possuem prejuízo do funcionamento da cadeia de transporte de elétrons devido à inativação da função do Complexo II (FLIEDNER e col., 2012). Com base nisto, as células PC-12 Adh foram silenciadas para o gene *SDHB* para simular a ausência da função da subunidade B do complexo SDH. A hipótese inicial era que a metformina, inibindo o complexo I e, estando o complexo 2 inoperante, ocorreria bloqueio completo da cadeia de transporte de elétrons, o que acarretaria na inibição completa da síntese de ATP e, conseqüentemente, do consumo de oxigênio. No entanto, os resultados mostraram que a apenas metformina 10mM por 6h foi capaz de reduzir a respiração basal das células silenciadas, enquanto os outros parâmetros da respiração permaneceram inalterados (Figura 24). A repetição desses estudos de silenciamento gênico em experimentos independentes ainda é necessária para conclusões definitivas. Além disso, outros ensaios que permitam detalhar o estado energético pré- e pós-

tratamento diante do silenciamento dos genes SDHx, tais como a expressão proteica de HIFs, são necessários para investigar os mecanismos pelos quais a metformina resulta em rearranjos energéticos celulares, especificamente em nível mitocondrial, com potencial efeito sobre a sobrevivência dessas células *in vitro* e *in vivo*.

7. CONCLUSÕES

- Por meio dos ensaios de viabilidade e proliferação na cultura de células PC-12 Adh pode-se concluir que a metformina apresenta potencial na redução na sobrevivência e crescimento destas células e que esse efeito parece ser seletivo para células do tumor apenas em 48h. No tratamento crônico, esse efeito parece ser semelhante;
- O sunitinibe diminuiu a viabilidade e proliferação celular das células de feocromocitoma de ratos de forma semelhante em todos os experimentos;
- A metformina parece induzir a morte das células PC-12 Adh por ativar caspases efetoras, caspase 3 e fragmentar o DNA genômico enquanto sunitinibe parece não modificar essa via;
- A via AMPK/AKT/mTOR/p70S6K/HIF1 α é modificada pelos efeitos da metformina nas células PC-12 Adh, culminando na inibição do mTOR, o que reforça a ideia de repressão do crescimento celular.
- Em cultura primária de feocromocitoma, previamente caracterizada, a metformina parece só inibir a via mTOR/p70S6K/HIF1 α e não modificar a ativação de AMPK;
- A metformina não altera a expressão gênica das isoformas de HIF, exceto da HIF2 α , e nem de marcadores de angiogênese, entretanto modificou a expressão do receptor VEGFR em células da cultura primária de feocromocitoma;
- A atividade do proteossoma em degradar HIF1 α das células de feocromocitoma de ratos foi induzida pela metformina o que justifica a não-alteração da expressão gênica e a diminuição da expressão proteica;
- Os resultados sugerem que a metformina altera a dinâmica mitocondrial, reduzindo o recrutamento de DRP-1 e conseqüentemente alterando a fragmentação da mitocôndria, processo importante para divisão celular;
- A modificação na sobrevivência e crescimento das PC12-Adh parece estar relacionada com o estresse energético induzido por metformina;

- A metformina reduz o consumo de oxigênio nas células de feocromocitoma diferentemente das células de fibroblasto humano. Além disto, nas células PC-12 Adh todos os parâmetros da respiração foram modificados com o uso da metformina;

- Nas células silenciadas para os genes VHL e SDHB, a metformina alterou a respiração basal e a produção de ATP apenas quando o tratamento foi feito na concentração 10mM. No tratamento feito com 20mM houve redução da razão do consumo de oxigênio quando comparado com a razão do consumo de oxigênio do tratamento 10mM, mas quando comparados com controle não houve redução.

REFERÊNCIAS

ADEBERG, S.; BERNHARDT, D.; HARRABI S.B.; NICOLAY, N.H. e col. Metformin enhanced *in vitro* radiosensitivity associates with G2/M cell cycle arrest and elevated adenosine-5'-monophosphate-activated protein kinase levels in glioblastoma. **Radiology and Oncology**, v.51, n.4, p.431-437, 2017.

AIYUN, L.I.; ZHANG S.; JIA, LI; LIU K, HUANG, F. e col. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 15, n. 434, p.36-47, 2016.

AJALLÉ, R.; PLOIN, P.F.; PACAK, K.; LEHNERT, H. Treatment of Malignant Pheochromocytoma. **Hormone and Metabolic Research**, v.41, n.9, p. 687–696, 2009.

ALJADA, A.; MOUSA, S. A. Metformin and neoplasia: Implications and indications. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 133, n. 1, p. 108-115, 2012.

ASTUTI, D.; DOUGLAS, F.; LENNARD, T.W.J.; ALIGIANIS, I.A. Germline *SDHD* mutation in familial pheochromocytoma. **Lancet**. v. 357, n.9263, p.1181-2, 2011.

WESTERMANN, B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. **Nature Reviews. Molecular and cell biology**, v.11, n. 12, p.872-84, 2010.

BAUSCH, B.; TISCHLER, A.S.; SCHMID, K.W.; LEIJON, H, e col. Max Schottelius: Pioneer in Pheochromocytoma. **Journal of the Endocrine Society**, v.1, n.7, p. 957-964, 2017.

BEST, S. M. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 171-92, 2008.

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 Biochemistry Biophysics**, v. 303, n.2, p.474-82, 1993.

BRIDGES, H.R.; JONES, A.J.Y.; POLLAK, M.N.; HIRST, J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. **Journal of Biochemistry**, v. 462, p. 475–487, 2014.

BRIETZKE, S. A. Oral antihyperglycemic treatment options for type 2 diabetes mellitus. **Medical Clinics of North America**, v. 99, n. 1, p. 87-106, Jan 2015.

BULLOVA, P.; COUGNOUX, A.; MARZOUCA, G.; KOPACEK J. Bortezomib Alone and in Combination With Salinosporamid A Induces Apoptosis and Promotes Pheochromocytoma Cell Death *In Vitro* and in Female Nude Mice. **Endocrinology**, v.158, n.10, p.3097-3108, 2017.

BUT, A.; WANG, H.; MANNISTO, S.; PUKKALA, E. e col. Assessing the effect of treatment duration on the association between anti-diabetic medication and cancer risk. **PLoS One**, v. 9, n. 11, p. e113162, 2014.

CAO, G. S.; LI, S.X.; WANG, Y.; XU, Y.Q. e col. A combination of four effective components derived from Sheng-mai san attenuates hydrogen peroxide-induced injury in PC12 cells through inhibiting Akt and MAPK signaling pathways. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 7, p. 508-17, Jul 2016.

CARVALHO, J. E. N. **Mecanismos moleculares envolvidos na redução da proliferação de células beta pancreáticas induzida por glicocorticóides**. 2010. Universidade de São Paulo

CHIONG M.; SAAVEDRA B.; NORAMBUENA-SOTO I; MONDACA-RUFF D.; MORALES P.E. e col. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. v. 15, p.1-9, 2014.

CLAUDIO, I. D. L. P. **Efeito antígeno-tóxico da metformina no diabetes mellitus**. Universidade do Estado de Rio de Janeiro. 2005

COLQUHOUN, A. J.; VENIER, N.A.; VANDERSLUIJ, A.D.; BESLA, R. e col. Metformin enhances the antiproliferative and apoptotic effect of bicalutamide in prostate cancer. **Prostate Cancer Prostatic Diseases**, v. 15, n. 4, p. 346-52, Dec 2012.

COSTA, D.; GIGONO, A.; WURTH, R.; CANCEDDA, R. e col. Metformin inhibition of neuroblastoma cell proliferation is differently modulated by cell differentiation induced by retinoic acid or overexpression of NDM29 non-coding RNA. **Cancer Cell International**, v. 14, p. 59, 2014.

COSTANZO, L. S. **Physiology**. 1 Edition. 820 p., 1998.

DE WAILLY, P.; ORAGANO, L.; RADÉ, F.; BEAULIEU, A. e col. Malignant pheochromocytoma: new malignancy criteria. **Langenbecks Archives of Surgery**, v. 397, n. 2, p. 239-46, Feb 2012.

DEL BARCO, S.; VAZQUEZ-MARTIN, A.; CUFI, S.; OLIVERAS-FERRAROS, C. e col. Metformin: multi-faceted protection against cancer. **Oncotarget**, v. 2, n. 12, p. 896-917, Dec 2011.

DENORME, M.; YON, L.; ROUX, C.; GONZALEZ, B.J. e col. Both sunitinib and sorafenib are effective treatments for pheochromocytoma in a xenograft model. **Cancer Lettes**, v. 352, n. 2, p. 236-44, Oct 1 2014.

DIABETES, A. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes. **Diabetes Care**, v. 41 Suppl 1, p. S73-85, Jan 2018.

DOWLING, R. J.; NIRLAULA, S.; STAMBOLIC, V.; GOODWIN, P.J. e col. Metformin in cancer: translational challenges. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 48, n. 3, p. R31-43, Jun 2012.

EL-SHARKAWY, A. A. ABDELMOTALEB, G.S.; ALY, M.K.; KABEL, A.M. e col. Effect of metformin on sleep disorders in adolescent girls with polycystic ovarian syndrome. **Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology**, v. 27, n. 6, p. 347-52, Dec 2014.

FAIVRE, S.; DELBALDO, C.; VERA, K.; ROBERT, C. e col. Safety, pharmacokinetic, and antitumor activity of SU11248, a novel oral multitarget tyrosine kinase inhibitor, in patients with cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 1, p. 25-35, Jan 1 2006.

FAVIER, J.; AMAR, L.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A. P. Paraganglioma and pheochromocytoma: from genetics to personalized medicine. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 2, p. 101-11, Feb 2015.

FERRANNINI, E. The target of metformin in type 2 diabetes. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 16, p. 1547-8, Oct 16 2014.

FLIEDNER, S.M.J; KALUDERCIC, N.; JIANG, X.; HANSIKOVA, H. E col. Warburg Effect's Manifestation in Aggressive Pheochromocytomas and Paragangliomas: Insights from a Mouse Cell Model Applied to Human Tumor Tissue. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. 1-13, 2012.

FRANCIOSI, M.; LUCISANO, G.; LAPICE, E; STRIPPOLI, G.F. e col. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71583, 2013.

GHAYEE, H. K.; BHAGWANDIN, V.J.; STASTNY, V.; CLICK, A. e col. Progenitor cell line (hPheo1) derived from a human pheochromocytoma tumor. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65624, 2013.

GREENE, L. A.; TISCHLER, A. S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proceedings of National Academy of Science of U S A**, v. 73, n. 7, p. 2424-8, Jul 1976.

GREENSPAN, F. S. S., G.J. **Basic & Clinical Endocrinology**. International Edition. 1997.

GWINN, D. M.; SHACKELFORD, D.B.; EGAN, D.F.; MIHAYLOVA, M.M. e col. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. **Molecular Cell**, v. 30, n. 2, p. 214-26, Apr 25 2008.

HWANG, I. C.; PARK, S.M.; SHIN, D.; AHN, H.Y.; RIEKEN, M. e col. Metformin association with lower prostate cancer recurrence in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 2, p. 595-600, 2015.

- HYUN KIM, J.; JIN LEE, K.; SEO, Y.; KWON J.H e col. Effects of metformin on colorectal cancer stem cells depend on alterations in glutamine metabolism. **Scientific Reports**, p. 8, n. 409, 2018.
- JAFRI, M.; MAHER, E. R. The genetics of pheochromocytoma: using clinical features to guide genetic testing. **European Journal of Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 151-8, Feb 2012.
- JUNQUEIRA, L. C. C., J. **Histologia Básica**. 12th, 2013.
- KATZUNG, B. G. M., S.B.; TREVOR, A.J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12. 2012.
- KHALLAGHI, B.; SAFARIAN, F.; NASOOHI, S.; AHMADIANI, A. e col. Metformin-induced protection against oxidative stress is associated with AKT/mTOR restoration in PC12 cells. **Life Science**, v. 148, p. 286-92, Mar 1 2016.
- KISFALVI, K.; EIBL, G.; SINNETT-SMITH, J.; ROZENQURT, E. e col. Metformin disrupts crosstalk between G protein-coupled receptor and insulin receptor signaling systems and inhibits pancreatic cancer growth. **Cancer Research**, v. 69, n. 16, p. 6539-45, Aug 15 2009.
- KUMAR, A.; AL-SAMMARRAIE, N.; DIPETTE, D.J.; SINGH U.S. e col. Metformin impairs Rho GTPase signaling to induce apoptosis in neuroblastoma cells and inhibits growth of tumors in the xenograft mouse model of neuroblastoma. **Oncotarget**, v. 5, n. 22, p. 11709-22, Nov 30 2014.
- LEE, S. K.; LEE., J.O.; KIM, J.H.; KIM, S.J. e col. Metformin sensitizes insulin signaling through AMPK-mediated PTEN down-regulation in preadipocyte 3T3-L1 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 5, p. 1259-67, May 2011.
- LENDERS, J. W.; DUH, Q.Y.; EISENHOFER, G.; GIMENEZ-ROQUEPLO, A.P. e col. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 6, p. 1915-42, Jun 2014.
- LEVESLEY, J.; STEELE, L.; TAYLOR, C.; SINHA, P. e col. ABT-263 enhances sensitivity to metformin and 2-deoxyglucose in pediatric glioma by promoting apoptotic cell death. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e64051, 2013.
- LI, M.; JIANG, X.; SU, T.; JIANG, L., ZHOU, W., WANG, W. Metformin Suppresses Proliferation and Viability of Rat Pheochromocytoma Cells. **Medical Science Monitor**, v. 23, p. 3253-3260, 2017.
- LI, W.; MA, W.; ZHONG, H.; LIU, W. Metformin inhibits proliferation of human keratinocytes through a mechanism associated with activation of the MAPK signaling pathway. **Experimental and therapeutic medicine**, v.7, n.2, p. 389-392, 2014.

LIMA, S.; ARRAIS, R.F.; ALAMEIDA, M.G.; SOUZA, Z.M. e col. Perfil lipídico e peroxidação de lipídeos no plasma em crianças e adolescentes com sobrepeso e obesidade. **Journal of Pediatric**, v. 80, n. 1, p. 23-8, 2004.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). **Methods**, v. 25, n.4, p.402-8, 2002.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. e col. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-75, Nov 1951.

MARSBOOM, G.; TOTH, P.T.; RYAN, J.J.; HONG, Z. e col. Dynamin-Related Protein 1–Mediated Mitochondrial Mitotic Fission Permits Hyperproliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Offers a Novel Therapeutic Target in Pulmonary Hypertension. **Circulation Research**, v. 110, n.11, p. 1484-97, 2012.

MARTINEZ, J. A.; CHALASANI, P.; THOMSON, C.A.; ROE, D. e col. Phase II study of metformin for reduction of obesity-associated breast cancer risk: a randomized controlled trial protocol. **BMC Cancer**, v. 16, p. 500, 2016.

MARTINIOVA, L.; LAI, E.W.; ELKAHLOUN, A.G.; ABU-ASAB, M. e col. Characterization of an animal model of aggressive metastatic pheochromocytoma linked to a specific gene signature. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 26, n. 3, p. 239-50, 2009.

MEIRELES, C. G. **Avaliação do efeito citotóxico da metformina em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata e de feocromocitoma**. 2015. 71 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

MEIRELES, C.G.; PEREIRA, S.A; VALADARES, L.P, RÊGO, D.F.e col. Effects of metformin on endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis. **Gynecologic Oncology**. v.147, n.1, p.167-180, 2017.

MELMED, S. P., K.; LARSEN, P.R.; KRONENBERG,mH.M. **Williams textbook of endocrinology**. 12th, 2011.

MILLER, R. A.; CHU, Q.; XIE, J.; FORETZ, M.; VIOLLET, B. e col. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 256-60, Feb 14 2013.

MOTZER, R. J. e col. Pazopanib versus sunitinib in metastatic renal-cell carcinoma. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 8, p. 722-31, Aug 22 2013.

NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Metformin: Current knowledge. **Journal of Research in Medical Science**, v. 19, n. 7, p. 658-64, Jul 2014.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008. ISBN 071677108X.

NEUMANN, H.P.; PAWLU, C.; PECZKOWSKA, M.; BAUSCH, B. e col. Distinct clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. **JAMA**, v.292, n.8, p.943-51, 2004.

OLIVEIRA, G. A. R. D. **Comparação da eficiência do tratamento por fotoeletrocatalise em relação à cloração química convencional na redução da mutagenicidade de azo corantes empregando o ensaio de micronúcleos**. Universidade de São Paulo. 2010

OLIVO, A.; NOEL, N.; BESSE, B.; TABURET, A.M. e col. Disseminated intravascular coagulation following administration of sunitinib. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 5, n. 1, p. 121-123, Jul 2016.

PAPPACHAN, J. M.; RASKAUSKIENE, D; SRIRAMAN, R.; EDAVALATH, M. e col. Diagnosis and management of pheochromocytoma: a practical guide to clinicians. **Current Hypertension Reports**, v. 16, n. 7, p. 442, Jul 2014.

PARENTI, G.; ZAMPETTI, B.; RAPIZZI, E.; ERCOLINO, T. e col. Updated and new perspectives on diagnosis, prognosis, and therapy of malignant pheochromocytoma/paraganglioma. **The Journal Oncology**, v. 2012, p. 872713, 2012.

PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 143-56, Mar 2014.

PERON, E. P.; OGBONNA, K. C.; DONOHOE, K. L. Antidiabetic medications and polypharmacy. **Clinics and Geriatric Medicine**, v. 31, n. 1, p. 17-27, vii, Feb 2015.

PIEROTTI, M. A.; BERRINO, F.; GARIBOLDI, M.; MELANI, C.; e col. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. **Oncogene**, v. 32, n. 12, p. 1475-87, 2013 Mar 21 2013.

PILLAI, S. e col. Updates on the genetics and the clinical impacts on phaeochromocytoma and paraganglioma in the new era. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 100, p. 190-208, Apr 2016.

POWERS, J. F.; BRACHOLD, J. M.; TISCHLER, A. S. Ret protein expression in adrenal medullary hyperplasia and pheochromocytoma. **Endocrine Pathology**, v. 14, n. 4, p. 351-61, Winter 2003.

PYASKOVSKAYA, O.N.; KOLESNIK, D.L.; FEDORCHUK, A.G.; GORBIK, G.V. Cytotoxic activity of metformin in vitro does not correlate with its antitumor action in vivo. **Experimental Oncology**, v.39, n.4, p. 264-268, 2017.

QIAN, W.; LI J. CHEN K.; JIANG Z.; CHENG L. E col. Metformin suppresses tumor angiogenesis and enhances the chemosensitivity of gemcitabine in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. **Life Sciences**, v.18, p. 30432-6, 2018.

RAYMOND, E.; DAHAN, L.; RAOUL, J.L.; BANG, Y.J. e col. Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 6, p. 501-13, Feb 10 2011.

REGO, D. F.; PAVAN, L.M.; ELIAS, S.T.; DE LUCA CANTO, G. E col. Effects of metformin on head and neck cancer: a systematic review. **Oral Oncology**, v. 51, n. 5, p. 416-22, May 2015.

SAITO, Y.; TANAKA, Y.; AITA, Y.; ISHII, K.A. e col. Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1 pathways through modulation of Bcl-2 and BAD. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 302, n. 6, p. E615-25, Mar 15 2012.

SALGADO, J. M. R. Mecanismos de regulação de catecolaminas nas células cromafins: papel da interleucina 1- β e do neuropeptídeo Y. 2007.

SALPETER, S. R.; GREYBER, E; PASTERNAK, G.A.; SALPETER, E.E. e col. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus. **Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 4, p. Cd002967, 2010.

SCHMITTGEN, T.D.; LIVAK K.2 Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. **Nature Protocols**, v.3, n.6, 2008.

SELIGER, C.; MEYER, A.L.; RENNER, K.; LEIDGENS, V. Metformin inhibits proliferation and migration of glioblastoma cells independently of TGF- β 2. **Cell Cycle**, v.2, n.15, p.1755-66, 2016.

SESEN, J.; DAHAN, P.; SCOTLAND, S.J.; SALAND, E. e col. Metformin inhibits growth of human glioblastoma cells and enhances therapeutic response. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123721, 2015.

SHI, W.; HU, J.; ZHU, S.; SHEN, X. e col. Expression of MTA2 and Ki-67 in hepatocellular carcinoma and their correlation with prognosis. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v.8, n.10, p.13083-13089, 2015.

SHINTANI-ISHIDA, K.; ZHU B.L.; MAEDA, H. TaqMan® Fluorogenic Detection System to Analyze Gene Transcription in Autopsy Material, **Methods in Molecular Biology**, v.1105, p.117-24, 2014.

SMEITINK, J.; VAN DEN HEUVEL, L.; DIMAURO, S. The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. **Nature Reviews in Genetic**, v. 2, n. 5, p. 342-52, May 2001.

TADAKAWA, M.; TAKEDA, T.; LI, B.; TSUIJI, K. e col. The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1alpha signaling pathway in ELT-3 cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 399, p. 1-8, Jan 5 2015.

THAI, E. e col. Very late recurrence of an apparently benign pheochromocytoma. **Journal of Cancer Research Therapeutics**, v. 11, n. 4, p. 1036, Oct-Dec 2015.

TSENG, C.-H. Metformin may reduce bladder cancer risk in Taiwanese patients with type 2 diabetes. **Acta Diabetologica**, v. 51, n. 2, p. 295-303, Apr 2014 2014.

TSILIDIS, K. K.; CAPOTHANASSI, D.; ALLEN, N.E.; RIZOS, E.C. e col. Metformin does not affect cancer risk: A cohort study in the U.K. clinical practice research datalink analyzed like an intention-to-treat trial. **Diabetes Care**, v. 37, n. 9, p. 2522-2532, 2014.

VERMA, A.; RICH L.J.; VINCENT-CHONG, V.K.; SESHADRI, M. Visualizing the effects of metformin on tumor growth, vascularity, and metabolism in head and neck cancer. **Journal of Oral Pathology and Medicine**. v.47, n.5, p.484-491, 2018.

VICHA, A.; MUSIL, Z.; PACAK, K. Genetics of pheochromocytoma and paraganglioma syndromes: new advances and future treatment options. **Current Opinions in Endocrinology Diabetes and Obesity**, v. 20, n. 3, p. 186-91, Jun 2013.

WANG, Z. e col. 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**, v. 106, n. 1, p. 19-26, Oct 2014.

WELANDER, J.; SODERKVIST, P.; GIMM, O. Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. **Endocrine Related Cancer**, v. 18, n. 6, p. R253-76, Dec 2011.

WEILIN LI, W.; WON, C.C.; ZHANG, X.; KANG, W.; NAKATSU, G. e col. CAB39L elicited an anti-Warburg effect via a LKB1-AMPK-PGC1 α axis to inhibit gastric tumorigenesis. **Oncogene**, 2018.

WIGERUP, C.; PAHLMAN, S.; BEXELL, D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. **Pharmacology & Therapeutics**, v.164, p. 152–169, 2016.

YIN, M. e col. Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Oncologist**, v. 18, n. 12, p. 1248-55, 2013.

ZHANG, D.; LI, J.; WANG, F.; HU, J. e col. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. **Cancer Letters**, v. 355, n. 2, p. 176-83, 2014 Dec 28 2014.

ZHANG, Z. J.; ZHENG, Z.J.; SHI, R.; SU, Q. e col. Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. The **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 7, p. 2347-53, Jul 2012.

ZHOU, X.; CHEN, J.; YI, G.; DENG, M. e col. Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1` through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, v.7, n.1, p.873-884, 2015.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D.M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.1, p.21-35, 2011.



Contents lists available at ScienceDirect

Gynecologic Oncology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ygyno

Review Article

Effects of metformin on endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis



Cynthia G. Meireles^a, Sidney A. Pereira^a, Luciana P. Valadares^{a,b}, Daniela F. Rêgo^c, Luiz A. Simeoni^a, Eliete N.S. Guerra^c, Adriana Lofrano-Porto^{a,b,*}

^a Molecular Pharmacology Laboratory, Health Sciences Faculty, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

^b Gonadal and Adrenal Diseases Clinics, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

^c Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, University of Brasilia, Brasilia, Brazil

HIGHLIGHTS

- Metformin use seems to be associated with positive outcomes in atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer.
- Metformin treatment may assist in the reversal of atypical hyperplasia to a normal endometrial histology.
- Metformin treatment may assist in the decrease of tumor biomarkers and in improving overall survival in endometrial cancer.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2017

Received in revised form 8 July 2017

Accepted 8 July 2017

Available online 29 July 2017

ABSTRACT

Background. Endometrial cancer is one of the most common gynecological cancers, which is frequently preceded by atypical endometrial hyperplasia, a premalignant lesion. Metformin, an antidiabetic drug, has emerged as a new adjunctive strategy for different cancer types, including endometrial cancer. This systematic review and meta-analysis aimed to evaluate the effects of metformin in atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer patients.

Methods. The search was conducted on January 2017 and the articles were collected in Cochrane, LILACS, PubMed, Scopus and Web of Science. A grey literature search was undertaken using Google SCHOLAR, ProQuest and Open Grey. Nineteen studies were included, which contained information about the following outcomes: reversal of atypical endometrial hyperplasia, cellular proliferation biomarkers expression and overall survival in metformin-users compared to non-users.

Results. Metformin was associated with reversion of atypical endometrial hyperplasia to a normal endometrial, and with decreased cell proliferation biomarkers staining, from 51.94% (CI = 36.23% to 67.46%) to 34.47% (CI = 18.55% to 52.43%). However, there is a high heterogeneity among studies. Metformin-users endometrial cancer patients had a higher overall survival compared to non-metformin users and non-diabetic patients (HR = 0.82; CI: 0.70–0.95; $p = 0.09$, $I^2 = 40\%$).

Conclusion. Regardless the high heterogeneity of the analyzed studies, the present review suggests that adjunct metformin treatment may assist in the reversal of atypical endometrial hyperplasia to normal endometrial histology, in the reduction of cell proliferation biomarkers implicated in tumor progression, and in the improvement of overall survival in endometrial cancer. Further work on prospective controlled trials designed to address the effects of adjunct metformin on clinical outcomes is necessary for definite conclusions.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	168
2. Methods	169
2.1. Eligibility criteria	169

* Corresponding author at: University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Health Science Faculty, Molecular Pharmacology Laboratory, Asa Norte, 70904-970 Brasilia, DF, Brazil.
E-mail address: adlofrano@uol.com.br (A. Lofrano-Porto).

2.2.	Information sources and search strategy	169
2.3.	Study selection	169
2.4.	Data extraction process and data items	169
2.5.	Risk of bias in individual studies	169
2.6.	Summary measures	169
2.7.	Synthesis of results	169
2.8.	Risk of bias across studies	169
2.9.	Level of evidence	169
3.	Results	170
3.1.	Study selection	170
3.2.	Study characteristics	170
3.3.	Risk of bias within studies	171
3.4.	Results of individual studies	171
3.5.	Synthesis of results	173
3.5.1.	Biomarkers immunoeexpression	173
3.6.	Overall survival (OS)	175
3.7.	Risk of bias across studies	175
3.8.	Level of evidence	175
4.	Discussion	176
4.1.	Summary of evidence	176
4.2.	Limitations.	178
5.	Conclusion	179
	Conflict of interest statement	179
	Funding	179
	Acknowledgements	179
	Appendix A. Supplementary data	179
	References.	179

1. Introduction

Endometrial cancer (EC) is one of the most common gynecological cancers. In 2012, 320,000 new cases and 72,000 deaths related to EC were reported worldwide [1]. The American Cancer Society estimates that approximately 60,050 new EC cases will be diagnosed in the USA in 2016 [2]. The main symptoms of EC are hypermenorrhea, dysfunctional uterine bleeding, and infertility [3]. Tumor classification is based on histological characteristics, grade, and hormone receptor expression (4). Briefly, there are two major histological types of EC: type I, also known as endometrioid or estrogen-dependent, and type 2, non-endometrioid or estrogen-independent. Type I EC comprises 75% to 85% of all cases. It commonly occurs in postmenopausal women, and is associated with a history of polycystic ovary syndrome (PCOS), insulin resistance, obesity and type 2 diabetes mellitus (T2DM). It is usually a low-grade neoplasm, with good prognosis [4,5,6,7]. Conversely, type II EC is a high-grade malignancy, which frequently presents a more aggressive course, often associated with metastasis [4,5,7]. The two subtypes of EC have been shown to have a distinct genetic background, with otherwise diverse etiologies [4].

Endometrial cancer may be preceded by atypical endometrial hyperplasia (AEH), a pre-malignant condition, which may progress to overt malignancy in approximately 20–30% of cases [8]. Some factors that might contribute to cancer progression are menopause hormone replacement therapy, a high body mass index, a family history of colorectal and endometrial cancer, diabetes, parity, and smoking [9]. The first-line approach in all women with endometrial cancer is surgical staging, while definition of the treatment is based on final histopathology, tumor type, grade and staging. Total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy with or without regional lymphadenectomy is the standard surgical procedure for EC, but young women with low-risk endometrial carcinoma who wish to preserve fertility may be candidates for treatment with oral progestin therapy, mainly medroxyprogesterone acetate (MPA) or megestrol acetate. However, despite timely and evidence-based treatment, EC sometimes progresses, thus raising the need for the development of new therapeutic strategies especially with the potential of fertility preservation [10].

Metformin is a biguanide widely used in the treatment of T2DM, which has been available in Europe since 1950's [11]. In the last years, evidences from epidemiological studies and clinical trials, as well as experimental studies involving several cancer cell lines, such as thyroid [12], head and neck [13], liver [14], colorectal [15], breast [16], pancreatic [17], among others [18] have raised the interest on the anti-carcinogenic properties of metformin. Furthermore, there has been an effort to understand the mechanisms that underlie the anti-carcinogenic effects of metformin, as an adjunct drug in the long-term management of some types of cancer. It has been proposed that this effect may be indirect or direct [18]. The first is related to the reduction of insulin levels and resistance. The direct effect is associated with the negative modulation of several cellular growth and proliferation signaling pathways. The foremost effect involves alterations in the Adenosine monophosphate/Adenosine diphosphate/Adenosine triphosphate (AMP/ADP/ATP) ratio, which generates a state of cellular energetic stress, and culminates with Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) activation. AMPK is one of the major mediators of energy homeostasis in the cells. Once AMPK is activated, the subsequent induction of a myriad of tumor suppressor genes, such as Phosphatase and Tensin Homolog/Protein kinase B (PTEN/AKT) and Tuberous Sclerosis Complex 2/Tuberous Sclerosis Complex 1 (TSC2/TSC1), leads to downregulation of growth pathways, specifically Mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling [18]. Metformin also affects AMPK-independent pathways responsible for tumor growth and cell proliferation, for instance, decreasing Antigen Ki-67 (Ki-67) and Paired box 2 (PAX2) expression [18, 19]. However, diverse pathogenic mechanisms may be involved in different types of cancer and could influence the potential anti-carcinogenic response to metformin.

Considering that some factors associated with AEH or EC development may benefit from metformin therapy, especially insulin resistance and T2DM, the biologic rationale for the use of metformin in these conditions appears to be strong. However, data regarding the effects of metformin in endometrial neoplasms have not been formally summarized. Therefore, we performed a systematic review and meta-analysis to investigate the effects of metformin treatment on the outcomes of AEH and EC.

2. Methods

This systematic review acceded the checklist of Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses [20]. The protocol has been registered in 2016, at the international prospective register of systematic reviews with the number CRD42016037096 (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>).

2.1. Eligibility criteria

The inclusion criteria were articles that have addressed women of any age with an established diagnosis of AEH or EC, who underwent treatment with metformin and were compared to those not treated with this medicine. The primary selected outcomes were: a) reversal of AEH or EC; b) cell proliferation biomarkers immunoeexpression in tumor samples; and c) overall survival (OS). Secondary outcomes were progression free survival (PGS) and recurrence free survival (RFS). The exclusion criteria were: a) review articles, letters, conference abstracts, personal opinions and book chapters; b) articles that addressed cancer risk instead of EC clinical outcomes related to metformin use; c) articles that did not show the individualized data of the metformin effect on EC or AEH; d) articles that did not relate the use of metformin to AEH or EC; e) articles that did not show the raw results; f) full articles that were not fully available to be accessed; g) articles that were not written in Latin (Roman) alphabet.

2.2. Information sources and search strategy

All searches were conducted on January 04th, 2017. The search strategies were conducted following bibliography databases in Cochrane, LILACS (*Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde*), PubMed, Scopus and Web of Science. The grey literature search was performed using Google SCHOLAR, Opengrey and ProQuest. At the end of the search phases, the reference lists of each selected article were hand screened for relevant studies that could have been missed during database searches. The references included in this search were managed and checked by Endnote reference manager software (Thomson Reuters, Virginia, USA) and the duplicate articles were removed. The details of the search are available in Appendix S1.

2.3. Study selection

The selection of the articles for inclusion in the study was performed in two phases. In the first phase, the studies were selected by two authors (C.G.M. and S.A.P.), according to the eligibility criteria, and the titles and abstracts were reviewed independently. In the second phase, full texts were retrieved and reviewed independently by the same authors (C.G.M. and S.A.P.). Disagreements between reviewers were then solved by consensus between other authors (D.F.R. and L.P.V.), who made the elaboration of the final list of articles to be selected.

2.4. Data extraction process and data items

Data from the included studies were collected by one author (C.G.M.), while a second (S.A.P) and third author (L.P.V.) crosschecked all information. For all included studies, the following descriptive characteristics were recorded: authors, year and country of publication, type of study, main objective, sample (metformin users and metformin non-users), mean/range of age (years), BMI (kg/m²), methods, results, and conclusions. Furthermore, the primary antibody used in Immunohistochemistry (IHC) examinations, hazard ratios (HR), confidence intervals (CI), *p*-values of OS, progression-free survival (PFS) rate and recurrence-free survival (RFS) rate were collected in the survival analysis.

2.5. Risk of bias in individual studies

Methodologically, the authors appraised all studies according to a checklist based in Meta-Analysis of Statistics Assessment and Review Instrument (MAStARI) by Joanna Briggs Institute [21]. Four reviewers (C.G.M., L.P.V., S.A.P. and D.F.R.) answered 18 questions (9 for Descriptive studies/Case Series Studies/Case reports; 9 for Comparable Cohorts/Case-Control Studies and 10 for Randomized/Pseudo-randomized trials) as Y for “yes”, N for “no”, U for “unclear” and NA for “Not applicable”. After that, the risk of bias was categorized as high when the study reached up to 49% of a “yes” score, moderate when the study reached 50% to 69% of a “yes” score, and low when the study reached >70% of a “yes” score. Disagreements were solved by discussion between the four authors.

2.6. Summary measures

In order to facilitate the reporting of the results, studies were classified into three groups: 1) studies that addressed cases of AEH; 2) studies that addressed EC using biological molecular markers as the main outcome; 3) studies that addressed EC using OS as the main outcome. The indexes derived from the studies summarized values composed the main outcomes in our compiled analysis.

2.7. Synthesis of results

A proportion meta-analysis of the immunoeexpression of protein biomarkers was performed using MedCalc (MedCalc Software, Ostend, Belgium). This meta-analysis was based on the number of subjects in each metformin users' groups (pre and post-treatment), and on the staining percentage of cellular proliferation biomarkers in tumor specimens before and after metformin treatment (pretreatment and post-treatment, respectively), in the group 2 studies.

The OS meta-analysis was performed following the appropriate Cochrane Guidelines [22]. Review Manager 5.3 (Rev-Man 5.3, The Nordic Cochrane Centre, Copenhagen, Denmark) was used to construct the forest plots as part of the meta-analysis, with the HR and 95% CI determined at a significance level of 5%, based on the OS values obtained from the group 3 studies.

2.8. Risk of bias across studies

Heterogeneity among studies was considered at all levels: clinically, methodologically and statistically. Clinical heterogeneity was analyzed by comparing variabilities among patients populations and outcomes, while methodological heterogeneity, by comparing the variability in study design and in the risk of bias. In order to decrease methodological and statistical heterogeneity, studies were separated in three groups: Group 1 (AEH studies), Group 2 (Biomarkers proliferation studies) and Group 3 (OS studies). Moreover, intragroup heterogeneity was also considered, so that only comparable data were combined in the two performed Biomarkers immunoeexpression meta-analyses (considering a fixed or a random effect) (Fig. 2). Similarly, in the OS meta-analysis, different study designs and/or patients population were separately combined as shown in the Forest plot and Funnel plot in Fig. 3. Accordingly, AEH pooled analysis was precluded mainly due to clinical and methodological heterogeneity.

2.9. Level of evidence

The Grading of Recommendation, Assessment, Development, and Evaluation (GRADE) [23] instrument was used to assess evidence quality and grading of recommendation strength in the 19 studies included in the quantitative synthesis [19,24–41]. This assessment was based on the study design, risk of bias, inconsistency, indirectness, imprecision and other considerations. Evidence quality was characterized as high,

moderate, low or very low [23]. The GRADE was assessed using the website <http://gradepro.org>.

3. Results

3.1. Study selection

In the first phase, 1344 studies were selected in five electronic databases. The duplicate studies were removed and 988 different citations remained. Subsequently, the comprehensive evaluation of the titles and abstracts resulted in the exclusion of 947 citations, thereby remaining 41 studies for consideration into the second phase. Moreover, 434 citations were identified in grey literature (Google SCHOLAR, OpenGrey and ProQuest), among which, 12 were already selected for further consideration. We did not identify any additional studies from the reference lists of the included studies. In the second phase, the full-text review was then conducted on the 41 first-phase selected citations, which

lead to the exclusion of 22 studies (Appendix S2). In the end of the two phases, 19 studies fully complied with the inclusion criteria. A flow-chart detailing the process of identification, inclusion, and exclusion of the studies is shown in Fig. 1.

3.2. Study characteristics

The studies selected to comprise the present review were published between 2003 and 2016 and were all written in the English language. They were conducted in six different countries: Austria [36], Canada [35,39], China [24,40,41], Japan [25,38], Poland [19,26], United Kingdom [27], and the United States of America (28–34, 37). The selected articles were observational studies, among which there were two case reports [24,34], one case series [41], one prospective cohort [40], one case-control [35] and nine retrospective cohorts [19,26,28–32,36,38]. Six intervention studies were included: one non-randomized trial [24], four non-controlled before-and-after clinical trials [25,33,37,39] one non-

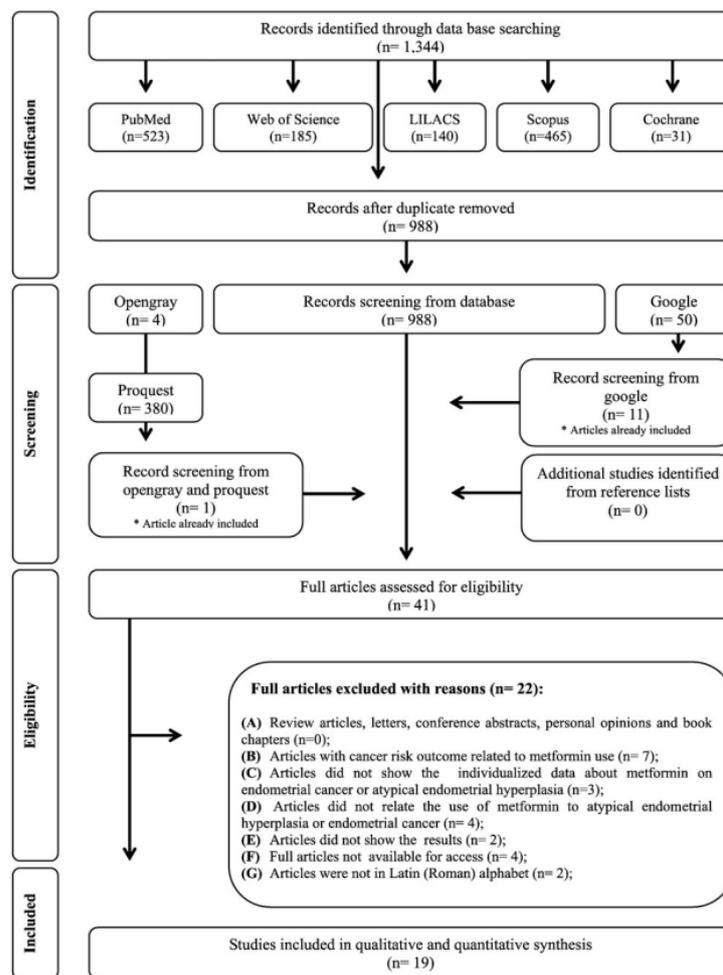


Fig. 1. Flow diagram of literature search and selection criteria adapted from PRISMA⁵⁵.

Table 1
Summarized descriptive characteristics of atypical endometrial hyperplasia (AEH) clinical studies.

Author, Year	Country	Study type	Main objective	Sample		Age Mean \pm SD/range (years)	BMI Mean \pm SD/range (kg/m ²)	Results	Conclusions
				MET users	MET non users				
Lou et al., 2013 [41]	China	Case Series	To analyze the efficacy of MET with or without oral progestins in the reversion of AEH in patients with PCOS.	17	-	30.4 \pm 3.8 (22–44)	23.71 \pm 3.87 (17.03–29.55)	Group A: Among 9 non-responders, progestin-treated patients, 6 reversed after the 3 months of MET (1000–1500 mg/daily), and 1 after 6 months. Group B: Among 8 progestin-untreated patients, reversion to normal endometrium was observed in 7, after 3 months, and in 1 after 6 months.	The majority of patients with PCOS and AEH treated with MET with or without progestin showed reversion to a histologically normal endometrium.
Mitsuhashi et al., 2016 [38]	Japan	Non-controlled Phase II Clinical Trial	To evaluate the efficacy of MET in preventing recurrence after MPA as a fertility-sparing treatment for AEH.	17	-	20–40	-	After progestin only therapy, AEH women had 85.6% of recurrence, whereas after the addition of MET (750 mg–2250 mg/daily) recurrence reduced to 26%.	Antidiabetic doses of MET suppressed cancer development; phase III studies are needed to confirm these findings.
Session et al., 2003 [34]	USA	Case report	To describe a case of progestogen-resistant AEH that successfully reversed after the addition of MET.	1	-	37	26	After 1 month of combined medroxyprogesterone acetate (150 mg/monthly) and MET (500 mg/daily), biopsy revealed a normal proliferative endometrium.	MET may be adjunctive to progesterone therapy in the reversion to a normal endometrium in AEH.
Shan et al., 2014 [40]	China	Prospective cohort	To compare the efficacy of MET plus megestrol acetate (MGA) with that of MGA alone for treating AEH.	8	8	35.2 \pm 5.8	-	In the MET plus MGA group, reversion was complete in 75% (6/8) of the cases, compared to 25% (2/8) in the MGA-only group ($p = 0.105$).	A higher proportion of complete reversion in the MET plus MGA group suggests that it may be a potential adjunctive therapy for AEH.
Shen et al., 2008 [24]	China	Case report	To describe the reversion of AEH after MET and oral contraceptives treatment.	2	-	32/31 (cases 1/2)	28/30.7 (cases 1/2)	After 3 months of treatment with MET (1500 mg/daily) and cyproterone (2 mg) plus ethinylestradiol (0.035 mg), hysteroscopy demonstrated a normal proliferative endometrium.	MET and cyproterone + ethinylestradiol may be a therapeutic option for women with AEH.

Abbreviations: EC = endometrial cancer, BMI = body mass index, PCOS = polycystic ovary syndrome, AEH = atypical endometrial hyperplasia, MGA: megestrol acetate, MET: metformin, MPA: medroxyprogesterone acetate.

controlled clinical trial phase II [38]. A summary of the AEH studies (herein called group 1 studies) is presented in Table 1; the characteristics of the EC studies with analysis of molecular biomarkers (group 2), in Table 2. Table 3 contains the EC overall survival data (group 3) of all studies that composed the meta-analysis (Fig. 3A) plus two studies that addressed secondary survival outcomes (progression free survival and recurrence free survival), but were not eligible for the pooled analysis in the meta-analysis [30,38].

3.3. Risk of bias within studies

Based on the MAsTARI [21] assessment of the 19 studies included in this systematic-review, seven (24, 30, 33, 34, 35, 37, 38) were classified as carrying a high risk of bias, just because the methods and results were unclear or of low quality. Five studies were classified as with moderate risk of bias [19,25,26,39,41] and seven were classified as with low risk of bias [27–29,31,32,36,40] (Appendix S3).

3.4. Results of individual studies

In the analysis of group 1 studies, Session et al. [34] and Shen et al. [24] reported two cases of successful reversion of AEH after metformin treatment in association with progestins in women who have previously failed to respond to progestin-only therapy. Lou et al. [41] showed that metformin combined with oral progestins lead to reversion of the AEH to a normal endometrial in a series of 17 patients with PCOS, including 9 who had not reversed satisfactorily with a course of progestin alone. Shan et al. [40] reported a prospective cohort composed of 16 patients with AEH plus at least one metabolic syndrome criterion; a complete response was found in 75% (6/8) of cases treated with metformin

plus megestrol, and in 25% (2/8) in those that used megestrol alone ($p = 0.105$). In a phase II study, Mitsuhashi et al. [38] showed that metformin reduces the EC grade 1 and AEH recurrence for 72% to 40% and 85.6% to 26% respectively.

In the analysis of group 2 studies, (primary outcome: biomarkers immunoeexpression), Laskov et al. [35], using a case-control experimental design, demonstrated that metformin increased *E-cadherin* mRNA and protein expression ($p = 0.0470$ and $p = 0.02$, respectively) in EC tissue. Four non-controlled before-and-after clinical trials investigated the association of metformin treatment with different biomarkers of cell proliferation (group 2 studies). Soliman et al. [37] showed a decrease of p-S6rp 70% ($p = 0.057$), MAPK 83% ($p = 0.004$) and p-AKT 90% ($p < 0.001$) expression in EC tissues of women treated with metformin. Laskov et al. [39] described a reduction in the mean percentage of EC tumor cells stained positive for Ki-67 and pS6 (from $14.0 \pm 12\%$ to $4.3 \pm 3.3\%$ [$p = 0.02$], and from $53.7 \pm 29\%$ to $22.7 \pm 18\%$ $p = 0.03$, respectively) in response to metformin treatment between two time points: first, in the diagnostic biopsy, and then in the surgical specimen. Schuler et al. [33] observed that metformin treatment was associated with a decreased expression of different markers of cell proliferation in post-treatment EC tissue samples obtained from hysterectomy specimens, compared to pre-treatment endometrial biopsy specimens. Proliferation markers evaluated were pAMPK (60.3%; $p = 0.00001$), pAKT (44.2%; $p = 0.0002$), pS6 (51.2%; $p = 0.0002$), p-4E-BP-1 (74.7%; $p = 0.001$), ER (65.7%; $p = 0.0002$) and Ki-67 (11.5%; $p = 0.008$), all significantly reduced in the post-treatment tumor samples.

Similarly, in a retrospective cohort, Markowska et al. [19] showed that EC diabetic patients treated with metformin exhibited a reduction in the expression of estrogen receptors (ER) in EC specimens in comparison to the group treated with insulin alone ($p = 0.004$). Moreover,

Table 2
Summarized descriptive characteristics of endometrial cancer clinical studies that analyzed immunoeexpression of molecular biomarkers.

Author, Year	Country	Study type	Main objective	Methods/analyzed biomarker	Samples		Age mean \pm SD/range (years)	BMI mean \pm AS/range (kg/m ²)	Results	Conclusions
					MET users	MET non-users				
Laskov et al., 2014 [39]	Canada	Non-controlled before and after clinical trial	To assess the effects of MET in proliferation markers between diagnostic biopsy and surgery in non-diabetic patients with EC.	IHC/Ki67; pAMPK and pS6.	11	10	MET: 60 (49–75); no-MET: 70 (57–76)	MET: 28.6 (20.5–34.9) no-MET: 28.8 (25–40)	There was a reduction in the mean percentage of cells stained positive for Ki-67 (14.0 \pm 12% to 4.3 \pm 3.3%), and for pS6 (53.7 \pm 29% to 22.7 \pm 18%), with a mean reduction of 31% after MET treatment ($p = 0.03$).	The reduction in cell proliferation biomarkers after MET treatment was consistent with an anti-proliferative effect of MET in EC.
Laskov et al., 2016 [35]	Canada	Case-control study	To investigate the expression of E-cadherin in EC tumor samples of diabetic patients who were treated with MET in comparison with untreated.	E-cadherin	30	20	MET: 67.4 (49–89); no-MET: 65.5 (37–86)	MET: 34.3 (21–46) no-MET: 37.5 (21–67)	The E-cadherin mRNA and protein expression were elevated in MET therapy group, compared with untreated ($p = 0.0470$ and $p = 0.02$, respectively).	This study showed elevated E-cadherin levels in MET-treated samples, but did not detect a correlation between E-cadherin levels and clinical outcomes.
Markowska et al., 2013 [19]	Poland	Retrospective cohort	To evaluate the expression of molecular biomarkers in EC in diabetics, and to determine the effect of MET on their expression.	IHC/ER; PR; IGF-1R; PAX-2 and β -catenin.	32	54 (38 non-diabetic)	65.25	32.1 (overall) Diabetic: 33.6 Non-diabetic 30.5	EC in diabetics treated with MET exhibited a reduction in ER expression compared with the group on insulin alone ($p = 0.004$). No statistically significant difference was noted in any biomarkers between MET-treated group and control.	The effect of MET on EC is still unknown. Further research is necessary to evaluate the clinical significance of decreased ER expression in EC of diabetic patients receiving MET, compared to insulin alone.
Mitsuhashi et al., 2014 [25]	Japan	Non-controlled before and after clinical trial	To investigate whether preoperative MET treatment affects EC cell growth markers.	IHC/Ki-67 and topoisome-rase I α .	31	10	51 (27–72)	28 (18–41)	Preoperative MET decreased immunostaining labeling index of Ki-67, from 51.0% (95% CI: 2.9–59.1%) to 30.3% (95% CI: 21.4–39.4%), and of Topoisomerase I α , from 49.9% (95% CI: 41.4–58.4) to 28.5% (95% CI: 23.0–34.0%), ($p < 0.001$).	MET decreases the immunostaining of Ki-67 and topoisomerase I α in EC tissues. This study provides reasonable rationale to support controlled clinical trials.
Schuler et al., 2015 [33]	USA	Non-controlled before and after clinical trial	To evaluate the effect of MET in molecular and metabolic biomarkers in EC.	IHC/pAMPK; pAKT; pS6; p-4E-BP-1; ER; Ki-67 and PR.	20	-	60 (54.4–60.9)	38.4 \pm 5.4)	MET decreased the expression of pAMPK (60.3% $p = 0.00001$), pAKT (44.2%, $p = 0.0002$), pS6 (51.2%, $p = 0.0002$), p-4E-BP-1 (74.7%, $p = 0.001$) and ER (65.7%, $p = 0.0002$), and Ki-67 staining by 11.5%, ($p = 0.008$). There	This study provides support for therapeutic clinical trials that evaluate MET use in obese patients with EC.

Table 2 (continued)

Author, Year	Country	Study type	Main objective	Methods/analyzed biomarker	Samples		Age mean ± SD/range (years)	BMI mean ± AS/range (kg/m ²)	Results	Conclusions
					MET users	MET non-users				
Sivalingam et al., 2016 [27]	UK	Non-randomized trial	To evaluate if MET reduces cellular proliferation biomarkers in endometrioid EC.	IHC/Ki-67; p-4E-BP-1; pAKT; pS6 and pACC.	28	12	MET: 63.6 ± 8.9; Non-MET: 67.8 ± 9.2	MET: 35.5 ± 11.3; Non-MET: 32.0 ± 5.9	was no effect on PR expression ($p = 0.28$). Ki-67 expression decreased from 50.9% to 37.4% (pre and post-treatment) in the MET group, whereas it did not change in the controls; p-4E-BP-1 expression slightly decreased (95% CI: 4.61%–0.06, $p = 0.045$), whereas pAKT, pS6, pACC did not change after MET treatment.	Short-term MET was associated with reduced Ki-67 and p-4E-BP-1 expression in EC.
Soliman et al., 2016 [37]	USA	Non-controlled before and after clinical trial	To evaluate the effects of MET on tumor biomarkers in EC women.	p-ACC; p-AMPK; p-S6rp; MAPK; p-AKT; Ki67 e Caspase 3	20	-	56.5 (27–67)	34.5 (21.9–50.0)	MET (850 mg/daily) decreased p-S6rp 70% ($p = 0.057$), MAPK 83% ($p = 0.004$) and p-AKT 90% ($p < 0.001$) expression in EC, but did not modify Ki67 and Caspase 3 expression.	MET therapy was associated with a decreased expression of p-S6rp, MAPK, and p-AKT in EC tissue.

Abbreviations: EC = endometrial cancer, IHC = immunohistochemistry, BMI = body mass index, CI = confidence intervals, Ki-67 = nuclear antigen Ki 6, pAMPK = phospho-monophosphate adenosine kinase, pS6 = phosphor-protein ribosomal S6, p4E - BP1 = phosphor- 4E- binding protein 1, PR = progesterone receptor, ER = estrogen receptor, pACC = phosphor-acetyl-CoA carboxylase, IGF-1R = insulin-like growth factor 1 receptor, PAX-2 = paired box2, AEH = atypical endometrial hyperplasia, MET = metformin, SD = Standard Deviation, CT = Clinical Trial.

Mitsuhashi et al. [25] observed that preoperative metformin administration decreased the immunostaining labeling index of Ki-67 from 51.0% (95% CI: 42.9–59.1%) to 30.3% (95% CI: 21.4–39.4%) ($p < 0.001$) and decreased topoisomerase II α I from 49.9% (95% CI: 41.4–58.4) to 28.5% (95% CI: 23.0–34.0%) ($p < 0.001$). Sivalingam et al. [27] also showed that metformin decreased Ki-67 expression from 50.9% (pre-treatment) to 37.4% (post-treatment) and p-4E-BP-1 (95% CI: 4.61–0.06%; $p = 0.045$), whereas the expression of pAKT, pS6 and pACC were unchanged.

Then, regarding group 3 studies (primary outcome: survival), six retrospective cohorts evaluated overall survival (OS), in which two treatment groups were compared: metformin users versus non-users, and therefore were eligible to the meta-analysis (Fig. 3). Ezewuiro et al. [29] found a significant increase in the OS (HR: 0.40; $p = 0.0036$) in the metformin-treated group compared to the non-metformin group. In Seebacher et al. [36] study, metformin therapy did not affect RFS (HR: 1.2 CI: 0.8–1.70; $p = 0.3$) and OS (HR: 0.9 CI: 0.69–1.2; $p = 0.5$) of EC women, but the OS was improved among metformin users in the overweight diabetic subgroup (81.1%) compared with metformin non-users overweight diabetics (60.8%) ($p = 0.04$). Moreover, Ko et al. [31], showed that non-metformin users were two times as likely to die as metformin users (95% CI: 1.3–3.2; $p = 0.003$), while Hall et al. [27] reported 10.3% ($n = 25/287$) of EC recurrences in non-metformin treated patients versus 1.9% ($n = 1/64$) in metformin-treated patients ($p = 0.05$). Nevadunsky et al. [32] showed that diabetic patients with non-endometrioid (type 2) EC who used metformin had a higher survival rate (HR: 0.54; 95% CI: 0.30–0.97; $p < 0.04$) than diabetic EC cases without metformin use or non-endometrioid EC cases without diabetes. Curiously, in turn, these authors found no association between metformin use and OS in endometrioid (type 1) EC (HR: 0.79; 95% CI: 0.31–2.00; p

$= 0.61$). In addition, two retrospective cohort studies found no statistical difference in the OS between metformin users versus non-users: Al Hilli et al. [25] (HR: 1.03; 95% CI: 0.57–1.85; $p = 0.92$) and Lemanska et al. [26] ($p = 0.86$). Lastly, in the Non-controlled Phase II Clinical Trial performed by Mitsuhashi et al. [38], the association of metformin with MPA in EC women was also investigated and showed a lower recurrence in the metformin plus MPA group, compared to the MPA-only group (76.2% to 40%).

3.5. Synthesis of results

3.5.1. Biomarkers immunoeexpression

The immunoeexpression staining was performed in tissues from EC patients before and after treatment with metformin. The staining proportion was quantified by the authors, and generated percentages of cells with positive staining in both pre- and post-treatment groups. The data compilation of three of the five group 2 studies afforded the construction of two figures, which represent the pre-treatment and the post-treatment analysis. The studies compiled by this approach were Laskov et al. [39], Mitsuhashi et al. [25], and Sivalingam et al. [27]; all of them had in common the assessment of Ki-67 immunostaining, with the addition of AMPK and S6 in the former, and of Topoisomerase II in the latter. Altogether, metformin treatment decreased the expression of biomarkers from 51.94% (CI: 36.23% to 67.46%) to 34.47% (CI: 18.55% to 52.43%), at a random effect, except for AMPK (Fig. 2). Of note, further analysis showed a high heterogeneity among those studies (pretreatment – CI: 24.83 to 86.57, $p = 0.0076$, $I^2 = 68.22\%$; post-treatment: CI: 45.88 to 89.29, $p = 0.0009$, $I^2 = 75.93\%$).

Table 3
Summarized descriptive characteristics of endometrial cancer clinical studies that addressed survival.

Author, Year	Country	Type of study	Main objective	Sample		Age Mean \pm SD/ range (years)	BMI Mean \pm SD/range (kg/m ²)	Results	Conclusions
				MET-users	MET non-users				
Al Hilli et al., 2015 [28]	USA	retrospective cohort	To examine the influence of diabetes and MET on OS and PFS in EC patients by using propensity score matching to address for confounding factors.	116 (diabetics)	1187 (161 diabetics)	Non-diabetics: 64.5 \pm 11.8 Diabetics: 64.9 \pm 10.6	Non-diabetics: 31.9 \pm 8.8 Diabetics: 39.0 \pm 9.5	There was no difference in PFS or OS ($p = 0.88$ and $p = 0.43$, respectively) among 277 diabetic patients, stratified by treatment group. In addition, among 115 MET-treated diabetic patients, propensity score-matched to non-diabetics, there were no differences in PFS (HR: 1.14; 95% CI: 0.49–2.62; $p = 0.77$) and OS (HR: 1.03; 95% CI: 0.57–1.85; $p = 0.92$).	OS and PFS were similar between diabetic and non-diabetic patients with EC, as well as between MET users and nonusers or non-diabetic patients.
Ezewuiro et al., 2015 [29]	USA	retrospective cohort	To examine OS in stage III–IV or recurrent EC patients treated with MET during chemotherapy.	31	318 (27 diabetic)	MET users: 65 \pm 11.0 MET non-users: 65 \pm 11.0 No diabetics: 63 \pm 11.0	MET users: 35.3 \pm 9.7 MET non-users: 33.3 \pm 8.1 No diabetics: 30.8 \pm 9.1	There was a significant increase in OS (HR: 0.40; $p = 0.0036$) between MET and non-MET groups. The univariate analysis showed a higher OS in MET-users compared with non-MET (HR: 0.38; 95% CI: 0.21–0.70; $p = 0.002$), as did the multivariate analysis (HR: 0.42; 95% CI: 0.23–0.78; $p = 0.006$). In stages III and IV, the OS also increased in the MET group (HR: 0.33; $p = 0.0363$, and HR: 0.41; $p = 0.0267$, respectively).	In stages III and IV EC diabetic patients treated with MET, OS was longer than in diabetics who did not use MET, suggesting that MET may have a role in the therapy for endometrial cancer.
Hall et al., 2015 [30]	USA	retrospective cohort	To examine survival-related outcomes in obese patients with EC treated and not treated with MET.	64	287	MET users: 58 (28–89) MET non-users: 58 (26–80)	MET users: 38 (33–46) MET non-users: 36 (31–42)	There were 25 (10.3%) recurrences in the MET non-users group vs. only one (1.9%) in MET users group ($p = 0.05$) among EEC at any time. In addition, 5 recurrences (7.8%) occurred among MET-users starting at the time of diagnosis, vs. 44 (15.3%) in patients who did start MET at diagnosis. (a)	Endometrioid EC patients treated with MET were less likely to recur than MET non-users.
Ko et al., 2014 [31]	USA	retrospective cohort	To investigate the association of MET use with EC-specific and all cause mortality outcomes	200	163	MET users: 62.2 (54–70) MET non-users: 64.8 (59–73)	MET users: 38 (33–46) MET non-users: 36 (31–42)	MET non-users had a 1.7 times worse RFS (95% CI: 1.3–2.6, $p = 0.01$) and were 2.0 times as likely to die as MET users (95% CI: 1.3–3.2; $p = 0.003$). MET was not significantly associated with time to recurrence (HR: 1.01; 95% CI: 0.6–1.9; $p = 0.96$).	MET was associated with improved RFS and OS in EC patients with diabetes. MET may be a useful adjuvant agent and improves overall health status in women with EC.
Lemanska et al., 2015 [26]	Poland	retrospective cohort	To investigate the impact of MET on the survival of EC patients.	30 (diabetic)	77 (38 diabetics, 39 non-diabetics)	63 (40–91)	MET users: 35 MET non-users: 32	No difference in survival between MET users vs. MET non-users was observed ($p = 0.86$).	MET use did not affect OS in EC patients.

Table 3 (continued)

Author, Year	Country	Type of study	Main objective	Sample		Age Mean \pm SD/range (years)	BMI Mean \pm SD/range (kg/m ²)	Results	Conclusions
				MET-users	MET non-users				
Mitsuhashi et al., 2016 [38]	Japan	Non-controlled clinical trial (phase II)	To evaluate the efficacy of MET in preventing recurrence after MPA as a fertility-sparing treatment for EC (b).	19	-	20–40	-	After progestin therapy, EC women had 76.2% of recurrence, whereas after MET (750 mg–2250 mg/daily) association, recurrence reduced to 40%.	The addition of antidiabetic doses of MET to MPA therapy was associated with reduced recurrence of EC.
Nevadunsky et al., 2014 [32]	USA	retrospective cohort	To investigate the association of MET use with survival in EC patients.	114	871 (total): Non diabetics: EEC (n = 437) or NEEC (n = 298); Diabetics: EEC (n = 82) or NEEC (n = 54).	EEC: 61.9 NEEC: 66.8	EEC: <18.5 (n = 5) 18.5–24.9 (n = 57) 25.0–29.9 (n = 115) >30 (n = 348) NEEC: <18.5 (n = 9) 18.5–24.9 (n = 59) 25–29.9 (n = 119); >30 (n = 177)	MET users NEEC diabetic patients had a higher survival (HR: 0.54; 95% CI: 0.30–0.97; p < 0.04) than diabetics who did not use MET, or NEEC without diabetes. There was no association between MET and EEC (HR: 0.79; 95% CI: 0.31–2.00; p = 0.61).	Diabetic patients with NEEC who used MET had a higher OS than those who did not use MET. Epidemiologic, translational, and pre-clinical data support an adjunctive role of MET in EC.
Seebacher et al., 2016 [36]	Austria	retrospective cohort	To investigate the association of MET and survival in EC patients.	419 (41 diabetics)	46	Diabetics MET users: 67.5 (18.6) Diabetics MET non-users: 68.5 (12) No diabetes: 65.1 (14.6)	Diabetics MET users: 35.3 (10.1) Diabetics MET non-users: 31.6 (7.6) No diabetes: 27.7 (8.7)	MET therapy did not affect RFS (HR: 1.2 CI: 0.8–1.70; p = 0.3) and OS (HR: 0.9 CI: 0.69–1.2; p = 0.5) of EC women, but it improved the OS in the MET-users overweight diabetic subgroup (81.1% compared with non-users (60.8%) (p = 0.04).	Overweight diabetic women who used MET had a prolonged OS than those who did not use MET.

Abbreviations: EC = endometrial cancer, OS = overall survival, RFS = recurrence free survival, PFS = progression free survival, HR = hazard ratios, BMI = body mass index, CI = confidence intervals, SD = Standard Deviation, MET = metformin, EEC = Endometrioid endometrial cancer, NEEC = Non-endometrioid endometrial cancer.

(a) and (b): Only data related to the secondary survival outcome recurrence free survival-RFS of endometrial carcinoma cases were included. These studies did not present overall survival (OS) data, therefore were not included in the meta-analysis.

3.6. Overall survival (OS)

Some studies assessed the OS of EC patients with the use of Kaplan-Meier curves, which generated Hazard Ratios (HR). The compilation of these data provided a graphic construction reporting the OS in different subgroups (Fig. 3). In the first subgroup analysis diabetic metformin users were compared to non diabetics, non metformin users from four OS studies: Al Hilli et al. [28] (HR: 1.01; CI: 0.72–1.42; p = 0.96), Ezewuiro et al. [29] (HR: 0.65; CI: 0.41–1.05; p = 0.077), Ko et al. [31] (HR: 1.2; CI: 0.78–1.69; p = 0.45) and Nevadunsky et al. [32] (HR: 0.57; CI: 0.31–0.97; p = 0.04). The second subgroup analysis was performed between diabetic metformin users versus non metformin users from three different studies: Al Hilli et al. [28] (HR: 0.61; CI: 0.30–1.23; p = 0.17), Ezewuiro et al. [29] (HR: 0.42; CI: 0.23–0.78; p = 0.006) and Lemanska et al. [26] (HR: 1.08; CI: 0.46–2.56; p = 0.86). In addition, three different subgroups' analysis were identified and therefore were included in the compiled OS analysis: a subgroup composed of diabetics, non metformin users plus non diabetics, non metformin users was compared with other metformin users (HR: 0.9; CI: 0.69–1.2; p = 0.5) in the study of Seebacher et al.; a subgroup of metformin users women with endometrioid EC compared with non metformin users (HR: 0.79; CI: 0.31–2.00; p = 0.61), and another subgroup of non metformin users women, with non endometrioid EC vs non metformin users (HR: 0.54; CI: 0.30–0.97; p = 0.04), the last two in the study of Nevadunsky et al. [32]. The pooled HR was 0.82 (CI: 0.70–0.95; p for heterogeneity = 0.09, I² = 40%), showing a moderate heterogeneity among studies. Other studies from both groups 2 and 3 were excluded from the meta-analysis [19,33,35,37,30,38], due to such a large heterogeneity that precluded data compilation.

3.7. Risk of bias across studies

The proportion of EC biomarkers staining was assessed in two groups: pretreatment and post-treatment with metformin. The OS was assessed in five different subgroups: diabetic metformin users vs. non diabetics, non metformin users; diabetics metformin users vs. non metformin users; diabetics non metformin users and non diabetics, non metformin users vs. metformin users; endometrioid EC, metformin users vs. non metformin users; and non endometrioid EC metformin users vs. non metformin users (Appendix S4). A funnel plot was also used to address publication bias across studies, concerning their differences regarding populations groups. The funnel plot showed a symmetrical shape suggesting a low risk of publication bias in this meta-analysis.

As regards to EC biomarkers, the heterogeneity was related to variable proteins evaluated and different methods employed to perform immunoeexpression among the studies. In the OS studies, the heterogeneity assessment was associated with different types or stages of EC.

3.8. Level of evidence

The quality of evidence analysis was based on the different outcomes evaluated by GRADE [23]. The quality of the evidence of the AEH and the OS studies (groups 2 and 3, respectively) was moderate, suggesting a moderate confidence in the estimated effect based on the assessed outcomes. On the other hand, for the expression of proliferation biomarkers, the quality of evidence was considered very low (Appendix S5). The high heterogeneity of the biomarkers studies was the main factor responsible for the limited quality of evidence.

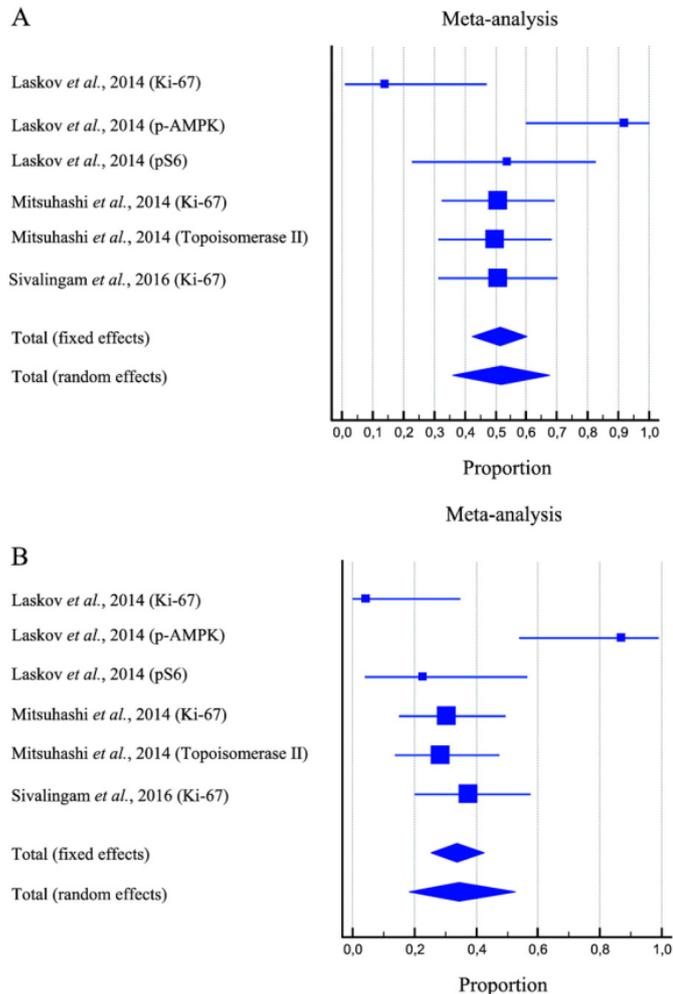


Fig. 2. Proportion of staining before (A) and after (B) treatment with metformin in patients with endometrial cancer (samples, $n = 123$). Results from two types of meta-analysis: fixed and random effect. Meta-analysis of the immunoexpression of proteins was performed using MedCalc. A. I^2 (inconsistency) = 68.22%. B. $I^2 = 75.93\%$.

4. Discussion

4.1. Summary of evidence

Recently, new treatment strategies for many types of cancer have been reported. Metformin is an oral antidiabetic drug with proven safety and efficacy in glycemic control and with a potential positive effect in several types of cancers. A previous systematic review by Franciosi et al. [42] suggested that metformin might be associated with a significant reduction in the risk of cancer and in cancer-related mortality among diabetic patients. Furthermore, a meta-analysis evaluating the effect of metformin among diabetic subjects with any type of cancer showed that metformin use was associated with improved OS [43]. Endometrial carcinoma was indeed one of the neoplasms in which metformin use has been reported to correlate with potentially beneficial clinical outcomes.

In the present review, we first evaluated the effect of metformin in AEH and observed a reversion to normal histology in the majority of cases after a course of metformin in association with progestin. Of note, a positive response was observed even in some patients who failed to respond to progestin therapy alone [24,34,40,41]. Meanwhile, Shan et al. [40] reported two cases (25%) in which the association of metformin failed to result in histological reversal to a normal endometrium. Even though a compiled statistical analysis was not applicable due to the studies' inherent characteristics (case reports and small series), an overview of the data suggests that metformin may play a role as a long-term adjuvant therapy in AEH. The reported clinical cases suggest that metformin can induce histological regression of AEH, thereby decreasing the likelihood of progression to overt EC, with the advantage of sparing fertility. These findings require further investigation in controlled trials, but are in keeping with the hypothesis of a beneficial effect of

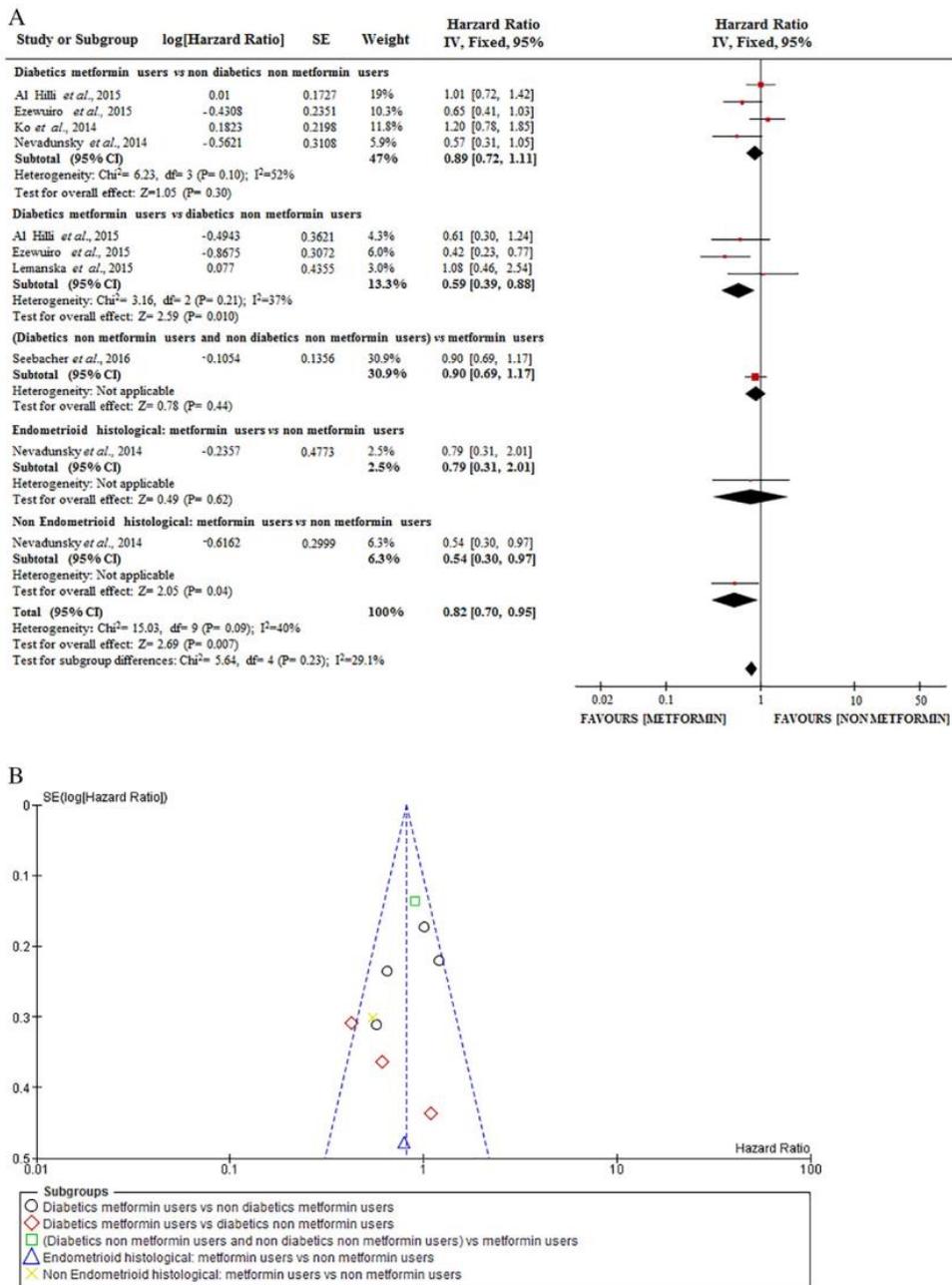


Fig. 3. A. Forest plot for Overall Survival (OS) of metformin users vs. non-metformin users in different subgroups. Survival meta-analysis was performed using RevMan. B. Funnel plot of the OS meta-analysis patients' subgroups showing a symmetrical shape consistent with a low risk of publication bias. Abbreviation: ID = identification, HR = hazard ratios, CI = confidence intervals, IV = inverse variance I^2 (inconsistency).

metformin on endometrial neoplasms, even in the very initial stage (pre-malignant).

The understanding of the effects of metformin in the progression of EC has gained attention since various observational clinical studies demonstrated its association with better clinical outcomes [31,32,44]. Despite the lack of clinical trials that systematically investigated this association, a number of *in vitro* and *in vivo* studies have proposed different mechanisms through which metformin could decrease EC cell survival and proliferation [25,45]. It is currently well established that metformin promotes downregulation of cellular growth and induces apoptosis, preferably in cancerous cells. The foremost cellular growth pathway is AMPK/mTOR. Metformin activates AMPK, a cellular energetic sensor, and induces its phosphorylation [46,47], with subsequent suppression of tumor suppression genes, such as PTEN/AKT [48], and TSC2/TSC1 [48], and/or with inhibition of tumor inductors, such as IGF (insulin-like growth factor) [49], and proliferation markers, as Ki-67 [50,51], among others. These effects culminate with downregulation of a central cell growth activator, mTOR [46–52], and resultant apoptosis through induction of caspases 3/7, 8, 9 [45] and proteins that regulate autophagy and cell death, such as bcl2 [53] and beclin 1 [54]. A few *in vitro* studies confirmed that treatment with metformin reduces cell viability and proliferation in a human endometrial carcinoma cell line (Ishikawa cells), through activation of pAMPK [54,55], induction of beclin 1, downregulation of IGF, and, consequently, increased autophagy and apoptosis [56]. Furthermore, Kilgore et al. [55] demonstrated that biguanides reduced EC cell viability, promoting cell cycle arrest in G0/G1 phase and AMPK activation as well.

Secondly, we systematically assessed the evidence for the anti-proliferative effect of metformin on EC through the evaluation of protein biomarkers in tumor samples of EC patients. We observed a significant heterogeneity in the studies that assessed biomarkers as outcomes in EC specimens, before and after treatment with metformin. Indeed, among 5 different studies, three studies were included in the meta-analysis, providing a list of 4 immunohistochemistry biomarkers: Ki-67, AMPK, S6 and Topoisomerase II [22,24,30]. We found that metformin treatment was associated with a decreased expression of those biomarkers, except for AMPK (Fig. 2).

Specifically, Ki-67, a DNA-binding nuclear protein, is a widely used marker of cell cycle activation and cell proliferation, usually highly expressed during tumor development [55]. Expression of Ki-67 was significantly reduced after metformin treatment according to our meta-analysis, and this finding reproduced those of the individual studies by Laskov et al. [39], Mitsuhashi et al. [25], Sivalingam et al. [27], Schuler et al. [33]. Interestingly, AMPK staining was unchanged in the only study included in the meta-analysis [27] that addressed it. This protein is considered the main target for the anti-carcinogenic effect of metformin in many types of cancer, including EC, and it was expected to increase after treatment. However, other factors may have interfered in the AMPK staining results, which may have contributed to some degree of disagreement, such as the ratio of phosphorylated and non-phosphorylated forms, the type of antibody, the percentage of tumor cells undergoing apoptosis, among others. Topoisomerase II is an enzyme that participates in DNA replication and packaging; a high expression of topoisomerase II might be associated with a poor prognosis [57]. Accordingly, Mitsuhashi et al. [25] found a statistically significant decrease in Topoisomerase II staining after metformin treatment. Similarly, S6K is a ribosomal protein directly related to cell growth [49]. The signaling cascade induced by metformin-induced AMPK phosphorylation promotes downregulation of mTOR and a subsequent decrease in pS6, which represent a downstream marker of cell growth. Only one study that evaluated pS6 expression was included in the meta-analysis [27], which also showed a statistically significant reduction in pS6.

Overall, our proliferation biomarkers' findings must be interpreted with caution, in light of the estimated risk of bias and consequent low quality of evidence obtained. The heterogeneity of those studies was the main factor responsible for the limited quality of the evidence.

Nevertheless, the decreased proportion of cell proliferation biomarkers observed in all studies is in keeping with the hypothesis that metformin may contribute to restrain EC progression. Further studies are needed to clarify the effects of metformin on the biological behavior of EC in terms of target biomarkers expression as a clinical outcome.

Lastly, six retrospective cohort studies were included to perform the OS data synthesis and analysis of EC patients treated with metformin (Table 3). While a moderate heterogeneity was observed among those studies, we conducted an OS meta-analysis based on the generation of two different constructions to compile combinations of studies that addressed OS in metformin-users vs. non-users, whether diabetics or not (Fig. 3A). Overall survival is defined as the time from diagnosis of EC to death by any reason. Both analytical constructions provided similar hazard ratios, even though with a wide variability, suggesting that metformin-users women with EC had between 13.3% and 47% less chance of death in a certain time frame, as compared to metformin non-users. Two studies enabled only separate subgroups' analysis (Seebacher et al., and Nevadunsky et al.) (Fig. 3), assuming that the OS may vary according to the histological classification or tumor grade. Type I or endometrioid EC expresses molecular hallmarks of estrogen-dependent growth, and can be preceded by AEH. Conversely, type II or non-endometrioid EC is estrogen independent [5]. In this context, individual studies provided interesting secondary data that, in general, remained in favor of the association between metformin use and a better OS (Fig. 3A). Nevadunsky et al. [32] observed a higher OS in diabetic metformin-users with non-endometrioid (type 2) EC compared to non-users, but no association was found between metformin use and survival in endometrioid (type 1) cases. Similarly, Al Hilli et al. [28] found no beneficial effect of metformin treatment in a separate group of endometrioid (type 1) EC. Interestingly, Ezewuiro et al. [29] showed that metformin improves the OS also in EC patients with advanced disease (Stages III and IV).

Indeed, most women diagnosed with EC survive after diagnosis and initial treatment, and will not die of the disease. Rather, mortality in type 1 EC is more often due to intercurrent medical illness, especially those related to obesity. Recurrent disease is less common, but usually occurs within three years after primary treatment and in obese women Fung-Kee-Fung et al. [58]. Although therapeutic measures to reduce obesity-related comorbidities in EC have not been systematically addressed so far, our OS meta-analysis results support that metformin may improve the OS of EC woman, and, thus represents a promising therapeutic tool in the management of EC.

4.2. Limitations

Limitations of the studies analyzed in this review should be pointed out, among which are the intrinsic limitations in handling observational data exclusively. In AEH search (group 1 studies), the low number of patients and differences in study design impaired a pooled statistical analysis. The possibility of selection bias due to non-random allocation has been considered since none of the studies were randomized. Further prospective and randomized trials with large sample sizes are required to confirm our findings as regards to AEH.

As regards to the biomarkers immunostaining analysis (group 2 studies), the criteria for evaluating a positive response differed among some studies, in which patients received different protocols of metformin treatment, thus limiting the conclusions. In addition, it is unclear whether the effects attributed to metformin could also translate into better outcomes for patients with EC receiving standard therapy. Further studies specifically designed to evaluate the biomarkers staining outcomes are needed to clarify these issues.

In the OS clinical studies, differences in follow-up time, tumor stage, treatment protocol, and methods of calculation of HR, CI, and *p*-values should be considered that might have interfered in the results of the pooled analysis, particularly as time-related bias. The low numbers of studies and the absence of randomized clinical trials may also have

compromised the evidence level, despite being addressed by the GRADE approach. Finally, another minor limitation was the accuracy and applicability of the MASTARI questions in qualifying some studies, which carries a degree of inherent subjectivity.

In order to partially overcome these limitations, we performed different risk of bias assessment analyzes (within studies and across studies), and used different meta-analysis approaches adequately applied to each group of study characteristics (Figs. 2 and 3). Moreover, the symmetric shape obtained in the Funnel plot suggested that publication bias was unlikely (Fig. 3B) regarding the OS studies.

5. Conclusion

In spite of the intrinsic analytical limitations, the evidence from the studies presented herein support the association of metformin treatment and positive outcomes in patients with AEH and EC. Our data suggest that adjunct metformin treatment may assist in the reversal of AEH to normal endometrial histology, in the reduction of cell proliferation biomarkers implicated in EC progression, and in the improvement of OS in EC patients, all three outcomes that were addressed with our research questions. These findings may transduce into potential novel clinical applications and/or research opportunities with metformin: 1) temporarily reversing disease in AEH for fertility preservation, and 2) as an adjunct to chemotherapy for advanced stage EC with the goal of improving cancer-related survival.

The present data also support the design of clinical trials with the aim of further investigating the effects of metformin in the adjunctive therapeutic approach of AEH and EC cases, including the definition of treatment protocols as regards to duration, dose, type and stage of disease, among others.

Conflict of interest statement

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Funding

This systematic review did not receive specific funding.

Acknowledgements

The authors would like to thank the contribution of André Luís Porporatti and Isabela Porto de Toledo for performing the meta-analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.07.120>.

References

- [1] J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. Dikshit, S. Eser, C. Mathers, M. Rebelo, et al., Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012, *Int. J. Cancer* 136 (2015) 359–386.
- [2] R.A. Smith, K. Andrews, D. Brooks, C.E. DeSantis, S.A. Fedewa, J. Lortet-Tieulent, et al., Cancer screening in the United States, 2016: a review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening, *CA Cancer J. Clin.* 66 (2016) 96–114.
- [3] R. Shao, X. Li, Y. Feng, J.F. Lin, H. Billig, Direct effects of metformin in the endometrium: a hypothetical mechanism for the treatment of women with PCOS and endometrial carcinoma, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 33 (2014) 1–11.
- [4] N. Colombo, C. Creutzberg, F. Amant, T. Bosse, A. Gonzalez-Martin, J. Ledermann, et al., ESMO-ESGO-ESTRO consensus conference on endometrial cancer: diagnosis, treatment and follow-up, *Radiother. Oncol.* 117 (2015) 559–581.
- [5] V.W. Setiawan, H.P. Yang, M.C. Pike, S.E. McCann, H. Yu, Y.B. Xiang, et al., Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J. Clin. Oncol.* 31 (2013) 2607–2618.
- [6] K. Jarzabek, M. Koda, M. Walentowicz-Sadlecka, M. Grabiec, P. Laudanski, S. Wolczynski, Altered expression of ERs, aromatase, and COX₂ connected to estrogen action in type I endometrial cancer biology, *Tumour Biol.* 34 (2013) 4007–4016.
- [7] P. Morice, A. Leary, C. Creutzberg, N. Abu-Rustum, E. Daraï, Endometrial cancer, *Lancet* 387 (2016) 1094–1108.
- [8] A. Pivano, P. Crochet, X. Carcopino, L. Cravello, L. Boublil, A. Agostini, Risk of coexisting endometrial carcinoma in case of atypical endometrial hyperplasia diagnosed on total hysteroscopic resection, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 203 (2016) 210–213.
- [9] J.V. Lacey, V.M. Chia, Endometrial hyperplasia and the risk of progression to carcinoma, *Maturitas* 63 (2009) 39–44.
- [10] A. Rodolakis, L. Biliatis, P. Morice, N. Reed, M. Mangler, V. Kesic, D. Denschlag, Clinical recommendations for fertility-sparing management in young endometrial cancer patients, *Int. J. Gynecol. Cancer* 25 (2015) 258–1265.
- [11] E. Ferrannini, The target of metformin in type 2 diabetes, *N. Engl. J. Med.* 37 (2014) 1547–1548.
- [12] M. Rotondi, F. Coperchini, P. Pignatti, F. Magri, L. Chiovato, Metformin reverts the secretion of CXCL8 induced by TNF-alpha in primary cultures of human thyroid cells: an additional indirect anti-tumor effect of the drug, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 100 (2015) 427–432.
- [13] D.F. Rego, L.M. Pavan, S.T. Elias, Canto G. De Luca, E.N. Guerra, Effects of metformin on head and neck cancer: a systematic review, *Oral Oncol.* 51 (2015) 416–422.
- [14] Z.J. Zhang, Z.J. Zheng, R. Shi, Q. Su, Q. Jiang, K.E. Kip, Metformin for liver cancer prevention in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 97 (2012) 2347–2353.
- [15] X.K. He, T.T. Su, J.M. Si, L.M. Sun, Metformin is associated with slightly reduced risk of colorectal cancer and moderate survival benefits in diabetes mellitus: a meta-analysis, *Medicine* 95 (2016) 2749.
- [16] M. Tandon, Z. Chen, A.H. Othman, J. Pratap, Role of Runx2 in IGF-1Rbeta/Akt- and AMPK/Erk-dependent growth, survival and sensitivity towards metformin in breast cancer bone metastasis, *Oncogene* 35 (2016) 4730–4740.
- [17] Z. Wang, S.T. Lai, L. Xie, J.D. Zhao, N.Y. Ma, J. Zhu, 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 Res. Clin. Pract.* 106 (2014) 19–26.
- [18] M.A. Pierotti, F. Berrino, M. Gariboldi, C. Melani, A. Mogavero, T. Negri, et al., Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects, *Oncogene* 32 (2013) 1475–1487.
- [19] A. Markowska, M. Pawalowska, V. Filas, K. Korsiński, M. Grybos, S. Sajdak, et al., Does metformin affect ER, PR, IGF-1R, beta-catenin and PAX-2 expression in women with diabetes mellitus and endometrial cancer? *Diabetol. Metab. Syndr.* 5 (2013) 1–11.
- [20] D. Moher, A. Liberati, J. Tetzlaff, D.G. Altman, Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement, *Int. J. Surg.* 8 (2010) 336–341.
- [21] The JBI MASTARI, Joanna Briggs Institute Reviewer's Manual 2014, Joanna Briggs Institute: University of Adelaide, 2014.
- [22] J.J. Deeks, et al., *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Diagnostic Test Accuracy* Version 1.0. The Cochrane Collaboration, 2010.
- [23] H. Balshem, M. Helfand, H.J. Schunemann, A.D. Oxman, R. Kunz, J. Brozek, et al., GRADE guidelines: 3. Rating the quality of evidence, *J. Clin. Epidemiol.* 64 (2011) 401–406.
- [24] Z.Q. Shen, H.T. Zhu, J.F. Lin, Reverse of progesterin-resistant atypical endometrial hyperplasia by metformin and oral contraceptives, *Obstet. Gynecol.* 112 (2008) 465–467.
- [25] A. Mitsuhashi, T. Kiyokawa, Y. Sato, M. Shozu, Effects of metformin on endometrial cancer cell growth in vivo: a preoperative prospective trial, *Cancer* 120 (2014) 2986–2995.
- [26] A. Lemanska, M. Zaborowski, M. Spaczynski, E. Nowak-Markwitz, Do endometrial cancer patients benefit from metformin intake? *Ginekol. Pol.* 86 (2015) 419–423.
- [27] V.N. Sivalingam, S. Kitson, R. McVey, C. Roberts, P. Pemberton, K. Gilmour, et al., Measuring the biological effect of presurgical metformin treatment in endometrial cancer, *Br. J. Cancer* 114 (2016) 281–289.
- [28] M.M. Al Hilli, J.N. Bakkum-Gamez, A. Mariani, W.A. Cliby, M.E. Mc Gree, A.L. Weaver, et al., The effect of diabetes and metformin on clinical outcomes is negligible in risk-adjusted endometrial cancer cohorts, *Gynecol. Oncol.* 140 (2016) 270–276.
- [29] O. Ezewuiro, T.A. Grushko, M. Kocherginsky, M. Habis, J.A. Hurteau, K.A. Mills, et al., Association of metformin use with outcomes in advanced endometrial cancer treated with chemotherapy, *PLoS One* 11 (2016), 0147145.
- [30] C. Hall, R.L. Stone, A. Gehlot, K.K. Zorn, A.F. Burnett, Use of metformin in obese women with type I endometrial cancer is associated with a reduced incidence of cancer recurrence, *Int. J. Gynecol. Cancer* 26 (2016) 313–317.
- [31] E.M. Ko, P. Walter, A. Jackson, L. Clark, J. Franasiak, C. Bolac, et al., Metformin is associated with improved survival in endometrial cancer, *Gynecol. Oncol.* 132 (2014) 438–442.
- [32] N.S. Nevedunsky, A. Van Arsdale, H.D. Strickler, A. Moadel, G. Kaur, M. Frimer, et al., Metformin use and endometrial cancer survival, *Gynecol. Oncol.* 132 (2014) 236–240.
- [33] K.M. Schuler, B.S. Rambally, M.J. DiFurio, B.P. Sampey, P.A. Gehrig, L. Makowski, et al., Antiproliferative and metabolic effects of metformin in a preoperative window clinical trial for endometrial cancer, *Cancer Med.* 4 (2015) 161–173.
- [34] D.R. Session, K.R. Kalli, L.S. Tummou, M.A. Damario, D.A. Dumesic, Treatment of atypical endometrial hyperplasia with an insulin-sensitizing agent, *Gynecol. Endocrinol.* 17 (2003) 405–407.
- [35] I.M.D. Laskov, P. Abou-Nader, O.M.B.B.S. Amin, C.A. Philip, M.C. Beauchamp, A. Yasmeen, W.H. Gotlieb, Metformin increases E-cadherin in tumors of diabetic patients with endometrial cancer and suppresses epithelial-mesenchymal transition in endometrial cancer cell lines, *Int. J. Gynecol. Cancer* 26 (2016) 1213–1221.
- [36] V. Seebacher, B. Bergmeister, C. Grimm, H. Koelbl, A. Reinthaller, S. Polterauer, The prognostic role of metformin in patients with endometrial cancer: a retrospective study, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 203 (2016) 291–296.

- [37] P.T. Soliman, Q. Zhang, R.R. Broaddus, S.N. Westin, D. Iglesias, M.F. Munsell, R. Schmandt, M. Yates, L. Ramondetta, K.H. Lu, Prospective evaluation of the molecular effects of metformin on the endometrium in women with newly diagnosed endometrial cancer: a window of opportunity study, *Gynecol. Oncol.* 143 (2016) 466–471.
- [38] A. Mitsuhashi, Y. Sato, T. Kiyokawa, M. Koshizaka, H. Hanaoka, M. Shozu, Phase II study of medroxyprogesterone acetate plus metformin as a fertility-sparing treatment for atypical endometrial hyperplasia and endometrial cancer, *Ann. Oncol.* 27 (2016) 262–266.
- [39] I. Laskov, L. Drudi, M.C. Beauchamp, A. Yasmeeen, A. Ferenczy, M. Pollak, et al., Anti-diabetic doses of metformin decrease proliferation markers in tumors of patients with endometrial cancer, *Gynecol. Oncol.* 134 (2014) 607–614.
- [40] W. Shan, C. Wang, Z. Zhang, C. Gu, C. Ning, X. Luo, et al., Conservative therapy with metformin plus megestrol acetate for endometrial atypical hyperplasia, *J. Gynecol. Oncol.* 25 (2014) 214–220.
- [41] X.F. Lou, J.F. Lin, S.P. Fang, F.L. Wang, Analysis on reverse of atypical endometrial hyperplasia by drugs in patients with polycystic ovary syndrome, *Reprod. Contracept.* 24 (2013) 205–214.
- [42] M. Franciosi, G. Lucisano, E. Lapice, G.F. Strippoli, F. Pellegrini, A. Nicolucci, A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review, *PLoS One* 8 (2013), e71583.
- [43] M. Yin, J. Zhou, E.J. Gorak, F. Quddus, Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis, *Oncologist* 18 (2013) 1248–1255.
- [44] C.H. Tseng, Metformin and endometrial cancer risk in Chinese women with type 2 diabetes mellitus in Taiwan, *Gynecol. Oncol.* 138 (2015) 147–153.
- [45] A. Takahashi, F. Kimura, A. Yamanaka, A. Takebayashi, N. Kita, K. Takahashi, et al., Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis, *Cancer Cell Int.* 14 (2014) 53.
- [46] M. Tadakawa, T. Takeda, B. Li, K. Tsujii, N. Yaegashi, The anti-diabetic drug metformin inhibits vascular endothelial growth factor expression via the mammalian target of rapamycin complex 1/hypoxia-inducible factor-1 α signaling pathway in ELT-3 cell, *Mol. Cell. Endocrinol.* 399 (2015) 1–8.
- [47] C. Campagnoli, P. Pasanisi, I. Castellano, C. Abbà, T. Brucato, F. Berrino, Postmenopausal breast cancer, androgens, and aromatase inhibitors, *Breast Cancer Res. Treat.* 139 (2013) 1–11.
- [48] A. Mohammed, N.B. Janakiram, M. Brewer, R.L. Ritchie, A. Marya, S. Lightfoot, et al., Antidiabetic drug metformin prevents progression of pancreatic cancer by targeting in part cancer stem cells and mTOR signaling, *Transl. Oncol.* 6 (2013) 649–659.
- [49] M. Zakikhani, M.J. Blouin, E. Piura, M.N. Pollak, Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 123 (2010) 271–279.
- [50] J. Cheng, T. Huang, Y. Li, Y. Guo, Y. Zhu, Q. Wang, et al., AMP-activated protein kinase suppresses the in vitro and in vivo proliferation of hepatocellular carcinoma, *PLoS One* 9 (2014) 93256.
- [51] S.Y. Cho, H.J. Lee, H.J. Lee, D.B. Jung, H. Kim, E.J. Sohn, et al., Activation of AMP-activated protein kinase α and Extracellular signal-regulated kinase mediates CB-PIC-induced apoptosis in hypoxic SW620 colorectal cancer cells, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 974313 (2013).
- [52] M. Dulovic, M. Jovanovic, M. Xilouri, L. Stefanis, L. Harhaji-Trajkovic, T. Kravic-Stevovic, et al., The protective role of AMP-activated protein kinase in alpha-synuclein neurotoxicity in vitro, *Neurobiol. Dis.* 63 (2014) 1–11.
- [53] Y. Saito, Y. Tanaka, Y. Aita, K.A. Ishii, T. Ikeda, K. Isobe, et al., Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1 pathways through modulation of Bcl-2 and BAD, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 302 (2012) 615–625.
- [54] Z. Zhuo, A. Wang, H. Yu, Metformin targeting autophagy overcomes progesterone resistance in endometrial carcinoma, *Arch. Gynecol. Obstet.* 294 (2016) 1055–1061.
- [55] Y. Tian, Z. Ma, Z. Chen, M. Li, Z. Wu, M. Hong, et al., Clinicopathological and prognostic value of Ki-67 expression in bladder cancer: a systematic review and meta-analysis, *PLoS One* 11 (2016), e0158891.
- [56] Y. Xie, J.L. Wang, M. Ji, Z.F. Yuan, Z. Peng, Y. Zhang, et al., Regulation of insulin-like growth factor signaling by metformin in endometrial cancer cells, *Oncol. Lett.* 8 (2014) 1993–1999.
- [57] W. Wu, B. Ma, H. Ye, T. Wang, X. Wang, J. Yang, et al., Millepachine, a potential topoisomerase II inhibitor induces apoptosis via activation of NF-kappaB pathway in ovarian cancer, *Oncotarget* 7 (2016) 52281–52293.
- [58] M. Fung-Kee-Fung, J. Dodge, L. Elit, H. Lukka, A. Chambers, T. Oliver, Follow-up after primary therapy for endometrial cancer: a systematic review, *Gynecol. Oncol.* 101 (2006) 520.

ANEXO B



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **061/12**

Título do Projeto: “Patogênese molecular dos tumores adrenais feocromocitomas e carcinomas adrenocorticais.”.

Pesquisadora Responsável: Olivia Laquis de Moraes

Data de Entrada: 07/05/12

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** ao projeto **061/12** com o título: “Patogênese molecular dos tumores adrenais feocromocitomas e carcinomas adrenocorticais”, analisado na 10ª Reunião Ordinária, realizada no dia 13 de novembro de 2012.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 13 de novembro de 2012.


Prof. Nairi Monsores
Coordenador do CEP-FS/UnB

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa clínica intitulada **“Patogênese molecular dos tumores adrenais: Feocromocitomas e carcinomas adrenocorticais”**, realizada no Hospital Universitário de Brasília-HUB, Setor de Endocrinologia e Metabologia.

Sua participação neste estudo é voluntária. Trata-se de uma pesquisa a respeito da doença de que você é portador (ou alguns de seus parentes), isto é, Feocromocitoma, Paraganglioma, ou carcinoma adrenocortical. O Feocromocitoma e o Paraganglioma são tumores que produzem hormônios (catecolaminas) e que surgem geralmente na glândula adrenal ou podem surgir em outras regiões do corpo. O carcinoma adrenocortical é um tumor raro, que surge na glândula adrenal. Sabe-se que essas doenças podem ser causadas por problemas genéticos que podem ser herdados em pessoas da mesma família, isto é, possivelmente por uma mutação genética. Os médicos responsáveis por esta pesquisa estão tentando descobrir o tipo de alteração genética que causa essa doença.

A sua participação nesta pesquisa é importante para os avanços dos conhecimentos da Medicina, que ocorrem através de estudos como este. Neste caso, este estudo poderá contribuir para melhor entendimento das causas desses tumores.

Será solicitado, após a leitura, que assine o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), em duas vias, ficando uma com você e outra com o pesquisador. Em seguida, será coletada uma amostra de sangue que ficará armazenada no Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB, para realização do exame molecular. Esses procedimentos serão realizados durante sua consulta ambulatorial de rotina, onde também serão verificados seus dados e de sua história médica. Você poderá se recusar a responder qualquer pergunta que lhe cause constrangimento. O seu acompanhamento clínico continuará seguindo normalmente conforme a rotina do Ambulatório.

A amostra de sangue (de 10 a 20 mL em adultos e em crianças maiores de dez anos, e de 2 a 10 mL de sangue em crianças até dez anos) será coletada de uma veia do antebraço, utilizando uma agulha e seringa (descartáveis). As complicações que podem ocorrer devido a este procedimento são: leve dor, inchaço (inflamação), infecção ou uma marca "preto-azulada" no local da picada (hematoma).

Em caso de ocorrência de uma desses eventos após a punção venosa, o Sr (a) deverá contactar a pesquisadora responsável por esse projeto, a qual irá lhe encaminhar à médica responsável pelo ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do HUB e orientadora dessa pesquisa, Dra Adriana Lofrano Alves Porto.

A partir da coleta do sangue, serão cultivadas as células brancas do seu sangue para obter DNA (seu código ou identidade genética), para que nele sejam estudados alguns genes que possam estar alterados e causar doenças.

Além disso, os pesquisadores responsáveis por este estudo irão coletar e armazenar no laboratório de Farmacologia da UnB um pequeno fragmento de aproximadamente 0,5 cm do tumor que será retirado durante a cirurgia que você realizará para o tratamento da sua doença. O DNA desse pequeno fragmento do tumor será analisado para verificar se alguns genes do tumor possam estar alterados e se essas alterações se relacionam com o aparecimento desse tumor. Esse procedimento não lhe causará nenhum risco ou desconforto, pois o fragmento será coletado após o tumor ter sido retirado do seu corpo. O material coletado (DNA extraído do sangue ou material proveniente do tumor) será armazenado por 5 anos.

Os resultados desta pesquisa poderão esclarecer se existe causa genética para a sua doença. Isso poderá ou não contribuir para a sua saúde diretamente, pois, caso seja encontrada uma mutação no seu caso, isso poderá determinar como o tratamento deverá ser continuado. Caso a mutação encontrada

não seja útil para a determinação do seu tratamento, poderá ser útil para o diagnóstico de outros membros da sua família, ou ainda, para o esclarecimento da doença de outras pessoas que tenham o mesmo problema.

Você poderá ter acesso a todas as informações e esclarecimentos que desejar a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa. A decisão de não participar, ou de se retirar do estudo depois do mesmo já ter iniciado, não ocasionará nenhum problema no seu tratamento no HUB, bastando para isto comunicar o seu desejo ao pesquisador responsável.

Nenhum tipo de pagamento será feito pela sua participação como voluntário(a) nessa pesquisa, e todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de sua responsabilidade.

Todas as informações acerca dos dados obtidos, inclusive biológico (amostra de sangue), serão utilizados exclusivamente para fins do estudo. Por serem confidenciais, estarão restritas ao prontuário médico da instituição.

Os resultados do estudo poderão ser publicados em revistas médicas nacionais e ou internacionais, apresentados em congressos ou eventos científicos ou às autoridades sanitárias, sem que seu nome seja mencionado em parte alguma.

Assinando este consentimento você estará autorizando o acesso ao seu prontuário médico sem, no entanto, renunciar aos seus direitos.

Se durante o estudo houver necessidade de esclarecer alguma dúvida entre em contato com a Dra. Adriana Lofrano Alves Porto pelo telefone 3448-5255 ou pelo email adlofrano@unb.br.

Outras informações a respeito dos procedimentos ou questões éticas, você poderá obter com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pelo telefone 3107-1748 ou no local.

DECLARAÇÃO DO PACIENTE

Eu, _____,
voluntariamente, concordo em participar do Estudo acima, a ser realizado no HUB/UNB. Declaro ter lido e compreendido este TCLE, fui informado de todos os dados, pude fazer perguntas e recebi respostas que me satisfizeram. Se eu não participar ou se eu decidir suspender minha participação neste estudo, não serei penalizado e não renunciarei a quaisquer direitos legais. Eu recebi uma cópia deste TCLE.

Assinatura do paciente: _____

Assinatura do responsável legal: _____

Data: / /

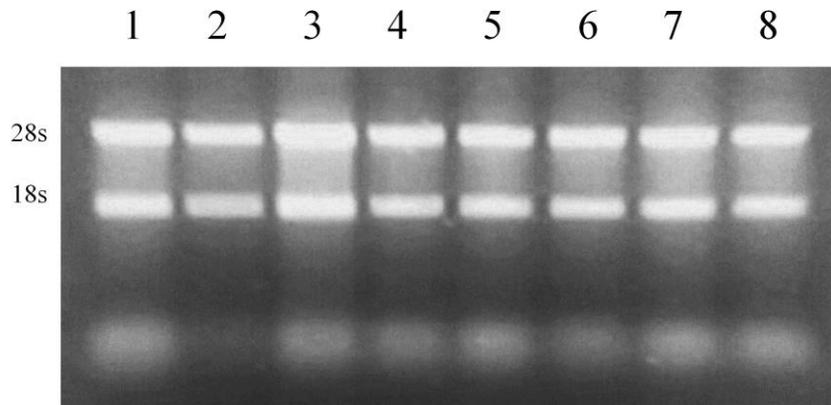
Nome da pessoa que conduziu a discussão do consentimento:

Assinatura do Investigador

Prof. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto
Professora Adjunta - FS– UnB
Endocrinologista – Hospital Universitário de Brasília
Contato: ambulatório de Endocrinologia – HUB (quintas-feiras à tarde) – 3448-5255
Laboratório de Farmacologia Molecular - Faculdade de Ciências da Saúde - UnB - 3107-1748
Email: adlofrano@unb

APÊNDICE B

A



- 1- RNA – Caracterização, amostra 1;
- 2- RNA – Caracterização, amostra 2;
- 3- RNA – Controle (meio de cultura), amostra 1;
- 4- RNA – Controle (meio de cultura), amostra 2;
- 5- RNA – Controle (meio de cultura), amostra 3;
- 6- RNA – Tratamento (metformina 20mM), amostra 1;
- 7- RNA – Tratamento (metformina 20mM), amostra 2;
- 8- RNA – Tratamento (metformina 20mM), amostra 3.

Figura 1A. Integridade das amostras de RNA: subunidades 28s e 18s do RNA total.

Tabela 1A. Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

Gene	Sequências dos Oligonucleotídeos (5'-3')	Produto (pb)	Acesso (Genbank)
<i>β-ACTINA</i>	Forward: TCACCCACACTGTGCCCATCTACG Reverse: CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATG	295	NM_001101.3
<i>CHGA</i>	Forward: CATCCAAGGATGTTATGGAGAAA Reverse: GTCTGTGGCTTCACCACTTTT	68	NM_001275.3
<i>DBH</i>	Forward: GGCCGGGAGTGGGAGATCGT Reverse: TGTGGCCAGCTCCCGGTCTT	150	NM_000787.3
<i>PNMT</i>	Forward: GCAGCCACTTTGAGGACATCA Reverse: GGCTGTACATGCTCCAGTTGAA	111	NM_002686.4
<i>TH</i>	Forward: CGGATGAGGAAATTGAGAAGCT Reverse: TCTGCTTACACAGCCCGAACT	69	NM_199292.2

Tabela 2A. Código identificador das sondas referentes aos ensaios de Taqman gene expression assay.

Sigla	Gene	ID do ensaio
1 ADM	adrenomedullin	Hs00969450_g1
2 ANGPTL4	angiopoietin like 4	Hs01101123_g1
3 ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	Hs01121918_m1
4 EPAS1	endothelial PAS domain protein 1	Hs01026149_m1
5 HIF1A	hypoxia inducible factor 1 alpha subunit	Hs00153153_m1
6 HIF3A	hypoxia inducible factor 3 alpha subunit	Hs00541709_m1
7 VEGFA	vascular endothelial growth factor A	Hs00900055_m1
8 VEGFR ou FLT1	kinase insert domain receptor	Hs01052961_m1
9 ACTB	actin beta	Hs01060665_g1

RESULTADOS DA CARACTERIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA

1 CARACTERÍSTICAS MORFORLÓGICA DA CULTURA PRIMÁRIA DE FEOCROMOCITOMA

A cultura primária foi conduzida a partir do tumor de medula da adrenal esquerda, feocromocitoma, que apresentava 6,1 x 4,2cm de diâmetro. Após a adrenalectomia esquerda, a cultura de células foi feita e foi acompanhado o crescimento destas células por aproximadamente 10 dias. Pôde-se observar nos primeiros dias de cultivo da cultura que as células tinham formato arredondado e que com passar do tempo o citoplasma ficava com aspecto mais estrelado. As células desenvolviam-se, entretanto pouco se observava o aumento do número de células. As características morfológicas eram compatíveis com cultura de células de feocromocitoma mostradas na literatura (GHAYEE e col., 2013).

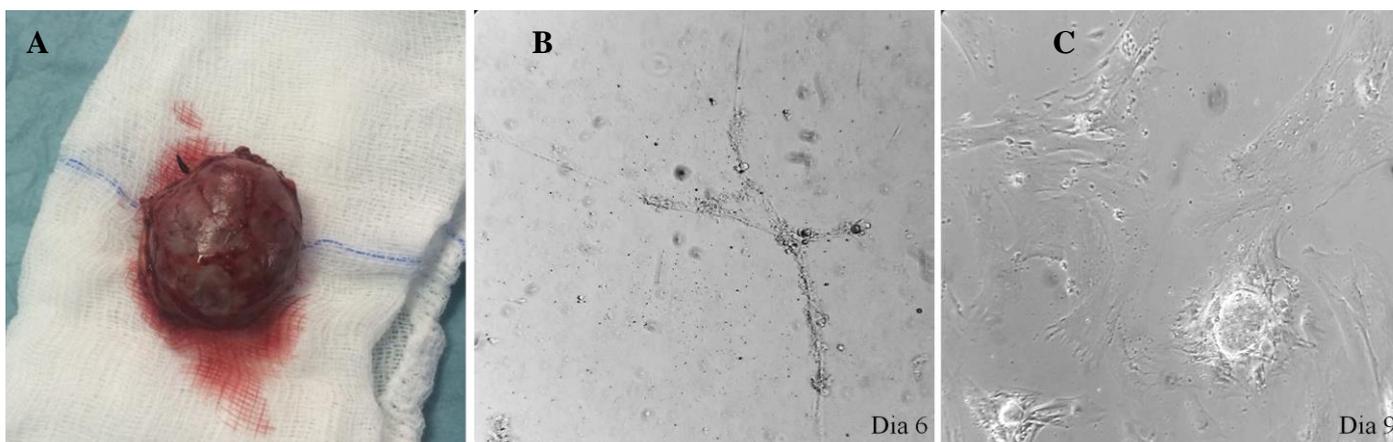


Figura 2A. Tumor e crescimento das células da cultura primária: A) Tumor após a adrenalectomia; B) células da cultura primária de feocromocitoma no aumento 10X no dia 6 de cultivo; C) células da cultura primária de feocromocitoma no aumento 10X no dia 9 de cultivo.

A marcação com faloidina foi conduzida para se observar as características morfológicas das células da cultura primária e comparar com a morfologia das células PC-12 Adh. Foi observado que as células da cultura primária de feocromocitoma possuem características morforológicas e tamanho semelhantes às células PC12-Adh.

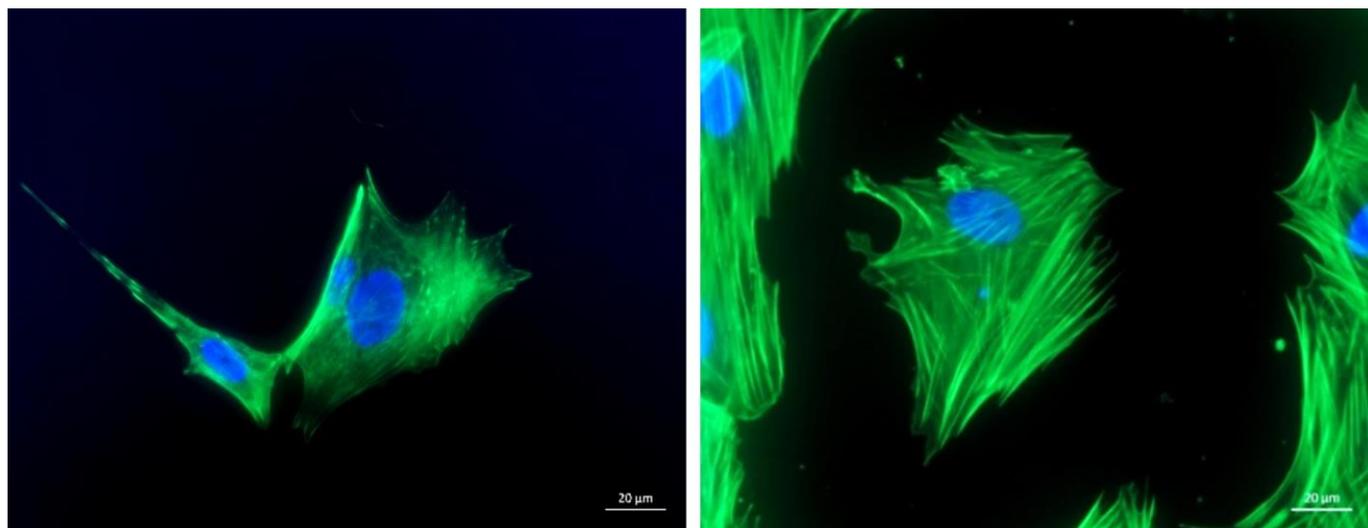


Figura 3A. Marcação das células da cultura primária com faloidina: A) Células PC12-Adh no aumento 40X marcadas com faloidina; B) Células da cultura primária de feocromocitoma no aumento 40 marcadas com faloidina;

2 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DA CULTURA PRIMÁRIA DE FEOCROMOCITOMA

Para caracterizar a cultura primária de feocromocitoma, genes foram selecionados para serem avaliados por PCRq. O primeiro gene está relacionado à proteína que é liberada na circulação sistêmica, a *CHGA* e é expressa em células de feocromocitoma. Foram selecionados ainda genes que codificam enzimas que participam da via de síntese de epinefrina como a *TH* (tirosina hidroxilase), *DBH* (dopamina β-hidroxilase) e *PNMT* (feniletonamina-N-metiltransferase). A expressão desses genes em células de feocromocitoma varia de acordo com as características genéticas do tumor. Os resultados mostraram baixa expressão de *CHGA* e *PNMT* e alta expressão de *TH* e *DBH* porém, o *TH* apresenta amplificação de 2 produtos, um no peso molecular esperado e outro produto inespecífico e o *DBH* apresenta amplificação de produtos específicos no fibroblasto. Na amostra do controle negativo não houve expressão desses mesmos genes, exceto o *DBH*, que amplificou produtos inespecíficos (Figura 4A e 5A). Melmed e colaboradores (2011) (MELMED e col., 2011) descrevem que tumores com mutação no VHL apresentam baixa expressão de PNMT produzindo predominantemente norepinefrina o que corrobora com os resultados do presente estudo.

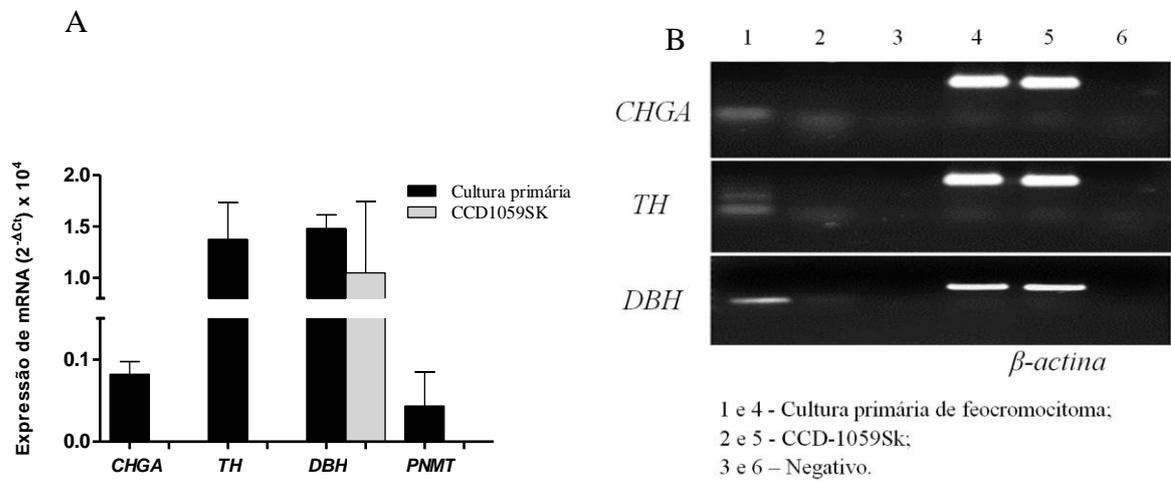


Figura 4A. Expressão de mRNA da cultura primária de feocromocitoma: A) Expressão de *CHGA* – cromogranina A; *TH* – tirosina hidroxilase; *DBH* – dopamina β-hidroxilase; *PNMT*– feniletanamina-N-metiltransferase. Dados apresentados em média ± D.P. B) Produtos da PCRq dos genes *CHGA*, *TH*, *DBH* das amostras de cultura primária de feocromocitoma, de fibroblato de pele humana e negativo.

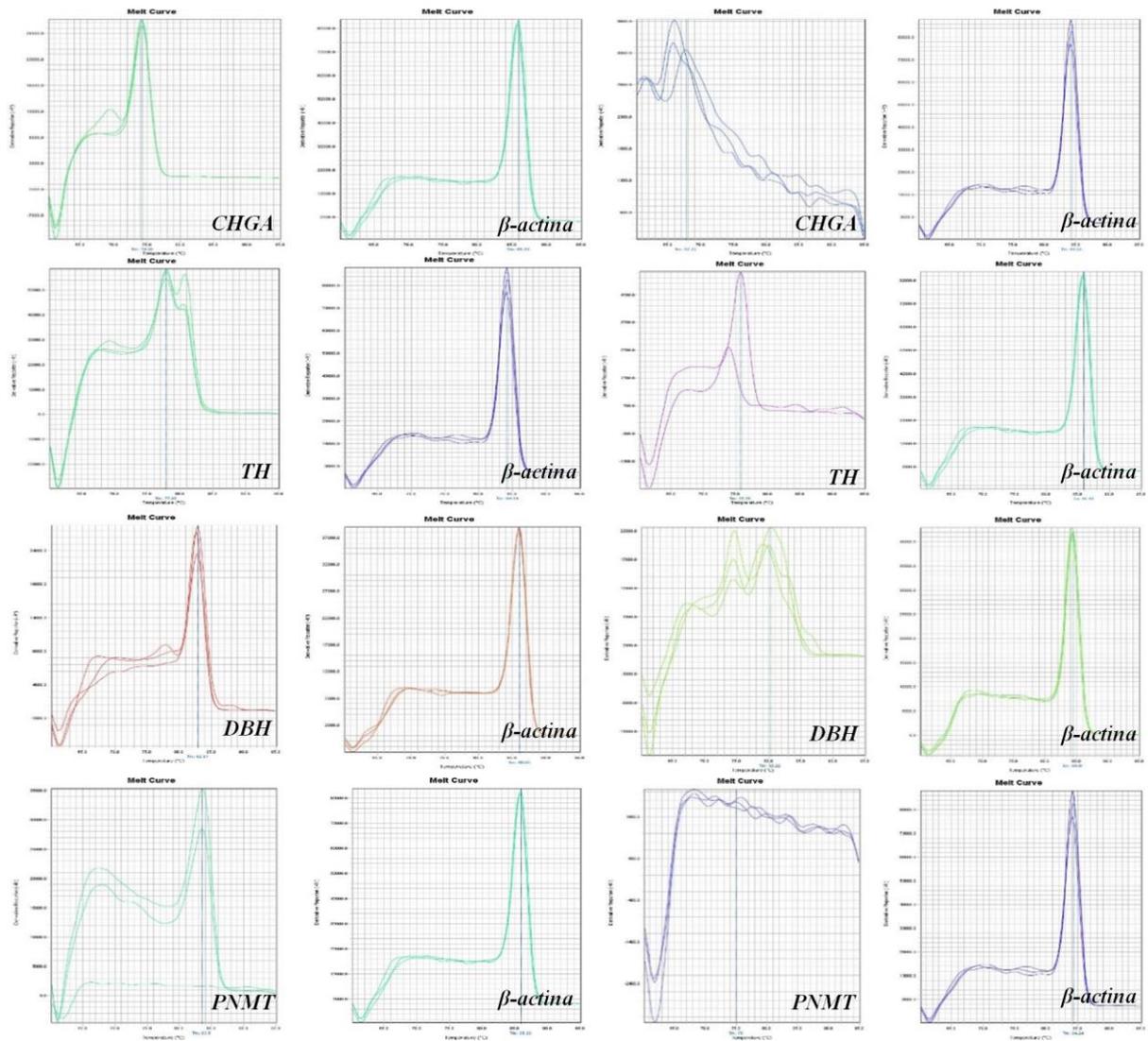


Figura 5A. Histograma da curva melting: genes avaliados *CHGA*, *TH*, *DBH*, *PNMT* das amostras de cultura primária de feocromocitoma, de fibroblato de pele humana.