ANAMARIA RITTI RICCI

**FOXO3a em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos:
Avaliação de seu potencial para terapia alvo *in vitro***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientadora: Profa. Dra. Kátia Cândido
Carvalho

**São Paulo
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ricci, Anamaria Ritti
FOXO3a em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos :
avaliação de seu potencial para terapia alvo in
vitro / Anamaria Ritti Ricci. -- São Paulo, 2018.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientadora: Kátia Cândido Carvalho.

Descritores: 1.Leiomioma 2.Leiomiossarcoma
3.Proteína forkhead box O3 4.Terapia alvo
5.Metformina 6.Genisteína

USP/FM/DBD-472/18

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Agradecimentos

Agradecimentos. Sempre achei esta a pior parte para escrever, talvez porque a vida não se coloca em análise de regressão, e não é pelo valor que descobrimos a significância das pessoas em nossa trajetória.

Gostaria de começar agradecendo a Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço a Ele também por manter minha mãe ao meu lado, com saúde e disposição.

Agradeço ao meu irmão, José Guilherme, e principalmente a minha mãe, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão, e me mostraram o quanto era importante estudar, e nunca desistir. Agradeço a minha avó, Natália Pires, por todas as orações a mim dirigidas, com sua fé poderosa e inabalável, e por todas as frases de carinho ao longo de todo o processo da pós-graduação. Agradeço aos meus queridos sobrinhos, Sophia, Nicole, Vinícius e a minha cunhada Maria Helena, por ter me dado esses três presentes. Agradeço ao meu namorado, Mauro, que esteve ao meu lado nas horas boas e ruins.

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, Dra. Kátia Cândido Carvalho, pela oportunidade de ser sua aluna, pela proposição do tema do trabalho, por todo o conhecimento compartilhado, por toda a capacidade técnica, empenho e sentido prático com que sempre me orientou nesta jornada, sempre me corrigindo quando necessário. De coração, muito obrigada!

Sou igualmente grata aos Professores Dr. Edmund Chada Baracat e Dr. Gustavo Arantes Rosa Maciel, por terem aberto as portas do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular – LIM 58, e por terem me dado toda estrutura e suporte necessários ao desenvolvimento deste projeto.

Agradeço a todos os meus colegas de laboratório, Luísa Pimenta, Rodrigo Marcondes, Laura Gonzalez, Leonardo Tomiatti, Natália Garcia, Henderson Narciso e Dara Ferreira cujo apoio e amizade estiveram presentes em todos os momentos. Em especial agradeço a Bruna Almeida e Kelly Pedrozo, por todo o apoio, carinho, amizade e companheirismo, nos momentos de estudo e de tensão, principalmente na reta final deste trabalho. Em especial à Kelly Pedrozo, por sempre atender aos meus pedidos de socorro e por ter toda a paciência do mundo em me ensinar. Muito Obrigada!

Agradeço imensamente aos funcionários do Laboratório de Ginecologia Estrutural e Molecular – LIM 58, Marinalva de Almeida, Thiago Hideki e Juciara Silva por me acolheram com todo o carinho e por serem sempre tão prestativos, fazendo com que tudo funcionasse da melhor maneira possível.

Mais uma vez, meu muito obrigado a todos!

**“Nada na vida nada deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais,
para temer menos.”**

Marie Curie

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas.....	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas.....	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tumores de musculatura lisa do útero: Leiomiomas e Leiomiossarcomas	2
1.2 FOXO3a	8
1.3 Metformina e Genisteína como reguladores do FOXO3a.....	12
2 OBJETIVOS.....	24
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3 MÉTODOS.....	26
3.1 Linhagens celulares condições de cultivo	27
3.2 Autenticação das Linhagens utilizadas nos ensaios.....	27
3.3 Extração de RNA e Síntese de DNA complementar (cDNA)	28
3.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)	28
3.5 Extração de proteínas e reações de Western Blot	29
3.6 Silenciamento Gênico por RNA de Interferência (RNAi).....	30
3.7 Índice de Citotoxicidade (IC50) e tratamento das células com Genisteína e Metformina.....	32
3.8 Imunocitoquímica.....	33
3.9 Ensaio de Proliferação Celular.....	34
3.10 Ensaio de Migração Celular (<i>Scratch Assay</i>).....	34
3.11 Ensaio para avaliação das células apoptóticas.....	35
3.12 Análises estatísticas	35
4 RESULTADOS	36
4.1 Cultivo e autenticação das linhagens celulares utilizadas no presente estudo .	37
4.2 Reações de qRT-PCR e <i>Western Blot</i> para detecção da expressão basal de FOXO3a nas linhagens celulares.....	39
4.3 Inibição transiente de FOXO3 por siRNA e seus efeitos nas linhagens celulares	40
4.4 Tratamento das células com Metformina e Genisteína e seus efeitos nas linhagens celulares	47

5	DISCUSSÃO.....	60
6	CONCLUSÕES.....	66
7	ANEXOS.....	68
8	REFERÊNCIAS	71

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

°C	Graus Celsius
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i>
CO₂	Dióxido de Carbono
CT	<i>Cycle Treshold</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ECL	Extracelular <i>Loop</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i>
FoxO3a	Forkhead Box Protein O3
g	gramas
GAPDH	gliceroaldeído 3-fosfato desidrogenase
h	hora
HPRT	hipoxantina-guanina fosforibosil transferase
IARC	<i>International Agency for Research</i>
IIQ	Imunoistoquímica
kDa	Kilodalton
LM	Leiomioma
LMs	Leiomiomas
LMS	Leiomiossarcoma
LMSs	Leiomiossarcomas
M	Molar
mg	miligrama
ml	mililitros
MM	Miométrio
mM	milimolar
μM	micromolar

mm²	milímetros quadrados
mRNA	RNA mensageiro
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
ng	nanogramas
nm	nanometro
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Padrão
PBS	<i>Phosphate-buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial Hidrogênico
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Real Time - Polymerase Chain Reaction</i>
R²	Regressão Linear
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	RNA de Interferência
RQ	<i>Relative Quantification</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate - Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
WB	<i>Western Blot</i>
X	Veze
β2M	Beta-2-microglobulina
μg	Micrograma
μL	Microlitro

Lista de figuras

Figura 1 – Classificação dos leiomiomas uterinos de acordo suas localizações neste órgão.....	3
Figura 2 – Aspectos macroscópicos, microscópicos e comportamentais dos leiomiomas e leiomiossarcomas no corpo do útero.....	5
Figura 3 – Mecanismo de ação do FoxO3a nos processos celulares.....	9
Figura 4 – Interação de FOXO com outros fatores transcricionais	10
Figura 5 – Alvos preditos <i>in silico</i> para a Metformina e agentes correlatos na terapêutica contra diferentes tipos de câncer.....	14
Figura 6 – Mecanismo de ação proposto para a Metformina na ativação de FOXO3a	16
Figura 7 – Estruturas químicas do 17 β -estradiol (A) e da Genisteína (B).....	18
Figura 8 – Alvos preditos <i>in silico</i> para a Genisteína e agentes correlatos na terapêutica contra diferentes tipos de câncer.....	20
Figura 9 – Mecanismo de ação proposto para a Genisteína na ativação de FOXO3a	22
Figura 10 – Fluxograma apresentando as dúvidas e hipóteses que levaram ao desenho do presente estudo.....	23
Figura 11 – Fotomicrografias das linhagens celulares de miométrio (MM), leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS).....	37
Figura 12 – Perfil genético obtido para a linhagem celular e CRL-4003 (leiomioma) por Short Tandem Repeat (STR).....	38
Figura 13 – Perfil genético obtido para a linhagem celular e CRL-4003 (leiomioma) por Short Tandem Repeat (STR).....	38
Figura 14 – Expressão gênica e proteica de FOXO3a nas linhagens celulares..	40

Figura 15 – Expressão relativa em porcentagem de <i>FOXO3a</i> em LM com diferentes tratamentos após 24, 48 e 72 horas da transfecção.	41
Figura 16 – Expressão relativa em porcentagem de <i>FOXO3a</i> em LMS com diferentes tratamentos após 24, 48 e 72 horas da transfecção.	41
Figura 17 – Fotomicrografias representativas das reações de imunocitoquímica (ICQ) para avaliação qualitativa da presença de <i>FOXO3a</i> nas células de LM nos grupos: Controle (sem tratamento - Meio), Controle Negativo (tratado com o EGFP) e tratado com siRNA (<i>FOXO-N</i> e <i>-P</i>).	42
Figura 18 – Fotomicrografias representativas das reações de imunocitoquímica (ICQ) para avaliação qualitativa da presença de <i>FOXO3a</i> nas células de LMS nos grupos: Controle (sem tratamento - Meio), Controle Negativo (tratado com o EGFP) e tratado com siRNA (<i>FOXO-N</i> e <i>-P</i>).	43
Figura 19 – Gráfico apresentando o perfil proliferativo das células de leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) com e sem tratamento.	44
Figura 20 – Perfil migratório das células de Leiomioma após transfecção..	45
Figura 21 – Perfil migratório das células de Leiomiossarcoma após transfecção.....	46
Figura 22 – Gráfico apresentando o perfil de inibição do crescimento das células de leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) durante o teste de IC50.	47
Figura 23 – Gráfico apresentando o perfil de proliferação das células de leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) após tratamento.	48
Figura 24 – Fotomicrografias representativas do perfil de migração das células de leiomioma (LM) com Genisteína e Metformina, com as doses pré-estabelecidas no IC50, e seus veículos, respectivamente DMSO e água	49

Figura 25 – Fotomicrografias representativas do perfil de migração das células de leiomiossarcoma (LMS) com Genisteína e Metformina, com as doses pré-estabelecidas no IC50, e seus veículos, respectivamente DMSO e água.....	50
Figura 26 – Controles negativo e positivo para as reações de detecção de células apoptóticas..	53
Figura 27 – Perfil apoptótico das células de leiomiomas (LM) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Genisteína e veículo..	54
Figura 28 – Perfil apoptótico das células de leiomiomas (LM) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Metformina e veículo.	55
Figura 29 – Controles negativo e positivo para as reações de detecção de células apoptóticas..	56
Figura 30 – Perfil apoptótico das células de leiomiossarcomas (LMS) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Genisteína e veículo..	57
Figura 31 – Perfil apoptótico das células de leiomiossarcomas (LMS) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Metformina e veículo..	58

Lista de tabelas

Tabela 1 – Preparação das misturas para reação de siRNA, quantidade de células e tipo de placas utilizados.....	31
Tabela 2 – Características dos anticorpos e diluições utilizadas nas reações de imunocitoquímica (IIQ).....	34
Tabela 3 – Porcentagem de área migrada pelas células de leiomioma após tratamento com as drogas em diferentes tempos (h)	51
Tabela 4 – Porcentagem de área migrada pelas células de leiomiossarcoma após tratamento com as drogas em diferentes tempos (h)	52
Tabela 5 – Verificação da proporção de células vivas e mortas ao final do tratamento (72h) com as drogas, em espectrofotometro (Countess, Invitrogen)	59

Resumo

RICCI AR. FOXO3a em leiomioma e leiomiossarcoma uterinos: avaliação de seu potencial para terapia alvo *in vitro* [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Os tumores de musculatura lisa do útero se desenvolvem a partir do miométrio e podem apresentar características clínicas malignas e benignas. Dentre eles, o leiomiossarcoma (LMS) é o tumor maligno mais comum, com altas taxas de metástase e recidiva, mesmo sendo diagnosticado em estágios iniciais. Já os leiomiomas (LM) são os tumores benignos mais frequentes em mulheres em idade reprodutiva. Ambos possuem mesma diferenciação celular, porém com comportamentos clínico e biológico bastante distintos, e até o momento não se dispõe de tratamento específico ou curativo. Nesse contexto, a busca por novos alvos moleculares pode contribuir não só para um melhor entendimento dessas neoplasias, como também para a descoberta de novas terapias. Em estudo prévio foi observada a expressão aumentada de FOXO3a nos sarcomas uterinos, em comparação aos LMs e ao miométrio adjacente (MM). Além disso, sua expressão foi crescente de acordo com o potencial de malignidade do tumor. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar *in vitro* o efeito de terapia alvo específica para FOXO3a em células de LM e LMS. Para isto, linhagens celulares de MM (ATCC PCS-460-011), LM (THESCs - CRL-4003) e LMS (SK-UT-1 - HTB-114) foram caracterizadas quanto à expressão basal de FOXO3a (gene e proteína) e submetidas a tratamento com Genisteína e Metformina ou inativação do gene por siRNA. Os efeitos dos tratamentos foram avaliados por PCR em tempo real, *Western Blot*, imunocitoquímica, ensaios de proliferação, migração e apoptose. Nossos resultados mostraram que todos os tratamentos realizados interferiram na capacidade de proliferação e migração das células, com maior inibição após as 48 horas nos LMS e 72h nos LM. O efeito obtido na transfecção com siRNA apresentou maior eficiência após 48 h da transfecção nos LMS e 72h nos LM. Os efeitos da inibição de FOXO3a foram maiores na proliferação e migração dos LM, porém os resultados não foram estatisticamente significativos. Dentre as substâncias testadas, a Metformina apresentou maior efeito sobre a proliferação, migração e viabilidade das linhagens celulares. A Genisteína também apresentou efeito inibitório nas células, porém o controle com veículo também apresentou o mesmo efeito citotóxico. De modo geral, os efeitos obtidos com os fármacos, foram tempo e concentração dependentes. Em conjunto, nossos resultados sugerem um relevante do FOXO3a nos tumores de musculatura lisa uterinos, além de apresentá-lo como potencial alvo para terapia específica.

Descritores: leiomiossarcoma uterino; FOXO3a; Metformina; Genisteína.

Abstract

Ricci AR. FOXO3a in uterine leiomyoma and leiomyosarcoma: evaluation of its potential for targeted therapy in vitro [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Smooth muscle tumors of the uterus develop from the myometrium and may present benign and malignant clinical features. Among them, leiomyosarcoma (LMS) is the most frequent malignant tumor, with high rates of metastasis and relapse, even when diagnosed in early stages. On the other hand, leiomyomas (LM) are the most frequent benign tumors in women of reproductive age. Both have the same cellular differentiation, but with very different clinical and biological behaviors, and so far no specific or curative treatment is available. In this context, the search for new molecular targets can contribute not only for a better understanding of these neoplasms, but also for the discovery of new therapies. In a previous study, increased expression of FOXO3a in uterine sarcomas was observed, compared to LMs and adjacent myometrium (MM). In addition, its expression was increasing according to the malignancy potential of the tumor. Thus, the aim of the present study was to evaluate in vitro, the effect of specific targeted therapy for FOXO3a on LM and LMS cells. For this, MM (ATCC PCS-460-011), LM (THESCs-CRL-4003) and LMS (SK-UT-1-HTB-114) cell lines were characterized for basal expression of FOXO3a (gene and protein) and subsequently submitted to treatment with metformin and genistein, or silencing of FOXO3a by siRNA. The effects of the treatments were evaluated by real-time PCR, Western Blot, immunocytochemistry, proliferation, migration and apoptosis assays. Our results showed that all treatments interfered in the proliferation and migration capacity of the cells, with greater inhibition after 48 hours for LMS and 72 hours LM. The effect obtained in the transfection with siRNA showed higher efficiency after 48 hours of transfection in LMS and 72 hours in LM. The effects of inhibition of FOXO3a were greater in the proliferation and migration of the LM, but the results were not statistically significant. Among the substances tested, Metformin had a greater effect on proliferation, migration and viability of the cell lines. Genistein also had an inhibitory effect on the cells, but the control with the vehicle also presented the same cytotoxic effect. In general, the effects obtained with the drugs were time and concentration dependent. Together, our results suggest a relevant role of FOXO3a in uterine smooth muscle tumors, in addition to presenting it as a potential target for specific therapy.

Descriptors: uterine leiomyosarcoma; FOXO3a; metformin; genistein.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores de musculatura lisa do útero: Leiomiomas e Leiomiossarcomas

Os tumores de músculo liso são tumores que se desenvolvem à partir do miométrio uterino, sendo considerados um grupo essencialmente dicotômico composto de tumores benignos e malignos (Miettinen, 2014).

Os tumores benignos que surgem das células de músculo liso do miométrio são chamados de leiomiomas (LMs), sendo o tipo de tumor mais comum do trato ginecológico. Os mecanismos que podem contribuir para o desenvolvimento de LMs ainda não são totalmente compreendidos. Estrogênios e possivelmente contraceptivos orais, estimulam o crescimento desses tumores que regredem em mulheres menopausadas (Kumar et al., 2017).

Os LMs são tipicamente massas brancas acinzentadas, firmes e circunscritas. São envoltos por uma fina pseudocápsula de tecido areolar e fibras musculares comprimidas. Os LMs são comumente descritos de acordo com sua localização (Figura 1). Os *intramurais* desenvolvem-se dentro da parede uterina e podem ser grandes o suficiente a ponto de distorcer esta cavidade e a superfície serosa. Os *submucosos* derivam de células miometriais localizadas imediatamente abaixo do endométrio, e frequentemente crescem para a cavidade uterina. Os *subserosos* originam-se na superfície serosa do útero e podem ter uma base ampla ou pedunculada e ser intraligamentares. Os *cervicais* estão localizados no cérvix uterino (ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology, 2001). Estes tumores podem ocorrer isoladamente, mas frequentemente ocorrem como múltiplos tumores espalhados pelo útero, variando de pequenos nódulos a grandes tumores. No exame histológico, estes tumores são caracterizados por feixes de células musculares lisas imitando o aparecimento de miométrio normal. Focos de fibrose, calcificação e degeneração podem estar presentes (ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology, 2001).

Fonte: <https://www.minhavidade.com.br/saude/temas/mioma-uterino>.

Figura 1 – Classificação dos leiomiomas uterinos de acordo suas localizações neste órgão

Supõe-se que esses tumores provenham de uma única célula mesenquimal geneticamente alterada, sob a influência de hormônios gonadais, como a progesterona e o 17β -estradiol (ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology, 2001).

Dados epidemiológicos relatam que os LMs são praticamente inexistentes antes da menarca, e tipicamente têm um curso indolente após a menopausa, reforçando que, os hormônios gonadais estão implicados fortemente na indução e manutenção do processo tumoral (McWilliams; Chennathukuzhi, 2017).

Esses tumores são encontrados em 70% das mulheres de descendência européia, e em mais de 80% das mulheres de ascendência africana em idade reprodutiva (Cramer; Patel, 1990; Baird et al., 2003). Além disso, outros fatores de risco para o desenvolvimento dos LMs incluem aumento da idade, nuliparidade, obesidade, pré-menopausa, histórico pessoal de hipertensão, histórico familiar, tempo desde o último parto e consumo de aditivos alimentares (Baird et al., 2003; Stewart et al., 2017).

Há sintomas característicos, dependendo da localização do tumor dentro do corpo uterino, ou seja, se o tumor é *submucoso*, *intramural* ou *subseroso*. Por exemplo, o leiomioma que distorce a cavidade uterina (submucoso e intramural), frequentemente produz sangramento uterino anormal, sangramento menstrual intenso e / ou sangramento intermenstrual na presença, ou, ausência de dismenorréia. Esses tumores que distorcem a cavidade uterina estão frequentemente implicados na anemia (decorrente de hemorragia) e na infertilidade. Se uma determinada paciente for capaz de engravidar com um leiomioma impactando a cavidade uterina, ela terá maior probabilidade de apresentar eventos adversos na gravidez, incluindo aborto recorrente, placentação anormal (ex: placenta prévia), má apresentação fetal, parto prematuro, cesariana e hemorragia pós-parto (Klatsky et al., 2008; Parazzini et al., 2016).

Os subtipos intramurais e subserosos estão mais frequentemente associados à pressão e dor pélvica, dispareunia, constipação crônica e incontinência urinária (Klatsky et al., 2008).

A cirurgia ainda é o tratamento padrão ouro e quase um terço de todas as histerectomias nos Estados Unidos é realizado para aliviar os sintomas causados por esses tumores (Myers et al., 2002). No Brasil, representam a maior causa de indicação de histerectomias, por sintomas que vão desde dor e sangramento à infertilidade. Alternativas não invasivas para o manejo clínico de LMs uterinos permanecem limitadas.

As neoplasias malignas que surgem em tecidos mesenquimais ou seus derivados, são denominadas sarcomas. Os sarcomas são tumores bastante raros, e são designados com base em sua composição celular, que supostamente reflete sua célula de origem. Portanto, um sarcoma composto exclusivamente por células de músculo liso, é denominado **leiomiossarcoma** (Kumar et al., 2017).

Ao contrário do LM que é uma neoplasia muito frequente, o leiomiossarcoma (LMS) é um tumor raro, e é reportado como sendo 0,1% dos tumores presumidos como LMs (Figura 2). É necessário ressaltar, que o

diagnóstico de certeza LMS é pós-cirúrgico, na grande maioria das vezes, após uma cirurgia de miomectomia ou histerectomia (Rodriguez et al., 2016).

Ainda em relação aos tumores malignos do corpo do útero, sua incidência mundial anual é de 319.605 (4,8%), com mortalidade de 76.155, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (International Agency for Research on Cancer, 2018). Dentre estes tumores, o leiomiossarcoma (LMS) representa aproximadamente 1% de todas as malignidades do útero, sendo o subtipo histológico mais comum de sarcoma uterino. Corresponde a quase 70% de todos os sarcomas de útero e contribui para uma proporção considerável de mortes por câncer neste órgão (Ricci et al., 2017). Apresenta comportamento agressivo, com etiologia e patogênese desconhecidas, com disseminação pela via hematogênica, atingindo principalmente os pulmões e fígado (Novetsky; Powell, 2013).

Fonte: <http://estudodeenfermagem.blogspot.com/2012/06/apoptose-e-neoplasia.html>.

Figura 2 – Aspectos macroscópicos, microscópicos e comportamentais dos leiomiomas e leiomiossarcomas no corpo do útero

Geralmente acomete mulheres com idade superior a 50 anos, mas alguns estudos referem uma taxa crescente em mulheres em idade reprodutiva (Nishigaya et al., 2018).

Os sintomas do LMS apresentam-se como intenso sangramento vaginal (56%), massa pélvica palpável (54%) e dor pélvica (22%) (D'Angelo; Prat, 2010). São tumores de crescimento carnosos com áreas de hemorragia e necrose (DeVita et al., 2011). Outra característica do LMS é o aumento do volume uterino em mulheres na menopausa que não estão em terapia de reposição hormonal (D'Angelo; Prat, 2010).

Com características biológicas ainda não elucidadas, a taxa de sobrevida global em 5 anos para o LMS é de apenas 20% (Park et al., 2017). O tratamento cirúrgico, ainda é a base da terapêutica padrão ouro para o LMS, no entanto, em torno de 50-75% das pacientes submetidas a cirurgia apresentam recidiva e/ou metástase (Zang et al., 2018). A quimioterapia e radioterapia adjuvantes têm efeito mínimo na melhora da sobrevida das mulheres acometidas por este tipo de tumor (Ducie; Leita, 2016). Mesmo quando diagnosticado em fase inicial, os LMSs apresentam um prognóstico ruim, e o estadiamento cirúrgico parece não exercer um papel tão expressivo, devido à disseminação hematogênica frequente (Mayerhofer et al., 1999).

Devido às suas características de agressividade e relativa quimiorresistência, terapias eficazes para aumentar a sobrevida, ou mesmo uma cura para as pacientes, ainda não foram encontradas. Além disso, há outro fator complicador no manejo do LMS uterino, uma vez que representa um desafio no diagnóstico pré-operatório por mimetizar na aparência e nos sintomas os LMs (Ricci et al., 2017).

Apesar de ser um tumor raro, o LMS desperta grande interesse nos pesquisadores por vários motivos. Esses tumores possuem diversas características morfológicas e clínicas, são poucos os agentes quimioterápicos razoavelmente eficazes, e apresentam altas taxas de toxicidade. Outro ponto a ser lembrado, é que este tipo de neoplasia apresenta baixa resposta à radioterapia. Todos estes fatores levam às altas taxas de mortalidade e morbidade como mencionado previamente (Amant et al., 2009).

O conhecimento da biologia do tumor constitui a base para delinear formas de tratamento específico/alvo, que atualmente estão sob investigação (Amant et al., 2009). Ainda há muito a ser pesquisado sobre o tema, uma vez

que até o momento, não há adjuvantes de terapia que possam verdadeiramente alterar o curso natural da doença (Ducie; Leitao, 2016). No entanto, poucos são os trabalhos encontrados quanto à etiologia dos sarcomas uterinos. Em relação às suas características moleculares, foram observadas algumas mutações e hiperexpressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular. Os fatores genéticos parecem desempenhar papel importante, já que a incidência dos sarcomas, em geral, é duas vezes maior em mulheres negras (Toro et al., 2006).

Diante deste cenário, há uma enorme necessidade, e urgência, de se estabelecer terapias direcionadas para melhores resultados clínicos e tolerabilidade no tratamento do leiomiossarcoma (Cassier et al., 2014).

As terapias alvo tem se desenvolvido rapidamente nos últimos anos, e podem ser um campo promissor no tratamento do LMS, dentro da busca de um tratamento eficaz contra este sarcoma. Até o momento, não há um alvo molecular específico para o tratamento dos LMSs.

Nesse sentido, sabe-se que o câncer é uma doença de base genética, isto é, é causada por alterações nos genes que controlam a maneira como as células funcionam, especialmente o modo como estas crescem e se dividem, ou seja, é uma doença iniciada e guiada por aberrações nos padrões de expressão gênica (Yeh et al., 2013).

Os fatores de transcrição são moléculas que leem e interpretam o "plano" genético no DNA. Ligam-se ao DNA e ajudam a iniciar um programa de aumento ou diminuição da transcrição gênica. Dito isto, os fatores de transcrição como os reguladores finais da expressão gênica, são alvos lógicos para eliminação seletiva de células cancerígenas e/ou sensibilização das mesmas para terapias já existentes (Yeh et al., 2013).

Em biologia molecular, um fator de transcrição, é uma proteína que controla a taxa de transcrição de informação genética do DNA para o RNA mensageiro, por ligação a uma sequência específica de DNA (Latchman, 1997). Essas proteínas são polipeptídeos que se ligam a sequências de DNA específicas e regulam (negativamente e positivamente) a taxa de transcrição de informações genéticas. Os fatores de transcrição atuam em grandes

complexos, cada vez mais reconhecidos por sua heterogeneidade e excelente variabilidade funcional. A transcrição é o passo chave no uso da informação de um gene para fazer uma proteína, e os fatores de transcrição ajudam a garantir que esses genes sejam expressos (Latchman, 1997).

Em função dos fatores de transcrição estarem envolvidos no desenvolvimento, sinalização, e ciclo celular, algumas patologias têm sido associadas a estes. Os papéis dessas moléculas estão comumente desregulados no câncer, e muitas neoplasias são causadas por essa desregulação (Lee; Young, 2013).

Estas proteínas usam uma variedade de mecanismos para a regulação da expressão gênica (Gill, 2001), e a regulação da transcrição gênica é fundamental, tanto para a expressão de gene específico, quanto para a regulação da atividade do gene em resposta a estímulos específicos (Latchman, 1996). Assim, embora existam alguns casos de regulação pós-transcrição, na maioria dos casos a regulação ocorre ao nível da transcrição, decidindo quais genes serão transcritos. Uma vez que isso tenha ocorrido, os estágios remanescentes da expressão gênica, como o *splicing* de RNA, ocorrem automaticamente e resultam na produção da proteína correspondente (Davidson et al., 1983).

Uma dessas classes de fatores de transcrição, que pode servir como um alvo para a modulação do câncer, é a família FOXO que será descrita a seguir.

1.2 FOXO3a

A família de fatores de transcrição FOXO regula a expressão de genes em eventos fisiológicos celulares, incluindo apoptose, controle do ciclo celular, metabolismo da glicose, resistência ao estresse oxidativo e longevidade (Figura 3). Um mecanismo regulador central das proteínas FOXO é a fosforilação pela serina-treonina quinase Akt/proteína quinase B (Akt/PKB), *downstream* da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), em resposta à insulina ou a vários fatores de crescimento. A fosforilação em três resíduos conservados resulta na exportação de proteínas FOXO do núcleo para o citoplasma, diminuindo assim

a expressão de seus genes alvo. Em contraste, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), após estímulos de estresse oxidativo e nutricional, fosforilam e ativam o FOXO. Além de AKT/PKB e AMPK, os FOXOs são regulados por múltiplos mecanismos, incluindo a fosforilação, mas também acetilação, metilação e ubiquitinação (Gomes et al., 2008; Vurusaner et al., 2012).

As proteínas FOXO (FOXO1, FOXO3a, FOXO4 e FOXO6) são uma subfamília de fatores de transcrição denominada *Forkhead* que estão envolvidas em vários processos celulares, incluindo a supressão de tumores, inativando a proliferação de células anormais, reparando danos no DNA e induzindo a apoptose (Maiese et al., 2008) (Figura 4).

A expressão de membros específicos dessa família varia entre diferentes tecidos e é regulada de maneira espaço-temporal durante vários estágios de desenvolvimento (Yadav et al., 2018).

Fonte: Adaptado de: Kim e Webb, 2017.

Figura 3 – Mecanismo de ação do FoxO3a nos processos celulares

Embora todos os quatro fatores de transcrição FOXO compartilhem os mesmos motivos de ligação ao DNA (Obsil; Obsilova, 2011) e pareçam ter funções coincidentes, os animais nocautes para os diferentes membros desta família apresentaram efeitos díspares (Arden, 2008). Dentro da família FOXO, o FOXO3a é o fator de transcrição cuja regulação da expressão já foi associada ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer. Resultados mostram que camundongos nocautes para FOXO3 sofrem de inflamação nos órgãos, resultante do desenvolvimento comprometido de células T reguladoras (Harada et al., 2010; Kerdiles et al., 2010).

Fonte: Modificado de: Calnan e Brunet, 2008.

Figura 4 – Interação de FOXO com outros fatores transcricionais

Em cultura de células de neuroblastoma, a ativação de FOXO3 desencadeou a via de morte intrínseca e induziu a morte celular programada (Obexer et al., 2007). Além disso, o FOXO3 reprimiu a proteína survivina, inibidora da apoptose (Guha et al., 2009; Obexer et al., 2009). Também já foram realizados vários trabalhos sobre a inativação do FOXO3a, associando este evento à formação de tumores como o câncer de mama, câncer de próstata, glioblastoma, rabdomiossarcoma e leucemia (Yang; Hung, 2009).

De modo geral, evidências são contundentes quanto a relação entre perda de regulação da função das proteínas FOXO com a tumorigênese e progressão tumoral (Myatt; Lam, 2007; Ho et al., 2008).

Em contrapartida, foi mostrado que além de sua função como supressor tumoral, o FOXO3 nuclear também pode promover a sobrevivência de células tumorais. Em leucemia mielóide crônica (LMC), a inibição ou bloqueio de TGF β -FOXO3a levou a redução significativa da população de células iniciadoras da leucemia (Naka et al., 2010). Os autores mostraram que uma combinação de inibição de TGF- β , deficiência de FOXO3a e tratamento com Imatinib induz a depleção eficiente de LMC *in vivo*. Em outro trabalho, observou-se um novo mecanismo contribuindo para a resistência a múltiplas drogas, envolvendo a FOXO3a como sensor para o estresse citotóxico induzido pelas terapias anticâncer. Nele, foi observado que a ativação sustentada de FOXO3a promove resistência e sobrevida das células via ativação da expressão de ABCB1 (Hui et al., 2008). Em fibroblastos, bem como em células de câncer de mama, FOXO3a inibiu a apoptose induzida por HIF1 via CITED2, resultando na expressão reduzida de NAP1 e RTP801 (pró-apoptóticos). Assim, FOXO3a desempenha um papel importante na resposta de sobrevivência das células normais e do câncer em resposta ao estresse hipóxico (Bakker et al., 2007). Em glioblastomas, foi observado que a alta expressão de FOXO3a está associada à progressão tumoral e que FOXO3a indica pior prognóstico para os pacientes. Os autores propõem que FOXO3a pode ser um novo biomarcador para prognóstico ou potencial alvo terapêutico no glioblastoma (Qian et al., 2017).

Devido a sua notável diversidade molecular, os fatores de transcrição, como impulsionadores da transformação celular, exercem um lugar de protagonismo como potenciais alvos terapêuticos para drogas voltadas para a modulação dos processos oncogênicos subjacentes aos cânceres (Yeh et al., 2013). Aproximadamente 10% dos medicamentos prescritos atualmente, tem como alvo direto a classe de receptores nucleares de fatores de transcrição (Overington et al., 2006). No que diz respeito ao FOXO3a, tanto a Metformina quanto a Genisteína já foram avaliadas quanto aos seus efeitos indutores da

parada do ciclo celular e da apoptose mediadas por este fator de transcrição (Kikuno et al., 2008; Queiroz et al., 2014). Alguns aspectos relevantes sobre essas duas moléculas serão abordados no item a seguir.

1.3 Metformina e Genisteína como reguladores do FOXO3a

A Metformina é um derivado da guanidina, um medicamento amplamente empregado para o tratamento do diabetes do tipo 2. Esse composto reduz os níveis de insulina, inibindo a gliconeogênese hepática através da ativação da AMPK (*AMP-activated protein kinase*). Como efeito, a Metformina aumenta a sensibilidade à insulina e a utilização da glicose pelo músculo esquelético e tecido adiposo, resultando em níveis diminuídos de glicose no sangue e consequentemente a diminuição da glicogênese no organismo (Witters, 2001).

Trabalhos sugerem que o mecanismo de ação da Metformina envolve a regulação negativa do eixo do fator insulina/fator de crescimento semelhante à insulina, mecanismo observado em diabéticos tipo 2 (Wysocki; Wierusz-Wysocka, 2010). No entanto, evidências experimentais mais recentes se concentraram na capacidade desta biguanida de ativar AMPK através do supressor tumoral LKB1 (Shaw et al., 2005), uma quinase, cuja inativação leva à síndrome de Peutz-Jeghers, uma condição genética caracterizada por pólipos colorretais e predisposição a tumores malignos em vários tecidos (Huang; Erdman, 2009). A ativação da AMPK, o sensor de energia das células, resulta no aumento do metabolismo oxidativo e redução do anabolismo - redução da síntese de lipídios, síntese de proteínas, entre outros (Luo et al., 2010). Além dos efeitos diretos da fosforilação em alvos metabólicos chave, como acetil-CoA carboxilase (ACC - envolvida na síntese de ácidos graxos) e fosfofructoquinase 2 (PFK2 - regulador principal da glicólise) (Cao et al., 2009), a ativação da AMPK também leva à inibição do alvo mTOR (*mammalian target of rapamycin*) (Kimura et al., 2003). Este por sua vez, pode diminuir a sinalização através de Akt e reduzir a eficiência da síntese proteica por

fosforilação de alvos mTOR, essenciais no mecanismo de tradução (Han et al., 2006; Zakikhani et al., 2010).

A ação molecular anti-câncer da Metformina proposta atualmente está associada principalmente com a inibição do alvo da Rapamicina (mTOR) (Algire et al., 2008; Berstein et al., 2011). A via mTOR desempenha um papel essencial no metabolismo, crescimento e proliferação de células de câncer (Chiang; Abraham, 2007).

Resultados de vários estudos indicam que indivíduos com diabetes (principalmente do tipo 2), apresentam risco substancialmente elevado de desenvolver câncer de pâncreas, fígado, endométrio, mama, cólon, reto e bexiga em comparação com indivíduos sem a doença. Em contrapartida, pacientes que fazem uso da Metformina na terapia contra o diabetes, apresentam uma menor incidência de câncer quando comparados aos que não fazem o uso deste medicamento (Smith; Gale, 2010).

A primeira evidência da potencial utilidade antineoplásica das biguanidas foi relatado por Dilman e Anisimov em 1979, quando demonstraram que a fenformina potencializava a efeito antitumoral da Ciclofosfamida em pacientes. Os autores também observaram em um estudo paralelo que a Fenformina inibia a carcinogênese espontânea em camundongos (Dilman; Anisimov, 1980), sugerindo que além das propriedades quimiossensibilizantes, as biguanidas possuiriam atividades quimiopreventivas. Um suporte adicional para essa atividade quimiopreventiva foi relatado em 2001, quando foi demonstrado que a Metformina inibiu a formação de adenocarcinoma pancreático em hamsters (Schneider et al., 2001). Posteriormente, em 2005, Anisimov relatou que administração de Metformina a ratas, reduziu significativamente o número e tamanho de adenocarcinomas mamários HER-2-positivos, sugerindo que a Metformina também pode antagonizar a formação de tumor dirigida por oncogene. Neste mesmo ano, um grupo da Universidade de Dundee foi o primeiro a relatar em um estudo retrospectivo caso-controle de pacientes diabéticos do tipo 2, em que a terapia com Metformina foi associada com um risco significativamente reduzido de desenvolvimento de todos os tipos de cânceres (Evans et al., 2005).

Estudo *in vitro* realizado por Zakikhani et al. em 2006 observou que a Metformina poderia antagonizar o crescimento de células de câncer de mama através da sinalização por AMPK (proteína quinase ativada por adenosina monofosfato). Já em 2007, foi relatado que este agente induziu a parada do ciclo celular e apoptose dependente de mitocôndrias em células de glioma, ambos os eventos mediados em parte por AMPK (Isakovic et al., 2007). Na Figura 5 podem ser observadas as interações entre a Metformina e outras duas substâncias correlatas, a Naringenina e o Disulfiram, em vários tipos de tumores e os alvos relacionados (Fang et al., 2017).

Diante destas evidências clínicas e experimentais, um editorial no *Journal of Clinical Oncology* publicado por Pamela Goodwin em 2009, propôs o uso de Metformina no tratamento adjuvante do câncer de mama (Goodwin et al., 2009). A autora cita, principalmente, a capacidade do fármaco em reduzir a hiperinsulinemia (Goodwin et al., 2008) que seria um fator de pior prognóstico para recorrência tumoral (Goodwin et al., 2002).

Fonte: Fang et al., 2017.

Figura 5 – Alvos preditos *in silico* para a Metformina e agentes correlatos na terapêutica contra diferentes tipos de câncer

A primeira evidência da segurança e eficácia da Metformina, como adjuvante no tratamento do câncer de mama, foi relatado pelo grupo de oncologia de mama do MD *Anderson Cancer Center* em um estudo retrospectivo. Foram incluídos: 68 pacientes diabéticos em uso de Metformina, 87 pacientes diabéticos que não faziam uso de Metformina e 2.374 pacientes não diabéticos (Jiralerspong et al., 2009). Os resultados mostraram que pacientes diabéticos com câncer de mama recebendo Metformina e terapia neoadjuvante, apresentaram maior taxa de resposta que pacientes diabéticos sem o tratamento. Ressaltando que o uso de Metformina não foi associado com efeitos adversos em pacientes com câncer recebendo quimioterapia.

Evidências *in vitro* mais recentes sugerem que a Metformina pode antagonizar o crescimento de células iniciadoras de câncer de mama resistentes à quimioterapia (Vazquez-Martin et al., 2011). Dado que indica o potencial uso do medicamento no tratamento de pacientes recidivantes e refratárias deste tumor.

Outro estudo evidencia a importância clínica da Metformina como tratamento do carcinoma endometrial de estágio I. Os autores relatam que o tratamento com esta droga, em combinação com agentes hormonais em mulheres jovens com perfil bem definido, resulta em remissão completa da doença, após tratamento de 6 meses e dois anos de acompanhamento (Stanosz, 2009).

Em suma, os resultados citados sugerem que a Metformina pode antagonizar o aparecimento do câncer, melhorar os resultados das estratégias terapêuticas tradicionais e inibir diretamente o crescimento de células tumorais. Adicionalmente, sendo a Metformina um fármaco relativamente seguro, com índices de toxicidades toleráveis e com farmacocinética relativamente conhecida, cada vez mais, surge interesse em seu potencial anti-neoplásico.

Vários trabalhos mostram a ação anti-neoplásica da Metformina associada ao FOXO3a. Dentre eles, Queiroz et al. (2014) mostraram que a Metformina teve efeito antiproliferativo associado à parada do ciclo celular e apoptose, mediada tanto pelo estresse oxidativo como pela ativação da AMPK e FOXO3a. Em células *HeLa* tratadas com agentes quimioterápicos, o acúmulo

de FOXO3A na mitocôndria promoveu a sobrevivência de maneira dependente de MEK/ERK, enquanto FOXO3A mitocondrial foi necessário para a indução de apoptose induzida pela Metformina (Celestini et al., 2018). Em associação com a Barberina, a Metformina potencializou a inibição de células de NSCLC (*non small cell lung cancer*), *in vitro* e *in vivo*, pelo aumento de FOXO3a mediado por MAPK (Zheng et al., 2018). No câncer de próstata, foi observado que o tratamento com Metformina induziu a expressão de FOXO3 pela inativação de ERK de modo dose dependente (Imada et al., 2017). Na Figura 6 é apresentado o mecanismo proposto de ação da Metformina na via de ativação do FOXO3a.

Fonte: Modificado de: Zhang et al., 2018.

Figura 6 – Mecanismo de ação proposto para a Metformina na ativação de FOXO3a

Já a Genisteína, a 4',5,7-tri-hidroxi-isoflavona (C₁₅H₁₀O₅), pertence a uma classe de isoflavonóides naturais multifuncionais, com um esqueleto de 15 carbonos. Semelhante a outros componentes vegetais que possuem efeito estrogênico, a Genisteína é um exemplo clássico de um composto fitoestrógeno. Ela foi isolada pela primeira vez da *Genista tinctoria* L. em 1899

e nomeada após o gênero desta planta ser caracterizado. Desde então, verificou-se que a Genisteína apresenta-se como o principal metabólito secundário das espécies *Trifolium* e em *Glycine max* L. (sinônimo Soja hispida) (Polkowski; Mazurek, 2000).

As isoflavonas são moléculas de baixo peso molecular com amplo espectro de atividades biológicas. São compostos bioativos e apresentam estrutura similar ao estradiol, o que justifica sua capacidade de comportar-se como o estrógeno. Como mostrado na (Figura 7), a estrutura química da Genisteína é semelhante ao estradiol, levando à sua capacidade de ligação com receptores de estrógeno. Possui uma alta solubilidade em solventes polares, embora sua solubilidade seja muito pequena em água. Embora a total síntese química da Genisteína tenha sido obtida em 1928, ela também pode ser obtida através de vários métodos biotecnológicos. No entanto, devido aos efeitos biológicos benéficos da Genisteína, muitos químicos tentam sintetizar vários novos derivados deste composto, buscando um melhor perfil farmacológico (Spagnuolo et al., 2015).

As isoflavonas são compostos químicos fenólicos, que estão amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo que suas concentrações são relativamente maiores nas leguminosas, e em particular na soja (Liggins et al., 2000). O grão de soja contém vários tipos de isoflavonas que se apresentam geralmente de duas formas: conjugada, os glicosídeos diadzina, genistina e glicetina, e na forma não conjugada, as agliconas daidzeína, Genisteína, e gliciteína. As formas conjugadas de isoflavona estão predominantemente presentes em produtos não fermentados, e por isso apresentam uma taxa de absorção intestinal, muito inferior às agliconas (Izumi et al., 2000).

Fonte: Modificado de: Seo et al., 2006.

Figura 7 – Estruturas químicas do 17 β -estradiol (A) e da Genisteína (B)

As agliconas podem ser absorvidas e/ou metabolizadas por bactérias intestinais e produzir metabolitos específicos, como o p-etinilfenol a partir da Genisteína. Inúmeras modificações ocorrem durante o curso de absorção dos flavonoides, por conjugação no intestino e mais tarde no fígado, por metilação, sulfatação e glucuronidação (Scalbert; Williamson, 2000). Por consequência, as principais formas de isoflavonas encontradas no sangue e nos tecidos, são diferentes daqueles presentes na dieta e podem apresentar considerável variação individual, uma vez que as reações do metabolismo são catalisadas por enzimas que apresentam polimorfismos genéticos e também são induzíveis pela dieta (Frankenfeld et al., 2004). As concentrações plasmáticas podem ter menor relevância do que níveis teciduais. Alguns estudos com humanos e animais mostraram que as concentrações de Genisteína em tecidos como mama, próstata, ovário, entre outros, pode exceder em varias vezes a concentração plasmática (Gardner et al., 2009).

O conceito de quimioprevenção pelo qual compostos naturais ou sintéticos podem prevenir, retardar ou reverter o desenvolvimento de cânceres, tem grande relevância clinica. É estimado pela *American Cancer Society* que 20% de todos os cânceres podem ser prevenidos pela modificação da dieta, manutenção de massa corporal e atividade física regular (American Cancer Society, 2018).

Os agentes candidatos a quimioprotetores podem ser classificados em dois grupos principais: agentes protetores e agentes supressores. Os agentes bloqueadores são inibidores da fase inicial da carcinogênese e incluem mecanismos como alterações transcricionais de enzimas metabolizadoras da fase I e fase II, atividade antioxidante, inibição da replicação celular e indução de reparo no DNA. Os agentes supressores são descritos especialmente como inibidores de promoção e progressão tumoral, e incluem mecanismos de supressão de crescimento celular e apoptose (De Flora; Ferguson, 2005).

A soja aparece neste contexto com elevado interesse dietético, apresentando propriedades biológicas suficientes para atrair a atenção de muitos pesquisadores para seus efeitos benéficos, dentre os quais destaca-se a prevenção de doenças crônicas. Em adição, ela é a única entre os alimentos comumente consumidos que contém entre 1-3mg/g de isoflavonas (Boersma et al., 2001), incluindo a Genisteína. Além de não ter efeitos colaterais, apresenta baixa toxicidade, tornando-a uma excelente candidata a agente quimiopreventivo. Os efeitos anti-cancerígenos dos flavonóides tem sido atribuídos a vários mecanismos, incluindo atividade estrogênica e antiestrogênica, inibição de crescimento celular, regulação do ciclo celular e apoptose, atividade antioxidante, inibição de angiogênese, regulação de vias de sinalização e modulação de atividade enzimática, que resulta no decréscimo de toxicidade (Moon et al., 2006). A Figura 9 apresenta as interações entre a Genisteína, o Resveratrol e o Canferol com diferentes alvos em vários tipos de tumores.

A extensa pesquisa sobre isoflavonas da soja, ao longo das últimas décadas concentrou-se em dois conjuntos de observação: investigações sobre os fatores responsáveis pela menor incidência de doenças crônicas, e a busca de agentes farmacológicos com potencial quimiopreventivo e quimioterapêutico. Em vários modelos experimentais, as isoflavonas exibem propriedades que sugerem a prevenção de doenças, tal como o câncer (Klein; King, 2007).

Figura 8 – Alvos preditos *in silico* para a Genisteína e agentes correlatos na terapêutica contra diferentes tipos de câncer

Os efeitos da Genisteína sobre o crescimento e proliferação, podem ser explicados em parte pela habilidade desta molécula em induzir apoptose e interromper o ciclo celular (Chodon et al., 2007).

Além disso, a Genisteína antagoniza as vias de sinalização mediadas por estrogênio e androgênio nos processos de carcinogênese (Russo et al., 2006). Esta substância apresenta efeitos agonista e antagonista estrogênicos dependendo de sua concentração. Em baixas concentrações e na ausência de estrógenos, a Genisteína promove proliferação celular agindo como um agonista em células intestinais positivas para receptor de estrógeno, enquanto que em concentrações mais altas inibe a proliferação celular (Chen; Donovan, 2004).

Há também evidências que mostram o efeito inibitório das isoflavonas sobre a carcinogênese mediado por regulação de várias vias de sinalização, incluindo a via PI3K/AKT (Wang et al., 2014). Foi demonstrado que a Genisteína inibe a ativação das vias de sinalização de NF- κ B e de Akt, ambas conhecidas por manter um equilíbrio homeostático entre a sobrevivência celular e apoptose (Davis et al., 2001).

Liang et al. (2012) demonstraram que a Genisteína, conjugada com Gencitabina, foi capaz de uma inibição significativa do crescimento e indução da apoptose em células de osteossarcoma. Os autores comprovaram que o efeito se deu por meio da regulação negativa da atividade de NF- κ B e ativação de Akt.

Em um estudo recente, foi demonstrado a capacidade da Genisteína de inibir significativamente a auto-renovação de células-tronco de câncer ovariano através de um mecanismo, em parte, dependente da ativação do FOXO3a (Ning et al., 2014). Em roedores, foi demonstrado que a exposição gestacional à Genisteína contribui para a hipospádia, alterando as vias de morfogênese tecidual, proliferação e sobrevivência celular. Em particular, genes nas vias de sinalização MAPK e TGF- β e aqueles controlados por fatores de transcrição FOXO, HOX e ER são interrompidos (Ross et al., 2011). Em hepatomas, a Genisteína em concentrações que não afetam IR/IGF1R, atenuou a fosforilação de Akt induzida por *Cooper íons*, modulando FOXO3a (Hamann et al., 2014).

Na Figura 6 pode ser observado o mecanismo de ação proposto para ativação de FOXO3a via Genisteína.

Fonte: Modificado de: Qi et al., 2011.

Figura 9 – Mecanismo de ação proposto para a Genisteína na ativação de FOXO3a

Por todos os motivos supracitados, e em razão da falta de agentes terapêuticos realmente eficazes contra os LMSs, faz-se necessário o estudo de novas substâncias visando uma terapia menos invasiva e que diminua o risco de recidivas, metástase e morte das pacientes. Desse modo, e com base nos resultados obtidos que obtivemos em estudo anterior (de Almeida TG, 2015), em que os tumores mesenquimais malignos do útero apresentaram maior expressão do FOXO3a, surgiu a idéia de avaliar melhor seu papel *in vitro*. Assim, propusemos-nos a avaliar os efeitos dos tratamentos com Metformina e Genisteína em células de leiomioma e leiomiossarcoma. Além disso, também foi analisado o efeito da inibição transiente dessa molécula nessas células. A Figura 10 descreve o fluxograma que resume as etapas e hipóteses que nos levaram à concepção do presente estudo.

Figura 10 – Fluxograma apresentando as dúvidas e hipóteses que levaram ao desenho do presente estudo.

2.1 Geral

Caracterizar o perfil de expressão do fator de transcrição FOXO3a em linhagens celulares de miométrio, leiomioma e leiomiossarcoma uterinos. Analisar os efeitos *in vitro* de sua inibição e indução *in vitro*.

2.2 Específicos

- Caracterizar as células de leiomiossarcoma, leiomioma e miométrio, quanto à expressão de FOXO3a, por qRT-PCR e *Western Blot*;
- Avaliar os efeitos do tratamento com Metformina e Genisteína, como agentes restauradores de função do FOXO3a, no comportamento celular;
- Aquilatar os efeitos do silenciamento do gene FOXO3a por RNAi nas células em cultura.

3.1 Linhagens Celulares Condições de Cultivo

Para os ensaios *in vitro* foram utilizadas três linhagens celulares distintas: *Primary Uterine Smooth Muscle Cells* (ATCC® PCS-460-011™), oriunda de miométrio normal; *T HESCs* (ATCC® CRL-4003™), proveniente de leiomioma; e *SK-UT-1* (ATCC® HTB-114™), derivada de leiomiossarcoma uterino grau III. As células permaneceram em nitrogênio líquido até o momento do uso. Todas as linhagens apresentam característica aderente de crescimento. As células foram cultivadas utilizando meios de cultura específicos. As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% CO₂. Os repiques das células eram feitos sempre que a confluência ultrapassava os 80%.

Para congelamento e armazenamento das células, foi utilizado SFB (Soro Fetal Bovino) + 20% DMSO (dimetilsulfóxido), contendo concentração ~1x10⁶ células/mL. O congelamento foi feito de modo gradual, assim, as células foram mantidas, primeiramente, em temperatura aproximada -20°C por 3 dias. Posteriormente, eram transferidas para -80°C, por mais 3 dias, e por fim para nitrogênio líquido por tempo indeterminado.

3.2 Autenticação das Linhagens Utilizadas nos Ensaios

Antes de iniciar os experimentos, foi feito um ensaio específico para autenticação das linhagens celulares. O ensaio consiste em comparar o perfil genético das células em uso com o perfil genético disponibilizado pelo banco de dados (ATCC – *American Type Culture Collection*). Para tanto, foi utilizado o kit *GenePrint 10 System* (Promega), que é capaz de caracterizar linhagens celulares com base em seu perfil de STR (*Short Tandem Repeat*). As reações seguiram as instruções do fabricante. A PCR foi realizada com o auxílio do equipamento *Veriti Thermal Cycler* (Thermo Fisher) e a análise de fragmentos no aparelho sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), calibrado previamente com a matriz padrão *PowerPlex® 4C Matrix Standard* (Promega).

Os resultados das análises de fragmentos foram comparados com o banco de dados do site da ATCC (www.atcc.org – *Cell Authentication Service*).

3.3 Extração de RNA e Síntese de DNA complementar (cDNA)

O RNA total das células foi extraído pelo método de Trizol® (Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante. A quantificação e pureza das amostras obtidas foram avaliadas em espectrofotômetro (NanoDrop, Thermoscientific) e a integridade dos RNAs foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (1%). Os RNAs foram mantidos a -80°C até o momento do uso.

A síntese do DNA complementar (cDNA), para análise da expressão gênica foi feita a partir de 2 µg do RNA total, utilizando o *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Life Technologies), segundo especificações do fabricante. A eficiência da síntese do cDNA e presença de contaminação por DNA genômico foram avaliadas através de PCR convencional, seguida por eletroforese em gel de agarose (2%). Os cDNAs foram mantidos em freezer a -20°C. As células de miométrio foram utilizadas somente como referência de expressão normal do FOXO3a, nos demais ensaios forma utilizadas somente as células de LM e LMS.

3.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qRT-PCR)

As reações de qRT-PCR foram realizadas no *aparelho 7500HT Real-Time PCR System* (Life Technologies), utilizando o sistema de detecção por sondas fluorescentes *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Life Technologies), seguindo as especificações do fabricante. Como iniciador da reação de polimerização foi utilizado o assay (conjunto de iniciadores e sondas) inventariado pela Life Technologies do Brasil, para o gene alvo do presente estudo (FOXO3 Hs00818121_m1). Como controles endógenos foram testados β -actina (Hs99999903_m1), B2M (β -2-microglobulina, Hs99999907_m1), GAPDH (gliceroaldeído 3-fosfato desidrogenase, Hs99999905_m1) e HPRT

(hipoxantina – guanina fosforibosil transferase, Hs99999909_m1). O melhor endógeno normalizador para os ensaios de qRT-PCR foi escolhido com auxílio do software algoritmo *NormFinder* (Department of Molecular Medicine, Aarhus University Hospital, Aarhus, Dinamarca: <http://moma.dk/normfinder-software>). A quantificação dos transcritos foi realizada pelo método do DDCT, utilizando os softwares *SDS 3.0* e *RQ manager LV2.0.6*.

Os perfis de expressão de *FOXO3a* foram avaliados antes e depois da dos tratamentos e da manipulação genética.

3.5 Extração de Proteínas e Reações de *Western Blot*

As proteínas foram extraídas com tampão RIPA (50mM Tris HCl; 150mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% desoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 5M EDTA, 1% Glicerol). Em seguida o SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida), ou eletroforese com agente desnaturante (*SDS* – Dodecil sulfato de sódio), foi realizado segundo a técnica descrita por Laemmli (1970). Para tanto foi utilizado gel de empilhamento contendo 4% de bisacrilamida/acrilamida em Tris 1M (pH 6,8) e 20% SDS, e gel de separação contendo 12% de bisacrilamida/acrilamida em Tris 1,5M (pH 8,8) e 20% SDS. As amostras, 30 µg, foram aquecidas a 97°C por 3 minutos, centrifugadas brevemente e aplicadas aos poços do gel. Em tampão de corrida 10X (144g Glicina, 30.3g Tris, 10g SDS, para 1 Litro de água destilada) a eletroforese foi realizada em média à 110 volts, por aproximadamente 2 horas. Ao final do processo, o gel foi imerso em solução corante (50mg Comassie blue R-250, 50mL metanol, 10mL ácido acético, 40mL água destilada) para análise do perfil protéico.

Para a técnica de *Western blot*, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Para tal procedimento, foi utilizado o sistema para transferência mini *Protein Trans Blot* (Bio-Rad). Antes de ser montado o sistema para a transferência, os filtros, a membrana, o gel e a esponja do sistema foram imersos em tampão de transferência 1X (14.4g Glicina, 3g Tris, 200mL Metanol, para volume final de 1 Litro em água destilada) por aproximadamente 3 minutos para que todos estivessem em

equilíbrio para a reação. A transferência ocorreu a 0,25 A (ou 100 V) por 1 hora. Ao final, a membrana foi corada com Ponceau s (0.1% Ponceau Red e 10% ácido acético) para verificar a eficiência da transferência. O bloqueio de sítios inespecíficos foi feito com leite desnatado a 5% diluído em PBS 1X + Tween 20%, por 1 hora, sob agitação constante em temperatura ambiente. Os anticorpos primários FOXO3a (anticorpo policlonal de coelho, ThermoFischer Scientific), e FOXO3a Fosforilado (anticorpo policlonal de coelho, LifeSpan BioSciences), foram ambos diluídos a 1:250 em PBS 1X. As membranas permaneceram incubadas com os anticorpos primários durante toda uma noite (~16 horas), a 4°C, sob agitação constante. No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes com PBS + Tween por 10 minutos. O anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase foi utilizado, na diluição de 1:750. Seguiu-se nova incubação, por 1 hora, sob agitação, em temperatura ambiente. Para revelação, foi utilizado o kit *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific), segundo especificações do fabricante.

3.6 Silenciamento Gênico por RNA de Interferência (RNAi)

No primeiro dia de experimento (pré-transfecção) as células foram plaqueadas, a partir de cultura mãe cultivadas em seus respectivos meios específicos. As quantidades de células necessárias para realização do ensaio estão indicadas na Tabela 1. Isso porque, dependendo do ensaio em questão, a quantidade de células varia, dependendo do tamanho da placa utilizada, e por consequência dos volumes de reagentes e densidade de células (placas de 96, 24 ou 6 poços). Lembrando que as células da cultura mãe estavam em fase de crescimento exponencial.

Ainda no segundo dia de experimento (dia da transfecção), foram preparados os mixes de diluição conforme indicado na Tabela 1, sempre de acordo com o tamanho do poço escolhido para o ensaio em questão. Foram adicionados os componentes do *Mix 1* (meio de cultura Opti-MEM® + Lipofectamina) em tubo estéril, homogeneizado e reservado. A outro tubo,

foram adicionados os componentes do *Mix 2* (meio de cultura Opti-MEM® + esiRNA), homogeneizado e reservado. O *Mix 3* foi composto pela mistura dos *mixes 1 e 2* na proporção de 1:1. Após homogeneização vigorosa, a mistura permaneceu à temperatura ambiente, por 10 minutos para que houvesse a formação das micelas lipídicas. Em seguida, a mistura foi adicionada aos poços das placas como apresentado na Tabela 1. Todas as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂ até o dia seguinte (3º dia de experimento).

No 3º dia (~16 horas após a transfecção), com o auxílio de um microscópio invertido, as células foram analisadas em relação à quantidade (crescimento), aderência e morte (células sobrenadantes). Foi adicionado um novo meio de cultivo padrão (suplementado com SFB), sem adição de antibióticos. As placas retornaram a estufa a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Nas horas seguintes do experimento (72 horas) não foi realizada a troca dos meios de cultura.

Após 24, 48 e 72 horas de transfecção, as células foram coletadas para avaliar a eficiência da transfecção.

Tabela 1 – Preparação das misturas para reação de siRNA, quantidade de células e tipo de placas utilizados

Item	COMPONENTE	96 poços	24 poços	6 poços
	Células Aderentes (por poço)	2×10^4	1×10^5	7×10^5
		VOLUMES PARA TRIPLICATA		VOLUME POR POÇO
MIX 1	Opti-MEM®	25 µL	75 µL	150 µL
	Lipofectamina® RNAiMAX	1,5 µL	4,5 µL	9 µL
MIX 2	Opti-MEM®	25 µL	75 µL	150 µL
	esiRNA (10 µM)	0,5 µL (5 pmol)	1,5 µL (15 pmol)	1,5 µL (15 pmol)
MIX 3	Mix 1	Todo o volume	Todo o volume	Todo o volume
	Mix 2	Todo o volume	Todo o volume	Todo o volume
	Incubação	Incubação	Incubação	Incubação
	MIX 3 na placa (gota à gota)	10 µL/poço	50 µL/poço	250 µL/poço
	esiRNA final	1 pmol/poço	5 pmol/poço	15 pmol/poço

3.7 Índice de Citotoxicidade (IC50) e Tratamento das Células com Genisteína e Metformina

As células de LM e LMS foram cultivadas em garrafas de cultura até uma confluência de 80-90%, sem antibióticos. Por seguinte, foi feito o plaqueamento das células (após contagem em câmara de Neubauer e/ou em aparelho *Countess* da Invitrogen) em placas de 96 poços, a uma densidade de 10^4 células por poço e 100 μ L de meio específico de cultivo.

Foram preparadas 5 placas, uma para cada horário a ser avaliado (0h, 24hs, 48hs, 72hs e 96 hs). As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ por 24 horas, para adesão completa e então tratadas com diferentes concentrações de Metformina (1, 10, 20, 50, 100, 200 mM) e Genisteína (1, 10, 20, 50, 100, 200 μ M). Decorridos os tempos de incubação com as drogas, as placas eram retiradas da estufa e eram adicionados 10% do reagente *Prestoblue* (Thermo Fisher) em meio de cultura. As placas permaneciam então por 3 horas em estufa a 37°C e em seguida eram lidas no equipamento *Glomax* Promega (535nm de excitação e 560nm de emissão). Os valores de fluorescência obtidos são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis que proliferam em cada poço.

Com exceção da placa de tempo 0 (zero), todas receberam reposição da droga a cada 24 h por 72 horas. Terminado o tempo de tratamento, as células voltaram a receber somente o meio de cultura.

Utilizando as medidas da absorbância (tempo zero (Tz), controle de crescimento (C) e os testes de crescimento com as diferentes concentrações de drogas (Ti), a porcentagem de crescimento foi calculada:

$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ para concentrações nas quais } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ para concentrações nas quais } Ti < Tz$$

O software GraphPad 5.0 foi utilizado para os cálculos, pelo método estatístico da curva de dose-resposta sigmoidal.

3.8 Imunocitoquímica

Para avaliar os efeitos do siRNA na expressão de FOXO3, foi realizado o ensaio de imunocitoquímica. Após o tratamento, as células foram transferidas para placas de 4 poços para adesão completa por 24hs em lamínula de vidro (10^4 células). Decorrido esse período o meio era retirado e o tapete de células era lavado com PBS 1X por 2 vezes (1 mL). Para fixação do tapete às laminas foram testados Metacan (500 uL) e Formaldeído tamponado (500 uL), com incubação a 8°C por até 30 min. Em seguida as lamínulas foram lavadas 3 vezes com água MilliQ (1mL) por 5 min. Procedeu-se então o bloqueio da peroxidase (com incubação por 2 vezes de 5 min. com H₂O₂) e novas lavagens. Para diminuir uma possível ligação inespecífica do anticorpo primário, foi feito o bloqueio de proteínas por 20 min. em PBS contendo 5% de BSA (albumina sérica bovina, MERCK). Imediatamente, sem lavar (só escorrer as lamínulas ou retirar o tampão com a pipeta), foi adicionado 1mL de PBS contendo 0,1% Triton X100 para permeabilizar as células (por 20 min. à temperatura ambiente). Novamente sem lavagens, foi retirado o excesso do tampão e adicionado o anticorpo primário (Tabela 2), com incubação por 1h a temperatura ambiente. Após essa incubação e entre todas as seguintes foram realizadas 3 lavagens com PBS, sem incubar. Após novas lavagens com PBS1X, foi adicionada a HRP-peroxidase (Polímero), com incubação por 20 minutos e novas lavagens.

A etapa de revelação, seguiu da seguinte maneira: As lamínulas foram cobertas por DAB (3,3 diaminobenzidina, *Dako*) 1:50, e então lavadas com água após incubação por no máximo 5 minutos. Na sequência as lamínulas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 10 minutos. Após lavagem para retirada do excesso de corante, foi realizada a diferenciação, desidratação, diafanização e montagem das lâminas com Entelan (Merck).

Para padronização das reações, e como controle positivo das reações, foram utilizadas células de câncer de mama (MCF7). Como controle negativo foi utilizada IgG inespecífica para bloqueio e/ou omissão do anticorpo primário,

ambos mostraram mesmo perfil de reatividade. As reações com os marcadores de interesse foram realizadas duas vezes e em duplicata.

Tabela 2 – Características dos anticorpos e diluições utilizadas nas reações de imunocitoquímica (IIQ)

Alvo	Marca	Fonte	Diluição
FOXO3a	ThermoFisher	Policlonal de Coelho	1:50
FOXO3a Fosforilado	Arigobio	Policlonal de Coelho	1:50

A expressão citoplasmática e nuclear de FOXO3a e FOXO3a fosforilado, foi interpretada por meio da coloração imunorreativa e caracterizada semiquantitativamente de acordo com a porcentagem de células positivas e sua intensidade de coloração.

3.9 Ensaio de Proliferação Celular

Para avaliar os efeitos dos tratamentos com as drogas e transfecção com siRNA no crescimento e viabilidade celular, foram semeadas 10^4 células por poço em placas de 96 poços e após a adesão total das células, por 24 horas, foram adicionadas as drogas nas concentrações pré-definidas nos ensaios de IC50 ou o siRNA. O tratamento com as drogas e RNAi foi realizado por até 72h e 24h, respectivamente, e as leituras efetuadas após 0, 24, 48, 72 e 96 h. Decorridos os tempos estabelecidos, eram adicionados 100 uL do reagente *Presto Blue* (Thermo Fisher Scientific), na concentração 1:10 por 2 horas em estufa à 37°C. As leituras foram feitas com auxílio do aparelho *GloMax* (Promega). As reações foram realizadas duas vezes, em quadruplicata.

3.10 Ensaio de Migração Celular (*Scratch Assay*)

Foram semeadas 10^5 células por poço em placas de 24 poços, após sua confluência total, foi feito um risco vertical (ensaio de *scratch*), utilizando uma

ponteira de 200ul. Nessa etapa, as células foram cultivadas sem soro fetal bovino para descartar o efeito da proliferação celular.

O tratamento com as drogas e RNAi foi realizado por 24 e 72 h, respectivamente. Depois disso foram feitas as “feridas” (método de *scratch*) nas placas nos tempos 0, 24, 48, 72, 96h. A cultura em todos os tempos foi mantida até o fechamento da “ferida”. Posteriormente, as áreas correspondentes foram avaliadas com o auxílio do *Software Image J*. A seleção das áreas foi manual e os dados foram apresentados em gráficos realizados no programa *Graph Pad Prism 5*.

Os ensaios foram realizados duas vezes e em triplicata para cada célula e condição testada.

3.11 Ensaio para Avaliação das Células Apoptóticas

Para avaliar se os tratamentos com Genisteína e Metformina induziram as células a entrarem em apoptose ou não, foi realizado o ensaio de incorporação da Anexina % (Millipore). Após os tempos determinados de incubação com as drogas as células foram coletadas das placas de 24 poços, contadas para a concentração de até 1×10^6 células/mL e ressuspensas de 200 uL de meio + solução de Anexina V (1:1). As células eram incubadas à temperatura ambiente, por até 30 minutos, e então procedia-se a leitura em aparelho *Muse* (Millipore). No ponto de 72 horas a leitura também foi realizada no aparelho *Countess* para avaliação da proporção de células vivas e mortas.

3.12 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do *software Prisma GraphPad 5.0*. Foram utilizados os testes de análise de variância (ANOVA) e o pós-teste de Dunn. Para as análises com duas variáveis foi utilizado o *Mann-Withney*.

4.1 Cultivo e autenticação das linhagens celulares utilizadas no presente estudo

A Figura 11 apresenta os perfis de crescimento e fenótipo das células nas condições de cultivo utilizadas. É necessário ressaltar que o material genético (DNA e RNA) e as proteínas, bem como todos os ensaios, utilizaram células que estavam em condições de crescimento exponencial e com viabilidade $\geq 95\%$.

Figura 11 – Fotomicrografias das linhagens celulares de miométrio (MM), leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS). As resoluções das imagens estão indicadas.

Para garantir a autenticidade das linhagens, antes de iniciarmos os ensaios, foram feitos testes para confirmar o perfil genético de cada uma delas. Por meio do banco de dados da ATCC (American Type Culture Collection), foi possível identificar a linhagem celular e a ausência de contaminação cruzada, bem como mutações decorrentes de repiques sucessivos. Os marcadores STR's específicos e seus alelos estão apresentados nas Figuras 12 e 13, bem como a compatibilidade (% match) das linhagens CRL-4003 e HTB-114 com o banco de dados da ATCC.

A LEIOMIOMA - CRL-4003

Marcador	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA	CSF1PO
Alelo 1	x	10	12	12	8	10	7	9	16	10
Alelo 2		12	13	14			8	11	18	12

B

Add to Cart	%Match	ATCC® Number	Designation	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	AMEL	TPOX	CSF1PO
☐	100	CRL-4003	T HESCsEndometriumHuman	8	12,13	10	12,14	16,18	7,8	X	9,11	10,12

Figura 12 – Perfil genético obtido para a linhagem celular e CRL-4003 (leiomioma) por Short Tandem Repeat (STR). No painel A, resultados obtidos em nosso laboratório e em B, os dados disponibilizados pela ATCC (www.atcc.org – Cell Authentication Service), mostrando 100% de similaridade nas análises

A LEIOMIOSARCOMA - HTB-114

Marcador	AMEL	CSF1PO	D13S317	D16S539	D5S818	D7S820	TH01	TPOX	vWA	CSF1PO
Alelo 1	x	10	13	13	10	9	7	8	15	10
Alelo 2		11		14	11	10			16	11

B

Add to Cart	%Match	ATCC® Number	Designation	D5S818	D13S317	D7S820	D16S539	vWA	TH01	AMEL	TPOX	CSF1PO
☐	100	HTB-114	SK-UT-1Uterine EpithelialHuman	10,11	13	9,10	13,14	15,16	7	X	8	10,11

Figura 13 – Perfil genético obtido para a linhagem celular e CRL-4003 (leiomioma) por Short Tandem Repeat (STR). No painel A, resultados obtidos em nosso laboratório e em B, os dados disponibilizados pela ATCC (www.atcc.org – Cell Authentication Service), mostrando 100% de similaridade nas análises

4.2 Reações de qRT-PCR e *Western Blot* para detecção da expressão basal de FOXO3a nas linhagens celulares

Para avaliar o perfil de expressão do FOXO3a nas linhagens de miométrio (MM), leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) foi necessária a síntese do DNA complementar (cDNA) a partir de 2µg RNA total. Para a avaliação dos transcritos, inicialmente foi avaliado o melhor gene endógeno a ser utilizado como normalizador das reações. Foram testados os genes da *β-actina*, *β2M*, *GAPDH* e *HPRT*. Os valores de CT (cycle threshold) foram avaliados pelo programa algoritmo *NormFinder* para identificar o gene constitutivo ideal com base em modelos matemáticos. Os resultados mostraram que o endógeno mais estável, com o qual os ensaios em tempo real foram normalizados foi o *β2M* humano.

Dando continuidade às análises de expressão dos genes de interesse, foram realizados ensaios (sempre em duplicata) de PCR em tempo real utilizando os assays (mistura de iniciadores e sondas) para o *FOXO3a*. As reações foram realizadas duas vezes, com lotes diferentes de cultura. Os resultados nos mostraram que, em relação ao miométrio, tanto as células de LM, quanto as de LMS apresentaram expressão aumentada de *FOXO3a* (Figura 14A). Porém, as células de LMS apresentaram expressão gênica 3 vezes maior que a observada para tumores benignos.

Para avaliação proteica de FOXO3a e FOXO3a Fosforilado, foram realizadas eletroforeses em géis de acrilamida/bisacrilamida 12% (SDS-PAGE). Após a avaliação do perfil de migração dos extratos proteicos das linhagens, foram realizados ensaios de *western blot* para a pesquisa individual com anticorpos específicos. Os resultados obtidos para FOXO3a e FOXO3a Fosforilado (Figura 14B), mostraram marcação de bandas com diferentes tamanhos.

Figura 14 – Expressão gênica e proteica de FOXO3a nas linhagens celulares. Em A, expressão gênica em LM (leiomiomas) e LMS (leiomiossarcomas), em relação a B2M e utilizando as células de MM (miométrio como referência). Em B, perfil de detecção da proteína normal e fosforilada (FOXO3aP) nas três linhagens.

4.3 Inibição transiente de FOXO3 por siRNA e seus efeitos nas linhagens celulares

Após a realização das reações de transfecção das células, foram realizadas análises por PCR em tempo real (qRT-PCR) e imunocitoquímica (ICQ) para checar a eficiência da inativação do *FOXO3a*. As reações de PCR mostraram que após 48 e 72 horas da transfecção houve menor quantidade de transcrito detectada nas duas linhagens avaliadas (Figuras 14 e 15). Porém, a eficiência parece ter sido maior nas células de LMS (Figura 15). Após 96 horas a expressão do gene volta a aumentar.

Figura 15 – Expressão relativa em porcentagem de *FOXO3a* em LM com diferentes tratamentos após 24, 48 e 72 horas da transfecção. As amostras referência foram as células não tratadas. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média

Figura 16 – Expressão relativa em porcentagem de *FOXO3a* em LMS com diferentes tratamentos após 24, 48 e 72 horas da transfecção. As amostras referência foram as células não tratadas. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média

Como observado nos gráficos, todos os tratamentos afetaram a expressão gênica nas células, tanto a lipofectamina (LIPO) quanto o controle negativo (EGFP). Desse modo, para evitarmos a interferência desses resultados, somente as células não tratadas (cultivadas em meio e condições iguais às transfectadas) foram utilizadas para comparação.

Outra tentativa de verificar a eficiência das transfecções foi avaliar a expressão do FOXO3a por imunocitoquímica. Para isso o protocolo foi

padronizado em células sabidamente expressoras da proteína e os controles negativos foram células na ausência do anticorpo primário. As reações para Foxo3a normal e fosforilado nos leiomiomas (LM) podem ser visualizadas na Figura 17.

Figura 17 – Fotomicrografias representativas das reações de imunocitoquímica (ICQ) para avaliação qualitativa da presença de FOXO3a nas células de LM nos grupos: Controle (sem tratamento - Meio), Controle Negativo (tratado com o EGFP) e tratado com siRNA (FOXO-N e -P). Barra equivalente à 100 px de resolução

O perfil de reatividade observado para as células de leiomiossarcoma LMS após a transfecção pode ser visualizado na Figura 18.

Figura 18 – Fotomicrografias representativas das reações de imunocitoquímica (ICQ) para avaliação qualitativa da presença de FOXO3a nas células de LMS nos grupos: Controle (sem tratamento - Meio), Controle Negativo (tratado com o EGFP) e tratado com siRNA (FOXO-N e -P). Barra equivalente à 100 px de resolução

Considerando a frequência de células marcadas e a intensidade de marcação, novamente as células de LMS apresentaram diminuição de expressão superior ao observado para as células de LM.

Após as transfecções, as células foram imediatamente avaliadas quanto a sua viabilidade e capacidade de proliferação (Figura 19), já que nosso objetivo era avaliar se a perda de FOXO3a levaria a alguma alteração no fenótipo das células. Aparentemente, a inibição do crescimento foi maior nas células de LM, uma vez que nos LMS não foi observada diferença marcante entre os controles e as células transfectadas em nenhum dos tempos testados. Não foi observada diferença estatisticamente significativa para nenhuma das comparações realizadas entre os testes e controles.

Figura 19 – Gráfico apresentando o perfil proliferativo das células de leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) com e sem tratamento. As colunas mostram os valores obtidos nas células dos grupos tratados com siRNA *FOXO3* e não tratado (Controle (Meio)). Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média $\pm$ desvio padrão (DP), considerando três réplicas experimentais

Em seguida, foi realizado o ensaio de migração por ferida (scratch) que consiste em arranhar a monocamada celular e acompanhar, por meio de fotografias, a capacidade da célula de se locomover (migrar) ou não em diferentes tempos (horas). Novamente o efeito pareceu ter sido superior nas células de LM que começaram a apresentar maior capacidade de migração após 48h da transfecção, em comparação aos LMS (Figuras 20 e 21). Os resultados dos gráficos apresentam a relação entre o tempo (horas) e a área migrada (mm^2) com tendência crescente.

Figura 20 – Perfil migratório das células de Leiomioma após transfecção. Os gráficos apresentam os resultados da análise quantitativa dos registros fotográficos do ensaio de *wound healing*. Meio - Controle, Lipo - Lipofectamina, siRNA – inibido para Foxo3a e EGFP – controle negativo (*scramble*).

LEIOMIOSSARCOMA

Figura 21 – Perfil migratório das células de Leiomiossarcoma após transfecção. Os gráficos apresentam os resultados da análise quantitativa dos registros fotográficos do ensaio de *wound healing*. Meio - Controle, Lipo - Lipofectamina, siRNA – inibido para Foxo3a e EGFP – controle negativo (*scramble*).

4.4 Tratamento das células com Metformina e Genisteína e seus efeitos nas linhagens celulares

Outro objetivo era avaliar o efeito do tratamento com drogas que restauram a função de FOXO3a, por inibir sua fosforilação por AKT. As drogas incluídas (Genisteína e Metformina) foram testadas em diversas concentrações para selecionarmos as melhores doses para continuidade dos experimentos. Os resultados dos testes de IC50 podem ser visualizados na Figura 22.

Figura 22 – Gráfico apresentando o perfil de inibição do crescimento das células de leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) durante o teste de IC50. As concentrações utilizadas de Genisteína e Metformina estão indicadas, bem como o tempo de tratamento. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média, considerando três réplicas experimentais

Como é possível observar nos ensaios de IC50, as drogas apresentaram maior eficiência nas concentrações superiores a 20 μ M e 20mM, para Genisteína e Metformina, respectivamente. Com base nesses resultados, para

continuidade dos experimentos foram selecionadas as doses de 50 e 100 μ M para Genisteína e 50 e 100mM para a Metformina.

Assim, o próximo passo foi avaliar os efeitos das drogas na proliferação das células (Figura 23). Os resultados dos ensaios mostraram significativa redução da proliferação após os tratamentos. Porém, para Genisteína o efeito tóxico do veículo (DMSO) foi significativo, o que só foi observado para a Metformina nos 50 mM.

Figura 23 – Gráfico apresentando o perfil de proliferação das células de leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) após tratamento. Os resultados foram plotados no gráfico como valores de média, considerando três réplicas experimentais. Negativo – meio, V – veículo (DMSO e água para Genisteína e Metformina, respectivamente).

Em seguida foram realizados os ensaios de migração. As células foram tratadas com as drogas por até 72h, depois disso foram feitos os riscos nas monocamadas celulares (Figuras 24 e 25).

Figura 24 – Fotomicrografias representativas do perfil de migração das células de leiomioma (LM) com Genisteína e Metformina, com as doses pré-estabelecidas no IC50, e seus veículos, respectivamente DMSO e água.

Figura 25 – Fotomicrografias representativas do perfil de migração das células de leiomiossarcoma (LMS) com Genisteína e Metformina, com as doses pré-estabelecidas no IC50, e seus veículos, respectivamente DMSO e água.

Os valores obtidos nas mensurações das áreas migradas estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Os resultados mostram claramente o potencial inibitório das duas concentrações de ambas as drogas testadas.

Tabela 3 – Porcentagem de área migrada pelas células de leiomioma após tratamento com as drogas em diferentes tempos (h)

Tratamento (tempo)	Dose*	Tempo (horas)	Genisteína Área Migrada (%)	Metformina Área Migrada (%)
24h	50	24	0	0
		48	30,43	2,7
		72	32,60	14,86
		96	34,78	16,21
	100	24	0	0
		48	21,27	19,56
		72	21,27	19,56
		96	23,4	19,56
	Veículo (100)	24	0	0
		48	96,61	100
		72	100	100
		96	100	100
48h	50	48	0	0
		72	8,33	34,14
		96	10,41	34,14
	100	24	0	34,14
		48	45,78	0
		72	46,98	14,70
		96	46,98	14,70
	Veículo (100)	24	0	14,70
		48	80,82	0
		72	91,78	95,52
		96	100	100
72h	50	48	0	100
		72	1,47	0
	100	48	0	0
		72	0	0
	Veículo (100)	48	0	0
		72	100	0
96h	50	24	0	100
		48	13,43	0
	100	24	0	0
		48	0	0
	Veículo (100)	24	0	0
		48	100	100

*Para a Genisteína = μM ; e para Metformina = mM.

Tabela 4 – Porcentagem de área migrada pelas células de leiomiossarcoma após tratamento com as drogas em diferentes tempos (h)

Tratamento (tempo)	Dose**	Tempo (horas)	Genisteína Área Migrada (%)	Metformina Área Migrada (%)
24	50	24	†*	0
		48	†	10,41
		72	†	10,41
		96	†	0
	100	24	†*	†
		48	†	†
		72	†	†
		96	†	0
	Veículo (100)	24	0	76,92
		48	100	100
		72	100	100
		96	100	0
48	50	24	†*	24
		48	†	26
		72	†	0
		96	†	17,94
	100	24	†*	†*
		48	†	†
		72	†	0
		96	†	88
	Veículo (100)	24	0	100
		48	100	100
		72	100	0
		96	100	1,58
72	50	24	†	1,58
		48	†	†*
		72	†	†*
	100	24	†	†
		48	†	0
		72	†	18,18
	Veículo (100)	24	0	100
		48	26,83	0
		72	100	14,45
96	50	24	†	†
		48	†	†
	100	24	†	0
		48	†	100
	Veículo (100)	24	0	0
		48	100	0

**Para a Genisteína = μ M; e para Metformina = mM. †* = início de morte celular. † = morte.

Ao contrário do observado para a proliferação, na migração os veículos parecem não ter exercido influência na capacidade migratória das células. Não foi observada diferença significativa nos valores obtidos para as duas drogas, considerando as linhagens isoladamente. Porém, quando comparamos os efeitos das duas drogas nas células de LM e LMS, esta última apresentou maior número de mortes após os tratamentos, tanto com Genisteína como com Metformina (vide Tabela 3 e 4). Dessa forma, o próximo passo foi avaliar se a morte das células se devia a indução de apoptose pelos tratamentos realizados. Como controle positivo foram utilizadas células expostas à radiação ultravioleta e como controle negativo as células crescidas em meio convencional (Figuras 26 - 31).

Figura 26 – Controles negativo e positivo para as reações de detecção de células apoptóticas. O painel superior mostra o perfil de viabilidade das células crescidas em meio, após 24 e 72 horas. No inferior, as células foram expostas a luz ultravioleta (45 min). As fotomicrografias mostram o aspecto das células após 72 horas de crescimento nas condições de controle negativo e positivo.

LM Pós-tratamento com Genisteína

Figura 27 – Perfil apoptótico das células de leiomiomas (LM) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Genisteína e veículo. As fotomicrografias mostram o aspecto das células ao final do ensaio (72h). As concentrações utilizadas da droga estão indicadas.

LM Pós-tratamento com Metformina

Figura 28 – Perfil apoptótico das células de leiomiomas (LM) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Metformina e veículo. As fotomicrografias mostram o aspecto das células ao final do ensaio (72h). As concentrações utilizadas da droga estão indicadas

Figura 29 – Controles negativo e positivo para as reações de detecção de células apoptóticas. O painel superior mostra o perfil de viabilidade das células crescidas em meio, após 24 e 72 horas. No painel inferior as células foram expostas a luz ultravioleta por 45 minutos para servirem como controle positivo do ensaio. As fotomicrografias mostram o aspecto das células após 72 horas de crescimento nas condições de controle negativo e positivo.

Corroborando com as perdas sofridas nos ensaios de migração, as leituras das células após o tratamento e marcação com a Anexina V também mostram elevado numero de células mortas. Os valores são significativamente maiores após as 72 h de tratamento. Porém, como pode ser visto nos gráfico, as células não morreram só por indução da apoptose.

LMS Pós-tratamento com Genisteína

Figura 30 – Perfil apoptótico das células de leiomiossarcomas (LMS) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Genisteína e veículo. As fotomicrografias mostram o aspecto das células ao final do ensaio (72h). As concentrações utilizadas da droga estão indicadas.

LMS Pós-tratamento com Metformina

Figura 31 – Perfil apoptótico das células de leiomiossarcomas (LMS) após 24, 48 e 72 horas de tratamento com Metformina e veículo. As fotomicrografias mostram o aspecto das células ao final do ensaio (72h). As concentrações utilizadas da droga estão indicadas.

Uma vez algumas leituras do aparelho não corroboravam o que era visível ao microscópio, fizemos uma leitura paralela no espectofotometro (Countess) das mesmas células utilizadas no ensaio da Anexina. As células foram coradas com Triplan Blue (corante de exclusão, onde células vivas não são coradas). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Verificação da proporção de células vivas e mortas ao final do tratamento (72h) com as drogas, em espectofotometro (Countess, Invitrogen)

Linhagem	Tratamento	Total de células/ml	Células vivas (%)	Células mortas (%)
LM	Ctr Meio	1.29x10 ⁵	14	86
	Veículo	1.47x10 ⁵	24	76
	50 uM Gen	6.92x10 ⁵	17	83
	100 uM Gen	3.28x10 ⁵	9	91
LM	Ctr Meio	2.46x10 ⁵	14	86
	Veículo	3.23x10 ⁵	16	84
	50 mM Met	8.27x10 ⁵	33	67
	100 mM Met	3.87x10 ⁵	17	83
LMS	Ctr Meio	1.81x10 ⁶	75	25
	Veículo	2.02x10 ⁶	68	32
	50 uM Gen	1.11x10 ⁶	12	88
	100 uM Gen	2.76x10 ⁶	3	97
LMS	Ctr Meio	3.99x10 ⁶	72	28
	Veículo	3.30x10 ⁶	69	31
	50 mM Met	1.38x10 ⁶	4	96
	100 mM Met	4.0x10 ⁶	11	89
LM	Ctr UV (+)	2.64x10 ⁵	11	89
LMS	Ctr UV (+)	2.25x10 ⁶	1	99

De mesmo modo que o observado para as células marcadas com Anexina, com o Tripan Blue também encontramos elevado número de células mortas. Porém, esse número foi muito maior nas células de LM, inclusive nos controles. Esse fato pode ser devido a perda de células na hora de colhê-las dos poços das placas, já que essa células se alonga muito e se rompe facilmente. Outro aspecto a ser considerado é que por se expandir muito, as células ocupam rapidamente o espaço livre nos poços, impedindo que as células filhas tenham espaço para aderir e se alimentar.

Como explicitado anteriormente, nosso grupo de pesquisa encontrou FOXO3a com superexpressão em leiomiossarcomas uterinos (de Almeida, 2015). Esse dado contrariava a literatura que até então apontava essa molécula como importante supressor tumoral. Porém, não era possível sabermos se a proteína estava ativa ou inativa nesses tumores, ou se nosso achado poderia ser ao acaso. Assim, para um melhor entendimento sobre o papel desse fator de transcrição nos tumores de musculatura lisa do útero, foram propostas duas abordagens: 1) o silenciamento gênico do FOXO3a por siRNA, seguindo a hipótese de que se tratasse de um oncogene e, 2) sua restauração funcional pelo tratamento com Metformina e Genisteína, uma vez que essas substâncias atuam na via de sinalização do FOXO3a inibindo sua fosforilação por AKT.

Inicialmente, era importante avaliar se nas linhagens encontraríamos superexpressão do gene e de sua proteína como havia ocorrido nas pacientes. Na avaliação da expressão gênica basal do FOXO3a, as células de leiomioma (LM) e leiomiossarcoma (LMS) apresentaram expressão de FOXO3a aumentada em relação a miométrio (MM), sendo que as células de LMS apresentaram expressão 3 vezes maior que as células de LM. Na análise de expressão proteica do FOXO3a e FOXO3a fosforilado por *Western blot* também foi identificada a expressão das proteínas nas três linhagens, corroborando nossos achados anteriores (de Almeida, 2015).

É de amplo conhecimento que a desregulação das funções do FOXO3a pode causar proliferação celular descontrolada e acúmulo de danos no DNA, o que pode levar à carcinogênese. De modo geral, as evidências são contundentes quanto a relação entre perda de regulação da função das proteínas FOXO com a tumorigênese e progressão tumoral (Myatt; Lam, 2007; Ho et al., 2008). Vários estudos mostram o FOXO3a como um supressor tumoral e correlacionam a perda deste com a progressão tumoral (Yang; Hung, 2009). Por outro lado, alguns estudos tem demonstrado que o FOXO3a também pode agir como um promotor tumoral (Hui et al., 2008; Naka et al., 2010).

No entanto, para seguirmos com essa hipótese do FOXO3a como promotor tumoral foi realizada sua inibição transiente por siRNA nas linhagens de LM e LMS. Embora tenha sido vista alguma alteração no comportamento das células considerando sua proliferação e migração, não houve diferença significativa entre as condições testadas. Esse fato se deu, principalmente, em função dos controles (com EGFP e Lipofectamina) terem alterado muito a expressão do gene, em relação às células crescidas somente em meio. Os mesmos resultados foram obtidos mais de uma vez, nos impedindo de concluir se a inibição de FOXO3a poderia ser considerada um futuro fator de melhor prognóstico para as pacientes com LMS.

Embora nos últimos anos tenha ocorrido um aumento significativo nas pesquisas clínica e básica, pouco sucesso foi obtido no desenvolvimento de novas terapias alternativas contra os sarcomas ginecológicos. Uma abordagem para diminuir o custo e aumentar a eficiência do desenvolvimento de novas terapias é o uso de drogas já existentes, propondo novos usos para estas (Chong; Sullivan, 2007).

Dentro deste perfil, encaixam-se a Metformina e a Genisteína. A primeira é uma das drogas mais utilizadas no mundo, estando disponível no mercado farmacêutico há muitos anos, com perfil de segurança e tolerabilidade bem estabelecidos. A segunda é proveniente, principalmente, da soja, um alimento que há algumas décadas atrás tinha seu consumo restrito a países asiáticos, mas que se tornou um constituinte quase que essencial na indústria alimentícia das sociedades ocidentais (Food and Agriculture Organization of the United Nations, c2017).

A princípio, a Metformina pode parecer uma candidata improvável para a terapêutica contra o câncer. No entanto, esta droga altera o metabolismo, e está tornando-se cada vez mais claro que as células cancerígenas têm desequilíbrios metabólicos que podem torná-las vulneráveis a essas drogas (Hanahan; Weinberg, 2011).

Já sobre a Genisteína, esta pode exercer os vários efeitos anti-cancerígenos atribuídos aos flavonóides, incluindo atividade estrogênica e antiestrogênica, inibição de crescimento celular, regulação do ciclo celular e

apoptose, atividade antioxidante, inibição de angiogênese, regulação de vias de sinalização e modulação de atividade enzimática (Moon et al., 2006).

Em razão das diversas possibilidades de ligações que a Metformina e a Genisteína podem desempenhar, essas moléculas são frequentemente objeto de estudo em diversas áreas das ciências médicas, incluindo a oncologia. O fator que nos chamou atenção nessas duas substâncias foi sua ação na via do AKT que atua na inibição do FOXO3a. Apesar de toda literatura envolvendo essas três moléculas, não foi possível encontrar, nos bancos de publicações científicas, qualquer estudo sobre FOXO3a em LMS uterino ou tratamentos com Genisteína e Metformina visando essa proteína. Assim, o passo seguinte do projeto foi avaliar a possível restauração funcional do FOXO3 por meio dessas substâncias e analisar seu efeito no comportamento das células de LM e LMS.

Ambas mostraram significativa redução na proliferação das duas linhagens. No entanto, o efeito tóxico do veículo utilizado para a Genisteína, o dimetilsulfóxido (DMSO), foi bastante significativo na proliferação das células. No tocante a migração, tanto a Metformina (50 e 100mM), quanto a Genisteína (50 e 100µM), mostraram significativa indução da redução da área migrada pelas células. Ao contrário do observado para a proliferação, na migração os veículos parecem não ter exercido grande influência. Comparando os efeitos das duas substâncias nas células de LM e LMS, encontramos maior número de células mortas após ambos tratamentos, nos LMS. De modo que o próximo passo foi avaliar se a morte celular se devia à indução de apoptose.

Os dados obtidos corroboraram as perdas sofridas nos ensaios de migração. As leituras das células após o tratamento e marcação com a Anexina V também mostraram elevado número de células mortas. Porém, essas mortes não eram devidas somente a indução da apoptose. Sabemos que um fármaco pode induzir morte celular por outros mecanismos alheios à apoptose convencional (Brunton et al., 2017), assim, acreditamos que, principalmente as células de LMS, podem ter sofrido indução de morte por ação das substâncias. Em um estudo de 2015, Yeh et al. demonstraram em células SK-UT-1 efeitos apoptóticos e não apoptótico de morte celular induzidos pela ação da

Genisteína. A investigação da expressão de moléculas relacionadas à apoptose indicou que a caspase-3 não foi ativada nas células SK-UT-1. Esses dados podem explicar, em parte, nossos achados.

Em relação à metformina, a ação molecular anti-câncer desta droga proposta atualmente está associada principalmente com a inibição do alvo da Rapamicina (mTOR) (Algire et al., 2008; Berstein et al., 2011). A via mTOR desempenha um papel essencial no metabolismo, crescimento e proliferação de células de câncer (Chiang; Abraham, 2007). Como já citado anteriormente, a metformina age no metabolismo celular, especialmente em um dos distúrbios metabólicos mais bem descritos nas células cancerígenas, a utilização de glicose. Células não transformadas, na presença de oxigênio, processam glicose através da glicólise, o ciclo do ácido tricarboxílico e a cadeia de transporte respiratório mitocondrial para produzir 38 moléculas de adenosina 5'-trifosfato (ATP) por molécula de glicose. Em contraste, as células cancerígenas preferencialmente geram energia apenas através da glicólise, mesmo quando o oxigênio está presente, o que gera ineficientemente o ácido láctico e apenas 2 moléculas de ATP por molécula de glicose. Esta dependência de células cancerígenas apenas na glicólise é referida como “glicólise aeróbica” e foi descrita pela primeira vez na década de 1920 pelo vencedor do Nobel Otto Warburg (Hanahan; Weinberg, 2011). Além disso, as células cancerosas metabolizam os lipídios de uma maneira única. Elas são capazes de síntese de ácidos graxos, enquanto células não transformadas são dependentes de ácidos graxos obtidos da ingestão dietética (Menendez; Lupu, 2007). No câncer de ovário, descobertas indicam que as células neoplásicas também obtêm lipídios de adipócitos normais adjacentes, usando estes para estimular um rápido crescimento (Nieman et al., 2011; Nieman et al., 2013). Analisando os propostos acima, podemos inferir que a morte celular mediada pela Metformina em nossos ensaios, possa ter sido, em parte, pela privação energética.

Nossos resultados são pioneiros na busca de tratamentos alternativos com essas substâncias, já utilizadas na medicina para outras doenças, focando uma molécula específica – o FOXO3a – nos tumores de musculatura lisa do útero. Embora análises mais aprofundadas precisem ser realizadas, foi

possível verificar nos tumores avaliados que essa proteína certamente desenvolve um papel importante na oncogênese.

6 CONCLUSÕES

- Os resultados de expressão de FOXO3a mostraram maior quantidade de transcrito e proteína nas células de LMS (leiomiossarcoma), em comparação aos LM (leiomiomas) e MM (miométrio).
- Os tratamentos com Genisteína e Metformina foram muito eficazes na inibição do crescimento, migração e índice de morte celular, com efeitos mais proeminentes no LMS.
- O silenciamento de FOXO3a com o siRNA foi de $\geq 70\%$. Em comparação aos tratamentos com os fármacos, seu efeito no comportamento das células foi menor.

Anexo A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP (CEPFMUSP)

FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: FOXO3A EM TUMORES MESENQUIMAIS UTERINOS: AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE SEU POTENCIAL PARA TERAPIA-ALVO

Pesquisador: KÁTIA CANDIDO CARVALHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59579816.9.0000.0065

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.717.839

Apresentação do Projeto:

Projeto de mestrado proposto pelo Depto de Obstetrícia do HCFMUSP. O projeto tem como hipótese que a metformina e a genisteína tem ação sobre fator de transcrição FoxO3a o qual possui papel regulatório em células do leiomiossarcoma. Para testar a hipótese linhagens celulares de miométrio (ATCC PCS-460-011), leiomioma

(THESCs - CRL-4003) e leiomiossarcoma (SK-LMS-1 - HTB-88) serão inicialmente caracterizadas quanto ao perfil de expressão de FoxO3a, por Western Blot e PCR em tempo real. Posteriormente, as células serão submetidas à inativação do gene por RNAi ou indução de sua expressão pelo tratamento com metformina e genisteína. Após esse tratamento e manipulação por RNAi, as células serão avaliadas quanto à viabilidade, capacidade de invasão e migração. Também serão avaliadas a expressão genica e protéica de FoxO3a e proteínas relacionadas (Pi3K, AKT, p21, CCND1, SIRT1, catalase, MnSOD e MDM2) nessas culturas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar o perfil de expressão do fator de transcrição FoxO3a em células de miométrio,

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36

Bairro: PACAEMBU

CEP: 01.246-003

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3503-4401

E-mail: cep.fm@usp.br

**FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO - FMUSP**

Continuação do Parecer: 1.717.839

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB - INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_750868.pdf	02/09/2016 13:58:12		Aceto
Outros	cadastro_hc.pdf	02/09/2016 13:50:32	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Aceto
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	02/09/2016 13:49:44	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Aceto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_tcle.pdf	02/09/2016 13:44:06	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Aceto
Outros	Aprovação_cepdog.pdf	31/08/2016 16:00:38	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Aceto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Universal_Foxo.pdf	31/08/2016 15:19:08	KÁTIA CANDIDO CARVALHO	Aceto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Setembro de 2016

Assinado por:
Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
 (Coordenador)

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
 Bairro: PACAEMBU CEP: 01.246-903
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3823-4401 E-mail: cep.fm@usp.br

ACOG Committee on Practice Bulletins-Gynecology. ACOG practice bulletin. Surgical alternatives to hysterectomy in the management of leiomyomas. Number 16, May 2000 (replaces educational bulletin number 192, May 1994). *Int J Gynaecol Obstet*. 2001 Jun;73(3):285-93.

Algire C, Zakikhani M, Blouin MJ, Shuai JH, Pollak M. Metformin attenuates the stimulatory effect of a high-energy diet on in vivo LLC1 carcinoma growth. *Endocr Relat Cancer*. 2008 Sep;15(3):833-9. doi: 10.1677/erc-08-0038.

Amant F, Coosemans A, Debiec-Rychter M, Timmerman D, Vergote I. Clinical management of uterine sarcomas. *Lancet Oncol*. 2009 Dec;10(12):1188-98. doi: 10.1016/s1470-2045(09)70226-8.

American Cancer Society. Cancer facts & figures 2018 [Internet]. Atlanta: American Cancer Society; 2018 [cited 2018 Nov 11]. Available from: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2018/cancer-facts-and-figures-2018.pdf>.

Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, Kovalenko IG, Poroshina TE, Semchenko AV, Provinciali M, Re F, Franceschi C. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp Gerontol*. 2005 Aug-Sep;40(8-9):685-93. doi: 10.1016/j.exger.2005.07.007.

Arden KC. FOXO animal models reveal a variety of diverse roles for FOXO transcription factors. *Oncogene*. 2008 Apr 7;27(16):2345-50. doi: 10.1038/onc.2008.27.

Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol*. 2003 Jan;188(1):100-7.

Bakker WJ, Harris IS, Mak TW. FOXO3a is activated in response to hypoxic stress and inhibits HIF1-induced apoptosis via regulation of CITED2. *Mol Cell*. 2007 Dec 28;28(6):941-53. doi: 10.1016/j.molcel.2007.10.035.

Berstein LM, Yue W, Wang JP, Santen RJ. Isolated and combined action of tamoxifen and metformin in wild-type, tamoxifen-resistant, and estrogen-deprived MCF-7 cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jul;128(1):109-17. doi: 10.1007/s10549-010-1072-z.

Birt DF, Hendrich S, Wang W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacol Ther*. 2001 May-Jun;90(2-3):157-77.

Boersma BJ, Barnes S, Kirk M, Wang CC, Smith M, Kim H, Xu J, Patel R, Darley-Usmar VM. Soy isoflavonoids and cancer -- metabolism at the target site. *Mutat Res*. 2001 Sep 1;480-481:121-7.

Brunton LL, Hilal-Dandan R, Knollmann BC. *Goodman & Gilman's: the pharmacological basis of therapeutics*. 13th ed. New York: McGraw-Hill; 2017.

- Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. 2008 Apr 7;27(16):2276-88. doi: 10.1038/onc.2008.21.
- Cao C, Lu S, Kivlin R, Wallin B, Card E, Bagdasarian A, Tamakloe T, Wang WJ, Song X, Chu WM, Kouttab N, Xu A, Wan Y. SIRT1 confers protection against UVB- and H₂O₂-induced cell death via modulation of p53 and JNK in cultured skin keratinocytes. *J Cell Mol Med*. 2009 Sep;13(9b):3632-43. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00453.x.
- Cassier PA, Polivka V, Judson I, Soria JC, Penel N, Marsoni S, Verweij J, Schellens JH, Morales-Barrera R, Schoffski P, Voest EE, Gomez-Roca C, Evans TR, Plummer R, Gallerani E, Kaye SB, Olmos D. Outcome of patients with sarcoma and other mesenchymal tumours participating in phase I trials: a subset analysis of a European Phase I database. *Ann Oncol*. 2014 Jun;25(6):1222-8. doi: 10.1093/annonc/mdu108.
- Celestini V, Tezil T, Russo L, Fasano C, Sanese P, Forte G, Peserico A, Lepore Signorile M, Longo G, De Rasmio D, Signorile A, Gadaleta RM, Scialpi N, Terao M, Garattini E, Cocco T, Villani G, Moschetta A, Grossi V, Simone C. Uncoupling FoxO3A mitochondrial and nuclear functions in cancer cells undergoing metabolic stress and chemotherapy. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 14;9(2):231. doi: 10.1038/s41419-018-0336-0.
- Chen AC, Donovan SM. Genistein at a concentration present in soy infant formula inhibits Caco-2BBE cell proliferation by causing G2/M cell cycle arrest. *J Nutr*. 2004 Jun;134(6):1303-8. doi: 10.1093/jn/134.6.1303.
- Chiang GG, Abraham RT. Targeting the mTOR signaling network in cancer. *Trends Mol Med*. 2007 Oct;13(10):433-42. doi: 10.1016/j.molmed.2007.08.001.
- Chodon D, Ramamurty N, Sakthisekaran D. Preliminary studies on induction of apoptosis by genistein on HepG2 cell line. *Toxicol In Vitro*. 2007 Aug;21(5):887-91. doi: 10.1016/j.tiv.2007.01.023.
- Chong CR, Sullivan DJ, Jr. New uses for old drugs. *Nature*. 2007 Aug 9;448(7154):645-6. doi: 10.1038/448645a.
- Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol*. 1990 Oct;94(4):435-8.
- D'Angelo E, Prat J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol*. 2010 Jan;116(1):131-9. doi: 10.1016/j.ygyno.2009.09.023.
- Davidson EH, Jacobs HT, Britten RJ. Very short repeats and coordinate induction of genes. *Nature*. 1983 Feb 10;301(5900):468-70.
- Davis JN, Kucuk O, Djuric Z, Sarkar FH. Soy isoflavone supplementation in healthy men prevents NF-kappa B activation by TNF-alpha in blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med*. 2001 Jun 1;30(11):1293-302.

de Almeida TG. *Análise da expressão do fator de crescimento HER-2 e do fator de transcrição FOXO3a em sarcomas e carcinosarcomas uterinos* [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2015.

De Flora S, Ferguson LR. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat Res*. 2005 Dec 11;591(1-2):8-15. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2005.02.029.

DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. *Cancer: principles & practice of oncology: primer of the molecular biology of cancer*. Philadelphia (PA): Lippincott Williams & Wilkins; 2011.

Dilman VM, Anisimov VN. Potentiation of antitumor effect of cyclophosphamide and hydrazine sulfate by treatment with the antidiabetic agent, 1-phenylethylbiguanide (phenformin). *Cancer Lett*. 1979 Oct;7(6):357-61. doi: 10.1016/S0304-3835(79)80066-X.

Dilman VM, Anisimov VN. Effect of treatment with phenformin, diphenylhydantoin or L-dopa on life span and tumour incidence in C3H/Sn mice. *Gerontology*. 1980;26(5):241-6. doi: 10.1159/000212423.

Ducie JA, Leitao MM Jr. The role of adjuvant therapy in uterine leiomyosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2016;16(1):45-55. doi: 10.1586/14737140.2016.1115724.

Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005 Jun 4;330(7503):1304-5. doi: 10.1136/bmj.38415.708634.F7.

Fang J, Wu Z, Cai C, Wang Q, Tang Y, Cheng F. Quantitative and Systems Pharmacology. 1. In Silico Prediction of Drug-Target Interactions of Natural Products Enables New Targeted Cancer Therapy. *J Chem Inf Model*. 2017 Nov 27;57(11):2657-71. doi: 10.1021/acs.jcim.7b00216.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Faostat [Internet]. Rome: FAO; c2017 [cited 2018 Nov 11]. Soybeans; [cited 2018 Nov 11]; [about 1 screen]. Available from: <http://www.fao.org/faostat/en/#search/soybeans>.

Frankenfeld CL, Atkinson C, Thomas WK, Goode EL, Gonzalez A, Jokela T, Wahala K, Schwartz SM, Li SS, Lampe JW. Familial correlations, segregation analysis, and nongenetic correlates of soy isoflavone-metabolizing phenotypes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 Oct;229(9):902-13.

Gardner CD, Oelrich B, Liu JP, Feldman D, Franke AA, Brooks JD. Prostatic soy isoflavone concentrations exceed serum levels after dietary supplementation. *Prostate*. 2009 May 15;69(7):719-26. doi: 10.1002/pros.20922.

Gill G. Regulation of the initiation of eukaryotic transcription. *Essays Biochem*. 2001;37:33-43.

- Gomes AR, Brosens JJ, Lam EW. Resist or die: FOXO transcription factors determine the cellular response to chemotherapy. *Cell Cycle*. 2008 Oct;7(20):3133-6. doi: 10.4161/cc.7.20.6920.
- Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau ME, Koo J, Madarnas Y, Hartwick W, Hoffman B, Hood N. Fasting insulin and outcome in early-stage breast cancer: results of a prospective cohort study. *J Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):42-51. doi: 10.1200/jco.2002.20.1.42.
- Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V. Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3271-3. doi: 10.1200/jco.2009.22.1630.
- Goodwin PJ, Pritchard KI, Ennis M, Clemons M, Graham M, Fantus IG. Insulin-lowering effects of metformin in women with early breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2008 Dec;8(6):501-5. doi: 10.3816/CBC.2008.n.060.
- Guha M, Plescia J, Leav I, Li J, Languino LR, Altieri DC. Endogenous tumor suppression mediated by PTEN involves survivin gene silencing. *Cancer Res*. 2009 Jun 15;69(12):4954-8. doi: 10.1158/0008-5472.Can-09-0584.
- Hamann I, Petroll K, Grimm L, Hartwig A, Klotz LO. Insulin-like modulation of Akt/FoxO signaling by copper ions is independent of insulin receptor. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Sep 15;558:42-50. doi: 10.1016/j.abb.2014.06.004.
- Han S, Khuri FR, Roman J. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res*. 2006 Jan 1;66(1):315-23. doi: 10.1158/0008-5472.Can-05-2367.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Harada Y, Harada Y, Elly C, Ying G, Paik JH, DePinho RA, Liu YC. Transcription factors Foxo3a and Foxo1 couple the E3 ligase Cbl-b to the induction of Foxp3 expression in induced regulatory T cells. *J Exp Med*. 2010 Jul 5;207(7):1381-91. doi: 10.1084/jem.20100004.
- Ho KK, Myatt SS, Lam EW. Many forks in the path: cycling with FoxO. *Oncogene*. 2008 Apr 7;27(16):2300-11. doi: 10.1038/onc.2008.23.
- Huang SC, Erdman SH. Pediatric juvenile polyposis syndromes: an update. *Curr Gastroenterol Rep*. 2009 Jun;11(3):211-9.
- Hui RC, Francis RE, Guest SK, Costa JR, Gomes AR, Myatt SS, Brosens JJ, Lam EW. Doxorubicin activates FOXO3a to induce the expression of multidrug resistance gene ABCB1 (MDR1) in K562 leukemic cells. *Mol Cancer Ther*. 2008 Mar;7(3):670-8. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-07-0397.
- Imada K, Shiota M, Kuroiwa K, Sugimoto M, Abe T, Kohashi K, Yokomizo A, Eto M, Naito S, Oda Y. FOXO3a Expression Regulated by ERK Signaling is

- Inversely Correlated With Y-Box Binding Protein-1 Expression in Prostate Cancer. *Prostate*. 2017 Feb;77(2):145-53. doi: 10.1002/pros.23254.
- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012 [Internet]. Lyon (FR): IARC; c2018 [cited 2018 Apr 26]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
- Isakovic A, Harhaji L, Stevanovic D, Markovic Z, Sumarac-Dumanovic M, Starcevic V, Micic D, Trajkovic V. Dual antiglioma action of metformin: cell cycle arrest and mitochondria-dependent apoptosis. *Cell Mol Life Sci*. 2007 May;64(10):1290-302. doi: 10.1007/s00018-007-7080-4.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr*. 2000 Jul;130(7):1695-9. doi: 10.1093/jn/130.7.1695.
- Jiralerspong S, Palla SL, Giordano SH, Meric-Bernstam F, Liedtke C, Barnett CM, Hsu L, Hung MC, Hortobagyi GN, Gonzalez-Angulo AM. Metformin and pathologic complete responses to neoadjuvant chemotherapy in diabetic patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 10;27(20):3297-302. doi: 10.1200/jco.2009.19.6410.
- Kerdiles YM, Stone EL, Beisner DR, McGargill MA, Ch'en IL, Stockmann C, Katayama CD, Hedrick SM. Foxo transcription factors control regulatory T cell development and function. *Immunity*. 2010 Dec 14;33(6):890-904. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.002.
- Kikuno N, Shiina H, Urakami S, Kawamoto K, Hirata H, Tanaka Y, Majid S, Igawa M, Dahiya R. Genistein mediated histone acetylation and demethylation activates tumor suppressor genes in prostate cancer cells. *Int J Cancer*. 2008 Aug 1;123(3):552-60. doi: 10.1002/ijc.23590.
- Kim SY, Webb AE. Neuronal functions of FOXO/DAF-16. *Nutr Healthy Aging*. 2017 Mar 31;4(2):113-26. doi: 10.3233/nha-160009.
- Kimura N, Tokunaga C, Dalal S, Richardson C, Yoshino K, Hara K, Kemp BE, Witters LA, Mimura O, Yonezawa K. A possible linkage between AMP-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway. *Genes Cells*. 2003 Jan;8(1):65-79.
- Klatsky PC, Tran ND, Caughey AB, Fujimoto VY. Fibroids and reproductive outcomes: a systematic literature review from conception to delivery. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Apr;198(4):357-66. doi: 10.1016/j.ajog.2007.12.039.
- Klein CB, King AA. Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Oct 1;224(1):1-11. doi: 10.1016/j.taap.2007.06.022.

- Kumar V, Abbas A, Aster J. *Robbins basic pathology*. 10th ed. Philadelphia (PA): Elsevier; 2017.
- Kurahashi N, Iwasaki M, Sasazuki S, Otani T, Inoue M, Tsugane S. Soy product and isoflavone consumption in relation to prostate cancer in Japanese men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Mar;16(3):538-45. doi: 10.1158/1055-9965.epi-06-0517.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
- Lampe JW, Nishino Y, Ray RM, Wu C, Li W, Lin MG, Gao DL, Hu Y, Shannon J, Stalsberg H, Porter PL, Frankenfeld CL, Wahala K, Thomas DB. Plasma isoflavones and fibrocystic breast conditions and breast cancer among women in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Dec;16(12):2579-86. doi: 10.1158/1055-9965.epi-07-0368.
- Latchman DS. Transcription-factor mutations and disease. *N Engl J Med*. 1996 Jan 4;334(1):28-33. doi: 10.1056/nejm199601043340108.
- Latchman DS. Transcription factors: an overview. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997 Dec;29(12):1305-12. doi: 10.1016/S1357-2725(97)00085-X.
- Lee TI, Young RA. Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*. 2013 Mar 14;152(6):1237-51. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.014.
- Liang C, Li H, Shen C, Lai J, Shi Z, Liu B, Tao HM. Genistein potentiates the anti-cancer effects of gemcitabine in human osteosarcoma via the downregulation of Akt and nuclear factor-kappaB pathway. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012 Jun;12(5):554-63.
- Liggins J, Bluck LJ, Runswick S, Atkinson C, Coward WA, Bingham SA. Daidzein and genistein contents of vegetables. *Br J Nutr*. 2000 Nov;84(5):717-25.
- Luo Z, Zang M, Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. *Future Oncol*. 2010 Mar;6(3):457-70. doi: 10.2217/fon.09.174.
- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC. OutFOXOing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol Med*. 2008 May;14(5):219-27. doi: 10.1016/j.molmed.2008.03.002.
- Mayerhofer K, Obermair A, Windbichler G, Petru E, Kaider A, Hefler L, Czerwenka K, Leodolter S, Kainz C. Leiomyosarcoma of the uterus: a clinicopathologic multicenter study of 71 cases. *Gynecol Oncol*. 1999 Aug;74(2):196-201. doi: 10.1006/gyno.1999.5436.

- McWilliams MM, Chennathukuzhi VM. Recent Advances in Uterine Fibroid Etiology. *Semin Reprod Med*. 2017 Mar;35(2):181-9. doi: 10.1055/s-0037-1599090.
- Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):763-77. doi: 10.1038/nrc2222.
- Miettinen M. Smooth muscle tumors of soft tissue and non-uterine viscera: biology and prognosis. *Mod Pathol*. 2014 Jan;27 Suppl 1:S17-29. doi: 10.1038/modpathol.2013.178.
- Moon YJ, Wang X, Morris ME. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol In Vitro*. 2006 Mar;20(2):187-210. doi: 10.1016/j.tiv.2005.06.048.
- Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Nov;7(11):847-59. doi: 10.1038/nrc2223.
- Myers ER, Barber MD, Gustilo-Ashby T, Couchman G, Matchar DB, McCrory DC. Management of uterine leiomyomata: what do we really know? *Obstet Gynecol*. 2002 Jul;100(1):8-17.
- Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, Nakao S, Motoyama N, Hirao A. TGF-beta-FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 2010 Feb 4;463(7281):676-80. doi: 10.1038/nature08734.
- Nieman KM, Kenny HA, Penicka CV, Ladanyi A, Buell-Gutbrod R, Zillhardt MR, Romero IL, Carey MS, Mills GB, Hotamisligil GS, Yamada SD, Peter ME, Gwin K, Lengyel E. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*. 2011 Oct 30;17(11):1498-503. doi: 10.1038/nm.2492.
- Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Oct;1831(10):1533-41. doi: 10.1016/j.bbali.2013.02.010.
- Ning Y, Luo C, Ren K, Quan M, Cao J. FOXO3a-mediated suppression of the self-renewal capacity of sphere-forming cells derived from the ovarian cancer SKOV3 cell line by 7-difluoromethoxyl-5,4'-di-n-octyl genistein. *Mol Med Rep*. 2014 May;9(5):1982-8. doi: 10.3892/mmr.2014.2012.
- Nishigaya Y, Kobayashi Y, Matsuzawa Y, Hasegawa K, Fukasawa I, Watanabe Y, Tokunaga H, Yaegashi N, Iwashita M. Diagnostic value of combination serum assay of lactate dehydrogenase, D-dimer, and C-reactive protein for uterine leiomyosarcoma. *J Obstet Gynaecol Res*. 2018 Aug 27. doi: 10.1111/jog.13792.
- Novetsky AP, Powell MA. Management of sarcomas of the uterus. *Curr Opin Oncol*. 2013 Sep;25(5):546-52. doi: 10.1097/CCO.0b013e328363e0ef.

- Obexer P, Geiger K, Ambros PF, Meister B, Ausserlechner MJ. FKHRL1-mediated expression of Noxa and Bim induces apoptosis via the mitochondria in neuroblastoma cells. *Cell Death Differ*. 2007 Mar;14(3):534-47. doi: 10.1038/sj.cdd.4402017.
- Obexer P, Hagenbuchner J, Unterkircher T, Sachsenmaier N, Seifarth C, Bock G, Porto V, Geiger K, Ausserlechner M. Repression of BIRC5/survivin by FOXO3/FKHRL1 sensitizes human neuroblastoma cells to DNA damage-induced apoptosis. *Mol Biol Cell*. 2009 Apr;20(7):2041-8. doi: 10.1091/mbc.E08-07-0699.
- Obsil T, Obsilova V. Structural basis for DNA recognition by FOXO proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Nov;1813(11):1946-53. doi: 10.1016/j.bbamcr.2010.11.025.
- Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Dec;5(12):993-6. doi: 10.1038/nrd2199.
- Parazzini F, Tozzi L, Bianchi S. Pregnancy outcome and uterine fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016 Jul;34:74-84. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2015.11.017.
- Park JY, Lee JW, Lee HJ, Lee JJ, Moon SH, Kang SY, Cheon GJ, Chung HH. Prognostic significance of preoperative (1)(8)F-FDG PET/CT in uterine leiomyosarcoma. *J Gynecol Oncol*. 2017 May;28(3):e28. doi: 10.3802/jgo.2017.28.e28.
- Park OJ, Surh YJ. Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. *Toxicol Lett*. 2004 Apr 15;150(1):43-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2003.06.001.
- Polkowski K, Mazurek AP. Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm*. 2000 Mar-Apr;57(2):135-55.
- Qi W, Weber CR, Wasland K, Savkovic SD. Genistein inhibits proliferation of colon cancer cells by attenuating a negative effect of epidermal growth factor on tumor suppressor FOXO3 activity. *BMC Cancer*. 2011 Jun 3;11:219. doi: 10.1186/1471-2407-11-219.
- Qian Z, Ren L, Wu D, Yang X, Zhou Z, Nie Q, Jiang G, Xue S, Weng W, Qiu Y, Lin Y. Overexpression of FoxO3a is associated with glioblastoma progression and predicts poor patient prognosis. *Int J Cancer*. 2017 Jun 15;140(12):2792-804. doi: 10.1002/ijc.30690.
- Queiroz EA, Puukila S, Eichler R, Sampaio SC, Forsyth HL, Lees SJ, Barbosa AM, Dekker RF, Fortes ZB, Khaper N. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells. *PLoS One*. 2014 May 23;9(5):e98207. doi: 10.1371/journal.pone.0098207.

- Ricci S, Stone RL, Fader AN. Uterine leiomyosarcoma: Epidemiology, contemporary treatment strategies and the impact of uterine morcellation. *Gynecol Oncol*. 2017 Apr;145(1):208-16. doi: 10.1016/j.ygyno.2017.02.019.
- Rodriguez AM, Asoglu MR, Sak ME, Tan A, Borahay MA, Kilic GS. Incidence of occult leiomyosarcoma in presumed morcellation cases: a database study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016 Feb;197:31-5. doi: 10.1016/j.ejogrb.2015.11.009.
- Ross AE, Marchionni L, Phillips TM, Miller RM, Hurley PJ, Simons BW, Salmasi AH, Schaeffer AJ, Gearhart JP, Schaeffer EM. Molecular effects of genistein on male urethral development. *J Urol*. 2011 May;185(5):1894-8. doi: 10.1016/j.juro.2010.12.095.
- Russo A, Cardile V, Lombardo L, Vanella L, Acquaviva R. Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells. *J Nutr Biochem*. 2006 Feb;17(2):103-8. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.011.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*. 2000 Aug;130(8S Suppl):2073s-85s. doi: 10.1093/jn/130.8.2073S.
- Schneider MB, Matsuzaki H, Haorah J, Ulrich A, Standop J, Ding XZ, Adrian TE, Pour PM. Prevention of pancreatic cancer induction in hamsters by metformin. *Gastroenterology*. 2001 Apr;120(5):1263-70. doi: 10.1053/gast.2001.23258.
- Seo HS, DeNardo DG, Jacquot Y, Laios I, Vidal DS, Zambrana CR, Leclercq G, Brown PH. Stimulatory effect of genistein and apigenin on the growth of breast cancer cells correlates with their ability to activate ER alpha. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 Sep;99(2):121-34. doi: 10.1007/s10549-006-9191-2.
- Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science*. 2005 Dec 9;310(5754):1642-6. doi: 10.1126/science.1120781.
- Simmen RC, Eason RR, Till SR, Chatman L Jr, Velarde MC, Geng Y, Korourian S, Badger TM. Inhibition of NMU-induced mammary tumorigenesis by dietary soy. *Cancer Lett*. 2005 Jun 16;224(1):45-52. doi: 10.1016/j.canlet.2004.11.009.
- Smith U, Gale EA. Cancer and diabetes: are we ready for prime time? *Diabetologia*. 2010 Aug;53(8):1541-4. doi: 10.1007/s00125-010-1815-8.
- Spagnuolo C, Russo GL, Orhan IE, Habtemariam S, Daglia M, Sureda A, Nabavi SF, Devi KP, Loizzo MR, Tundis R, Nabavi SM. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions. *Adv Nutr*. 2015 Jul;6(4):408-19. doi: 10.3945/an.114.008052.
- Stanosz S. An attempt at conservative treatment in selected cases of type I endometrial carcinoma (stage I a/G1) in young women. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2009;30(4):365-9.

Stewart EA, Cookson CL, Gandolfo RA, Schulze-Rath R. Epidemiology of uterine fibroids: a systematic review. *Bjog*. 2017 Sep;124(10):1501-12. doi: 10.1111/1471-0528.14640.

Toro JR, Travis LB, Wu HJ, Zhu K, Fletcher CD, Devesa SS. Incidence patterns of soft tissue sarcomas, regardless of primary site, in the surveillance, epidemiology and end results program, 1978-2001: An analysis of 26,758 cases. *Int J Cancer*. 2006 Dec 15;119(12):2922-30. doi: 10.1002/ijc.22239.

Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraro C, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. The anti-diabetic drug metformin suppresses self-renewal and proliferation of trastuzumab-resistant tumor-initiating breast cancer stem cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Apr;126(2):355-64. doi: 10.1007/s10549-010-0924-x.

Vurusaner B, Poli G, Basaga H. Tumor suppressor genes and ROS: complex networks of interactions. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jan 1;52(1):7-18. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.035.

Wang SD, Chen BC, Kao ST, Liu CJ, Yeh CC. Genistein inhibits tumor invasion by suppressing multiple signal transduction pathways in human hepatocellular carcinoma cells. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Jan 16;14:26. doi: 10.1186/1472-6882-14-26.

Witters LA. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(8):1105-7. doi: 10.1172/jci14178.

Wysocki PJ, Wierusz-Wysocka B. Obesity, hyperinsulinemia and breast cancer: novel targets and a novel role for metformin. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010 May;10(4):509-19. doi: 10.1586/erm.10.22.

Yadav RK, Chauhan AS, Zhuang L, Gan B. FoxO transcription factors in cancer metabolism. *Semin Cancer Biol*. 2018 Jun;50:65-76. doi: 10.1016/j.semcancer.2018.01.004.

Yang JY, Hung MC. A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 1;15(3):752-7. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-08-0124.

Yeh CC, Fan Y, Jiang L, Yang YL, He B, You L, Mann M. Genistein Suppresses Growth of Human Uterine Sarcoma Cell Lines via Multiple Mechanisms. *Anticancer Res*. 2015 Jun;35(6):3167-73.

Yeh JE, Toniolo PA, Frank DA. Targeting transcription factors: promising new strategies for cancer therapy. *Curr Opin Oncol*. 2013 Nov;25(6):652-8. doi: 10.1097/01.cco.0000432528.88101.1a.

Zakikhani M, Blouin MJ, Piura E, Pollak MN. Metformin and rapamycin have distinct effects on the AKT pathway and proliferation in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;123(1):271-9. doi: 10.1007/s10549-010-0763-9.

Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res.* 2006 Nov 1;66(21):10269-73. doi: 10.1158/0008-5472.Can-06-1500.

Zang Y, Gu L, Zhang Y, Wang Y, Xue F. Identification of key genes and pathways in uterine leiomyosarcoma through bioinformatics analysis. *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):9361-8. doi: 10.3892/ol.2018.8503.

Zhang Y, Paikari A, Sumazin P, Ginter Summavarell CC, Crosby JR, Boerwinkle E, Weiss MJ, Sheehan VA. Metformin induces FOXO3-dependent fetal hemoglobin production in human primary erythroid cells. *Blood.* 2018 Jul 19;132(3):321-33. doi: 10.1182/blood-2017-11-814335.

Zheng F, Wu J, Tang Q, Xiao Q, Wu W, Hann SS. The enhancement of combination of berberine and metformin in inhibition of DNMT1 gene expression through interplay of SP1 and PDPK1. *J Cell Mol Med.* 2018 Jan;22(1):600-12. doi: 10.1111/jcmm.13347.