

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

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE INTERLEUCINA-11 E FATOR INIBIDOR
DE LEUCEMIA EM CULTURA DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS SUBMETIDAS
A AMBIENTE HIPERINSULINÊMICO**

Juliana Oliveira Rangel

Orientador: Prof. Dr. Edison Capp

Porto Alegre, março de 2014

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

**EFEITO DA METFORMINA SOBRE INTERLEUCINA-11 E FATOR INIBIDOR DE
LEUCEMIA EM CULTURA DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS SUBMETIDAS A
AMBIENTE HIPERINSULINÊMICO**

Juliana Oliveira Rangel

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, UFRGS, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.

Porto Alegre, março de 2014

*Dedico este trabalho a meus pais, que
sempre me apoiaram em todos os
sentidos, proporcionando acesso à
educação e, mais importante, pelo seu
amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Capp, por abrir as portas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, e pela confiança depositada na minha capacidade.

Ao Prof. Dr. Henrique Sarubbi Fillmann, seu apoio foi essencial para o meu ingresso no Programa.

À Profa. Dra. Ilma Simoni Brum, pela disponibilidade, orientação e carinho, me recebendo em seu Laboratório como uma de suas alunas.

À Profa. Dra. Helena von Eye Corleta, pela atenção e auxílio nas coletas, além da contribuição crítica para o trabalho nas reuniões do grupo.

A todo o Programa de Pós-Graduação, desde os professores que proporcionaram o enriquecimento do meu conhecimento científico e pessoal, aos secretários do Programa que sempre me atenderam com atenção.

À Amanda de Barros Machado, que foi essencial para a prática e conclusão desse trabalho. Ela me guiou durante esses dois anos, sempre muito articulada e com paciência e disposição para me ensinar e incentivar. Fica a minha admiração tanto pela qualidade de seu trabalho, como pela extraordinária pessoa, com a qual pude aprender e crescer.

Ao Gustavo Ferreira, que me auxiliou muitas vezes na pesquisa prática e contribuiu com a análise crítica do trabalho.

A todos os colegas do Laboratório com os quais tive a oportunidade de conviver e trocar ideias, fossem elas científicas ou corriqueiras. Obrigada Diego, Patrícia, Caroline, Gabriela, Vanderlei e Joelson.

RESUMO

A compreensão dos mecanismos que regulam o endométrio e suas implicações clínicas podem contribuir para melhorar as taxas de implantação do embrião humano. Apesar de muitas proteínas e moléculas influenciarem a receptividade endometrial, sua contribuição coordenada para o processo de implantação do embrião ainda é pouco compreendida. Dentre a complexa rede que guia este processo em direção à preparação de um endométrio receptivo se encontram as citocinas, das quais a interleucina-11 (IL-11) e o fator inibidor de leucemia (LIF) desempenham papel essencial. Estudos demonstram que a interrupção das vias de sinalização celular dessas citocinas prejudica ou mesmo impede a implantação, implicando diretamente na fertilidade feminina. Além disso, a hiperinsulinemia afeta negativamente a fertilidade da mulher. Dentro desse contexto, a metformina, fármaco antidiabético, pode exercer efeitos positivos sobre a expressão da IL-11 e LIF, revertendo o possível prejuízo do excesso de insulina sobre a secreção dessas citocinas. Para avaliar esse efeito, utilizou-se um modelo de cultura primária de células estromais de endométrio humano expostas aos hormônios sexuais femininos estrogênio e progesterona, divididas em grupos: controle, metformina, insulina, e associação insulina e metformina. Utilizando RT-qPCR e ensaio imunoenzimático de ELISA, foram avaliadas a expressão gênica e proteica, respectivamente, das duas citocinas. Não foram observadas diferenças entre os grupos. O ensaio de MTT para avaliar a proliferação celular permitiu a verificação da ação antiproliferativa da metformina sobre o grupo hiperinsulinêmico. Embora as hipóteses formuladas nesse estudo encontrem forte sustentação na literatura, no modelo proposto não foi possível encontrar diferenças na expressão da IL-11 e LIF. Dada a complexa regulação de todos os fatores considerados nessa pesquisa e suas múltiplas inter-relações, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos que orquestram essa complexa rede.

Palavras-chave: endométrio, implantação, insulina, citocinas, insulino-sensibilizantes

ABSTRACT

The understanding of the endometrium regulation and its clinical implications can help to improve implantation rates of the human embryo. Although many proteins and molecules influence the endometrial receptivity, their coordinated contribution to embryo implantation process is still poorly understood. Among the complex pathways involved in this process toward the preparation to a receptive endometrium are the cytokines, including interleukin - 11 (IL- 11) and leukemia inhibitory factor (LIF) that play an essential role. It has been shown that disruption of cellular signaling pathways of these cytokines impairs or even prevents implantation, direct implications on fertility. Moreover, the hyperinsulinemia can negatively affected women's fertility. Within this context, metformin, an antidiabetic drug, may exert positive effects on the expression of IL-11 and LIF, reversing the possible effects insulin excess. To evaluate this effect, a model of primary culture of human endometrial stromal cells exposed to female sex hormones estrogen and progesterone was used. Cells were divided in groups: control, metformin, insulin, association insulin and metformin. From qRT-PCR and ELISA immunoenzymatic assay gene expression and protein, respectively, of the two cytokines were evaluated. No differences were observed between groups. Additionally, the assay to evaluate cell proliferation MTT found the important antiproliferative action of metformin on hyperinsulinemic group. In the proposed model could not find differences in the expression of IL-11 and LIF. Given the complex regulation of all factors considered in this study and their multiple interrelationships, more studies are required to unravel the mechanisms that orchestrate this complex network.

Key-words: endometrium, implantation, insulin, cytokines, insulin-sensitizing

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---------|-----------------------------------------------------------|
| AMPK | Proteína quinase ativada por AMP |
| ANOVA | Análise de variância |
| CT | Ciclo limiar |
| CV | Coeficiente de variação |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| DM2 | Diabetes mellitus tipo II |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium High glucose |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DNA | Ácido desoxirribunucleico |
| dNTPS | Desoxinucleotídeos trifosfatados |
| E2 | Estradiol |
| GLUT1 | Transportador de glicose I |
| GLUT4 | Transportador de glicose IV |
| h | Horas |
| HB-EGF | |
| hCG | Gonadotrofina coriônica humana |
| HPRT-1 | |
| IGF-1 | Fator de crescimento semelhante à insulina |
| IGFBP-1 | Fator de crescimento da insulina tipo I ligado a proteína |
| IL | Interleucina |
| JAK | Janus quinase |
| LH | Hormônio luteinizante |
| MAPK | Proteína quinase ativada por mitógeno |
| mTOR | alvo da rapamicina em mamíferos |
| MTT | Dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide |
| PBS | Tampão Salina-Fosfato |
| PI3-K | fosfatidilinositol 3-quinase |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| SBF | Soro bovino fetal |
| SOP | Síndrome dos ovários policísticos |
| SHBG | Globulina carreadora de esteroides sexuais |
| STAT | Fator de transcrição da via Janus quinase |

RNA_m Ácido ribonucleico mensageiro

RT-qPCR Transcrição reversa

TNF- α Fator de necrose tumoral α

TGF- β Fator de crescimento tumoral β

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ligação da IL-11 e LIF à subunidade de receptor compartilhada gp130 e ativação subsequente da via JAK/STAT. Adaptado de (Guo, Xu et al. 2012). 19
- Figura 2. Expressão da IL-11 e LIF **(A)** Interação entre blastocisto e endométrio na pré-implantação, mostrando a secreção de IL-11 e LIF pelo epitélio glandular (ge) e pelas células estromais (s) e decíduais (dc) **(B)** secreção de IL-11 e LIF no sítio de implantação (cc-coluna celular). Adaptado de Paiva, Menkhorst et al. 2009. 20
- Figura 3. Chave dos grupos experimentais: EP: cultivo com estradiol e progesterona. EPM: Tratamento com estradiol, progesterona e metformina. EPI: Tratamento com estradiol, progesterona e insulina. EPIM: Tratamento com estradiol, progesterona, insulina e metformina. 38
- Figura 4. Linha do tempo da cultura celular endometrial. 39
- Figura 5. Percentual de culturas aptas e não-aptas para avaliação das intervenções. 50% de culturas concluídas com sucesso 49
- Figura 6. Células estromais endometriais em cultura. Imagens obtidas por microscópio invertido de contraste de fase, demonstrando sua morfologia característica em monocamada: A) Primeiro dia de cultivo após semeadura, células não aderidas; B) Células diferenciadas em monocamada após 12 dias de cultivo. 50
- Figura 7. Proliferação de células estromais endometriais em meio de cultura contendo estrógeno e progesterona (EP) adicionado de insulina (I), tratamento com metformina (M) por 48 horas. Valores apresentados como média \pm erro padrão. * diferente de EP # diferente de EPI $P < 0,05$ N=5 54
- Figura 8. Expressão gênica da IL-11 em cultura de células estromais endometriais contendo estrógeno e progesterona (EP), adicionado de insulina (I: ambiente hiperinsulinêmico) e tratamento com metformina (M) por 48 horas.

Expressão do RNAm da IL-11 normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA). Resultados apresentados como média \pm erro padrão (N=7/grupo) 58

Figura 9. Expressão gênica do fator inibidor de leucemia (LIF) em cultura de células estromais endometriais contendo estrógeno e progesterona (EP), adicionado de insulina (I: ambiente hiperinsulinêmico) e tratamento com metformina (M) por 48 horas. Expressão do RNAm normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA). Resultados apresentados como média \pm erro padrão (N=5-6/grupo). 59

Figura 10. Expressão proteica de IL-11 em cultura de células estromais endometriais contendo estrógeno e progesterona (EP), adicionado de insulina (I: ambiente hiperinsulinêmico) e tratamento com metformina (M) por 48 horas, determinada por ensaio imunoenzimático de ELISA, corrigido pelo número total de proteínas (N=6/grupo). 60

LISTA DE TABELAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Concentração dos tratamentos dos grupos experimentais..... | 39 |
|----------------------------------------------------------------------|----|

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO..... | 5 |
| ABSTRACT | 6 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | 7 |
| LISTA DE FIGURAS | 9 |
| LISTA DE TABELAS | 11 |
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 1. 1 O endométrio e sua relação com a fertilidade..... | 14 |
| 1.2 Citocinas e seu papel na implantação do embrião..... | 16 |
| 1.3 Citocinas tipo IL-6: interleucina 11 (IL-11) e fator inibidor da leucemia (LIF) | 18 |
| 1.4 IL-11 e LIF: ações na interface embrião-endométrio..... | 21 |
| 1.5 Ação da insulina no endométrio..... | 23 |
| 1.6 Hiperinsulinemia e infertilidade feminina..... | 25 |
| 1.7 A Metformina na pesquisa da reprodução | 29 |
| 2 JUTIFICATIVA..... | 32 |
| 3 HIPÓTESES..... | 33 |
| 4 OBJETIVOS | 34 |
| 5 METODOLOGIA..... | 35 |
| 5.1 Delineamento | 35 |
| 5.2 Pacientes | 35 |
| 5.3 Cálculo do tamanho da amostra | 35 |
| 5.4 Aspectos éticos | 35 |
| 5.5 Coleta das amostras | 36 |
| 5.6 Processo de cultura celular..... | 36 |
| 5.7 Avaliação da viabilidade e proliferação celular | 40 |
| 5.8 Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR)..... | 40 |
| 5.9 Extração de RNA total..... | 41 |
| 5.10 Quantificação do RNA..... | 42 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.11 Síntese do cDNA..... | 42 |
| 5.12 PCR em Tempo Real..... | 43 |
| 5.13 Quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta C_T$ | 43 |
| 5.14 Protocolo da PCR em tempo real para os genes de interesse | 44 |
| 5.15 Avaliação da expressão proteica por ELISA | 44 |
| 5.16 Análise estatística | 45 |
| 5.17 Locais de realização do projeto..... | 47 |
| 6 RESULTADOS | 48 |
| 6.1 Capítulo I: Cultura celular de células estromais endometriais..... | 49 |
| 6.1.1 Discussão do Capítulo I..... | 50 |
| 6.2 Capítulo II: Análise da proliferação celular em cultura de células estromais endometriais em ambiente hiperinsulinêmico sob efeito da metformina | 54 |
| 6.2.1 Discussão do Capítulo II | 55 |
| 6.3 Capítulo III: Expressão gênica e proteica da IL-11 e do LIF em cultura de células estromais endometriais submetidas a ambiente hiperinsulinêmico sob o efeito da metformina | 58 |
| 6.3.1 Discussão do Capítulo III | 60 |
| 7 CONCLUSÃO..... | 66 |
| 8 PERSPECTIVAS..... | 67 |
| 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| 10 ANEXO I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)..... | 77 |

1 INTRODUÇÃO

1. 1 O endométrio e sua relação com a fertilidade

O sucesso da implantação depende de um diálogo sincronizado entre o embrião e a mãe. O embrião precisa estar em um adequado estágio de desenvolvimento como blastocisto. Já pela parte materna, constitui um pré-requisito fundamental a sua receptividade endometrial, ou seja, o estágio de desenvolvimento uterino ideal que seja receptivo ao embrião. Para isso, a mucosa que reveste internamente o útero – o endométrio – precisa passar por alterações morfológicas e funcionais definidas precisamente até o desenvolvimento de um tecido receptivo, o que inclui um estroma espesso e rico em nutrientes (Singh, Chaudhry et al. 2011; Altmae, Reimand et al. 2012; Oreshkova, Dimitrov et al. 2012).

Várias desordens endocrinológicas, ginecológicas e/ou metabólicas como síndrome dos ovários policísticos (SOP), obesidade, e aborto recorrente, estão associadas à redução da fertilidade e da receptividade uterina (Shang, Jia et al. 2012; Chakraborty, Goswami et al. 2013; Tsai, Wang et al. 2013). Apesar de recentes avanços nas técnicas de reprodução assistida, permitindo a seleção de embriões de alta qualidade, a taxa de implantação continua baixa e não tem aumentado suficientemente nas últimas décadas (Strowitzki, Germeyer et al. 2006). A falha na implantação do embrião resulta em infertilidade e é a maior causa do insucesso nas tecnologias de reprodução assistida (Paiva, Menkhorst et al. 2009). Entre os casais que vivem a experiência da infertilidade, 25% apresentam infertilidade sem causa aparente (Cahill and Wardle 2002; Dimitriadis, Menkhorst et al. 2010). A falha na implantação nesses casos é predominantemente atribuída a um endométrio não receptivo (Norwitz, Schust et al. 2001; Makker and Singh 2006). Atualmente, não há meios de determinar se o endométrio é receptivo, devido à carência de biomarcadores confiáveis. Por isso, a identificação de marcadores é essencial para que novas opções sejam disponibilizadas para o tratamento da infertilidade (Strowitzki, Germeyer et al. 2006).

O fenômeno da receptividade endometrial foi primeiramente identificado em ratos e posteriormente validado em outras espécies (Singh, Chaudhry et al. 2011). A preparação do endométrio ocorre na fase secretória do ciclo menstrual, sendo direcionada à fase de receptividade, que é conhecida como janela de implantação. A janela de implantação consiste em um período limitado temporalmente, durante o qual o endométrio se encontra apto à implantação do embrião, 6 a 9 dias após o pico de hormônio luteinizante ou do dia 19 ao dia 24 do ciclo menstrual (Harper 1992; Dimitriadis, Nie et al. 2010). Diferentes tipos celulares formam a camada endometrial e interagem para permitir uma implantação adequada. Três grupos de células podem ser diferenciados nesse processo: células endoteliais, células epiteliais e as células estromais, além das células imunes não residentes. Nesse período, as células estromais condicionadas pelo estrogênio irão se diferenciar em células decíduais sob a influência da progesterona, sofrendo transformações morfogenéticas (Strowitzki, Germeyer et al. 2006). Simultaneamente, ocorrem alterações vasculares e bioquímicas no endométrio, e o conjunto desses eventos é conhecido como decidualização (Ramathal, Bagchi et al. 2010; Oreshkova, Dimitrov et al. 2012).

Essas mudanças no endométrio foram descritas inicialmente por Noyes, Hertig and Rock e são guiadas sob o controle dos hormônios sexuais esteroides, estrogênio e progesterona (Noyes, Hertig et al. 1975). O estrogênio é o hormônio dominante na fase proliferativa, enquanto que a progesterona é o hormônio determinante da fase secretória, quando a decidualização ocorre (Makrigiannakis, Minas et al. 2006; Strowitzki, Germeyer et al. 2006). A presença da progesterona capacita a proliferação e transformação das células estromais do endométrio, permitindo o processo da receptividade uterina (Zhang, Funk et al. 1994). Além do papel já bem estabelecido dos hormônios no estabelecimento da gravidez, uma variedade de proteínas e moléculas complexas participam ativamente da implantação, como fatores de crescimento, moléculas de adesão e citocinas. Um conjunto dessas moléculas exerce papel crucial na preparação de um endométrio receptivo para o embrião (Dimitriadis, Nie et al. 2010; Singh, Chaudhry et al. 2011).

Embora a implantação do embrião seja um processo dinâmico por si só, por depender da interação materno-embrionária, o condicionamento do endométrio em direção à janela de implantação é de origem puramente materna (Strowitzki, Germeyer et al. 2006). Alterações morfofuncionais neste período podem dificultar ou mesmo impedir a implantação, assim, um endométrio adequado pode ser considerado como o principal fator determinante na fertilidade (Strowitzki, Germeyer et al. 2006; Lessey 2011).

Dentro desse contexto, o endométrio tem recebido muito menos atenção na pesquisa da reprodução comparada com o ovário, fertilização ou o desenvolvimento embrionário (Casper 2011). Além disso, uma receptividade endometrial reduzida tem sido encontrada em um número crescente de infertilidades inexplicáveis (Lessey, Castelbaum et al. 1995; Norwitz, Schust et al. 2001; Strowitzki, Germeyer et al. 2006), o que levanta a necessidade premente de mais estudos com foco na biologia do endométrio para avaliar seus aspectos fisiológicos e sua resposta a fármacos.

1.2 Citocinas e seu papel na implantação do embrião

Entre os fatores essenciais para uma implantação bem sucedida, está a complexa interação de sinalização celular do endométrio materno com o embrião, a qual é mediada por uma infinidade de moléculas-chave como prostaglandinas, hormônios, fatores de crescimento, moléculas de adesão, entre outras. Cada um desses fatores, quando expressos ou inibidos, irão contribuir para formar um endométrio adequadamente receptivo. As citocinas pertencem a este grupo de fatores (van Mourik, Macklon et al. 2009; Dimitriadis, Nie et al. 2010; Singh, Chaudhry et al. 2011).

As citocinas são pequenas glicoproteínas multifuncionais cujas ações biológicas são mediadas por receptores específicos na superfície celular. São produzidas por monócitos, macrófagos e linfócitos, e agem como potentes sinalizadores intracelulares, regulando inclusive funções das células endometriais e interações entre mãe e embrião (Makrigiannakis, Minas et al.

2006; van Mourik, Macklon et al. 2009). As citocinas foram descobertas, primeiramente, associadas às células imunes e hematopoiéticas, sendo nomeadas de acordo com sua ação e/ou expressão em diferentes tecidos (Paiva, Menkhorst et al. 2009; van Mourik, Macklon et al. 2009). Atualmente, essa associação foi ampliada, e sabe-se que as citocinas também participam de funções celulares importantes como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Dimitriadis, Menkhorst et al. 2010).

Quando o embrião chega ao útero, há uma importante produção de citocinas, tanto pelas células do blastocisto quanto pelo endométrio que podem modular a receptividade uterina através da regulação de várias moléculas de adesão (Singh, Chaudhry et al. 2011; Altmae, Reimand et al. 2012). O conjunto dessas citocinas anti e pró-inflamatórias na cavidade uterina irá desempenhar um papel central no desenvolvimento do embrião, atuando como potentes sinalizadores intracelulares, regulando funções celulares endometriais e a interação endométrio-embrião (van Mourik, Macklon et al. 2009; Lessey 2011). Em mamíferos, uma expressão desregulada de citocinas e suas sinalizações levam a uma falha absoluta ou parcial da implantação do embrião e uma formação anormal da placenta (Guzeloglu-Kayisli, Kayisli et al. 2009).

Existem redundâncias dentro das famílias de citocinas, e muitas geralmente exercem funções similares e sobrepostas em certas células (Singh, Chaudhry et al. 2011). Em nosso grupo de pesquisa, a expressão de algumas citocinas como interleucina-8 (IL-8) e interleucina-1 β (IL-1 β) em modelo de cultura celular endometrial já foi investigada, onde se encontrou aumento da expressão da IL-1 β após tratamento com metformina (Machado 2013), o que motivou o seguimento de estudos na mesma linha. O foco deste trabalho foi o estudo das citocinas interleucina-11 (IL-11) e fator inibidor de leucemia (LIF), as quais são requeridas na implantação do embrião em ratos e em humanos (Cork, Li et al. 2001; Mikolajczyk, Wirstlein et al. 2006; Paiva, Menkhorst et al. 2009; Dimitriadis, Nie et al. 2010).

1.3 Citocinas tipo IL-6: interleucina 11 (IL-11) e fator inibidor da leucemia (LIF)

A IL-11 e o LIF constituem apenas um pequeno número de fatores que estão envolvidas intimamente com a implantação do embrião no endométrio (Robb, Dimitriadis et al. 2002; Marwood, Visser et al. 2009). A IL-11 e o LIF foram primeiramente descobertos por seus efeitos sob as células do sistema hematopoiético e imune, respectivamente. O LIF foi originalmente identificado por sua habilidade em induzir a diferenciação de macrófagos da linhagem celular mieloide M1 (Du and Williams 1994), enquanto a IL-11 foi identificada como um fator de crescimento com ação em múltiplos estágios na hematopoiese, em sinergismo com outros fatores (Paul, Bennett et al. 1990).

Ambas são membros da família da IL-6, que inclui também oncostatina M, cardiotrofina-1, fator neurotrófico ciliar, entre outros (Paiva, Menkhorst et al. 2009). Elas compartilham uma subunidade glicoproteica acessória transdutora de sinal (gp130), embora possuam subunidades de receptores específicas individuais (IL-11R α e LIF-R). A ligação de cada citocina ao seu receptor cognato desencadeia a dimerização com o gp130, formando um receptor de alta afinidade, podendo induzir à ativação de várias vias, principalmente a da Janus quinase/sinal transdutor e ativador da transcrição proteica (JAK/STAT) (Figura 1) (Marwood, Visser et al. 2009; Paiva, Menkhorst et al. 2009). Outras vias que podem ser ativadas são a da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e fosfatidilinositol 3 quinase/Akt (PI3k/AKT) (Chen, Cheng et al. 2000). Com isso, tanto a IL-11 como o LIF possuem uma variedade de papéis biológicos incluindo proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, todas funções essenciais para implantação e desenvolvimento do embrião (Robb, Dimitriadis et al. 2002; Marwood, Visser et al. 2009; Dimitriadis, Menkhorst et al. 2010).

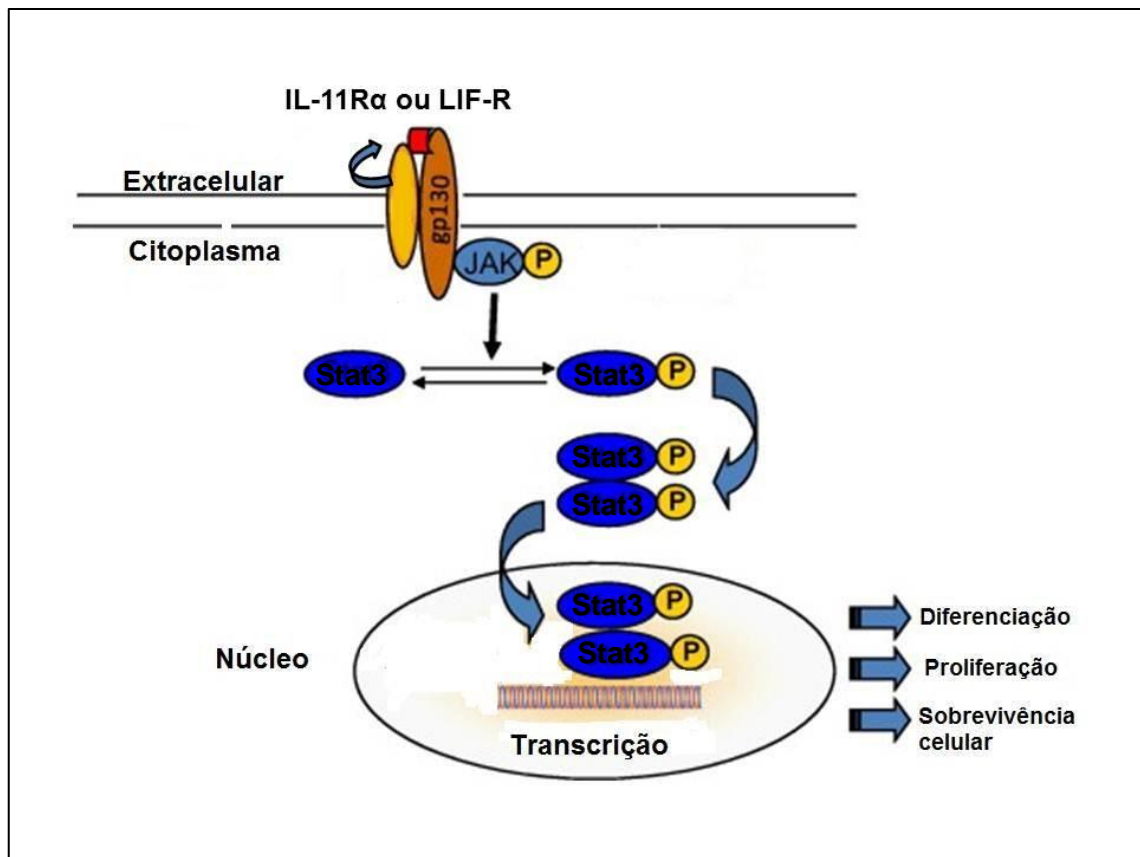


Figura 1. Ligação da IL-11 e LIF à subunidade de receptor compartilhada gp130 e ativação subsequente da via JAK/STAT. Adaptado de (Guo, Xu et al. 2012).

O RNAm da IL-11 e o do LIF e seus receptores são expressos pelo epitélio glandular e luminal do endométrio, predominantemente durante o período receptivo do útero, na fase secretória do ciclo menstrual, independente da presença do blastocisto (Figura 2A) (Mikolajczyk, Wirstlein et al. 2006; Marwood, Visser et al. 2009). As células estromais do endométrio, que nessa mesma fase do ciclo irão sofrer o processo de decidualização, também secretam as proteínas IL-11 e LIF, isso é evidenciado por sua presença no fluido uterino, porém em quantidade reduzida, comparadas às células epiteliais (Charnock-Jones, Sharkey et al. 1994; Arici, Engin et al. 1995). Além disso, as tubas uterinas humanas também expressam IL-11 e LIF, sugerindo ações adicionais dessas citocinas no desenvolvimento do blastocisto (Makrigiannakis, Minas et al. 2006). Na Figura 2B, pode-se ver a expressão da IL-11 e do LIF no ambiente pré-implantação.

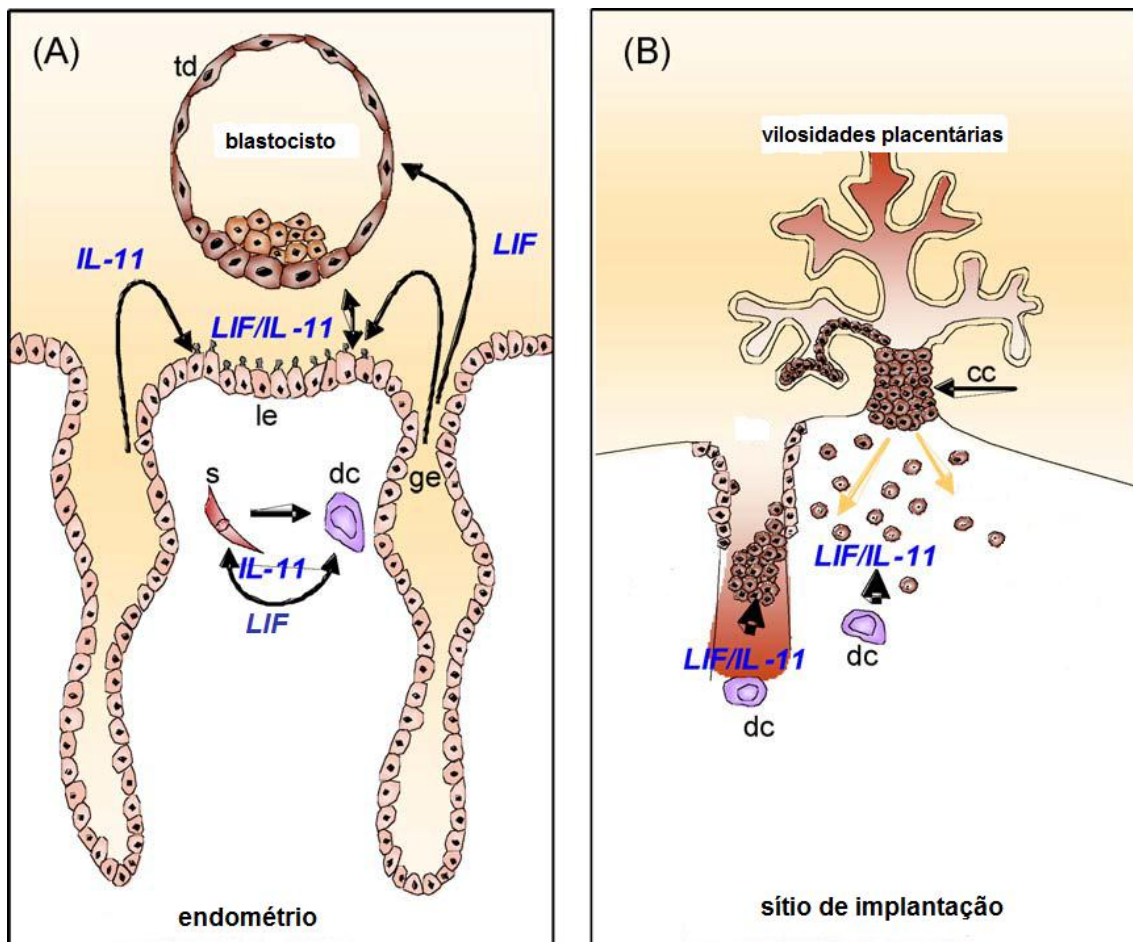


Figura 2. Expressão da IL-11 e LIF **(A)** Interação entre blastocisto e endométrio na pré-implantação, mostrando a secreção de IL-11 e LIF pelo epitélio glandular (ge) e pelas células estromais (s) e decíduais (dc) **(B)** secreção de IL-11 e LIF no sítio de implantação (cc-coluna celular). Adaptado de Paiva, Menkhorst et al. 2009.

O mecanismo que regula a produção dessas citocinas ainda precisa ser claramente elucidado. No entanto, há fortes evidências de que a progesterona é o maior regulador direto e indireto da expressão da IL-11 e do LIF em primatas, sustentado pelo fato de que a expressão de ambas no endométrio coincide com a predominância da progesterona nesse tecido (Robb, Dimitriadis et al. 2002; Paiva, Menkhorst et al. 2009). Somado a isso, mulheres tratadas com mifepristona (antagonista do receptor de progesterona) imediatamente após ovulação, têm a expressão de LIF reduzida durante a janela de implantação (Danielsson, Swahn et al. 1997). A expressão da IL-11 e do LIF também é regulada por citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina-

1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), reforçando o conceito de que o processo inflamatório é importante durante a implantação (Makrigiannakis, Minas et al. 2006). *In vitro*, IL-1 β , TNF- α e leptina estimulam a secreção de LIF (Sawai, Matsuzaki et al. 1997). Similarmente, IL-1 α , TNF- α e fator de transformação do crescimento β (TGF- β) estimulam a secreção de IL-11 por células epiteliais e estromais (Cork, Li et al. 2001). Outros fatores locais, como o fator de crescimento heparina-ligando EGF (HB-EGF) (Lessey 2002) e a gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Licht, Fluhr et al. 2007), também têm efeito regulatório sobre a secreção de LIF por células endometriais cultivadas *in vitro*. A regulação da produção da IL-11 durante a decidualização *in vitro* também é estimulada via fatores locais como relaxina e prostaglandina E2 (Dimitriadis, Nie et al. 2010).

Assim, a regulação da produção da IL-11 e do LIF parece ser complexa e é provavelmente dependente de microambientes bem controlados e do balanço entre reguladores positivos e negativos (Makrigiannakis, Minas et al. 2006; Marwood, Visser et al. 2009). Portanto, mais estudos são requeridos para estabelecer quais fatores são os mais importantes, uma vez que esses podem prover uma oportunidade de manipulação do ambiente durante a janela de implantação.

1.4 IL-11 e LIF: ações na interface embrião-endométrio

A relação das citocinas com a implantação do embrião no endométrio foi primeiramente estabelecida a partir de estudos *in vivo* com animais, onde essa relação já se encontra bem elucidada, diferente dos humanos. Camundongos LIF-deficientes são inférteis devido à falha na implantação, pois o embrião não adere (Fouladi-Nashta, Jones et al. 2005). Em contrapartida, camundongos fêmeas com mutação nula (*knockout*) no gene do receptor da IL-11 (IL-11R α) são inférteis devido a um defeito na resposta à decidualização na implantação do embrião. No entanto, quando os embriões de camundongos nocaute para LIF e IL-11R α são transferidos para mães selvagens, estes se desenvolvem normalmente (Robb, Li et al. 1998). Dessa maneira, fica claro que

defeitos na fertilidade de camundongos com deficiência tanto de LIF quanto do IL-11R α são consequência de um defeito puramente materno, evidenciando a importância de um endométrio receptivo para ocorrência da implantação (Paiva, Menkhorst et al. 2009).

Estudos recentes sugerem um papel essencial da IL-11 e do LIF na decidualização, a qual é determinante para o estabelecimento da gravidez (Ramathal, Bagchi et al. 2010; Shuya, Menkhorst et al. 2011). A expressão do receptor para LIF foi identificada em células estromais decidualizadas de camundongos e humanos. A presença do RNAm da IL-11 e do gp130 também foi encontrada nas células estromais durante o processo de decidualização (Dimitriadis, Robb et al. 2003; Dimitriadis, Stoikos et al. 2006). Estudos *in vitro* têm identificado um papel dessas duas citocinas na adesão do embrião ao endométrio. O LIF e a IL-11 mostraram a capacidade de aumentar a adesão de células epiteliais primárias à fibronectina e ao colágeno IV, duas proteínas presentes na superfície das células do blastocisto humano no primeiro trimestre da gravidez (Marwood, Visser et al. 2009). Além disso, o tratamento de células epiteliais endometriais primárias com IL-11 promove o aumento da adesão do blastocisto a essas células (Dimitriadis, Nie et al. 2010). Esses efeitos são abolidos depois da aplicação de um anticorpo neutralizador de IL-11 ou um antagonista do LIF, que inibe a fosforilação do STAT3 (fator transcricional da via JAK/STAT) induzida pela IL-11 e LIF, respectivamente (Marwood, Visser et al. 2009). Além disso, uma inibição direta do STAT3 também bloqueia a adesão das células endometriais à fibronectina mediada por LIF e IL-11, reforçando a hipótese de que ambas utilizam mecanismos de sinal de transdução comuns (Marwood, Visser et al. 2009).

Estudos clínicos indicam que a IL-11 e o LIF possuem funções distintas porém não redundantes no endométrio de mulheres com várias formas de infertilidade (Salamonsen, Nie et al. 2009). Em biópsias de mulheres inférteis cuidadosamente cronometradas, a IL-11, IL-11R α e o LIF se mostraram anormais ou ausentes durante a janela de implantação. Em outro estudo, a IL-11 e o fator de transcrição STAT3 fosforilado estavam desregulados na fase receptiva do endométrio de mulheres com infertilidade sem causa aparente

(Norwitz, Schust et al. 2001; Dimitriadis, Stoikos et al. 2006; Dimitriadis, Sharkey et al. 2007). Os níveis de LIF no fluido uterino também se encontram reduzidos ou inalterados em mulheres inférteis, comparadas com mulheres férteis (Mikolajczyk, Wirstlein et al. 2006). Em mulheres propensas à falha de fertilização *in vitro* ou com aborto recorrente, os níveis de IL-11 no endométrio, nos fluidos uterinos e no plasma são baixos, sugerindo um papel da IL-11 alterada na dificuldade de engravidar (Makkar, Ng et al. 2006).

Tomadas em conjunto, todas essas evidências indicam que a IL-11 e o LIF exercem papel crucial na fertilidade feminina (Dimitriadis, Stoikos et al. 2006; Paiva, Menkhorst et al. 2009; Dimitriadis, Nie et al. 2010). Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que o LIF e a IL-11 são moléculas-chave na regulação da implantação. No entanto, evidências em humanos são menos claras comparadas com seus papéis já bem estabelecidos nos roedores, indicando a necessidade do aprofundamento de pesquisas nessa área (Robb, Dimitriadis et al. 2002; Dimitriadis, Nie et al. 2010).

1.5 Ação da insulina no endométrio

Previamente, foi relatada uma dificuldade na distinção das ações da insulina *in vivo* no endométrio porque, muitas vezes, o hiperandrogenismo e a hiperinsulinemia são correlacionados positivamente em mulheres anovulatórias (Giudice 2006; Shang, Jia et al. 2012). Sabe-se que a insulina estimula a oxidação da glicose na fase secretória tardia no endométrio humano, sugerindo seu envolvimento em atividades metabólicas do tecido endometrial (Truchan, Taylor et al. 1987). Adicionalmente, receptores de insulina estão presente no endométrio, com expressão máxima na fase secretória, dando suporte à hipótese de que a insulina influencia diretamente o crescimento endometrial através de efeitos metabólicos e mitogênicos (Strowitzki, von Eye et al. 1993). Além disso, o transportador de glicose 1 (GLUT1), um transportador não regulado pela insulina, é expresso no endométrio de animais e humanos (Strowitzki, Capp et al. 2001), indicando a importância do transporte da glicose nesse tecido. Nesse mesmo nível, outro transportador de glicose, porém

insulino-dependente, o GLUT4, é também expresso e parece ser regulado pelo peso corporal e pela insulina (Mioni, Chiarelli et al. 2004). Um estudo experimental mostrou que a expressão do GLUT4 está prejudicada em pacientes com síndrome dos ovários policísticos (SOP) (Mioni, Chiarelli et al. 2004), sugerindo que a hiperinsulinemia induz uma expressão inadequada de GLUT4 e assim, um suprimento reduzido de glicose ao endométrio. As consequências dessa alteração podem ser responsáveis pelo prejuízo à receptividade endometrial, e a metformina pode ser efetiva na restauração da funcionalidade do endométrio (Mioni, Chiarelli et al. 2004).

A insulina também exerce função na implantação, por ser um produto do blastocisto, pode causar alterações no padrão de expressão das células estromais decidualizadas, e esse efeito possivelmente pode ser modulado pela metformina, fármaco antidiabético (Germeyer, Jauckus et al. 2011). O excesso de insulina interfere nos níveis de glicodelina e IGFBP-1, importantes moléculas que agem na inibição da reação imune do endométrio em resposta ao embrião, facilitado o processo de adesão na interface feto-mãe (Giudice 2006; Shang, Jia et al. 2012). O fator de crescimento da insulina tipo I ligado a proteína (IGFBP-1) também constitui um importante biomarcador da decidualização, e estudos *in vitro* verificaram que a insulina, ao inibir sua produção por células estromais endometriais (Capp, Jauckus et al. 2011; Shang, Jia et al. 2012), acaba por aumentar os níveis de IGF-I livre na circulação (Capp, Jauckus et al. 2011). Essa inibição através de baixas doses de insulina é mediada via PI3-kinase, enquanto que altas doses de insulina também ativam a via da MAPK. Essas observações sugerem que níveis fisiológicos de insulina tem papel homeostático no metabolismo energético do endométrio e na hiperinsulinemia, a insulina pode ativar a mitose celular através da via da MAPK e assim predispor o endométrio à hiperplasia e/ou câncer (Giudice 2006).

Estudos *in vitro* também revelam que a insulina promove a proliferação em linhagens de câncer endometrial tanto negativas como positivas para receptor de estrogênio, evidenciando a independência entre estrogênio e insulina na promoção do câncer. Além disso, a insulina estimula a expressão e

atividade da aromatase no estroma (Michalakis, Mintziori et al. 2013) Considerando que o estrogênio é um produto direto dessa enzima e que esse hormônio estimula a proliferação no endométrio, isso pode ser outro mecanismo pelo qual a insulina pode influenciar o processo de carcinogênese (Giudice 2006; Shang, Jia et al. 2012).

Todos esses fatores somados contribuem para disfunção endometrial e infertilidade. Os mecanismos potenciais sobre essas desordens são complexos e precisam de mais pesquisas para completa elucidação. Nesse contexto, a metformina tem aparecido com o novo propósito de auxiliar no tratamento dessas desordens da reprodução feminina (Palomba, Falbo et al. 2009; Zhang and Liao 2010).

1.6 Hiperinsulinemia e infertilidade feminina

A resistência à insulina refere-se a uma reduzida sensibilidade tecidual à ação da insulina. Para superar essa resistência e buscar a manutenção da homeostase da glicose, o pâncreas, de maneira compensatória, secreta quantidades cada vez maiores de insulina resultando em um estado hiperinsulinêmico, que por sua vez está associado a complexos efeitos sobre a regulação do metabolismo proteico e lipídico, e sobre a síntese e modulação da produção de androgênios (Prado 1992; Shanik, Xu et al. 2008). As causas da hiperinsulinemia são mecanismos genéticos e ambientais complexos e suas consequências podem contribuir para o desenvolvimento de inúmeras doenças, aumentando o risco para doenças cardiovasculares, diabetes mellitus tipo II (DM2), e disfunções que levam à infertilidade (Prado 1992; Diamanti-Kandarakis and Papavassiliou 2006; Shanik, Xu et al. 2008).

A associação da hiperinsulinemia com a infertilidade pode ser encontrada em alguns distúrbios ou desordens reprodutivas e metabólicas como a SOP, a obesidade, defeitos da fase lútea e o aborto recorrente (Nestler 1997; Pasquali, Patton et al. 2007; Shang, Jia et al. 2012; Boutzios, Karalaki et al. 2013; Michalakis, Mintziori et al. 2013). A obesidade está relacionada a altas

concentrações de insulina circulantes (Garcia, Sanz et al. 2013). Existe uma alta prevalência de mulheres obesas na população infértil e a ligação entre obesidade e infertilidade já foi avaliada (Pasquali, Patton et al. 2007). O principal fator implicado nessa associação parece ser o excesso de insulina e a resistência à insulina.

Esses efeitos adversos ficam bem evidentes na SOP (Nestler 1997; Traub 2011; Murri, Insenser et al. 2014). A SOP é uma desordem endocrinológica heterogênea de etiologia ainda desconhecida, que afeta de 6 a 10% de mulheres em idade reprodutiva. O critério de diagnóstico para SOP inclui no mínimo duas de três características: anovulação crônica ou oligomenorreia, hiperandrogenismo bioquímico ou clínico, e morfologia de ovários policísticos, segundo o critério de Rotterdam de 2003 (Palomba, Falbo et al. 2009; Strowitzki, Capp et al. 2010).

Embora a hiperinsulinemia não esteja incluída no critério diagnóstico da SOP, ela tem sido amplamente reconhecida, junto com a obesidade, como um dos principais fatores fisiopatológicos que afetam as mulheres com essa síndrome (Nestler 1997; Ehrmann 2005; Traub 2011; Murri, Insenser et al. 2014). A resistência à insulina com hiperinsulinemia compensatória está presente em 50 a 80% das mulheres com SOP, enquanto a obesidade é encontrada numa faixa de 30 a 70% das mulheres afetadas por essa condição (Dunaif 1999; Ehrmann 2005; Murri, Insenser et al. 2014). Um estudo ontogenético recente sugeriu o excesso de insulina como fator importante na patogênese da SOP, evidenciado pelo fato de que adolescentes e adultas jovens quase sempre manifestam essa característica (Abbott and Bacha 2013). Tal fato é suportado pela melhora no padrão do hiperandrogenismo com o uso de insulino-sensibilizantes, como a metformina (Palomba, Falbo et al. 2009), ou mudanças no estilo de vida como um rigoroso programa de perda de peso.

A obesidade é outro fator, que somado à hiperglicemia e histórico familiar, contribuem para a diferenciação do fenótipo da SOP ou para amplificação desse genótipo (Littlejohn, Weiss et al. 2007), no entanto a obesidade é um fator independente da hiperinsulinemia (Abbott and Bacha

2013; Murri, Insenser et al. 2014). A obesidade constitui também um dos fatores de risco para o aborto recorrente (Shang, Jia et al. 2012; Chakraborty, Goswami et al. 2013) e a resistência à insulina foi sugerida como fator preditor significativo para interrupção espontânea precoce da gravidez (Chakraborty, Goswami et al. 2013; Tsai, Wang et al. 2013). Mulheres com aborto recorrente frequentemente tem SOP.

A hiperinsulinemia também constitui um dos fatores possivelmente responsáveis pelos defeitos da fase lútea (Boutzios, Karalaki et al. 2013). Defeito de fase lútea se refere a uma disfunção ovulatória, definida como um defeito do corpo lúteo em produzir e secretar quantidades adequadas de progesterona durante a fase lútea do ciclo menstrual, o que inclui defeito do corpo lúteo em preservar altos níveis de progesterona na segunda metade do ciclo assim como defeito no endométrio em responder aos níveis circulantes de progesterona (Boutzios, Karalaki et al. 2013). Assim, os defeitos de fase lútea junto com a SOP compartilham a hiperinsulinemia como fator importante na patogênese dessas disfunções (Nestler 1997; Boutzios, Karalaki et al. 2013). Mulheres com SOP podem apresentar defeitos da fase lútea: as células da granulosa dessas mulheres demonstram menor habilidade de produzir e secretar progesterona, isso pode resultar de um metabolismo anormal da glicose devido a um defeito na via de sinalização intracelular da insulina. Além disso, a hiperinsulinemia pode causar um efeito negativo diretamente sobre a hipófise (Fedorcak, Dale et al. 2004; Rice, Christoforidis et al. 2005), afetando a fertilidade feminina. Enfim, são variadas disfunções que se inter-relacionam, e provam a ligação da hiperinsulinemia com a infertilidade.

Estudos clínicos e epidemiológicos recentes também apontam uma relevante associação entre a resistência à insulina e o câncer de endométrio, o qual representa 8% de todos cânceres femininos, sugerindo um papel importante da insulina no desenvolvimento e crescimento desse câncer uma vez que receptores de insulina estão presentes no endométrio e câncer de endométrio (Capp E 1996; Bjorge, Stocks et al. 2010; Papaioannou and Tzafettas 2010; Mu, Zhu et al. 2012; Li and Shao 2014).

Os mecanismos para esta associação não estão bem esclarecidos, mas acredita-se que ocorra de duas formas. De forma indireta, onde os altos níveis de insulina e o aumento da biodisponibilidade do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) inibem a síntese hepática da globulina carreadora de esteroides sexuais (SHBG) (Irwin, de las Fuentes et al. 1993; Papaioannou and Tzafettas 2010). Ambos hormônios atuam estimulando a síntese ovariana de esteroides sexuais, os quais promovem a proliferação celular no epitélio endometrial e inibem a apoptose. Considerando a forma direta, a hiperinsulinemia pode promover a carcinogênese aumentando proliferação e a sobrevivência celular através das vias da PI3K/Akt e MAPK (Cust, Kaaks et al. 2007; Bjorge, Stocks et al. 2010; Papaioannou and Tzafettas 2010). Essa associação fica mais evidente em mulheres obesas, com DM2 ou SOP. A prevalência da hiperplasia endometrial está aumentada entre mulheres com SOP, variando numa taxa de 12% a 49%. A resistência à insulina é sugerida como fator etiológico comum na SOP e obesidade e importante contribuinte para o desenvolvimento do câncer endometrial (Li and Shao 2014). Muitos mecanismos têm sido propostos associando a SOP com o risco de hiperplasia endometrial e câncer de endométrio, incluindo o efeito estimulatório do estrogênio, defeito na ação da progesterona, hiperandrogenismo, excesso de hormônio luteinizante (LH) ou IGF-1, e a hiperinsulinemia (Papaioannou and Tzafettas 2010; Mu, Zhu et al. 2012).

Ao se considerar conjuntamente todos esses fatores interferentes na fertilidade da mulher, é possível dimensionar o grande impacto do excesso da insulina nesses problemas, que varia de disfunções reprodutivas ao desenvolvimento de câncer (Mu, Zhu et al. 2012; Michalakis, Mintziori et al. 2013). Embora, para infertilidade, existam tratamentos disponíveis, como medicações indutoras da ovulação, perfuração ovariana laparoscópica, entre outras; as taxas de gravidez muitas vezes permanecem paradoxalmente baixas e com alta taxa de abortos espontâneos (Strowitzki, Germeyer et al. 2006). Essas evidências sugerem funções endometriais anormais, reforçando a importância de um desenvolvimento endometrial adequado para a fertilidade (Strowitzki, Germeyer et al. 2006; Chakraborty, Goswami et al. 2013). Dentro

desse contexto, estudos têm sugerido que a metformina, um agente insulino-sensibilizante, apresenta potencial efeito terapêutico no tratamento da infertilidade assim como no câncer endometrial, embora os resultados ainda não estejam bem esclarecidos (Palomba, Falbo et al. 2009). Com isso, se torna necessário o aprofundamento do estudo sobre a metformina e a procura por novas terapias para o tratamento da infertilidade, focando esforços na redução da ação da insulina nos tecidos reprodutivos, incluindo o endométrio.

1.7 A Metformina na pesquisa da reprodução

A metformina é um insulino-sensibilizante utilizado para o tratamento de diabetes mellitus tipo II (DM2) há mais de 40 anos. Entretanto, nos últimos anos tem se estudado o seu papel sobre aspectos reprodutivos. A metformina foi introduzida na prática clínica para tratar pacientes obesas com SOP em 1994 (Velazquez, Mendoza et al. 1994). Considerando que muitas mulheres apresentam resistência ao tratamento de primeira escolha para induzir a ovulação – o citrato de clomifeno - e outras não obtêm êxito com uma mudança no estilo de vida, foi proposto o uso de medicamentos insulino-sensibilizantes, sendo a metformina o mais utilizado (Palomba, Falbo et al. 2009).

Estudos demonstram que a metformina é utilizada com sucesso para o tratamento da infertilidade de pacientes com SOP uma vez que diminui os níveis dos androgênios e restaura os ciclos menstruais dessas mulheres, sem o aumento de taxas de gestação múltipla (Costello, Chapman et al. 2006; Zhang and Liao 2010). Evidências consideráveis têm mostrado o benefício do tratamento em pacientes com SOP, incluindo a redução da hiperinsulinemia, resistência insulínica, hiperandrogenismo, melhora da função ovulatória, e efeitos benéficos no endométrio (Nestler 1997; Chou, von Eye Corleta et al. 2003; Costello, Chapman et al. 2006; Katsiki and Hatzitolios 2010).

Essas ações positivas sobre aspectos reprodutivos podem ser consequência de ações diretas ou indiretas da metformina nos níveis de androgênios (Nestler and Jakubowicz 1996; Palomba, Falbo et al. 2009).

Assim, sugeriu-se um efeito direto da metformina sobre a via da insulina no endométrio, uma vez que essa via já mostrou participação prévia nesse tecido com a identificação de receptores para o hormônio e transportadores de glicose. Indiretamente, a metformina pode reduzir os níveis de androgênios (Nestler and Jakubowicz 1996). Nesse contexto, Jakubowicz e Sepalla mostraram um aumento nas concentrações séricas de glicodelina e IGF-1, dois biomarcadores importantes da receptividade endometrial, com o uso de metformina (Jakubowicz, Seppala et al. 2001). A consequência dessa alteração pode ser responsável pelo prejuízo à receptividade endometrial e a metformina pode ser efetiva na restauração da funcionalidade do endométrio (Mioni, Chiarelli et al. 2004; Palomba, Russo et al. 2006; Capp, Jauckus et al. 2011). A ação da metformina também foi avaliada em relação à espessura endometrial, a qual tem sido considerada um marcador da receptividade uterina e na predição de gravidez (Gonen and Casper 1990; Habara, Nakatsuka et al. 2002; Palomba, Russo et al. 2006). Há divergências na literatura, entretanto, a maior parte relata que a metformina não parece exercer efeito sobre esse parâmetro (Palomba, Russo et al. 2006).

Outro nível de ação da metformina é sobre a proliferação celular. A metformina tem apresentado importante efeito antiproliferativo em vários tipos celulares, como células musculares lisas vasculares (Li, Zhang et al. 2005), diversos tipos de câncer (Dowling, Niraula et al. 2012; Umene, Banno et al. 2013), incluindo as células endometriais (Takemura, Osuga et al. 2007; Hanna, Zhou et al. 2012). A hipótese é que essa ação antiproliferativa ocorra através da inibição da via PI3K/Akt, e pela ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) com consequente inibição da via do alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) (Gotlieb, Saumet et al. 2008; Cantrell, Zhou et al. 2010; Umene, Banno et al. 2013). A metformina ativa a AMPK simulando as alterações metabólicas intracelulares da deprivação nutricional (Shaw, Lamia et al. 2005). Apesar de achados de que a metformina induz mudanças na atividade tirosina/quinase do receptor de insulina (Stith, Goalstone et al. 1996; Holland, Morrison et al. 2004), trabalhos recentes demonstram que o principal mecanismo pelo qual a metformina reduz os níveis de glicose e insulina no

DM2, é consequência da ativação da via da AMPK nos hepatócitos (Shaw, Lamia et al. 2005). Também foi relatado que a metformina tem como alvo o complexo da cadeia respiratória I da mitocôndria, ou ativa AMPK via mudanças nas espécies reativas de nitrogênio mitocondriais (Zou, Kirkpatrick et al. 2004). Em roedores foi sugerido que as biguanidas, da qual a metformina é um representante, podem exercer efeito protetor contra o desenvolvimento de tumores malignos em ratos expostos a agentes carcinogênicos (Alexandrov, Anisimov et al. 1980).

Vários fatores relacionados à SOP, como obesidade, hiperinsulinemia crônica e DM2, podem influenciar a proliferação endometrial por meio de ações diretas ou indiretas (Alexandrov, Anisimov et al. 1980; Bjorge, Stocks et al. 2010; Papaioannou and Tzafettas 2010). Dessa forma, o uso de metformina foi proposto, recentemente, como um agente preventivo de carcinoma endometrial, sugerindo que a metformina, juntamente com mudança no estilo de vida, é capaz de reduzir esses fatores, inibindo a proliferação celular endometrial (Campagnoli, Abba et al. 2013).

Em extensa revisão, Palomba e colaboradores relatam que a administração de metformina age sobre o útero promovendo a melhora de muitos parâmetros reguladores da receptividade endometrial, seja reduzindo o hiperandrogenismo ou a resistência à insulina (Palomba, Russo et al. 2006; Palomba, Falbo et al. 2009), sendo difícil identificar apenas uma única ação específica da metformina. Além disso, mais estudos são necessários para explicar o exato mecanismo pelo qual a metformina exerce efeito positivo sobre o endométrio (Palomba, Russo et al. 2006; Palomba, Falbo et al. 2009), reforçando a necessidade de maiores pesquisas relacionando sua forma de ação frente à infertilidade.

2 JUTIFICATIVA

A hiperinsulinemia está associada à infertilidade, interferindo na implantação endometrial. Nesse contexto, a metformina tem sido usada com sucesso no tratamento da infertilidade, porém os efeitos que ela exerce sobre o endométrio e sobre fatores relacionados ao processo de implantação, como citocinas, ainda são pouco compreendidos.

3 HIPÓTESES

- O excesso de insulina inibe a expressão gênica e proteica de citocinas como a IL-11 e LIF no endométrio;
- A metformina aumenta a expressão gênica e proteica da IL-11 e LIF no endométrio;
- A metformina inibe a proliferação celular em um ambiente hiperinsulinêmico no endométrio.

4 OBJETIVOS

- Estabelecer culturas celulares de células estromais endometriais humanas viáveis para avaliação das intervenções.
- Avaliar o efeito da metformina sobre a proliferação celular em cultura de células estromais endometriais em um ambiente hiperinsulinêmico.
- Avaliar a ação da metformina sobre a expressão gênica e proteica das citocinas IL-11 e LIF em cultura de células estromais endometriais em um ambiente hiperinsulinêmico.

5 METODOLOGIA

5.1 Delineamento

Trata-se de um estudo experimental *in vitro*.

5.2 Pacientes

As células endometriais foram obtidas de pacientes submetidas à histerectomia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), cuja indicação foi independente deste estudo. As pacientes foram informadas que as células endometriais normalmente são descartadas e permitiram, mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, a utilização deste material na pesquisa. Foram excluídas do estudo: pacientes na pós-menopausa, ou aquelas que utilizaram hormônios esteroides nos três meses anteriores à cirurgia.

5.3 Cálculo do tamanho da amostra

Para detectar uma diferença de um desvio padrão (tamanho de efeito de moderado a grande) na expressão gênica e proteica da IL-11 e do LIF entre os grupos, considerando um $\alpha=0,05$, um poder de 90% e uma correlação entre as medidas de 0,7, foram necessárias 7 pacientes, das quais se obtiveram as células endometriais para cultura. Para o cálculo da amostra foi utilizado o programa PEPI 4.0.

5.4 Aspectos éticos

As pacientes que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo I). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, sob o número 12-0261.

5.5 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas no centro cirúrgico do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), imediatamente após a retirada do útero, sendo transferidas para um frasco estéril, identificado, contendo solução de Hank (Gibco BRL Grand Island, NY, USA) e solução de 2% de penicilina/estreptomicina 0,5 mg/mL (Gibco BRL Grand Island, NY, USA). O endométrio foi coletado com o auxílio de um bisturi, fazendo-se uma raspagem no lado interno do útero e imergindo o conteúdo no frasco com o meio apropriado para manutenção das células viáveis. A amostra foi então acondicionada a uma temperatura média de 4°C, nunca ultrapassando um período maior que 24 horas até o início da cultura celular. Uma parte da amostra foi encaminhada ao exame anátomo-patológico.

5.6 Processo de cultura celular

No laboratório, em capela de fluxo laminar, a amostra foi limpa através da retirada de pequenos coágulos e quatro lavagens sucessivas em solução de Hank (Gibco BRL Grand Island, NY, USA). Os fragmentos de endométrio foram reduzidos a fragmentos ainda menores com o auxílio de uma tesoura estéril e então transferidos para um frasco Erlenmeyer previamente pesado para a determinação do peso do tecido. Após a pesagem, foi calculado o valor necessário de colagenase tipo IA (Sigma Chem Co. St Louis, MO, USA) para dissociar o tecido, sendo utilizado 7,5 mg/g de tecido. Ainda, foi acrescentado ao meio de dissociação solução de Hank, mantendo-se uma relação de 10 mL de meio para cada 4 g de tecido. Foi adicionada a colagenase IA à solução de Hank e o endométrio foi submetido à dissociação enzimática durante 2 horas, a 37°C, sob agitação constante. Dissociado o tecido, a ação da colagenase foi inibida pela adição de igual volume de solução de Hank adicionado previamente. O isolamento das células endometriais foi baseado no trabalho de Satyaswaroop e colaboradores (1979). O material dissociado foi centrifugado a 800xg durante 10 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium High*

glucose/LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil). Uma nova centrifugação foi feita e a suspensão celular foi vertida em filtro de nylon 100 micra (Polylabo, Strasbourg, France) para reter porções de tecido não digeridas. Para promover a separação das células epiteliais das estromais o filtrado passou por um separador celular de 40 μm (BD Falcon Franklin Lakes, N.J, USA) onde as células estromais passaram e as epiteliais ficaram retidas. As células estromais foram suspensas com meio DMEM suplementado com 1% de antibiótico (penicilina/streptomicina 0,5 mg/mL), 10 % soro bovino fetal (SBF – Gibco BRL Grand Island, N.Y, USA) e estradiol 10^{-5} M, para serem semeadas em garrafa de cultura de 75 cm^2 ou 150 cm^2 (Greiner Bio-One GmbH Maybachstrasse Frickenhausen, Germany), dependendo da quantidade de tecido dissociado, por onde permaneceram durante aproximadamente 5 dias até atingirem uma confluência em torno de 80%, sendo acompanhada diariamente através de microscópio invertido (Axyover 25, Carl Zeis Jena, Germany). O meio foi trocado a cada 2 dias. As células estromais foram mantidas em garrafas e incubadas em estufa (NuAire Inc., Minesota, USA) a 37°C com atmosfera úmida e adição automática de 5% de CO_2 . A adesão das células foi avaliada nas primeiras 48 horas, e a diferenciação nas 48 horas subsequentes. Após atingirem a confluência, as células foram liberadas das garrafas com uso de tripsina. As células em suspensão, antes da semeadura, foram submetidas a um teste de viabilidade por coloração com azul de Tripán e contagem em hemocítômetro. Em seguida, para as técnicas de extração de RNA e coleta de sobrenadante, para cada grupo utilizou-se uma placa estéril do tipo multiwell de 6 poços (TPP – Techno Plastic Products AG, Suíça) numa concentração de 1×10^4 células/mL por poço, contabilizando um total de 4 placas. Para a técnica do MTT (*dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide*), as células foram semeadas em placas de 96 poços, numa concentração de 10^2 células/mL, utilizando 6 poços para cada grupo.

Cada processo de cultura celular contabilizou uma média de 12 dias. A semeadura seguiu conforme os grupos experimentais definidos de acordo com a chave a seguir (Figura 3). A cada dois dias foram feitos os tratamentos correspondentes a cada grupo, renovando-se o meio. Prévio à divisão dos

grupos, antes de terem atingido uma confluência adequada, as células foram tratadas somente com estrogênio, uma vez que as células estromais são fisiologicamente dependentes desse hormônio para sobreviverem (Apparao, Lovely et al. 2002).



Figura 3. Chave dos grupos experimentais: EP: cultivo com estradiol e progesterona. EPM: Tratamento com estradiol, progesterona e metformina. EPI: Tratamento com estradiol, progesterona e insulina. EPIM: Tratamento com estradiol, progesterona, insulina e metformina.

Attingido cerca de 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e divididas nos 4 grupos acima listados, com a combinação hormonal correspondente a cada grupo, por onde permaneceram sem o tratamento com metformina até o dia 10, para permitir a adesão, diferenciação e crescimento celular. No dia 10, os grupos EPM e EPIM foram tratados com metformina para avaliação do seu efeito a curto-prazo (48 horas). No dia 12 foi coletado 3 mL/grupo de sobrenadante, feito a extração de RNA com trizol, e realizado o experimento de proliferação (MTT). Todo o processo, desde a coleta até a finalização da cultura, está representado na linha de tempo do experimento (Figura 4).

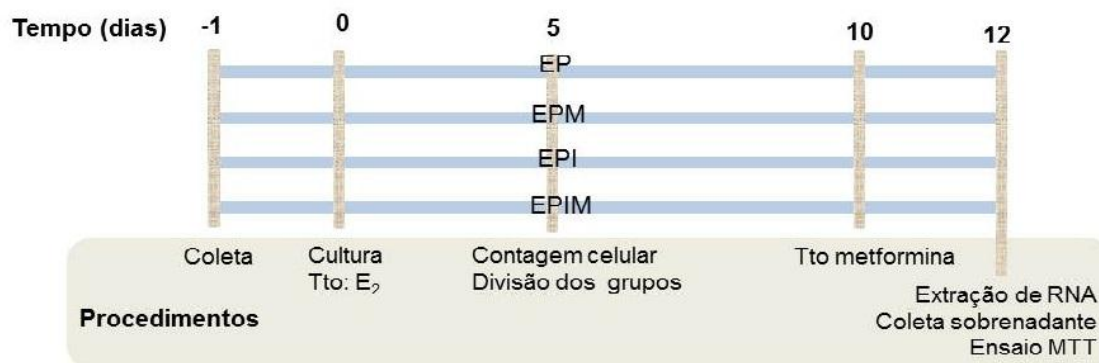


Figura 4. Linha do tempo da cultura celular endometrial. E₂= estrogênio, Tto= tratamento

As concentrações de insulina e metformina foram padronizadas conforme estudo anterior do nosso grupo de pesquisa (Machado 2013). A progesterona, hormônio que define as características histológicas de um endométrio secretor (Noyes, Hertig et al. 1975) é fundamental para receptividade uterina (Lessey 2011), uma vez que é um dos principais fatores que induz à decidualização (Ramathal, Bagchi et al. 2010), e por isso também integrou todos os grupos. A concentração suprafisiológica do hormônio insulina conferiu característica hiperinsulinêmica ao modelo, e a dose de 1mM ($10^{-3}M$) de metformina foi escolhida por essa concentração ter se mostrado capaz de alterar a expressão de outras citocinas importantes na implantação (Apparao, Lovely et al. 2002; Zhang and Liao 2010; Germeyer, Jauckus et al. 2011) (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração dos tratamentos dos grupos experimentais.

| Grupos | E ₂ | P | Insulina | Metformina |
|--------|----------------|----------------|----------|------------|
| EP | $10^{-8}mol/L$ | $10^{-6}mol/L$ | | |
| EPM | $10^{-8}mol/L$ | $10^{-6}mol/L$ | | $10^{-3}M$ |
| EPI | $10^{-8}mol/L$ | $10^{-6}mol/L$ | 100ng/mL | |
| EPIM | $10^{-8}mol/L$ | $10^{-6}mol/L$ | 100ng/mL | $10^{-3}M$ |

E₂=estrogênio, P=progesterona.

5.7 Avaliação da viabilidade e proliferação celular

Para avaliar a viabilidade e proliferação celular foi utilizada a técnica de MTT (*dimethylthiazoldiphenyltetrazolium bromide*) (Mosmann 1983), na qual as células foram semeadas em placas multiwell de 96 poços em uma densidade de 10^2 células/mL de meio de cultura, incubadas com 100 μ L de meio respectivo a cada grupo. No dia da avaliação, foram retirados 10 μ L do meio de cultura e adicionados 10 μ L de solução de 5 mg/mL de MTT (Sigma Chem. Co. St Louis, MO, USA) diluído em PBS com pH de 7,2 e incubado por 4 horas a 37°C. O MTT mede a atividade metabólica das células, onde é acumulado por endocitose, quantificando a redução metabólica do MTT por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a redução do tetrazólio a cristais de formazano, intensamente coloridos, que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas o ensaio é frequentemente utilizado para analisar a viabilidade e proliferação celular, resultando em um aumento da atividade do sistema mitocondrial que conduz a um aumento na quantidade de formazan formado. A coloração produzida nessa reação é medida por densidade óptica, sendo esta diretamente proporcional ao número de células viáveis na placa.

Após as 4 horas de incubação, aspirou-se todo o meio, ficando o formazan retido no fundo da placa. Adicionou-se 100 μ L de solvente orgânico DMSO (*dimethyl sulfoxide*) (Sigma, St Louis, MO, EUA) por poço e a densidade óptica foi medida em uma leitora de ELISA no comprimento de onda de 540 nm. A leitura do MTT para cada grupo foi feita em sextuplicata (média da leitura de 6 poços).

5.8 Avaliação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de Transcrição Reversa (RT-qPCR)

Os níveis de RNAm da IL-11 e LIF foram avaliados pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real a partir de transcrição

reversa. A técnica consiste de duas etapas, sendo a primeira a transcrição reversa do RNAm a DNA complementar (cDNA), o qual é submetido à reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR), que permite a quantificação do cDNA submetido à amplificação pela enzima Taq DNA Polimerase.

5.9 Extração de RNA total

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

5.10 Quantificação do RNA

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

5. 11 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi feita a partir de 0,5 µg de RNA total, utilizando-se um oligonucleotídeo (*primer*) complementar à cauda poli-A característica do RNAm, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do RNAm. Considerando que a fração do RNAm corresponde a aproximadamente 2-3% do RNA total, estima-se que 0,5 µg dá origem a 10 ng de cDNA. O RNA foi inicialmente desnaturado a 65°C por 5 minutos juntamente com o *primer* e os desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTPs). Em seguida, adicionou-se uma mistura contendo tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,4 com cloreto de potássio (KCl) 50 mM, cloreto de magnésio 25 mM 10 mM e ditioneitol (DTT) 0,1 M sendo incubado por 2 minutos a 42° C. Em seguida foi feita incubação enzima transcriptase reversa a 42°C por 50 minutos. Após nova desnaturação a 70°C por 15 minutos, a mistura foi incubada com a enzima Rnase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do cDNA totalizou um volume de 20µL que foi armazenado a -20°C até a amplificação por PCR.

5.12 PCR em Tempo Real

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência. Foi utilizado o sistema de detecção TaqMan® (Reagente TaqMan PCR Master Mix - Applied Biosystems) para análise dos genes de interesse. Na detecção por TaqMan a sequência de interesse foi marcada com uma molécula fluorescente (*reporter*) e um silenciador (*quencher*). Quando estas moléculas estão muito próximas, o *quencher* absorve a fluorescência que o *reporter* emite, portanto, o equipamento não lê fluorescência daquela sonda. No entanto, após se ligar na sua região complementar nos produtos de amplificação gerados durante os ciclos, a DNA polimerase cliva esta sonda separando o *quencher* do *reporter*, e emitindo fluorescência.

5.13 Quantificação relativa pelo método $\Delta\Delta C_T$

Para análise da expressão gênica através do RT-qPCR foi utilizado o método Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta C_T$). Calculou-se inicialmente o ΔC_T de cada amostra (média da duplicata), subtraindo-se os valores de C_T (ciclo limiar) do gene normalizador (HPRT1) dos valores C_T dos genes alvo (IL-11 e LIF). Para o cálculo do $\Delta\Delta C_T$ utilizou-se a fórmula seguinte: [ΔC_T (da amostra) - ΔC_T (normalizador)]. Uma vez determinado o $\Delta\Delta C_T$, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$, que resultou no valor da expressão gênica relativa.

Para utilizar o método comparativo do $\Delta\Delta C_T$, foi necessário determinar inicialmente a eficiência de amplificação do gene alvo e do controle interno. Para tanto, foram feitas curvas de diluição seriadas dos *pools* de cDNAs para cada um dos genes estudados. Para comparar a eficiência da de amplificação dos dois genes, subtraem-se os valores de C_T do gene normalizador dos valores de C_T do gene alvo. A diferença é plotada contra o logaritmo da diluição da diluição do cDNA. Quando a inclinação da reta for menor ou igual a 0,1, a eficiência de amplificação é comparável, podendo-se utilizar esse método.

Os dados de expressão foram de cada gene foram analisados por *fold change*, cuja função é identificar diferenças na expressão de um determinado gene entre duas condições, levando em conta um dado *cut-off* ou *threshold* (limite). Foi estabelecido um *fold change* de 1.0, possibilitando observar qualquer diferença nos valores de expressão entre o grupo controle e os demais grupos.

5.14 Protocolo da PCR em tempo real para os genes de interesse

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

As condições de reação foram: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, 50 ciclos continuando a desnaturação em 94°C por 50 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos. Uma curva-padrão com 5 pontos em duplicata com concentração conhecida de cDNA (12,5 a 800 pg) foi utilizada para quantificar as amostras. Os valores quantitativos foram obtidos a partir do número do *threshold cycle* (Ct), onde o aumento do sinal fluorescente está associado com um aumento exponencial do produto da qPCR.

5.15 Avaliação da expressão proteica por ELISA

Para o ensaio imunoenzimático quantitativo do tipo sanduíche foi utilizado o sobrenadante coletado no último dia de cultura e armazenado em -80°C. Foi utilizado 1 Kit ELISA para cada citocina (R&D Systems, Minneapolis, USA). Ambos utilizam o mesmo princípio. Foram pipetados 100 µL da curva e da amostra (duplicata) em cada poço da placa do kit, sendo incubadas por 2

horas. As amostras não foram diluídas, conforme teste prévio para avaliar a necessidade de diluição. IL-11 ou LIF presente no sobrenadante das células se ligou ao anticorpo monoclonal específico para IL-11 ou LIF immobilizado na placa. Depois de quatro lavagens sucessivas com tampão para remover as substâncias não ligantes, foram adicionado 200 μ L de anticorpo policlonal específico conjugado a uma enzima para IL-11 ou LIF em cada poço. A placa foi incubada por 2 horas para IL-11 e 2 horas e 30 minutos para LIF. Seguiu-se mais quatro lavagens para remover qualquer reagente anticorpo-enzima não ligado, sendo posteriormente adicionado uma solução substrato nos poços ficando incubado por aproximadamente 30 minutos. Após esse tempo, uma coloração se desenvolveu na proporção de quantidade de IL-11 ou LIF ligada no passo inicial. A revelação da cor foi terminada com a adição de uma solução de parada e a intensidade da cor foi mensurada através de um leitor de ELISA a 450 nm (EnVision 2104 Multilabel reader da PerkinElmer). O tempo do protocolo varia para cada citocina, sendo de aproximadamente 5,5 horas para IL-11 e 4,5 horas para LIF.

5.16 Análise estatística

Os dados de proliferação celular, expressão gênica e proteica foram todos avaliados quantitativamente através do teste de Equações de Estimação Generalizadas (*Generalized Estimating Equations – GEE*) e teste de *Bonferroni* como *post hoc*. O método *GEE* foi proposto por Zeger e Liang (Zeger and Liang 1986) com o objetivo de estimar parâmetros de regressão especialmente quando os dados estão correlacionados. O modelo *GEE* avalia a relação entre a variável resposta e as variáveis preditoras em um contexto populacional, e não somente individual, sendo o método mais recomendado para se estudar a diferença na resposta média populacional entre grupos com diferentes fatores de risco (Twisk 2004).

Em situações em que os sujeitos estudados são independentes, mas a informação sobre uma variável é coletada repetidas vezes ao longo do tempo, ou em situações em que um mesmo sujeito é submetido a diferentes grupos,

estas observações são correlacionadas. É possível também que os sujeitos dividam características em comum, e, portanto, não possam ser considerados independentes. Neste caso pode haver uma estrutura natural de correlação entre os sujeitos, no que cabe perfeitamente o exemplo de cultura celular. O primeiro caso é conhecido como medidas repetidas, e o segundo caso, como dados agrupados (*clustered data*). A correlação, nestes casos, pode ocorrer, já que as observações feitas em um mesmo indivíduo ou em um mesmo grupo tendem a ser mais semelhantes do que as observações de indivíduos diferentes ou de diferentes grupos (Guimarães 2012).

No presente estudo, foram utilizadas amostras de um tipo de tecido (endométrio) provenientes de sete pacientes diferentes. No esquema experimental das culturas, as células estromais endometriais de cada paciente foram submetidas a quatro diferentes grupos. Desta forma, fica claro que cada um dos grupos não pode ser tratado de forma independente, havendo correlação tanto entre os diferentes grupos (tecido proveniente do mesmo paciente) caracterizando uma relação de dependência entre as variáveis.

Os modelos tradicionais de regressão, como o *General Linear Model* (GLM), têm uso limitado devido à suposição de independência entre os sujeitos. Este modelo, se utilizado para dados correlacionados, pode levar a inferências estatísticas incorretas devido a distorções nas estimativas dos parâmetros e de seus erros padrões. Uma alternativa seria a utilização da Análise de Variância (ANOVA) de medidas repetidas para avaliar mudanças em um desfecho contínuo ao longo do tempo e comparar estas mudanças entre grupos. Entretanto, além deste método ser utilizado somente para desfechos com distribuição normal, não permite ajuste para exposições que se modifiquem ao longo do tempo, além de necessitar de balanceamento em relação ao número de repetições (Guimarães 2012).

O GEE estima coeficientes de regressão e erros padrões com distribuições amostrais normais e não normais. Pode ser utilizado para testar efeitos principais e interações, permitindo avaliar variáveis independentes categóricas ou contínuas. Este método deve ser utilizado quando o objetivo da

análise estatística é descrever a esperança da variável resposta em função de um conjunto de covariáveis considerando a correlação entre as observações (Guimarães 2012).

Para todos os testes, as diferenças encontradas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todas as análises foram feitas com o programa SPSS 18.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*).

5.17 Locais de realização do projeto

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Departamento de Fisiologia, UFRGS e no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia Molecular, Centro de Pesquisa no HCPA, que dispõem da infraestrutura necessária para a execução dos procedimentos utilizados neste projeto.

6 RESULTADOS

O estudo teve seus resultados divididos em três capítulos:

- I. Cultura celular de células estromais endometriais humanas

- II. Análise da proliferação celular em cultura de células estromais endometriais em ambiente hiperinsulinêmico sob o efeito da metformina

- III. Expressão gênica e proteica da IL-11 e do LIF em cultura de células estromais endometriais em ambiente hiperinsulinêmico sob o efeito da metformina

6.1 Capítulo I: Cultura celular de células estromais endometriais

A partir da coleta endometrial de 14 pacientes hysterectomizadas, foram realizadas um total de 14 culturas, sendo que 7 foram concluídas com sucesso e sem interveniências, ou seja, mostraram-se aptas para avaliação das intervenções, passando por todas as etapas descritas na figura 4 do item 5.6 da Metodologia (página 39). Dessas, todas apresentaram morfologia característica. Dos 50% restantes, 3 culturas (21,42%) não tiveram continuidade pois as células não se diferenciaram, apesar de terem aderido; 2 culturas apresentaram contaminação por bactérias e 2 foram descartadas por apresentarem número insuficiente de células (Figura 5). Desse total que não obteve sucesso, as células foram descartadas cerca de 3 a 5 dias após início do processo de cultura celular, antes da divisão dos grupos.

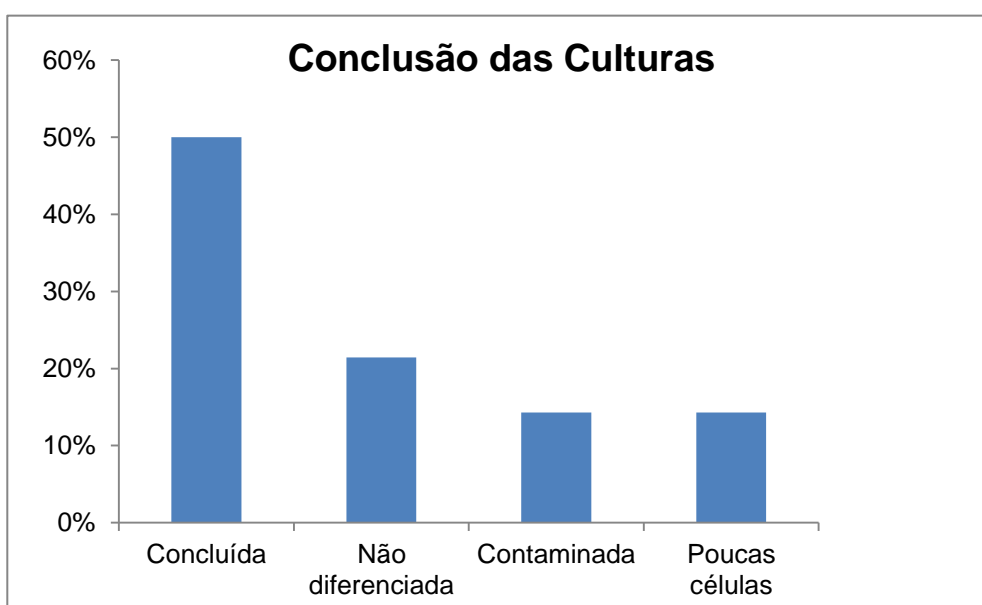


Figura 5. Percentual de culturas aptas e não-aptas para avaliação das intervenções. 50% de culturas concluídas com sucesso

No início do cultivo, quando as células ainda não se aderiram à placa, elas apresentam um formato redondo ou irregular, com limites citoplasmáticos mal definidos, variando em tamanho (Figura 6-A). Após a aderência, as células estromais se caracterizam por seu aspecto fusiforme ou em formato estrelado (Figura 6-B).

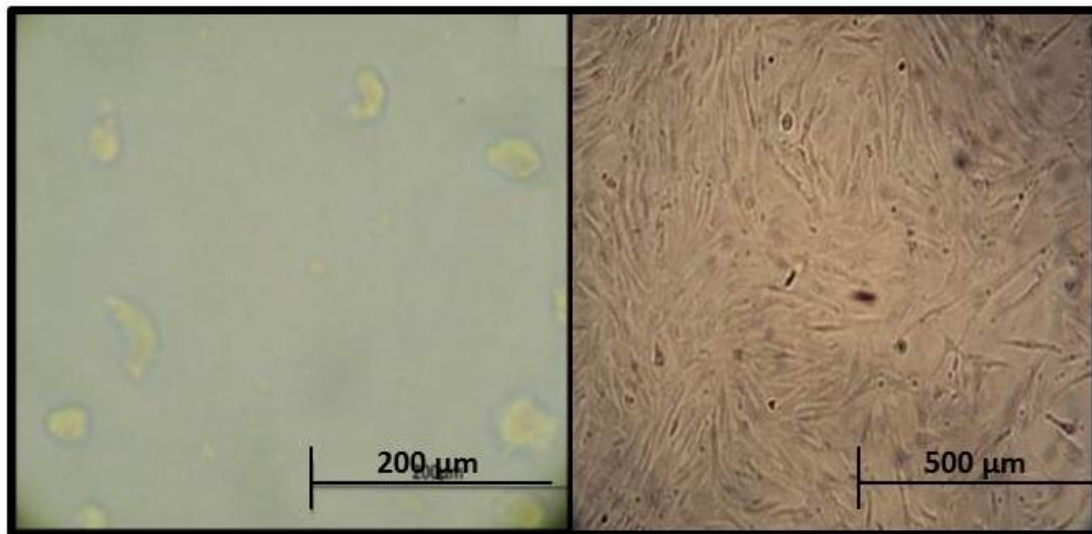


Figura 6. Células estromais endometriais em cultura. Imagens obtidas por microscópio invertido de contraste de fase, demonstrando sua morfologia característica em monocamada: A) Primeiro dia de cultivo após semeadura, células não aderidas; B) Células diferenciadas em monocamada após 12 dias de cultivo.

As células estromais crescem em monocamadas, formando ilhas de alta densidade celular a partir de um aglomerado ou mesmo de uma única célula, e após alguns dias de cultivo apresentam confluência superior a 80%, como pode ser visto na Figura 6-B.

6.1.1 Discussão do Capítulo I

As condições ideais de cultivo primário de células estromais endometriais, onde estas células são capazes de aderir, diferenciar e proliferar-se já estão bem descritas na literatura (Arnold, Kaufman et al. 2001; Germeyer, Jauckus et al. 2011). Apesar disso, houve alguns testes adicionais para o estabelecimento e padronização dessa cultura celular em nosso Laboratório (Machado 2013), com o intuito de analisar variáveis como tempo de tratamento, meio de cultivo e concentrações dos hormônios e da metformina.

Pela variabilidade inerente entre os indivíduos, o cultivo celular nem sempre atinge a expectativa esperada, como pode ser visualizado pelo alto índice de insucesso das células submetidas ao cultivo (50% das culturas). Ainda, por se tratar de uma amostra restrita em tamanho, existe o obstáculo do número total de células que pode ser obtido do tecido coletado, o que restringe os grupos experimentais do estudo. Entretanto, estudos envolvendo tecido endometrial podem contribuir para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos em desordens reprodutivas e auxiliar no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. Para isso, é importante o conhecimento da fisiologia endometrial e uma maneira eficiente de obter informações a esse respeito é por meio de cultivo de células endometriais. Estudos *in vitro* são necessários para estudar aspectos fisiológicos da biologia endometrial, além de permitir a avaliação de efeitos de medicações (Schutte and Taylor 2012). Culturas em monocamada de células humanas são extremamente informativas, embora não possam ser usadas para estudar as complexas interações célula-célula ou o remodelamento tecidual (Schutte and Taylor 2012). No entanto, para o objetivo desse estudo, a cultura em monocamada das células estromais endometriais foi adequada, proporcionando um método confiável para avaliar a ação da metformina sobre a expressão da IL-11 e LIF.

Outros modelos têm sido usados, porém com diferentes abordagens. Para pesquisas que envolvem a interação endométrio com o embrião (Arnold, Kaufman et al. 2001) ou a invasão do câncer endometrial (Arnold, Lessey et al. 2002), são cada vez mais comuns o uso de culturas tridimensionais, que incluem as células epiteliais e matriz extracelular, além das células estromais. Ainda, para estudos que procuram estudar comunicações celulares, existem as coculturas (Schutte and Taylor 2012). A cultura de células endometriais coletadas a partir de histerectomia, fluido peritoneal, biópsia endometrial ou curetagem do endométrio, tem sido usada depois de separar células estromais das glândulas epiteliais (Kamelle, Sienko et al. 2002). Mais recentemente, células coletadas a partir de secreções menstruais foram transpostas para cultura com sucesso (Lu, Wang et al. 2009). Já a avaliação clínica do endométrio pode ser realizada através de ultrassom, biópsia endometrial,

análise de secreções uterinas. Essas técnicas têm sido intensivamente estudadas e opções terapêuticas para melhorar a função endometrial têm sido sugeridas e testadas (Strowitzki, Germeyer et al. 2006).

Essencial para o perfeito funcionamento do endométrio e estabelecimento da gravidez é uma adequada decidualização (Dimitriadis, Nie et al. 2010). Uma decidualização inadequada pode contribuir para infertilidade (Ramathal, Bagchi et al. 2010). Um estudo revelou que células estromais do endométrio isoladas de mulheres inférteis não decidualizavam efetivamente *in vitro* como aquelas isoladas de mulheres com fertilidade normal (Karpovich, Klemmt et al. 2005). O uso de células estromais não decidualizadas foi, previamente, relatado como modelo de um endométrio não receptivo, uma vez que a decidualização é primordial para a implantação (Gellersen, Reimann et al. 2010). Esse processo, que acontece na segunda fase do ciclo menstrual, determina a receptividade endometrial e é caracterizado pela diferenciação das glândulas endometriais em um estado altamente secretório e uma produção alterada da adesão da superfície celular e de moléculas da matriz extracelular do epitélio luminal (Oreshkova, Dimitrov et al. 2012). No compartimento estromal, os fibroblastos nas regiões periarteriolares sofrem uma diferenciação em células deciduais distintas morfológica e funcionalmente (Ramathal, Bagchi et al. 2010; Oreshkova, Dimitrov et al. 2012). Estudo prévio também avaliou o efeito da insulina nesse processo, concluindo que esse hormônio reduz a decidualização (Lathi, Hess et al. 2005). No mesmo modelo de cultura celular, Germeyer e colaboradores (2011) verificaram que a metformina também interfere no processo decidual, reduzindo-o (Germeyer, Jauckus et al. 2011), fato que deve ser levado em consideração pelos clínicos ao indicarem essa medicação no tratamento da SOP.

A decidualização *in vitro* das células estromais endometriais é possível com a incubação de progesterona ou AMPc (Ramathal, Bagchi et al. 2010). Contudo, a incubação sequencial com estrogênio e progesterona é um modelo mais fisiológico. No caso do estudo presente, a progesterona foi escolhida para indução desse evento. Os principais produtos de secreção das células decidualizadas são a prolactina e o IGFBP-1 (Ramathal, Bagchi et al. 2010).

Enfim, embora com algumas limitações, o método de cultura celular descrito nesse trabalho permite avaliar os efeitos de diferentes tratamentos, fornecendo uma valiosa ferramenta para o estudo da expressão gênica e secreção de proteínas importantes no período de decidualização, essencial para ocorrência da implantação.

6.2 Capítulo II: Análise da proliferação celular em cultura de células estromais endometriais em ambiente hiperinsulinêmico sob efeito da metformina

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio de MTT, que também verifica a viabilidade das células (Figura 7). O ensaio foi realizado no último dia da cultura, após tratamento com metformina por 48 horas e cultivo com insulina desde a semeadura. As células mantiveram-se viáveis durante todo o período de cultivo, apresentando aumento significativo na proliferação celular no grupo hiperinsulinêmico (EPI) em relação ao grupo controle (EP) ($P=0,045$). O tratamento com metformina causou uma redução importante na proliferação celular, evidenciando sua ação antiproliferativa, como pode ser visualizado nos grupos EPM e EPIM, comparados aos grupos EP e EPI, respectivamente ($P=0,015$ e $P=0,022$). O grupo controle mostrou-se diferente de todos os outros. Os grupos EPM e EPIM mostraram-se iguais estatisticamente, indicando que o tratamento com metformina em ambiente hiperinsulinêmico num período de 48 horas foi capaz de reduzir a proliferação celular no mesmo nível do controle.

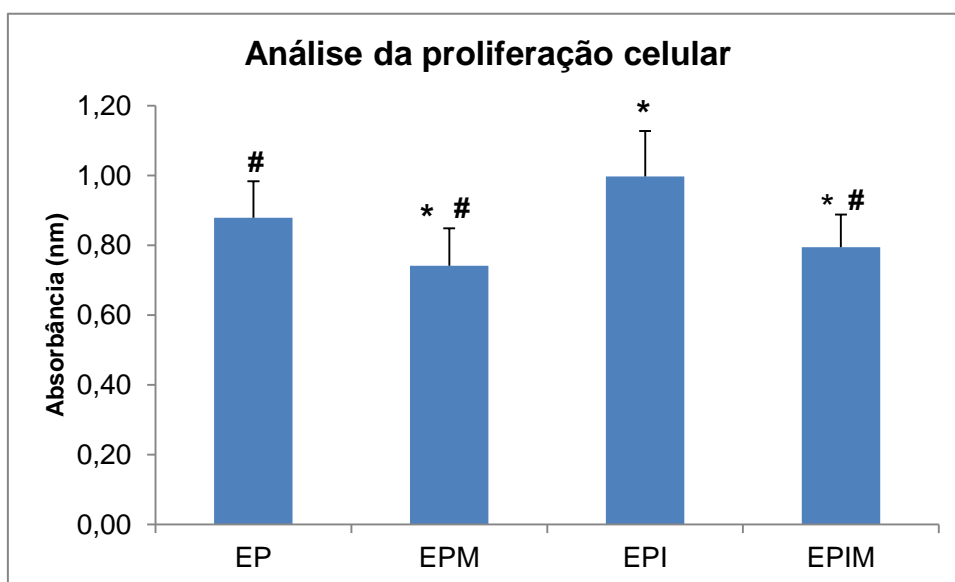


Figura 7. Proliferação de células estromais endometriais em meio de cultura contendo estrógeno e progesterona (EP) adicionado de insulina (I), tratamento com metformina (M) por 48 horas. Valores apresentados como média \pm erro padrão. * diferente de EP # diferente de EPI $P<0,05$ N=5

6.2.1 Discussão do Capítulo II

Para avaliar a proliferação celular e viabilidade celular em estudos *in vitro* existem inúmeras técnicas, desde a contagem direta de células a métodos mais aprimorados que medem diretamente o conteúdo de DNA ou a síntese de DNA (Clynes 1993; Chehrehasa, Meedeniya et al. 2009). O método escolhido nesse trabalho foi o do MTT, que constitui uma técnica indireta baseada no metabolismo celular através da atividade mitocondrial das células, de maneira que o produto da reação de redução (azul de Formazan) é proporcional à respiração celular e, indiretamente, ao número de células viáveis em cultura. Isso permite a inferência quantitativa de células (Mosmann 1983).

No presente estudo, observou-se um aumento na proliferação celular no grupo tratado com concentrações suprafisiológicas de insulina, corroborando com o fato de que a insulina age promovendo a mitose no endométrio (Strowitzki, von Eye et al. 1993). Quando as células que estavam em ambiente hiperinsulinêmico e foram tratadas com metformina, mostraram uma redução na sua proliferação. Esse resultado está de acordo com a literatura prévia, que tem mostrado o importante efeito antiproliferativo da metformina. Takemura e colaboradores encontraram o mesmo efeito em células estromais com endometriose, utilizando a mesma dose de metformina em igual tempo de tratamento (Takemura, Osuga et al. 2007).

Condições associadas com altos níveis de insulina, como obesidade e SOP estão ligadas à incidência aumentada de câncer endometrial, pois agem influenciando a proliferação endometrial por meio de ações diretas ou indiretas (Bjorge, Stocks et al. 2010; Li and Shao 2014). A insulina já mostrou um efeito carcinogênico em camundongos, ao ser administrada por período prolongado a doses farmacológicas, estando bem estabelecido que a hiperinsulinemia pode ser um dos fatores patogênicos responsável pela iniciação e progressão do câncer (Mu, Zhu et al. 2012).

A metformina, biguanida oral para tratar o DM2, tem sido cada vez mais usada para o tratamento de outras condições associadas com resistência à insulina, especialmente a SOP (Nestler, Jakubowicz et al. 1998; Palomba,

Falbo et al. 2009). Foi demonstrado que a metformina inibe a proliferação de células em cultura de maneira dose-dependente (Gotlieb, Saumet et al. 2008), sugerindo que uma ação anticâncer dessa droga possa ser mediada, no mínimo em parte, através de um efeito direto nas células cancerosas. Mecanicamente, a metformina inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, reduzindo a síntese de ATP e ativando a via da AMPK através de um aumento na taxa AMP/ATP e conseqüentemente, inibindo a via da mTOR (Hanna, Zhou et al. 2012). Contudo, mecanismos independentes da via da AMPK têm sido propostos, como a ação inibitória sobre a via da Akt (Wurth, Pattarozzi et al. 2013). O AMPK é uma proteína quinase serina/treonina reguladora do metabolismo celular que está ativa em resposta a deprivação nutricional ou estresses patológicos (Hay 2005). Uma vez ativado, o AMPK fosforilado suprime o mTOR, que através de seus efetores moleculares 4E-BP1 e p70S6, finalmente afetam a transcrição e tradução celular (Hay 2005). Inúmeras abordagens experimentais tem demonstrado o potencial efeito terapêutico da inibição da mTOR, induzindo drásticos efeitos antiproliferativos e antiangiogênicos em modelos pré-clínicos (Luo, Zang et al. 2010). Alterações na via da mTOR tem sido fortemente implicada na carcinogênese endometrial. A PTEN é um regulador negativo dessa via e aparece ausente em mais de 83% de cânceres de endométrio tipo I (Hanna, Zhou et al. 2012). Assim, a via da mTOR constitui um alvo promissor para o tratamento desse câncer, e a metformina pode ser de grande valia na prevenção e tratamento do câncer endometrial. Especialmente devido ao fato de que a resistência à insulina e a obesidade impactam fortemente essa doença (Cantrell, Zhou et al. 2010; Hanna, Zhou et al. 2012).

Recentemente, Campagnoli e colaboradores propuseram o uso de metformina como um agente preventivo de carcinoma endometrial, pois a metformina juntamente com mudança no estilo de vida diminui esses fatores, inibindo a proliferação celular endometrial (Campagnoli, Abba et al. 2013). O efeito antiproliferativo da metformina tem também sido demonstrado em outros tipos celulares, como em células musculares lisas vasculares (Li, Mamputu et al. 2005), e em diversos tipos de câncer, como em glioblastomas e linhagens

de câncer celular de mama, próstata e ovário (Cantrell, Zhou et al. 2010). De todos esses cânceres, o endometrial é o que mais sofre impacto da obesidade e da resistência à insulina (Cantrell, Zhou et al. 2010).

A potencial ligação entre a via de sinalização da insulina/IGF e o câncer tem atraído atenção substancial durante os últimos anos. Como resultado, há um interesse crescente em alvos dessa via para o tratamento do câncer (Gotlieb, Saumet et al. 2008). A hiperinsulinemia leva a um aumento do IGF-1, que por sua vez estimula a proliferação endometrial (Mu, Zhu et al. 2012). A insulina e o IGF-1 são reguladores chave do metabolismo energético e crescimento e ambos aumentam os níveis de estrogênio livre e levam a um decréscimo nos níveis séricos de SHBG, conseqüentemente contribuindo para que mais estrogênio livre influencie o crescimento tumoral (Irwin, de las Fuentes et al. 1993; Li and Shao 2014).

Em síntese, além do efeito da metformina sobre a redução dos níveis de insulina e redução de crescimento de diferentes tipos de linhagens de câncer, nesse modelo celular utilizando células estromais submetidas a ambiente hiperinsulinêmico, a metformina também apresentou importante efeito antiproliferativo.

6.3 Capítulo III: Expressão gênica e proteica da IL-11 e do LIF em cultura de células estromais endometriais submetidas a ambiente hiperinsulinêmico sob o efeito da metformina

Os resultados da expressão do RNAm dos genes das citocinas IL-11 e LIF foram obtidos por reação de PCR em tempo real a partir de transcrição reversa (Figuras 8 e 9). Não houve diferenças na expressão desses genes entre os grupos experimentais.

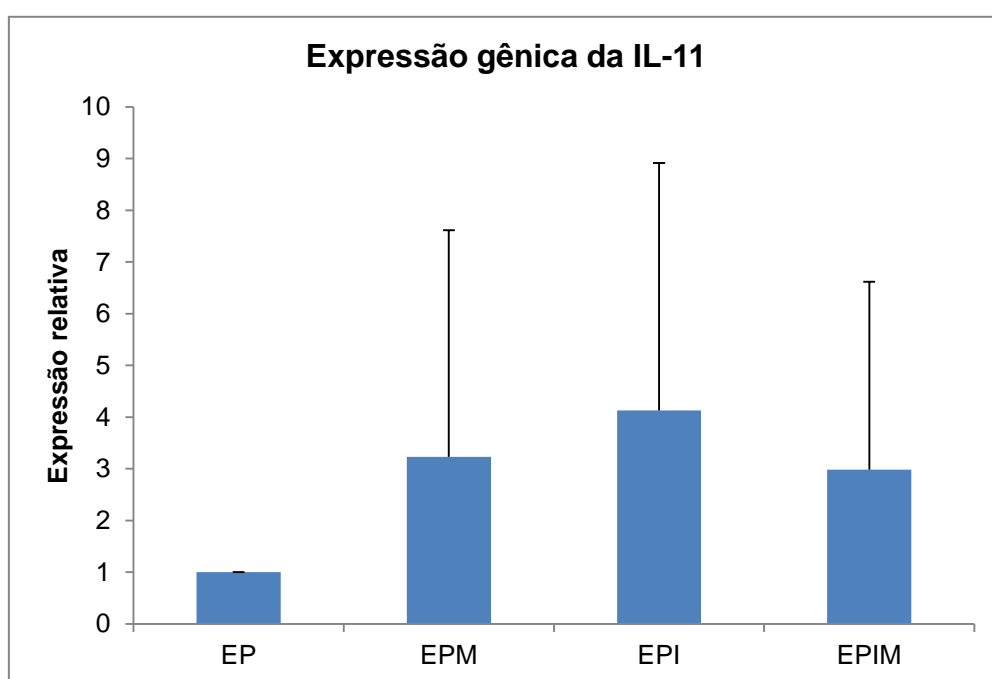


Figura 8. Expressão gênica da IL-11 em cultura de células estromais endometriais contendo estrógeno e progesterona (EP), adicionado de insulina (I: ambiente hiperinsulinêmico) e tratamento com metformina (M) por 48 horas. Expressão do RNAm da IL-11 normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA). Resultados apresentados como média \pm erro padrão (N=7/grupo)

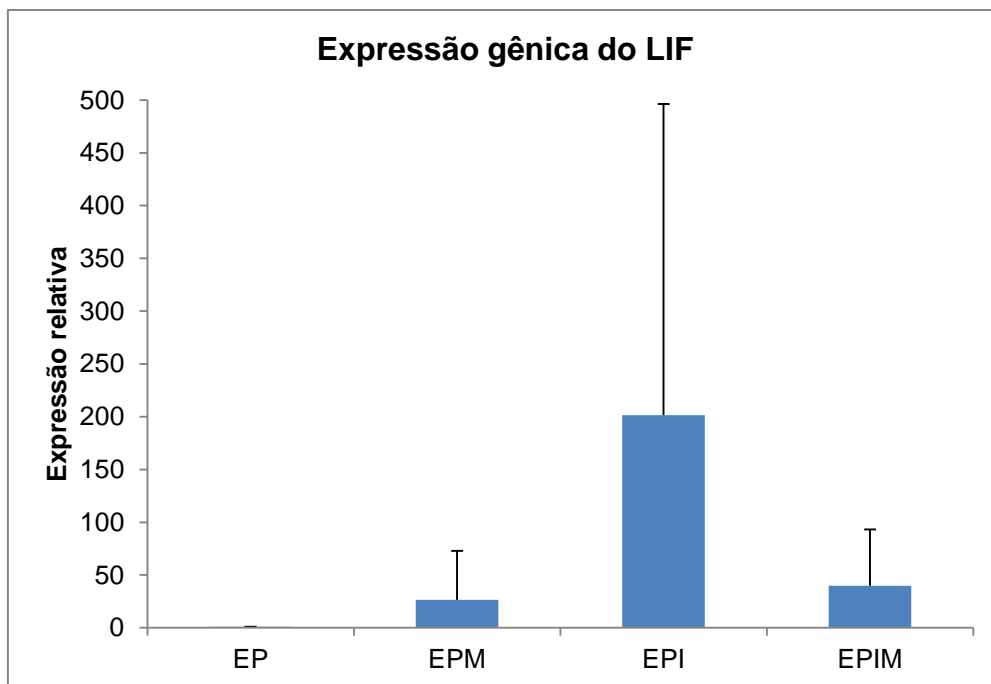


Figura 9. Expressão gênica do fator inibidor de leucemia (LIF) em cultura de células estromais endometriais contendo estrógeno e progesterona (EP), adicionado de insulina (I: ambiente hiperinsulinêmico) e tratamento com metformina (M) por 48 horas. Expressão do RNAm normalizada pelo gene *HPRT1* e expressa em unidades arbitrárias (UA). Resultados apresentados como média \pm erro padrão (N=5-6/grupo).

A avaliação da expressão proteica da IL-11, assim como na avaliação da sua expressão gênica, não encontrou diferenças ao se comparar os grupos experimentais entre si (Figura 10). Não foi possível detectar o LIF no sobrenadante das células estromais.

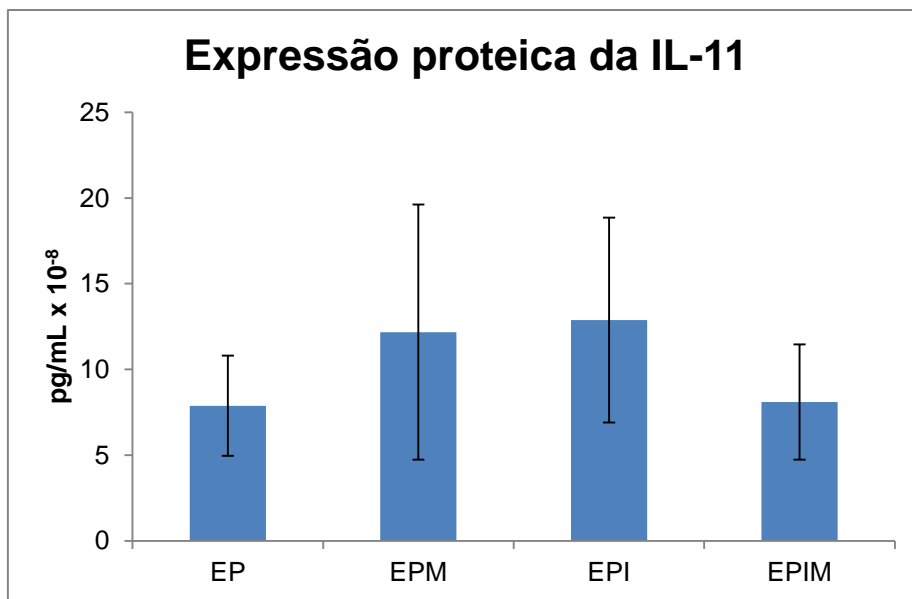


Figura 10. Expressão proteica de IL-11 em cultura de células estromais endometriais contendo estrógeno e progesterona (EP), adicionado de insulina (I: ambiente hiperinsulinêmico) e tratamento com metformina (M) por 48 horas, determinada por ensaio imunoenzimático de ELISA, corrigido pelo número total de proteínas (N=6/grupo).

6.3.1 Discussão do Capítulo III

Os mecanismos fisiológicos e moleculares subjacentes à implantação do embrião permanecem parcialmente compreendidos. No entanto, nos anos recentes um maior corpo de literatura tem emergido, na medida em que técnicas de análises proteômicas, epigenéticas, e análise de secreções e fluidos endometriais, têm identificado moléculas chave no processo de implantação e potenciais marcadores para receptividade endometrial (Strowitzki, Germeyer et al. 2006; Garrido-Gomez, Dominguez et al. 2011; Grimaldi, Christian et al. 2012). Atualmente sabe-se que os requisitos para o sucesso da implantação dependem de uma comunicação sincronizada entre o embrião e o endométrio, com desenvolvimento apropriado tanto do blastocisto como do endométrio, de maneira que este se encontre em um estado receptivo. Diversos eventos celulares e moleculares complexos estão envolvidos durante o processo de implantação (Singh, Chaudhry et al. 2011). Da perspectiva das células estromais do endométrio, o blastocisto irá exercer um significativo impacto sobre a expressão gênica dessas células, assim como

a insulina pode também pode exercer efeitos nesse ambiente (Strowitzki, Germeyer et al. 2006).

Embora, recentemente, haja sofisticadas pesquisas na área, como a seleção de embriões ou o tratamento com indutores da ovulação, não necessariamente aumentam as taxas de implantação (Strowitzki, Germeyer et al. 2006), e o endométrio continua relegado à segundo plano quando comparado ao ovário, embrião ou o processo de fertilização (Casper 2011). Além disso, faltam biomarcadores confiáveis que possam prever a receptividade uterina. Tratando desse contexto, o modelo celular descrito no presente estudo foi utilizado para analisar a expressão gênica e proteica da IL-11 e LIF e a ação da metformina sobre elas. Na biologia reprodutiva essas citocinas têm demonstrado papel essencial no processo de implantação, participando da decidualização do endométrio no período da janela de implantação, período em que é maior a probabilidade de o embrião implantar (Marwood, Visser et al. 2009; Singh, Chaudhry et al. 2011). Estudos em roedores já provaram sua importância nesse processo, fato comprovado quando transposto para estudos em humanos, sejam *in vitro* ou epidemiológicos. Roedores nocaute para o gene do LIF, IL-11 ou IL-11R não permitem a implantação, e mulheres inférteis mostram níveis reduzidos dessas citocinas quando comparadas a mulheres férteis (Robb, Li et al. 1998; Fouladi-Nashta, Jones et al. 2005). A regulação da expressão da IL-11 e do LIF é feita primordialmente pela progesterona (Paiva, Menkhorst et al. 2009), predominante na fase secretória do ciclo quando essas citocinas são expressas. Por essa razão esse hormônio foi administrado em todos os grupos experimentais, além de ela ser um dos principais reguladores da decidualização.

O cultivo das células estromais do endométrio foi escolhido por esse estudo uma vez que a expressão da IL-11 e do LIF já foi descrito previamente e são essas células que irão direcionar o crescimento e diferenciação do epitélio subjacente (Arnold, Lessey et al. 2002). Adicionalmente, as células estromais endometriais têm mostrado prover um substrato receptivo para invasão do blastocisto e protegê-lo através de mecanismos de defesa contra o estresse

oxidativo, auxiliando na tolerância imunológica do feto (Weimar, Macklon et al. 2013).

Estados hiperinsulinêmicos prejudicam a fertilidade feminina (Diamanti-Kandarakis and Papavassiliou 2006; Traub 2011), e essa associação tem sido estudada em algumas disfunções endocrinológicas e/ou reprodutivas como obesidade, SOP e aborto recorrente (Pasquali, Patton et al. 2007; Boutzios, Karalaki et al. 2013; Wu, Divall et al. 2013). Com base nisso, a metformina, um insulino-sensibilizante utilizado há anos na prática clínica, tem ampliado suas sugestões de uso, desde desordens reprodutivas como a SOP até, mais recentemente, o câncer. E a partir dessa nova abordagem do uso da metformina, esse trabalho propôs avaliar sua ação sobre citocinas importantes da implantação humana em um modelo de cultura celular de endométrio hiperinsulinêmico. Entretanto, contrariando as hipóteses iniciais de que a insulina diminuiria a expressão da IL-11 e do LIF enquanto a metformina aumentaria a expressão dessas, não foi possível observar diferenças entre os grupos propostos. Mikolajczyk e colaboradores (2012) também avaliaram a expressão gênica e proteica de IL-11 e LIF em mulheres inférteis e mulheres férteis pelos mesmos métodos desse estudo, e não verificaram nenhuma diferença entre os grupos (Mikolajczyk, Wirstlein et al. 2006). Já Ledee-Bataille et al. encontraram uma correlação inversa entre concentrações de LIF em amostras de fluido uterino e a probabilidade do sucesso de implantação (Ledee-Bataille, Lapree-Delage et al. 2002), apesar da maioria das evidências convencer o contrário (Robb, Dimitriadis et al. 2002; van Mourik, Macklon et al. 2009). Ao se analisar o efeito quantitativo dessas citocinas, Calluwaerts (2002) aponta que baixas doses de IL-11 melhoram a implantação do blastocisto, porém altas doses prejudicam a decidualização, essencial para implantação (Caluwaerts, Pijnenborg et al. 2002). Tal resultado levanta a hipótese de que mudanças sutis na concentração dessas citocinas podem alterar significativamente sua natureza de ação, ou seja, pode existir quantidade considerável de IL-11 ou LIF no ambiente pré-implantação sem que, obrigatoriamente, essa grande quantia aja de maneira favorável à implantação.

A análise proteica da IL-11 também se mostrou igual entre os grupos. Além disso, não se detectou a proteína LIF no sobrenadante das células estromais de endométrio através do ELISA específico para essa citocina. Em outro estudo que utilizou o mesmo kit imunoenzimático para avaliar a expressão da proteína LIF em homogenato endometrial de suínos, LIF não foi detectado (Blitek, Morawska et al. 2012). No entanto, tais fatos não indicam que o endométrio não secreta o LIF, conforme discutido por Tawfeek (2012) que relatou o conflito existente entre os diferentes resultados devido ao uso de diferentes kits ELISA. Segundo esse autor, os kits ELISA comercialmente disponíveis estão longe da equivalência, e diferem principalmente em sua habilidade de detectar a proteína glicosilada. Sabe-se que a proteína LIF humana é altamente glicosilada, e essa porção de açúcar pode representar cerca de 50% do peso total da proteína naturalmente produzida (Tawfeek, Eid et al. 2012). Dessa maneira, muitos epítomos podem ser mascarados e o LIF pode acabar não sendo detectado por anticorpos em alguns kits. Somado a isso, a expressão do LIF comparada à da IL-11 é temporalmente anterior no ciclo menstrual, ocorrendo entre a fase secretória inicial e média, enquanto que a expressão de IL-11 predomina na fase secretórias tardia, quando as células já deciduizaram por completo (Cork, Li et al. 2001; Dimitriadis, Robb et al. 2003; Karpovich, Klemmt et al. 2005). Pode ser que esse modelo, por induzir a deciduização através do tratamento com progesterona, possa ter privilegiado a expressão de IL-11 em relação ao LIF. Além disso, em termos quantitativos, a expressão de LIF pelas células estromais, é inferior quando comparada à expressão de IL-11 (Cork, Li et al. 2001; Marwood, Visser et al. 2009; Singh, Chaudhry et al. 2011).

Outro fator que pode explicar a dificuldade de encontrar diferenças nas expressões dessas citocinas é o fato de que as células estromais do endométrio secretam menor quantidade de citocinas comparadas às células epiteliais endometriais (Marwood, Visser et al. 2009; Paiva, Menkhorst et al. 2009), evidenciado pela baixa expressão visualizada através do RT-PCR. Adicionalmente, pode-se considerar que a imensa variabilidade de resultados encontrada em culturas celulares humanas somada ao fato de que não foi

possível utilizar todas as culturas na análise estatística, tenham contribuído para isso, visto que o número amostral ficou reduzido.

Outra observação a ser feita é em relação ao tempo de tratamento com metformina. O período de 48 horas de tratamento com metformina pode não ter sido suficiente para desenvolver uma resposta na expressão do RNAm dos genes em estudo, assim como na secreção das citocinas. A influência da insulina nas células estromais parece ser maior com a incubação de metformina a longo prazo, uma situação encontrada em mulheres anovulatórias com SOP tratadas com metformina, em que é necessário de semanas a meses para restaurar a ovulação (Germeyer, Jauckus et al. 2011).

Os estudos *in vitro* que têm como objetivo avaliar a ação da metformina geralmente variam o tempo de incubação de 24 a 96 horas (Gotlieb, Saumet et al. 2008; Zhang and Liao 2010; Tan, Adya et al. 2011). O tempo de 48 horas já foi considerado de curto prazo por estudo prévio semelhante a esse (Germeyer, Jauckus et al. 2011), embora tenha sido capaz de alterar favoravelmente a expressão de IL-8 e IL-1 β , e por isso esse tempo foi escolhido nesse modelo. Essas citocinas, também importantes fatores na implantação, tiveram sua expressão diminuída quando tratadas com alta concentração de insulina, aumentando substancialmente sua expressão quando tratadas com metformina (Germeyer, Jauckus et al. 2011). Nosso grupo, por meio de igual metodologia, avaliou as mesmas citocinas, encontrando diferença na expressão de IL-1 β no tempo de 48 horas, tendo o tempo de 24 horas se mostrado insuficiente para causar efeito na expressão (Machado 2013). Contrariando esses achados, Takemura (2007) observou a redução da IL-8 e IL-1 β , em cultura de células estromais com endometriose tratadas com metformina. No entanto, é possível que a inflamação proveniente da endometriose induzida nesse modelo possa ter interferido no resultado (Takemura, Osuga et al. 2007). Esse autor aponta que a metformina parece exercer um papel anti-inflamatório através da redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias e sugere que a via da AMPK pode estar envolvida nesses efeitos anti-inflamatórios (Takemura, Osuga et al. 2007). Já foi relatado na literatura que a família da IL-6, da qual a IL-11, e o LIF têm efeito pleiotrópico,

podendo ter tanto efeitos anti- como pró-inflamatórios (Cork, Li et al. 2001; van Mourik, Macklon et al. 2009).

Ao se tratar das doses de metformina usualmente utilizadas em estudos *in vitro*, estas variam de 0,01 a 5 mM (Cantrell, Zhou et al. 2010), estando a dose desse estudo dentro dessa faixa – 1mM. Essas doses podem ser consideradas supraterapêuticas quando comparadas às doses utilizadas em pacientes diabéticos, a dose máxima recomendada na clínica é de 2250 mg/dia (Cantrell, Zhou et al. 2010). Em estudos clínicos farmacocinéticos, níveis terapêuticos medidos em voluntários saudáveis variam de 0,5 a 2,0 mg/l. Foi sugerido que a dose equivalente *in vitro* é 20 μ M (Cantrell, Zhou et al. 2010). Entretanto, é importante considerar que as células em cultura crescem sob condições hiperglicêmicas em ambiente com abundância de nutrientes. Os meios de cultura por si só contém altas doses de glicose e 5-10% de soro bovino fetal é tipicamente adicionado, podendo resultar em estimulação de crescimento excessivo (Cantrell, Zhou et al. 2010). No caso do presente estudo, o meio continha alta concentração de glicose e 10% de soro bovino foi adicionado, o que pode ter dificultado a ação da metformina. É possível que com uma dose maior de metformina fosse achado diferenças entre os grupos. Sem dúvida, isso constitui uma limitação inerente de estudos *in vitro* e pode ser uma explicação viável para as altas doses necessárias para visualizar os efeitos da metformina em cultura celular comparado as doses usadas em pacientes diabéticos.

Embora haja claras evidências de que a hiperinsulinemia interfira na fertilidade feminina e de que a metformina venha mostrando relevante papel em desordens da reprodução, no modelo proposto não foi possível encontrar diferenças na expressão da IL-11 e do LIF, citocinas importantes na implantação do embrião humano. Considerada a complexa regulação de todos os fatores considerados nessa pesquisa e suas múltiplas inter-relações, mais estudos são requeridos para desvendar os mecanismos que orquestram essa intrincada rede.

7 CONCLUSÃO

O uso da cultura celular de células estromais de endométrio humano permitiu a avaliação dos efeitos da metformina e da insulina sobre a expressão das citocinas IL-11 e LIF. O tratamento com metformina nesse modelo submetido a ambiente hiperinsulinêmico evidenciou uma significativa ação antiproliferativa sobre as células estromais endometriais, sugerindo um importante papel desse insulino-sensibilizante na reprodução feminina, seja no contexto do câncer endometrial, seja na adaptação do endométrio para uma possível implantação.

Ao se analisar a expressão gênica da IL-11 e do LIF, se verificou uma alta variabilidade de respostas *in vitro*, não sendo possível encontrar diferenças na expressão dessas citocinas.

Embora haja claras evidências de que a hiperinsulinemia interfira na fertilidade feminina e de que a metformina venha mostrando relevante papel nesse aspecto, no modelo proposto não foi possível encontrar diferenças na expressão da IL-11 e do LIF, citocinas importantes na implantação humana. Considerada a complexidade da regulação de todos os fatores considerados nessa pesquisa e a diversidade nas suas interações, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos que dirigem essa intrincada rede.

8 PERSPECTIVAS

Em frente às fortes evidências da ação antiproliferativa da metformina, pretende-se analisar um marcador de proliferação celular de maneira a comprovar esse efeito. Para melhor compreender o mecanismo de ação dessa droga, outra intenção é avaliar substratos da via da AMPK, para análise direta do nível bioquímico em que a metformina está atuando para promover essa redução da proliferação celular.

Além disso, o grupo atualmente visa o estabelecimento de um modelo tridimensional de cultura endometrial, cultivando simultaneamente células estromais e epiteliais através de matrizes pré-fabricadas, fornecendo uma ampliação de possibilidades na mesma linha de estudo, uma vez que esse modelo permite a avaliação das interações entre os diferentes tipos celulares do endométrio entre si e com a matriz extracelular. Uma vez padronizada a cultura tridimensional, pretende-se testar maiores doses de metformina, assim como maior tempo de tratamento, com o objetivo de encontrar as diferenças hipotetizadas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, D. H. and F. Bacha (2013). "Ontogeny of polycystic ovary syndrome and insulin resistance in utero and early childhood." Fertil Steril **100**(1): 2-11.
- Alexandrov, V. A., V. N. Anisimov, et al. (1980). "The inhibition of the transplacental blastomogenic effect of nitrosomethylurea by postnatal administration of buformin to rats." Carcinogenesis **1**(12): 975-978.
- Altmae, S., J. Reimand, et al. (2012). "Research resource: interactome of human embryo implantation: identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks." Mol Endocrinol **26**(1): 203-217.
- Apparao, K. B., L. P. Lovely, et al. (2002). "Elevated endometrial androgen receptor expression in women with polycystic ovarian syndrome." Biol Reprod **66**(2): 297-304.
- Arici, A., O. Engin, et al. (1995). "Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium." J Clin Endocrinol Metab **80**(6): 1908-1915.
- Arnold, J. T., D. G. Kaufman, et al. (2001). "Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model." Hum Reprod **16**(5): 836-845.
- Arnold, J. T., B. A. Lessey, et al. (2002). "Effect of normal endometrial stroma on growth and differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells." Cancer Res **62**(1): 79-88.
- Bjorge, T., T. Stocks, et al. (2010). "Metabolic syndrome and endometrial carcinoma." Am J Epidemiol **171**(8): 892-902.
- Blitek, A., E. Morawska, et al. (2012). "Regulation of expression and role of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 in the uterus of early pregnant pigs." Theriogenology **78**(5): 951-964.
- Boutzios, G., M. Karalaki, et al. (2013). "Common pathophysiological mechanisms involved in luteal phase deficiency and polycystic ovary syndrome. Impact on fertility." Endocrine **43**(2): 314-317.
- Cahill, D. J. and P. G. Wardle (2002). "Management of infertility." BMJ **325**(7354): 28-32.
- Caluwaerts, S., R. Pijnenborg, et al. (2002). "Differential effects of IL-11 on rat blastocysts and decidua during the peri-implantation period." Am J Reprod Immunol **47**(4): 231-241.
- Campagnoli, C., C. Abba, et al. (2013). "Life-style and metformin for the prevention of endometrial pathology in postmenopausal women." Gynecol Endocrinol **29**(2): 119-124.

- Cantrell, L. A., C. Zhou, et al. (2010). "Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy." *Gynecol Oncol* **116**(1): 92-98.
- Capp E, B. A., Ribeiro MFM, Freitas M, Pureur M, Tortorella H, Corleta H, Monego H (1996). "Binding and tyrosine kinase activity of insulin receptor in human normal and neoplastic endometrium." *Medical Science Research* **24**: 621-623.
- Capp, E., J. Jauckus, et al. (2011). "Does metformin influence the insulin-, IGF I- and IGF II-receptor gene expression and Akt phosphorylation in human decidualized endometrial stromal cells?" *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **158**(2): 248-253.
- Casper, R. F. (2011). "It's time to pay attention to the endometrium." *Fertil Steril* **96**(3): 519-521.
- Chakraborty, P., S. K. Goswami, et al. (2013). "Recurrent pregnancy loss in polycystic ovary syndrome: role of hyperhomocysteinemia and insulin resistance." *PLoS One* **8**(5): e64446.
- Charnock-Jones, D. S., A. M. Sharkey, et al. (1994). "Leukaemia inhibitory factor mRNA concentration peaks in human endometrium at the time of implantation and the blastocyst contains mRNA for the receptor at this time." *J Reprod Fertil* **101**(2): 421-426.
- Chehrehasa, F., A. C. Meedeniya, et al. (2009). "EdU, a new thymidine analogue for labelling proliferating cells in the nervous system." *J Neurosci Methods* **177**(1): 122-130.
- Chen, J. R., J. G. Cheng, et al. (2000). "Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis." *Endocrinology* **141**(12): 4365-4372.
- Chou, K. H., H. von Eye Corleta, et al. (2003). "Clinical, metabolic and endocrine parameters in response to metformin in obese women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind and placebo-controlled trial." *Horm Metab Res* **35**(2): 86-91.
- Clynes, A. M. a. M. (1993). "Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays." *Cytotechnology*(11): 49-58.
- Cork, B. A., T. C. Li, et al. (2001). "Interleukin-11 (IL-11) in human endometrium: expression throughout the menstrual cycle and the effects of cytokines on endometrial IL-11 production in vitro." *J Reprod Immunol* **50**(1): 3-17.
- Costello, M. F., M. Chapman, et al. (2006). "A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials on metformin co-administration during gonadotrophin ovulation induction or IVF in women with polycystic ovary syndrome." *Hum Reprod* **21**(6): 1387-1399.
- Cust, A. E., R. Kaaks, et al. (2007). "Metabolic syndrome, plasma lipid, lipoprotein and glucose levels, and endometrial cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." *Endocr Relat Cancer* **14**(3): 755-767.

- Danielsson, K. G., M. L. Swahn, et al. (1997). "The effect of various doses of mifepristone on endometrial leukaemia inhibitory factor expression in the midluteal phase--an immunohistochemical study." Hum Reprod **12**(6): 1293-1297.
- Diamanti-Kandarakis, E. and A. G. Papavassiliou (2006). "Molecular mechanisms of insulin resistance in polycystic ovary syndrome." Trends Mol Med **12**(7): 324-332.
- Dimitriadis, E., E. Menkhorst, et al. (2010). "Review: LIF and IL11 in trophoblast-endometrial interactions during the establishment of pregnancy." Placenta **31 Suppl**: S99-104.
- Dimitriadis, E., G. Nie, et al. (2010). "Local regulation of implantation at the human fetal-maternal interface." Int J Dev Biol **54**(2-3): 313-322.
- Dimitriadis, E., L. Robb, et al. (2003). "IL-11 and IL-11Ralpha immunolocalisation at primate implantation sites supports a role for IL-11 in placentation and fetal development." Reprod Biol Endocrinol **1**: 34.
- Dimitriadis, E., A. M. Sharkey, et al. (2007). "Immunolocalisation of phosphorylated STAT3, interleukin 11 and leukaemia inhibitory factor in endometrium of women with unexplained infertility during the implantation window." Reprod Biol Endocrinol **5**: 44.
- Dimitriadis, E., C. Stoikos, et al. (2006). "Interleukin-11, IL-11 receptoralpha and leukemia inhibitory factor are dysregulated in endometrium of infertile women with endometriosis during the implantation window." J Reprod Immunol **69**(1): 53-64.
- Dowling, R. J., S. Niraula, et al. (2012). "Metformin in cancer: translational challenges." J Mol Endocrinol **48**(3): R31-43.
- Du, X. X. and D. A. Williams (1994). "Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment." Blood **83**(8): 2023-2030.
- Dunaif, A. (1999). "Insulin action in the polycystic ovary syndrome." Endocrinol Metab Clin North Am **28**(2): 341-359.
- Ehrmann, D. A. (2005). "Polycystic ovary syndrome." N Engl J Med **352**(12): 1223-1236.
- Fedorcsak, P., P. O. Dale, et al. (2004). "Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment." Hum Reprod **19**(11): 2523-2528.
- Fouladi-Nashta, A. A., C. J. Jones, et al. (2005). "Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice." Dev Biol **281**(1): 1-21.
- Garcia, S. D., S. D. Sanz, et al. (2013). "[Type 2 diabetes mellitus and obesity: should we treat the obesity or the diabetes?]." Med Clin (Barc) **141 Suppl 2**: 14-19.
- Garrido-Gomez, T., F. Dominguez, et al. (2011). "Modeling human endometrial decidualization from the interaction between proteome and secretome." J Clin Endocrinol Metab **96**(3): 706-716.

- Gellersen, B., K. Reimann, et al. (2010). "Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals." Hum Reprod **25**(4): 862-873.
- Germeyer, A., J. Jauckus, et al. (2011). "Metformin modulates IL-8, IL-1beta, ICAM and IGFBP-1 expression in human endometrial stromal cells." Reprod Biomed Online **22**(4): 327-334.
- Giudice, L. C. (2006). "Endometrium in PCOS: Implantation and predisposition to endocrine CA." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **20**(2): 235-244.
- Gonen, Y. and R. F. Casper (1990). "Sonographic determination of a possible adverse effect of clomiphene citrate on endometrial growth." Hum Reprod **5**(6): 670-674.
- Gotlieb, W. H., J. Saumet, et al. (2008). "In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer." Gynecol Oncol **110**(2): 246-250.
- Grimaldi, G., M. Christian, et al. (2012). "Expression of epigenetic effectors in decidualizing human endometrial stromal cells." Mol Hum Reprod **18**(9): 451-458.
- Guimarães, L. (2012). "Use of the Generalized Estimating Equation Model in Longitudinal Data Analysis." Revista HCPA **32**(4): 503-511.
- Guo, Y., F. Xu, et al. (2012). "Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer." Cancer Treat Rev **38**(7): 904-910.
- Guzeloglu-Kayisli, O., U. A. Kayisli, et al. (2009). "The role of growth factors and cytokines during implantation: endocrine and paracrine interactions." Semin Reprod Med **27**(1): 62-79.
- Habara, T., M. Nakatsuka, et al. (2002). "Elevated blood flow resistance in uterine arteries of women with unexplained recurrent pregnancy loss." Hum Reprod **17**(1): 190-194.
- Hanna, R. K., C. Zhou, et al. (2012). "Metformin potentiates the effects of paclitaxel in endometrial cancer cells through inhibition of cell proliferation and modulation of the mTOR pathway." Gynecol Oncol **125**(2): 458-469.
- Harper, M. J. (1992). "The implantation window." Baillieres Clin Obstet Gynaecol **6**(2): 351-371.
- Hay, N. (2005). "The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer." Cancer Cell **8**(3): 179-183.
- Holland, W., T. Morrison, et al. (2004). "Metformin (Glucophage) inhibits tyrosine phosphatase activity to stimulate the insulin receptor tyrosine kinase." Biochem Pharmacol **67**(11): 2081-2091.
- Irwin, J. C., L. de las Fuentes, et al. (1993). "Insulin-like growth factor regulation of human endometrial stromal cell function: coordinate effects on insulin-like growth factor binding protein-1, cell proliferation and prolactin secretion." Regul Pept **48**(1-2): 165-177.
- Jakubowicz, D. J., M. Seppala, et al. (2001). "Insulin reduction with metformin increases luteal phase serum glycodelin and insulin-like growth factor-binding protein 1 concentrations

and enhances uterine vascularity and blood flow in the polycystic ovary syndrome." J Clin Endocrinol Metab **86**(3): 1126-1133.

- Kamelle, S., A. Sienko, et al. (2002). "Retinoids and steroids regulate menstrual phase histological features in human endometrial organotypic cultures." Fertil Steril **78**(3): 596-602.
- Karpovich, N., P. Klemmt, et al. (2005). "The production of interleukin-11 and decidualization are compromised in endometrial stromal cells derived from patients with infertility." J Clin Endocrinol Metab **90**(3): 1607-1612.
- Katsiki, N. and A. I. Hatzitolios (2010). "Insulin-sensitizing agents in the treatment of polycystic ovary syndrome: an update." Curr Opin Obstet Gynecol **22**(6): 466-476.
- Lathi, R. B., A. P. Hess, et al. (2005). "Dose-dependent insulin regulation of insulin-like growth factor binding protein-1 in human endometrial stromal cells is mediated by distinct signaling pathways." J Clin Endocrinol Metab **90**(3): 1599-1606.
- Ledee-Bataille, N., G. Lapree-Delage, et al. (2002). "Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation." Hum Reprod **17**(1): 213-218.
- Lessey, B. A. (2002). "Adhesion molecules and implantation." J Reprod Immunol **55**(1-2): 101-112.
- Lessey, B. A. (2011). "Assessment of endometrial receptivity." Fertil Steril **96**(3): 522-529.
- Lessey, B. A., A. J. Castelbaum, et al. (1995). "Integrins as markers of uterine receptivity in women with primary unexplained infertility." Fertil Steril **63**(3): 535-542.
- Li, J., J. V. Zhang, et al. (2005). "Inhibition of the beta-catenin signaling pathway in blastocyst and uterus during the window of implantation in mice." Biol Reprod **72**(3): 700-706.
- Li, X. and R. Shao (2014). "PCOS and obesity: insulin resistance might be a common etiology for the development of type I endometrial carcinoma." Am J Cancer Res **4**(1): 73-79.
- Licht, P., H. Fluhr, et al. (2007). "Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation?" Mol Cell Endocrinol **269**(1-2): 85-92.
- Littlejohn, E. E., R. E. Weiss, et al. (2007). "Intractable early childhood obesity as the initial sign of insulin resistant hyperinsulinism and precursor of polycystic ovary syndrome." J Pediatr Endocrinol Metab **20**(1): 41-51.
- Lu, S. H., H. B. Wang, et al. (2009). "Reconstruction of engineered uterine tissues containing smooth muscle layer in collagen/matrigel scaffold in vitro." Tissue Eng Part A **15**(7): 1611-1618.
- Luo, Z., M. Zang, et al. (2010). "AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth." Future Oncol **6**(3): 457-470.
- Machado, A. B. (2013). "Efeito da metformina sobre IL-8 e IL-1b em um modelo de células estromais endometriais hiperinsulinêmicas e hiperandrogênicas in vitro."

- Makkar, G., E. H. Ng, et al. (2006). "Reduced expression of interleukin-11 and interleukin-6 in the periimplantation endometrium of excessive ovarian responders during in vitro fertilization treatment." J Clin Endocrinol Metab **91**(8): 3181-3188.
- Makker, A. and M. M. Singh (2006). "Endometrial receptivity: clinical assessment in relation to fertility, infertility, and antifertility." Med Res Rev **26**(6): 699-746.
- Makrigiannakis, A., V. Minas, et al. (2006). "Hormonal and cytokine regulation of early implantation." Trends Endocrinol Metab **17**(5): 178-185.
- Marwood, M., K. Visser, et al. (2009). "Interleukin-11 and leukemia inhibitory factor regulate the adhesion of endometrial epithelial cells: implications in fertility regulation." Endocrinology **150**(6): 2915-2923.
- Michalakis, K., G. Mintziori, et al. (2013). "The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: a narrative review." Metabolism **62**(4): 457-478.
- Mikolajczyk, M., P. Wirstlein, et al. (2006). "Leukaemia inhibitory factor and interleukin 11 levels in uterine flushings of infertile patients with endometriosis." Hum Reprod **21**(12): 3054-3058.
- Mioni, R., S. Chiarelli, et al. (2004). "Evidence for the presence of glucose transporter 4 in the endometrium and its regulation in polycystic ovary syndrome patients." J Clin Endocrinol Metab **89**(8): 4089-4096.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays" Journal of Immunological Methods(65): 55-63.
- Mu, N., Y. Zhu, et al. (2012). "Insulin resistance: a significant risk factor of endometrial cancer." Gynecol Oncol **125**(3): 751-757.
- Murri, M., M. Insenser, et al. (2014). "Metabolomics in polycystic ovary syndrome." Clin Chim Acta **429**: 181-188.
- Nestler, J. E. (1997). "Role of hyperinsulinemia in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome, and its clinical implications." Semin Reprod Endocrinol **15**(2): 111-122.
- Nestler, J. E. and D. J. Jakubowicz (1996). "Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome." N Engl J Med **335**(9): 617-623.
- Nestler, J. E., D. J. Jakubowicz, et al. (1998). "Effects of metformin on spontaneous and clomiphene-induced ovulation in the polycystic ovary syndrome." N Engl J Med **338**(26): 1876-1880.
- Norwitz, E. R., D. J. Schust, et al. (2001). "Implantation and the survival of early pregnancy." N Engl J Med **345**(19): 1400-1408.
- Noyes, R. W., A. T. Hertig, et al. (1975). "Dating the endometrial biopsy." Am J Obstet Gynecol **122**(2): 262-263.

- Oreshkova, T., R. Dimitrov, et al. (2012). "A cross-talk of decidual stromal cells, trophoblast, and immune cells: a prerequisite for the success of pregnancy." Am J Reprod Immunol **68**(5): 366-373.
- Paiva, P., E. Menkhorst, et al. (2009). "Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy." Cytokine Growth Factor Rev **20**(4): 319-328.
- Palomba, S., A. Falbo, et al. (2009). "Evidence-based and potential benefits of metformin in the polycystic ovary syndrome: a comprehensive review." Endocr Rev **30**(1): 1-50.
- Palomba, S., T. Russo, et al. (2006). "Uterine effects of metformin administration in anovulatory women with polycystic ovary syndrome." Hum Reprod **21**(2): 457-465.
- Papaoiannou, S. and J. Tzafettas (2010). "Anovulation with or without PCO, hyperandrogenaemia and hyperinsulinaemia as promoters of endometrial and breast cancer." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **24**(1): 19-27.
- Pasquali, R., L. Patton, et al. (2007). "Obesity and infertility." Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **14**(6): 482-487.
- Paul, S. R., F. Bennett, et al. (1990). "Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7512-7516.
- Prado, S. D. (1992). "Hyperinsulinism. Causes and mechanisms." Presse Med(28): 1312-1317.
- Ramathal, C. Y., I. C. Bagchi, et al. (2010). "Endometrial decidualization: of mice and men." Semin Reprod Med **28**(1): 17-26.
- Rice, S., N. Christoforidis, et al. (2005). "Impaired insulin-dependent glucose metabolism in granulosa-lutein cells from anovulatory women with polycystic ovaries." Hum Reprod **20**(2): 373-381.
- Robb, L., E. Dimitriadis, et al. (2002). "Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: cytokines with key roles in implantation." J Reprod Immunol **57**(1-2): 129-141.
- Robb, L., R. Li, et al. (1998). "Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation." Nat Med **4**(3): 303-308.
- Salamonsen, L. A., G. Nie, et al. (2009). "Society for Reproductive Biology Founders' Lecture 2009. Preparing fertile soil: the importance of endometrial receptivity." Reprod Fertil Dev **21**(7): 923-934.
- Sawai, K., N. Matsuzaki, et al. (1997). "Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor: regulation by decidual cytokines and steroid hormones." Biol Reprod **56**(5): 1274-1280.
- Schutte, S. C. and R. N. Taylor (2012). "A tissue-engineered human endometrial stroma that responds to cues for secretory differentiation, decidualization, and menstruation." Fertil Steril **97**(4): 997-1003.

- Shang, K., X. Jia, et al. (2012). "Endometrial abnormality in women with polycystic ovary syndrome." Reprod Sci **19**(7): 674-683.
- Shanik, M. H., Y. Xu, et al. (2008). "Insulin resistance and hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse?" Diabetes Care **31 Suppl 2**: S262-268.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, et al. (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." Science **310**(5754): 1642-1646.
- Shuya, L. L., E. M. Menkhorst, et al. (2011). "Leukemia inhibitory factor enhances endometrial stromal cell decidualization in humans and mice." PLoS One **6**(9): e25288.
- Singh, M., P. Chaudhry, et al. (2011). "Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors." J Endocrinol **210**(1): 5-14.
- Stith, B. J., M. L. Goalstone, et al. (1996). "The antidiabetic drug metformin elevates receptor tyrosine kinase activity and inositol 1,4,5-trisphosphate mass in *Xenopus* oocytes." Endocrinology **137**(7): 2990-2999.
- Strowitzki, T., E. Capp, et al. (2010). "The degree of cycle irregularity correlates with the grade of endocrine and metabolic disorders in PCOS patients." Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol **149**(2): 178-181.
- Strowitzki, T., E. Capp, et al. (2001). "Expression of glucose transporter 1 in human endometrial and decidual tissue." Gynecol Endocrinol **15**(3): 219-224.
- Strowitzki, T., A. Germeyer, et al. (2006). "The human endometrium as a fertility-determining factor." Hum Reprod Update **12**(5): 617-630.
- Strowitzki, T., H. C. von Eye, et al. (1993). "Tyrosine kinase activity of insulin-like growth factor I and insulin receptors in human endometrium during the menstrual cycle: cyclic variation of insulin receptor expression." Fertil Steril **59**(2): 315-322.
- Takemura, Y., Y. Osuga, et al. (2007). "Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells." J Clin Endocrinol Metab **92**(8): 3213-3218.
- Tan, B. K., R. Adya, et al. (2011). "Metformin treatment exerts antiinvasive and antimetastatic effects in human endometrial carcinoma cells." J Clin Endocrinol Metab **96**(3): 808-816.
- Tawfeek, M. A., M. A. Eid, et al. (2012). "Assessment of leukemia inhibitory factor and glycoprotein 130 expression in endometrium and uterine flushing: a possible diagnostic tool for impaired fertility." BMC Womens Health **12**: 10.
- Traub, M. L. (2011). "Assessing and treating insulin resistance in women with polycystic ovarian syndrome." World J Diabetes **2**(3): 33-40.
- Truchan, B., P. Taylor, et al. (1987). "Basal, oxytocin-, and insulin-stimulated glucose oxidation in human endometrium." Can J Physiol Pharmacol **65**(3): 323-327.

- Tsai, Y. H., T. W. Wang, et al. (2013). "Dietary intake, glucose metabolism and sex hormones in women with polycystic ovary syndrome (PCOS) compared with women with non-PCOS-related infertility." Br J Nutr **109**(12): 2190-2198.
- Twisk, J. W. (2004). "Longitudinal data analysis. A comparison between generalized estimating equations and random coefficient analysis." Eur J Epidemiol **19**(8): 769-776.
- Umene, K., K. Banno, et al. (2013). "New candidate therapeutic agents for endometrial cancer: potential for clinical practice (review)." Oncol Rep **29**(3): 855-860.
- van Mourik, M. S., N. S. Macklon, et al. (2009). "Embryonic implantation: cytokines, adhesion molecules, and immune cells in establishing an implantation environment." J Leukoc Biol **85**(1): 4-19.
- Velazquez, E. M., S. Mendoza, et al. (1994). "Metformin therapy in polycystic ovary syndrome reduces hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperandrogenemia, and systolic blood pressure, while facilitating normal menses and pregnancy." Metabolism **43**(5): 647-654.
- Weimar, C. H., N. S. Macklon, et al. (2013). "The motile and invasive capacity of human endometrial stromal cells: implications for normal and impaired reproductive function." Hum Reprod Update **19**(5): 542-557.
- Wu, S., S. Divall, et al. (2013). "Obesity induced infertility and hyperandrogenism are corrected by deletion of the insulin receptor in the ovarian theca cell." Diabetes.
- Wurth, R., A. Pattarozzi, et al. (2013). "Metformin selectively affects human glioblastoma tumor-initiating cell viability: A role for metformin-induced inhibition of Akt." Cell Cycle **12**(1): 145-156.
- Zeger, S. L. and K. Y. Liang (1986). "Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes." Biometrics **42**(1): 121-130.
- Zhang, L. and Q. Liao (2010). "Effects of testosterone and metformin on glucose metabolism in endometrium." Fertil Steril **93**(7): 2295-2298.
- Zhang, Z., C. Funk, et al. (1994). "Progesterone regulation of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor gene expression during sensitization and decidualization in the rat uterus: effects of the antiprogestin, ZK 98.299." Endocrinology **135**(3): 1256-1263.
- Zou, M. H., S. S. Kirkpatrick, et al. (2004). "Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species." J Biol Chem **279**(42): 43940-43951.

10 ANEXO I: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Projeto: EFEITO DA METFORMINA SOBRE INTERLEUCINA-11 E FATOR INIBIDOR DE LEUCEMIA EM CULTURA DE CÉLULAS ENDOMETRIAIS SUBMETIDAS A AMBIENTE HIPERINSULINÊMICO

Pesquisadores:

- Dr. Edison Capp (Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral – UFRGS – Fone: (51) 33083559/ (51) 33597625

- Juliana Oliveira Rangel – Aluna de mestrado - Fone: (51) 81081303

Prezada paciente,

Antes de concordar em participar deste estudo é importante que você leia e entenda a explicação que se segue sobre os procedimentos propostos. Se depois de ler este documento existir alguma questão que você não compreenda sobre o estudo ou sobre os procedimentos, por favor, pergunte ao pesquisador.

Você está sendo convidada para participar do estudo que estamos realizando sobre o efeito de um medicamento (metformina) em células provenientes de endométrio (a camada interna do útero). O objetivo do nosso estudo é avaliar algumas proteínas importantes no processo de implantação do embrião no útero materno.

Estamos convidando a senhora para fazer parte deste experimento, pois quando a Sra. realizar a remoção do útero, parte desse órgão será enviado para exames, no entanto, boa parte não será utilizada. Por isso, estamos solicitando permissão para utilizar parte do material que será desprezado após a avaliação para a utilização em nossa pesquisa. No início do estudo aplicaremos um breve questionário para obtermos informações gerais de identificação, saúde geral e ginecológica. O questionário não deve durar mais que 10 minutos.

A sua participação no estudo não trará custos a você e a senhora não receberá nenhum pagamento pela sua participação.

Os resultados deste estudo não trarão benefícios diretos para a senhora. Porém, no futuro, essas avaliações poderão auxiliar no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas à infertilidade. Após a pesquisa o material será descartado e não haverá nenhum uso comercial do referido material. Todos os resultados referentes à pesquisa serão utilizados para fins exclusivos de pesquisa. Os seus dados serão mantidos em sigilo, não sendo revelados a outras pessoas que não os participantes do estudo.

Qualquer dúvida que surja ao longo do estudo basta entrar em contato com os pesquisadores. Em caso de dúvidas éticas, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) pelo telefone 33598304.

Este termo é elaborado em duas vias, ficando uma com a senhora e a outra com o pesquisador.

Eu, _____, concordo em participar do estudo acima nomeado, e afirmo que fui adequadamente informada sobre a pesquisa, podendo me retirar do estudo quando assim desejar, sem qualquer prejuízo no seu atendimento na Instituição.

Nome _____ da _____ paciente:

Assinatura _____ da
paciente: _____

Nome _____ do _____ Investigador:

Assinatura _____ do
Investigador: _____

Porto Alegre, _____ de _____ de _____