JOÃO GLASBERG

Estudo de fase II piloto de metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra Rachel Simões Pimenta Riechelmann

São Paulo

2022

JOÃO GLASBERG

Estudo de fase II piloto de metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Glasberg, João
Estudo de fase II piloto de metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados / João Glasberg. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Rachel Simões Pimenta Riechelmann.

Descritores: 1.Tumores neuroendócrinos 2.Metformina 3.Glicemia 4.Insulina 5.Peptídeo C 6.Hemoglobina A glicada

USP/FM/DBD-321/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha esposa e meu filho, que foram a minha motivação e o meu alicerce ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a todos os pacientes que se dispuseram a participar deste projeto. Obrigado por contribuir, de forma genuína, com o único propósito de ajudar a ciência na luta contra o câncer.

À minha orientadora, amiga Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann, por me orientar e me guiar durante toda essa jornada. Sua ética, competência e dedicação são inspirações para mim.

Ao meu amigo e colega Dr. João Evangelista Bezerra Neto, pelos ensinamentos e contribuição neste projeto e pela amizade e companheirismo durante todo esse período.

Aos meus queridos colegas do grupo de Oncologia Gastrointestinal do ICESP, em especial ao Dr. Jorge Sabbaga, que me ajudaram no recrutamento dos pacientes, na assistência aos pacientes quando eu não podia estar presente para assisti-los.

Ao colega e amigo Dr. Aley Talans, por seu trabalho impecável na avaliação dos exames de imagem.

À Dra. Rossana Veronica Mendonza Lopez, por todo auxílio na análise estatística.

À Dra. Débora Zachello Recchimuzzi, por contribuir no projeto na avaliação dos exames de imagem.

Ao colega e amigo Dr. Tomás Giollo Rivelli, pela ajuda no projeto e pelas conversas que tivemos ao longo desta jornada.

Ao Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff, pelos ensinamentos e incentivos.

Ao amigo e Prof. Dr. Gilberto de Castro Junior, por ser um exemplo profissional e de ser humano para mim. Obrigado pelos conselhos, conversas e todos apoio que você me deu.

A todos os professores que tive ao longo da minha formação, desde a escola básica até a pós-graduação, em especial ao Dr. Auro del Giglio, Dra. Melyssande Pontes Faccin (*in memoriam*), Dr. José Jorge Namura.

Finalmente, à minha família, pelo apoio e suporte ao longo desta jornada e por me ensinarem o valor do trabalho e dedicação. Sem vocês esse sonho não seria possível.

NORMATIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento da publicação:

Referências: Adaptado de *International Commitee of Medical Journals Editors (Vancouver)*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertação, tese e monografias*. Elaborado por Annelise 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 e Siglas ix
Lista de Símbolos.....x
Lista de Figuras.....xi
Lista de Tabelas xii
RESUMO..... xiii
ABSTRACT.....xiv
1 INTRODUÇÃO.....1
1.1 Neoplasia Neuroendócrina 3
1.2 mTOR e Câncer.....4
1.3 Metformina como droga antitumoral 6
1.4 Metformina em TNE 11
1.5 Justificativa.....12
2 OBJETIVOS 13
2.1 Desfechos e Avaliações.....14
3 MATERIAL E MÉTODOS 16
3.1 Desenho do Estudo.....17
3.2 Aspectos regulatórios 17
3.3 Pacientes elegíveis.....18
3.3.1 Critérios de elegibilidade 18
3.4 Tratamento 19
3.4.1 Metformina.....19
3.4.2 Administração 20
3.4.3 Aderência 22
3.4.4 Redução de dose.....22
3.4.5 Avaliações 23
3.4.6 Seguimento.....27
3.5 Considerações estatísticas 27
4 RESULTADOS 29
4.1 Características dos pacientes e das neoplasias 30
4.2 Eficácia.....34

4.3 Perfil glicêmico 37
4.4 Toxicidades 41
5 DISCUSSÃO 42
5.1 Características da população 43
5.2 Eficácia da metformina 43
5.3 Ação da metformina em associação ao everolimo 47
5.4 Ação da metformina em pacientes portadores de DM-2 48
5.5 Análise do perfil glicêmico como fator preditivo de ação antitumoral da metformina 50
5.6 Obesidade como fator preditivo de ação antitumoral da metformina 51
5.7 Análise do efeito metformina nas síndromes endócrinas associadas ao TNE 52
5.8 Perfil de toxicidade da metformina 53
5.9 Considerações finais 54
6 CONCLUSÕES 56
7 ANEXOS 58
A- Solicitação de execução do estudo 59
B- Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP 60
C- Registro no *Clinicaltrials.gov* 61
D- Parecer Consubstanciado do CEP 62
E- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 64
F- Diário de Sintomas 69
G- Artigo Publicado 70
8 REFERÊNCIAS 84

LISTAS

ABREVIATURAS E SIGLAS

^{177}Lu-Dotatate	*Lu-tetraazacyclododecanetetraacetic acid–octreotide*
4E-BP1	*eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins*
5-HIAA	ácido 5-hidroxiindolacético
Akt	*protein kinase* B
AMP	adenosine monofosfato
AMPK	*adenosine monophosphate-activated kinase*
ATP	adenosina trifosfato
Capox	esquema de quimioterapia com capecitabina oxaliplatina
CTCAE	Critérios de Toxicidade Comuns para Eventos Adversos
DM-2	*diabetes melittus* tipo 2
ECOG	*Eastern Cooperative Oncology Group*
EGFR	*epidermal growth factor*
EUA	Estados Unidos da América
FGFR3	*vascular endotelial growth factor receptor-3*
G1	Grau 1
G2	Grau 2
G3	Grau 3
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
IC	intervalo de confiança
ICESP	Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IGF-1	*insulin-like growth factor* 1
IGF-1R	*insulin-like growth factor 1receptor*
IMC	Índice de Massa Corpórea
LKB1	*serine threonine Kinase-1*
mFLOX.	Esquema de quimioterapia com 5- fluoruracil, oxaliplatina e leucovorin
mLST8	*mammalian LST8*
mTOR	*mammalian target of rapamycin*

mTORC1	*mTOR complexes 1*
mTORC2	*mTOR complexes 2*
PI3K	*phosphoinositidi-3-kinase*
PRAS40	proline-rich Akt substrate 40
RADIANT	*RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors*
RECIST	*Response Evaluation Criteria in Solid Tumor*
S6K1	proteína ribossômica S6 kinase
SLP	sobrevida livre de progressão
TACE	quimioembolização
TAE	embolização
TCD	taxa de controle de doença
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNE	Tumor neuroendócrino
TSC2	tuberous sclerosis complex 2
WHO	*World Health Organization*

SÍMBOLOS

%	por cento
≥	maior e igual
μIU/ml	mililitro de unidade internacional por mililitro
<	menor
g/dl	grama por decilitro
Kg/m^2	kilograma por metro quadrado
mg	miligrama
mg/dl	miligrama por decilitro
mg/m^2	miligrama por metro quadrado
mM	milimolar
mm^3	milímetro cúbico
ng/ml	nanograma por mililitro

FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de ação antitumoral da metformina 10

Figura 2 - Curva de Kaplan–Meier de sobrevida livre de progressão 34

Figura 3 - Curva de *Kaplan–Meier* de sobrevida livre de progressão, conforme o índice de massa corpórea 35

Figura 4 - Máxima mudança no tamanho do tumor.....36

Figura 5 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação de glicemia sérica.....39

Figura 6 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação de insulina sérica.....39

Figura 7 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação peptídeo C 40

Figura 8 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação da hemoglobina glicada 40

TABELAS

Tabela 1 - Escalonamento da dose 23

Tabela 2 - Características da população 31

Tabela 3 - Tratamentos pregressos 32

Tabela 4 - Histórico de quimioterapias utilizadas 33

Tabela 5 - Perfil glicêmico 37

Tabela 6 - Perfil glicêmico na avaliação de 180 dias nos pacientes com doença estável e nos pacientes com progressão de doença 38

Tabela 7 - Eventos adversos relacionados ao tratamento 41

RESUMO

Glasberg J. *Estudo de fase II piloto de metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: O uso de metformina como terapia antitumoral vem sendo estudada em diferentes tipos de tumor. Em tumores neuroendócrinos (TNE) estudos pré-clínicos com culturas celulares sugerem uma ação antitumoral do uso da metformina. Esta ação dar-se-ia por meio de duas vias: a primeira, denominada via direta, ocorre pela ativação de *adenosine monophosphate-activated kinase* (AMPK); a segunda, denominada via indireta, ocorre pela redução de níveis séricos de insulina. Ambas, enfim, levam a inibição de *mammalian target of rapamicin* (mTOR) e, consequentemente, inibição do crescimento celular. Estudos retrospectivos de pacientes com TNE tratados com everolimo apontam para um ganho em sobrevida livre de progressão (SLP) em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) que receberam metformina. O objetivo deste estudo foi avaliar a segurança e ação antitumoral da metformina em uma população de pacientes com TNE bem diferenciado. **Métodos:** Pacientes com diagnóstico de TNE, graus 1 e 2, metastáticos e em progressão, foram recrutados para este estudo fase II, de braço único, para uso de metformina em monoterapia de 850 mg via oral duas vezes ao dia até progressão ou intolerância. O desfecho primário do estudo foi taxa de controle de doença por RECIST 1.1 em 180 dias. Os desfechos secundários foram: taxa de resposta radiológica, SLP, avaliação de SLP em pacientes com índice de massa corpórea (IMC) < 25 Kg/m^2, e em pacientes com IMC ≥ 25 Kg/m^2, toxicidade e variação no perfil glicêmico por meio dos níveis séricos de glicemia em jejum, hemoglobina glicada, insulina e peptídeo C a cada 90 dias. **Resultados:** Entre 2014 e 2019 foram incluídos 28 pacientes: a idade mediana foi 50 anos, sendo 53% homens. 84% tinham tumores não funcionantes, 86% eram gastrintestinais e 62% eram grau 2. Metformina foi o primeiro tratamento em 25% dos casos. No momento do último seguimento, 26 pacientes haviam apresentado progressão de doença. Treze pacientes (46%) apresentaram controle de doença em 6 meses com mediana de SLP de 6,3 meses (intervalo de confiança 95%: 3,2 – 9,3). Nenhum paciente apresentou resposta radiológica. Nos pacientes com tumor funcionante, apesar da metformina não controlar a secreção hormonal, um paciente referiu melhora completa dos sintomas de síndrome carcinoide. A avaliação da variação do perfil glicêmico não se correlacionou com a taxa de controle de doença em 6 meses. O evento adverso mais comum foi diarreia: graus 1-2 em 17% e graus 3-4 em 10%. **Conclusões:** Metformina como monoterapia não demonstrou ação antitumoral em TNE. Apesar de segura e bem tolerada, apresentou alta frequência de diarreia.

Descritores: Tumores neuroendócrinos; Metformina; Glicemia; Insulina; Peptídeo C; Hemoglobina A glicada.

ABSTRACT

Glasberg J. *A phase II trial of metformin in patients with well differentiated neuroendocrine tumors* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Background: Preclinical studies have suggested that metformin has antitumor effects, likely due to blockage of mTOR pathway through *adenosine monophosphate-activated kinase* (AMPK) and decreased insulin levels. A retrospective study showed that metformin combined with everolimus to treat related hyperglycemia offered longer progression-free survival (PFS) in patients with pancreatic neuroendocrine tumors (NET). **Aim(s):** To evaluate the efficacy and safety of metformin monotherapy in non-diabetic patients with NET. **Methods:** Non-diabetic patients with progressive metastatic grade 1-2 gastroenteropancreatic NET were recruited for this single-arm phase II trial, to receive metformin 850 mg PO twice daily until progression or intolerance (NCT02279758). The primary endpoint was disease control rate (DCR) by RECIST 1.1 at 6 months. Secondary endpoints were: clinical and radiological response rate, PFS, toxicity and variations in glycemia, glycated hemoglobin and peptide C kinetics at baseline and at every 90 days. **Results:** From 2014 to 2019, 28 patients were enrolled: median age was 50 years, 53% were male. 84% had nonfunctional NET, 86% had gastrointestinal NET, 62% had grade 2 NET. Metformin was not the first line of treatment in 25% of them. By the last follow up, 26 patients presented progression. Thirteen patients (46%) presented DCR at 6 months, with a median PFS of 6,3 months (95% Confidence interval: 3,2 – 9.3). There was no objective response in any patient, but one with refractory carcinoid syndrome had full symptom relief. The variation on glycemic profile (glycemia, glycated hemoglobin, peptide C and insulin) was not associated with DRC at 6 months. Diarrhea was the most common adverse event: grade 1-2 in 17% and grade 3-4 in 10%. **Conclusion:** Metformin monotherapy offers none antitumor activity in NET and high frequency of diarrhea.

Descriptors: Neuroendocrine tumors; Metformin; Blood glucose; Insulin; C-Peptide; Glycated hemoglobin A.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os tumores neuroendócrinos (TNE) são um grupo heterogêneo de neoplasias com diferentes apresentações clínicas e histológicas. Consideradas neoplasias raras, sua incidência vem aumentando nos últimos anos, em razão da melhora nos métodos diagnósticos como colonoscopia, endoscopia, tomografias e ressonâncias. Dados do *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER), uma base de dados com os registros de câncer dos Estados Unidos da América (EUA), apontam para um aumento na incidência de 1,09/10000 para 6,98/100000, entre os anos de 1973 e 2012 [(1)]. Este aumento de incidência, associado à natureza indolente dos TNE, resultou no aumento da prevalência destas neoplasias. Dados dos EUA apontam para aumento da prevalência, de 0,006% em 1993 para 0,48% em 2012 [(1)]. No Brasil, não há dados nacionais de incidência e prevalência em TNE disponíveis.

A primeira descrição de TNE foi realizada pelo patologista alemão Siegfried Oberndorfer em 1907, em seu artigo intitulado *"Karzinoïde Tumoren des Dunndarmscomo"* [(2)]. Neste artigo, é descrito o caso clínico de uma mulher de 48 anos que havia morrido presumivelmente de tuberculose, mas, que em sua autopsia foi encontrado um tumor em ílio, histologicamente semelhante ao adenocarcinoma, porém de comportamento mais indolente, que foi denominado *"Karzinoïde Tumoren"*, ou tumor carcinoide [(2-4)]. Posteriormente a este artigo, foram descritas inúmeras neoplasias neuroendócrinas de diferentes órgãos e sistemas com prognóstico e quadro clínico muito distintos entre si. Esta grande heterogeneidade levou à necessidade de se ampliar a classificação destas neoplasias e abandonar a denominação carcinoide [(3, 4)]. A classificação deste grupo de tumores vem sofrendo

atualizações constantes para envolver as grandes diferenças clínicas e prognósticas destes tumores. Recentemente, a *World Health Organization* (WHO) apresentou uma nova classificação, na qual a nomenclatura TNE foi atribuída apenas aos tumores bem diferenciados, e a denominação carcinoma neuroendócrino, aos tumores pouco diferenciados [(5)]. Os TNE são subdivididos em baixo grau (G1), grau intermediário (G2) e alto grau (G3). Esta divisão é determinada pela taxa de mitoses e pelo índice de proliferação Ki-67. Os carcinomas são todos indiferenciados e podem ser subdivididos em pequenas células ou grandes células, a depender de sua característica morfológica [(5)]. Esta classificação permitiu uma melhor caracterização prognóstica e melhor seleção de tratamento para cada tipo de neoplasia neuroendócrina.

1.1 Neoplasia Neuroendócrina

As neoplasias neuroendócrinas recebem este nome por se originarem de células ditas neuroendócrinas. Esta denominação vem da capacidade destas células produzir e secretar monoaminas (componente endócrino), e da presença de grânulos de armazenamento destas aminas semelhantes aos presentes nos neurônios (componente neural) [(6, 7)]. Esse conjunto de células pode ser dividido em dois grandes grupos: 1) células agregadas, que vão constituir as glândulas (tireoide, paratireoide, adrenal, etc.) e 2) células difusamente dispersas, que são encontradas em todo o corpo, como trato respiratório, trato gastrointestinal, trato urinário entre outros [(8)].

Em razão da grande heterogeneidade deste grupo de tumores, seu tratamento torna-se um grande desafio. Eles podem diferir quanto à sua velocidade de

crescimento, variando de tumores com crescimento mais lentos até tumores agressivos com rápido crescimento. Outra característica é sua capacidade de secretar hormônios. Estes tumores podem secretar diferentes hormônios, gerando as mais distintas síndromes endócrinas. Estes tumores também podem variar quanto à sua localização, podendo se originar de qualquer órgão ou sistema do corpo humano [8-10].

Nos últimos anos, uma série de novos tratamentos surgiu para auxiliar no tratamento dos TNE, como análogos de somatostatina, quimioterapias, terapia com radionuclídeo, inibidores da tirosina quinase e inibidor de *mammalian target of rapamicin* (mTOR). A escolha da melhor sequência de tratamento torna-se distinta em cada paciente, tornando a abordagem multidisciplinar de extrema importância [10-14].

1.2 mTOR e Câncer

Uma das áreas de central importância nos TNE é o estudo da inibição do mTOR. O mTOR age na regulação da tradução proteica, crescimento celular e metabolismo. Sua ativação está envolvida na patogênese de diversos tumores [15, 16]. Dentre as diferentes formas de se ativar mTOR, destaca-se a via de sinalização da *phosphoinositidi-3-kinase* (PI3K)/*protein kinase* B (Akt)/mTOR. Esta, por sua vez, é ativada por meio de diversos receptores de *tyrosine-kinase*, como *insulin-like growth factor* 1 (IGF-1) e *insulin-like growth factor* receptor (IGF-1R), *epidermal growth factor* (EGFR), *vascular endotelial growth factor receptor-3* (FGFR3), c-Kit e receptores de somatostatina 1-5 [17, 18]. Esta ativação provoca uma cascata de reações

químicas por meio da via PI3K/Akt/mTOR, culminando na ativação de dois grandes complexos mTORC1 e mTORC2 que causam diminuição do apoptose, aumento do crescimento celular, aumento do metabolismo celular e aumento da tradução proteica [18-20]. Mutações que levam a ativação patológica da via PI3K/Akt/mTOR estão ligadas à carcinogênese de diversos tumores, como carcinoma de mama hormônio-resistente, carcinoma renal de células claras, TNE, entre outros [20-22]. O papel chave desta via na regulação do crescimento celular, metabolismo energético celular e apoptose tornam a ativação patológica da via PI3K/Akt/mTOR uma das mutações mais prevalentes em todas as neoplasias [23-25].

O bloqueio de mTOR, como mecanismo antitumoral começou a ser estudado com a descoberta do *Rapamycin*, um macrolídeo produzido pelo *Streptomyces Hygroscopicus* com a capacidade de inibir a atividade de mTOR [26]. Posteriormente, foram sintetizados outros inibidores de mTOR, como o everolimo - o mais estudado como terapia antitumoral. O everolimo (anteriormente denominado RAD001) é um potente e seletivo inibidor análogo da rapamicina, que age bloqueando mTOR inibindo o metabolismo e o crescimento celular [27, 28]. O everolimo teve sua ação antitumoral reportada em estudos pré clínicos em TNE [21, 29], motivando a realização da série de estudos clínicos denominada RADIANT (*RAD001 in Advanced Neuroendócrine Tumors)*,[30-32] para avaliar a segurança e a eficácia do uso de everolimo em diferentes populações de TNE. O primeiro estudo desta série, RADIANT-1, foi um estudo internacional de fase 2 com 160 pacientes com TNE de origem pancreática, após progressão à quimioterapia [33]. Foi encontrada uma taxa de resposta tumoral com everolimo isolado de 9,6% e uma sobrevida livre de progressão (SLP) mediana de 9,7 meses. A associação de everolimo e octreotide de longa

duração obteve a mediana de SLP de 16,7 meses [33]. No estudo RADIANT-2, 429 pacientes com TNE grau 1 ou grau 2, com sintomas de síndrome carcinoide, foram randomizados para receber everolimo (10 mg diariamente) associado à octreotide de liberação prolongada (30 mg a cada 28 dias) ou placebo associado à octreotide de liberação prolongada. O estudo demonstrou SLP de 16,4 meses versus 11,3 meses, favorecendo o grupo com intervenção. No entanto, essa diferença não alcançou significância estatística previamente determinada (p=0,026) [30]. No estudo RADIANT-3, 410 pacientes com TNE de pâncreas, graus 1 ou 2, com doença metastática e em progressão, foram randomizados para receber everolimo 10 mg ou placebo [31]. Foi observado um ganho de SLP de 5,4 meses em favor do braço do everolimo p<0,001 [31]. Uma terceira população de TNE foi avaliada no estudo RADIANT-4. Neste estudo, pacientes com tumores não funcionantes, bem diferenciados, de origem pulmonar ou gastrointestinal, foram randomizados para receber everolimo 10 mg versus placebo [32]. O estudo foi positivo para seu objetivo primário, com mediana de SLP de 11 meses para o grupo everolimo e 3,9 meses para o grupo placebo (razão de risco: 0,48 intervalo de confiança [IC] 95%: 0,35-0,67; p<0,00001) [32].

1.3 Metformina como droga antitumoral

A ação antitumoral demonstrada na série de estudos RADIANT aumentou o interesse em novas formas de bloquear mTOR. Neste cenário, a metformina surge como uma candidata à terapia antitumoral por sua ação inibindo a via PI3K/Akt/mTOR. Amplamente utilizada no controle do diabetes mellitus tipo 2

(DM-2), a metformina vem sendo estudo por uma possível ação antitumoral. Esta ação inicialmente, foi sugerida no estudo de Evans et al. em 2005, em um estudo caso-controle com 11.876 pacientes com DM-2, no qual o uso de metformina reduziu o risco de desenvolver câncer em 21% [34]. Outros estudos observaram esta possível associação entre uso de metformina e redução na incidência de câncer, como apresentado no estudo tipo caso controle realizado no MD Anderson Cancer Center (Houston, Texas, EUA), no qual se obteve uma redução de 62% no risco de desenvolver câncer de pâncreas em pacientes com DM-2 tratados com metformina [35]. Uma metanálise analisou o papel da metformina, como terapia adjuvante em pacientes com câncer potencialmente curáveis, incluindo 27 estudos, quase todos coortes retrospectivas, para avaliar sobrevida global, sobrevida câncer-específica e sobrevida livre de recidiva [36]. O uso de metformina associou-se à melhores desfechos clínicos nos cânceres colorretal e de próstata [36]. O estudo ZODIAC-16 analisou uma coorte de 1.353 pacientes holandeses com diagnóstico de câncer e DM-2 [37]. Destes, 289 foram tratados com metformina e 1.064 tratados com outros agentes hipoglicemiantes. Foi encontrada uma redução de mortalidade câncer-específica no grupo que recebeu metformina (razão de risco: 0,43; [IC] 95%: 0,23-0,80). Esta associação foi maior com maiores concentrações de metformina, com queda de 42% no risco de morte para o aumento de um grama na concentração de metformina [37]. Dados semelhantes foram descritos por Bowker et al., que realizaram uma coorte retrospectiva com pacientes com câncer e DM-2, demonstrando um aumento na mortalidade câncer-específica no grupo tratado com sulfonilureia em comparação ao grupo que recebeu metformina (razão de risco: 1,3; [IC] 95%: 1,1- 1,6) [38].

Apesar da evidência de uma série de estudos epidemiológicos sugerirem ação antitumoral da metformina, reduzindo incidência de câncer e mortalidade câncer-específica em pacientes com DM-2, não há conhecimento exato do mecanismo deste efeito. A maioria dos estudos aponta para duas vias de ação: a primeira denominada via direta, por meio da ação da metformina nas células neoplásicas via ativação da *adenosine monophosphate-activated kinase* (AMPK), que vai levar à fosforilação e ativação do tumor supressor tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) levando à inibição da ação da mTOR; e a segunda, denominada via indireta, por meio de metabolismo glicêmico, reduzindo fatores pró-mitogênicos, como insulina e IGF-1 e, consequentemente, inibindo a via PI3k/ Akt/mTOR [39, 40].

O primeiro mecanismo, conhecido como via direta, ocorre por meio da ativação de AMPK. A metformina age na mitocôndria pelo complexo respiratório I, inibindo a produção de adenosina trifosfato (ATP) e, por conseguinte, reduzindo a razão adenosina trifosfato/adenosina monofosfato (AMP), o que ativa a AMPK [41, 42]. A AMPK também pode ser ativada de forma indireta pela *LKB1/serine threonine Kinase-11*, *calmodulin-dependent Kinase-2* e *TGF beta-activated kinase-1* [41]. A ativação da AMPK leva a uma inibição de mTOR pela fosforilação direta do TSC2 [43]. A mTOR é a forma catalítica de um complexo denominado mTORC1 formado pelo mTOR, mammalian LST8(mLST8), proline-rich Akt substrate 40 (PRAS40) e raptor. A inibição do complexo mTORC-1 vai levar à inibição na fosforilação e ativação de eukaryotic initiation fator 4E-binding proteins (4E-BP1) e a proteína ribossômica S6 kinase (S6K1). Como consequência, ocorre redução da progressão tumoral e indução da apoptose. A mesma AMPK também age diretamente na mTOR, inibindo sua fosforilação e ativação da S6K1 e 4E-BP1 [34, 40, 44, 45]. (Figura 1)

O segundo mecanismo, conhecido como via indireta, ocorre por meio da ação da metformina, que reduz os níveis séricos de glicose, insulina, IGF-1, levando assim à inibição da via PI3K /Akt / mTOR. Esta redução nos níveis séricos de glicose, insulina, IGF-1 ocorre em razão da inibição da gliconeogênese hepática e aumento da sensibilidade dos receptores de insulina à insulina sérica, levando assim ao aumento de captação de glicose pelas células músculoesqueléticas [40, 46]. (Figura 1)

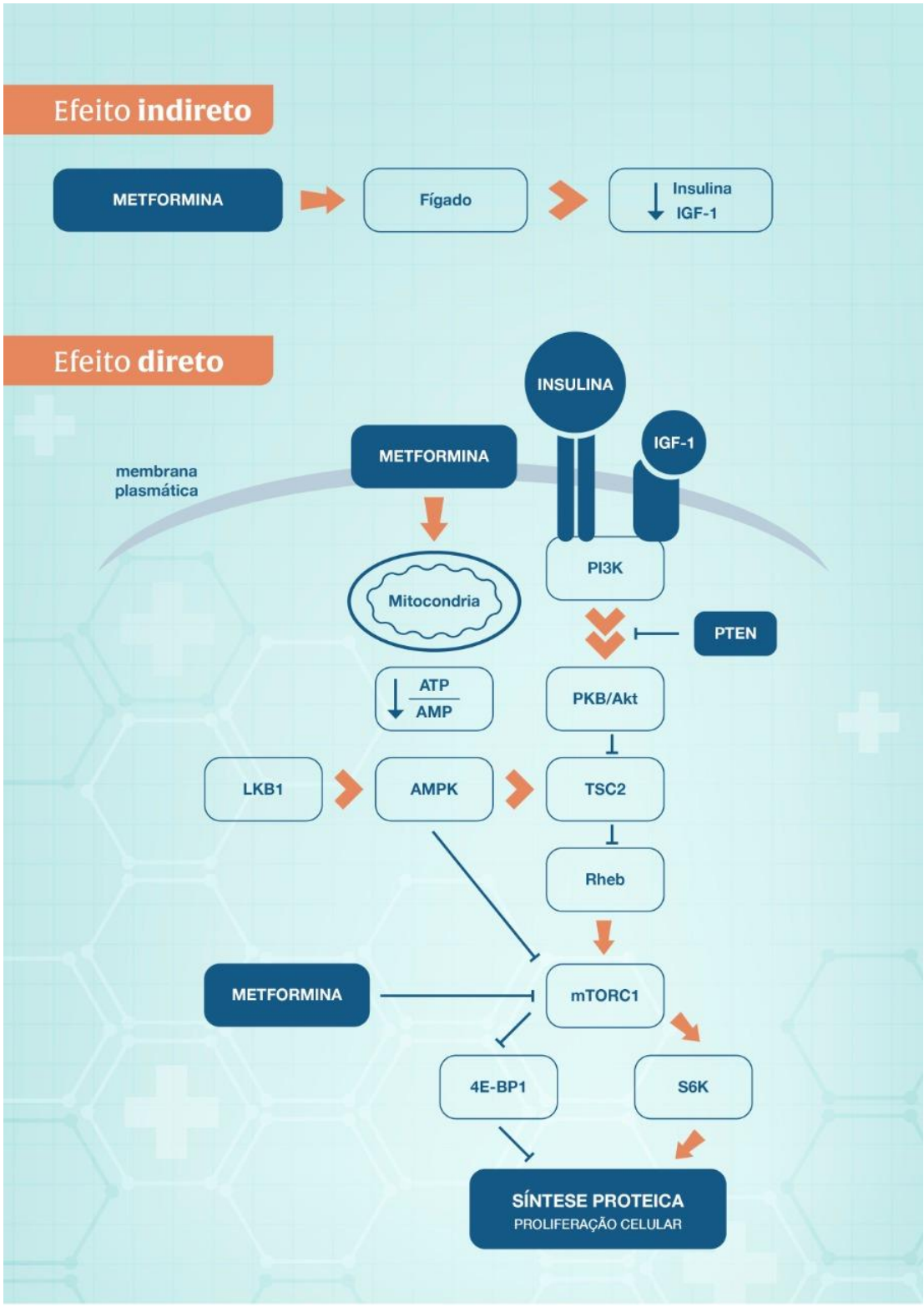


Figura 1 - Representação esquemática do mecanismo de ação antitumoral da metformina

1.4 Metformina em TNE

Os mecanismos antitumorais da metformina são responsáveis pelo recente aumento no interesse em estudos do uso de metformina em TNE, como uma candidata à terapia antitumoral nestes tumores, sobretudo pela importância da mTOR na tumorigênese dos TNE [47, 48]. Estudos pré-clínicos com culturas celulares foram realizados com o intuito de avaliar o papel da metformina em TNE de diferentes origens, e o seu papel na associação ao everolimo. Um estudo examinou concentrações crescentes de metformina (0,1 a 10 mM) em três linhagens de TNE: BON1 (pancreática), NCI-H727 (broncopulmonar) e GOT1 (intestino médio), e observou a redução da viabilidade celular e do número de células nas três linhagens celulares [49]. No entanto, nas células BON1 e GOT1, a metformina levou à fosforilação de AMPK e sua ativação, enquanto nas células NC-H727 levou à inibição de AMPK, sugerindo uma ação antitumoral distinta a depender do tipo celular. Apesar dos mecanismos de ação antitumoral diferentes, as três linhagens tiveram inibição de mTORC1 [49]. Explorando um possível papel sinérgico da metformina em associação ao everolimo, Vitali et al. avaliaram a ação antitumoral de everolimo e metformina, em forma isolada ou em combinação, em cultura de células de TNE pulmonar e pancreático [50]. Tanto o everolimo como a metformina demonstraram ação antitumoral de forma isolada. A associação de ambas as drogas foi mais eficaz na linhagem de células de TNE pancreático; o mesmo não ocorreu nas células de TNE pulmonar [50].

Apesar dos dados pré-clínicos encorajadores, existem poucos dados clínicos comprovando a ação da metformina em pacientes com TNE, apenas análises

retrospectivas de pacientes com TNE e DM-2, que receberam metformina para tratamento da DM-2. O maior estudo, até o momento da publicação desta tese, é uma análise retrospectiva de 445 pacientes com TNE avançado. O objetivo primário do estudo foi avaliar o impacto da DM-2 na sobrevida livre de progressão (SLP), e o objetivo secundário foi avaliar um possível impacto do uso da metformina na SLP [51]. A SLP foi maior nos pacientes com DM-2 do que em normoglicêmicos (mediana de 32.0 versus 15.1 meses). Entre os pacientes com DM-2 (n=133), a SLP foi ainda maior nos pacientes que receberam metfomina quando comparados aos tratados com outros hipoglicemiantes (mediana de 44,2 meses versus 20,8 meses; razão de risco=0,49; [IC] 95% 0.34-0.69; p<.0001)) [51].

1.5 Justificativa

Apesar dos estudos pré-clínicos e análises retrospectivas sugerirem que a metformina teria uma possível ação antitumoral, não há estudos clínicos prospectivos analisando esta possível ação. Muitas questões ainda precisam ser elucidadas, como por qual mecanismo a metformina teria sua ação, se seria exclusiva de pacientes com DM-2 ou se a metformina teria algum papel em pacientes normoglicêmicos, na dose de metformina a ser administrada, se a metformina teria algum papel como monoterapia ou necessariamente em combinação com outras drogas, como o everolimo, entre outras. Neste cenário, este estudo foi concebido com o intuito de avaliar uma possível ação antitumoral da metformina no tratamento de pacientes com TNE bem diferenciado.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a eficácia do uso de metformina, quando usado, de forma isolada, em pacientes com TNE, grau 1 ou grau 2, metastáticos e com doença em progressão.

Foram analisadas taxa de controle de doença em seis meses, sobrevida livre de progressão e avaliação de taxa de resposta. Também foram analisadas a segurança e a tolerabilidade da medicação, além de possíveis fatores preditivos de benefício do uso da metformina, como variação no perfil glicêmico (glicemia de jejum, hemoglobina glicada, insulina sérica, peptídeo C) e índice de massa corpórea.

2.1 Desfechos e Avaliações

O desfecho primário deste estudo foi a taxa de controle de doença (TCD) em 180 dias de tratamento. TCD foi definida como doença estável, resposta parcial ou resposta completa, conforme *Response Evaluation Criteria in Solid Tumor* (RECIST) 1.1 [52].

O estudo seria considerado positivo se, após 180 dias de uso de metfomina, mais de 50% dos pacientes não apresentassem progressão de doença pelo critério de RECIST 1.1 [52]. Como desfecho secundário, foi avaliada a SLP, definida como o período do tratamento com metformina até a progressão da doença ou óbito.

Desfechos secundários foram:

- Segurança e tolerabilidade: avaliadas nas consultas médicas com graduação dos eventos adversos associados ao uso da metformina;

- Avaliação da variação no perfil glicêmico, como preditor de resposta ao tratamento: Análise da variação nos níveis séricos do perfil glicêmico (glicemia, peptídeo C, insulina, hemoglobina glicada) no início do tratamento e 180 dias. Avaliando a associação desta variação com TCD;
- Avaliação do índice de massa corpórea (IMC) como preditor de ação da metformina: Avaliado à SLP mediana para os pacientes com IMC< 25 Kg/m^2 e com IMC ≥25 Kg/m^2.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo piloto de fase II de braço único, uni-institucional, que avaliou o benefício do uso de metformina no tratamento de pacientes com tumor neuroendócrino avançado, graus 1 e 2, e em progressão tumoral. Os pacientes elegíveis receberam o tratamento até a progressão, toxicidade inaceitável ou retirada de consentimento. Todos os pacientes foram recrutados entre julho de 2014 e agosto de 2019, no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

3.2 Aspectos regulatórios

A solicitação de execução do estudo no ICESP foi deferida em 17 de fevereiro de 2014, sob registro NP 515/14 (Anexo A).

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em 19 de março de 2014, sob NP 059/14 (Anexo B).

O estudo foi registrado no Clinicaltrials.gov como NCT02279758 (Anexo C).

Em 8 de novembro de 2016, o estudo obteve Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, sob número 1836.260 (Anexo D).

3.3 Pacientes elegíveis

A população do estudo foi composta de pacientes com diagnóstico histológico de TNE graus 1 ou 2 de origem gastroenteropancreática ou pulmonar, que apresentavam doença metastática ou localmente avançadas inoperáveis.

3.3.1 Critérios de elegibilidade

- Diagnóstico histológico de TNE Grau 1 ou 2, metastático ou localmente avançado, incurável e inoperável.
- Pacientes tinham que apresentar progressão radiológica de doença determinada por julgamento clínico do médico assistente. Foram aceitos pacientes virgens de tratamento ou que receberam terapia prévia.
- Escala de performance do *Eastern Cooperative Oncology Group* (ECOG) 0, 1 e 2.
- Capacidade de engolir comprimidos.
- Idade acima de 16 anos.
- Função orgânica adequada, conforme definido pelos seguintes critérios:
- Contagem absoluta de neutrófilos $\geq$ 1.500/ mm^3;
- Contagem de plaquetas $\geq$ 80.000/ mm^3;
- Hemoglobina $\geq$ 8,0 g/dl;
- Creatinina sérica < 1,5 mg/dl (para homens);
- Creatinina sérica < 1,4 mg/dl (para mulheres);
- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), assinado pelo paciente ou representante legal (Anexo E).

3.4 Tratamento

3.4.1 Metformina

A metformina é uma biguanida semi-sintética, derivada da planta *Galega officinalis*, com uso bem definido no tratamento de DM-2, síndrome de ovários policísticos e síndrome metabólica, há várias décadas. Esta droga tem a capacidade de reduzir a captação de glicose intestinal, reduzir a produção de glicose hepática e aumentar a sensibilidade celular à glicose pela ativação da enzima AMPK; no entanto, ela não estimula a secreção de insulina. Dessa forma, em pacientes diabéticos com resistência à insulina, a metformina leva a maior absorção e utilização da glicose pelas células musculoesqueléticas e tecido adiposo, e redução dos níveis séricos de insulina. A redução nos níveis séricos de glicose é observada apenas em pacientes com DM-2, não havendo esta ação em pacientes não diabéticos [(39)].

A metformina é absorvida após 1 a 3 horas da ingestão. A seguir, a metabolização é predominantemente hepática ou por meio da mucosa do trato gastrointestinal, até 90% de sua eliminação é renal. Esta medicação é comercializada por meio de comprimidos de 500 e 850mg; os comprimidos devem ser tomados até três vezes ao dia, juntamente com as refeições, e a dose máxima permitida é 2.550 mg/dia [(53)].

A metformina induz a formação de glicose em lactato na mucosa intestinal, podendo aumentar os níveis séricos de lactato. O risco de desenvolver acidose lática pelo uso da metformina é de três em 100.000 usuários. Dessa forma, a metformina deve ser evitada em pacientes que apresentam risco de evoluir com hiperlactatemia

/acidose metabólica como, por exemplo, em quadros de insuficiência renal, insuficiência hepática, alcoolismo, sepse ou insuficiência cardíaca. Pelo aumento dos níveis de lactato sérico, também é recomendada a suspensão da metformina até 48 horas antes de exames de imagem que necessitem de contraste e preconiza-se reiniciá-la, após a restauração da função renal [53].

A metformina costuma ser altamente tolerável. Os principais efeitos colaterais relacionados a seu uso de metformina são gastrointestinais (diarreia, náusea, vômito, desconforto abdominal, anorexia), podendo chegar a 30% dos casos, geralmente reversíveis. Também são relatadas sensação de gosto metálico na boca em 3% e redução nos níveis de vitamina B12 em 6% dos pacientes [54].

Baseando-se em experiência prévia de tolerabilidade, conforme estudos conduzidos no ICESP com pacientes oncológicos [55], e, em razão da ausência de dosagem-padrão no tratamento com intuito antitumoral, o presente estudo-piloto adotou a dosagem de 850 mg de metformina a cada 12 horas continuadamente.

3.4.2 Administração

O tratamento utilizado foi metformina de 850 mg via oral a cada 12 horas continuadamente (durante as refeições), com copo de água. Em casos de vômitos ocorridos após 1 hora da tomada ou quando uma dose foi esquecida por mais de 6 horas, o paciente foi orientado a pular esta dose e não compensar na próxima tomada. O período de tratamento foi o tempo em que o paciente apresentou benefício, isto é, até progressão ou intolerância ou a julgamento médico. Um ciclo de tratamento foi definido por 30 dias.

Com 15 dias de tratamento (D 15) os pacientes foram submetidos à avaliação de segurança/tolerância e aderência, para avaliar possíveis toxicidades relacionadas à metformina. Os investigadores poderiam descontinuar o paciente do estudo em caso de toxicidade grave e/ou se julgassem haver progressão clínica evidente com o uso de metformina.

As visitas médicas foram a cada 30 dias (+/- 7 dias). A cada 90 dias (+/-7 dias) foram realizados exames de imagem (tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética de abdômen/pelve e tórax, se aplicável) até progressão radiológica de doença pelos critérios de RECIST 1.1 [(52)]. A avaliação do desfecho primário do estudo deu-se por meio de exames de imagem (tomografia computadorizada e/ou ressonância nuclear magnética de abdômen/pelve e tórax, se aplicável) com 180 dias do início do tratamento (+/-7 dias). Pacientes que não apresentaram progressão de doença pelos critérios de RECIST 1.1 continuaram utilizando a metformina até progressão radiológica, progressão clínica a critério do investigador e/ou subinvestigador ou toxicidade limitante. Estes pacientes continuaram sendo submetidos a avaliações clínicas a cada 30 dias (+/-7 dias) e radiológicas a cada 90 dias (+/-7 dias).

Pacientes com DM-2 em uso de metformina tiveram sua doença controlada por meio de outros hipoglicemiantes, evitando aumentar a dose de metformina. Pacientes que pudessem necessitar de metformina em doses maiores do que 850 mg duas vezes ao dia seriam descontinuados do estudo.

De forma geral, foram permitidas medicações e terapias concomitantes consideradas necessárias para o tratamento de suporte (incluindo octreotide para tumores funcionantes) e segurança do paciente, desde que seu uso fosse

documentado no prontuário do paciente e na ficha clínica apropriada. Drogas que pudessem interagir com a metformina foram evitadas (contraindicação moderada). Alguns exemplos de drogas com possível interação com a metformina são: cefalexina e cimetidina (que podem aumentar o nível sérico da metformina), diuréticos tiazídicos, análogos hormônio de liberação do hormônio luteinizante e corticosteroides (que podem reduzir o efeito anti-hiperglicemiante da metformina) [54]. Substituições por drogas de mesma classe foram permitidas no estudo.

3.4.3 Aderência

A cada consulta, os pacientes recebiam a quantidade de comprimidos de metformina suficiente até a próxima consulta. Para avaliação da aderência, foi solicitado que os pacientes trouxessem os *blisters* a cada consulta e no momento da descontinuação do tratamento.

3.4.4 Redução de dose

Interrupção ou redução de dose foram permitidas em casos de eventos adversos clinicamente significativos (Tabela 1). Foi permitida a redução de um nível de dose de metformina (redução máxima de 1 comprimido) em caso de qualquer toxicidade com grau igual ou maior que três ou toxicidade grau 2 intolerável, conforme os dados da tabela a seguir:

Tabela 1 - Escalonamento da dose

Medicamento em estudo e dose	metformina 850 mg duas vezes por dia
Toxicidades **grau ≥ 3 ou grau 2 intolerável.**	Suspender a terapia até recuperação do quadro (com avaliação semanal pelo médico responsável até o término da recuperação). Quando há melhora do quadro (toxicidade grau 1), reiniciar com um comprimido 850mg ao dia (redução de uma dose). Caso não haja melhora do quadro clínico em até três semanas (persiste com toxicidade grau 3 ou grau 2 intolerável) ou paciente não tolere a dose de um comprimido/dia, o paciente seria descontinuado do estudo por toxicidade inaceitável.
Toxicidade hematológica ou não hematológica < grau 2	Nenhuma redução de dose seria realizada para toxicidades toleráveis.
Realização de exames de imagem que necessitem de contraste iodado	Suspender a terapia 48 horas antes do exame de imagem. Retornar o uso de metformina, após 24 horas da realização do exame.

3.4.5 Avaliações

Avaliação na Linha de Base

Após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os pacientes foram submetidos à avaliação basal, para determinar a elegibilidade do paciente (vide itens abaixo) e receberam o diário de sintomas para ser preenchido (Anexo F). O início do uso da metformina foi programado para uma semana, após a assinatura do TCLE.

Dentro de +/- 3 dias da assinatura do TCLE

- Imagem por tomografia computadorizada de abdômen, pelve e tórax (se aplicável) ou ressonância nuclear magnética.

- Histórico médico, incluindo diagnóstico e tratamentos para o TNE, histórico de outras doenças (ativas e resolvidas), medicamentos em uso e dados demográficos gerais. Exame físico completo, índice de desempenho ECOG, peso e altura corporal e sinais vitais.

- Teste de gravidez para mulheres em idade fértil e com suspeita de gravidez. Pacientes serão orientadas à contracepção.

- Exames laboratoriais como: hemograma, ureia, creatinina, gasometria venosa, glicemia e marcador tumoral (se tumor funcionante). Estes exames fazem parte da rotina no tratamento de TNE no ICESP.

Avaliação de Eficácia

Os pacientes realizaram avaliação radiológica a cada 90 dias (janela +/- 7 dias). Os pacientes que não apresentavam progressão radiológica, conforme os critérios do RECIST 1.1 seguiam com avaliação clínica mensal e nova avaliação de eficácia em 90 dias (janela +/- 7 dias). O desfecho primário do estudo foi determinado, como a taxa de controle de doença na avaliação de eficácia com 180 dias (janela +/- 7 dias), após o início do tratamento. Pacientes com benefício, conforme os critérios de eficácia, puderam continuar o tratamento e foram avaliados mensalmente, até a progressão ou retirada de consentimento.

Segue abaixo a avaliação de eficácia:

- Realização de exames de imagem por tomografia computadorizada de abdômen, pelve e tórax (se aplicável) ou ressonância nuclear magnética das mesmas regiões com avaliação pelos critérios de RECIST 1.1 [52].

Para os pacientes que não apresentaram critérios de progressão radiológica na avaliação de imagens aos 180 dias (D180), com uso de metformina, a medicação foi mantida até a progressão. Os pacientes seguiram a rotina de exames de imagem (tomografias ou ressonância magnética) a cada 90 dias (janela +/- 7 dias). Foi solicitado que o paciente suspendesse o uso de metformina 48 horas antes de cada tomografia, e reiniciasse 24 horas, após a realização do exame de imagem.

Pacientes que saíram do estudo por outros motivos que não progressão foram seguidos com exames de imagem periódicos (descritos a seguir) até a documentação radiológica de progressão.

Avaliação do perfil glicêmico

O perfil glicêmico do paciente foi avaliado por meio da dosagem dos níveis séricos de jejum de insulina, peptídeo C, glicemia, hemoglobina glicada. Os exames foram colhidos na linha de base (+/- 3 dias) e a cada 90 dias (+/- 7 dias), a partir do início da metformina.

Avaliação de Toxicidades

A cada consulta com o oncologista, isto é, no D15 (+/- 3 dias) a partir da primeira dose de Metformina, e depois de cada 30 dias (+/- 7 dias), foram avaliados os efeitos adversos e a toxicidade relacionados ao tratamento, por meio de anamnese, exame físico e avaliação laboratorial: função renal, TGO, TGP, bilirrubina, eletrólitos e hemograma.

Os eventos adversos foram avaliados, de acordo com os Critérios de Toxicidade Comuns para Eventos Adversos (CTCAE) versão 4.03 [56]. Toxicidades

que não tinham classificação do CTCAE foram graduadas em leve, moderada ou grave conforme a gravidade (se ameaça à vida). Pacientes que apresentaram toxicidade graus 3 ou 4 tiveram a dose do tratamento reduzida e foram conduzidos, conforme previamente exposto. Todos os efeitos adversos foram graduados e avaliados se eram relacionados ou não ao tratamento. Pacientes que necessitaram de internação foram identificados imediatamente pelos investigadores do estudo e, posteriormente, monitorados.

A primeira avaliação de eventos adversos foi realizada em consulta médica em 15 dias do início do tratamento (D15, janela +/- 3 dias), quando o paciente foi avaliado clinicamente para tolerabilidade. As avaliações subsequentes foram em consultas médicas a cada 30 dias (janela +/- 3 dias). Em caso de evento adverso clinicamente relevante, isto é, evento relacionado ao tratamento de grau ≥3, o mesmo foi seguido clinicamente, conforme julgamento clínico até seu encerramento/resolução.

Evento adverso, para os fins deste protocolo, foi definido como aparecimento (ou piora dos pré-existentes) de sinal(is), sintoma(s) ou condição(ões) médica(s) indesejável(is) que ocorreu(ram) após a assinatura do Consentimento Livre e Esclarecido, mesmo se o evento não seja considerado como, relacionado ao(s) medicamento(s) em estudo. Os eventos adversos também poderiam ser detectados, quando fossem relatados voluntariamente pelo paciente, durante ou entre as visitas, ou por meio de exame físico, exames laboratoriais ou outras avaliações.

Sempre que possível, cada evento adverso deveria ser avaliado para determinar:

1. A gravidade (leve, moderado, grave e ameaça à vida) ou (grau CTCAE 4.03);

2. Sua relação com cada medicamento em estudo (suspeita / não suspeita);

3. Sua duração (datas inicial e final ou se continuam no exame final); e

4. Conduta adotada (nenhuma conduta adotada; dosagem do medicamento em estudo ajustada/temporariamente interrompida; medicamento em estudo descontinuado permanentemente em decorrência do referido evento adverso; medicação concomitante administrada; terapia não medicamentosa administrada; hospitalização/hospitalização prolongada).

Os pacientes receberam visita médica após 30 dias (7+/- dias) do fim do tratamento para avaliação de toxicidades e segurança do estudo.

3.4.6 Seguimento

Os pacientes descontinuados por progressão foram seguidos, conforme rotina do ICESP.

3.5 Considerações estatísticas

O tamanho da amostra foi determinado arbitrariamente em 30 pacientes, como estudo piloto prospectivo, avaliando a eficácia da metformina em TNE. Para fins de interpretação, o estudo seria considerado positivo se, ao menos, metade dos pacientes atingissem o desfecho primário de taxa de controle de doença em seis meses. Esse desfecho foi definido baseado no resultado de estudos fase III em TNE, nos quais aproximadamente, metade dos pacientes estavam livres de progressão em seis meses [30, 31, 57].

Para a estatística descritiva, foram calculadas as médias, medianas, desvio padrão das variáveis quantitativas. As comparações entre as variáveis quantitativas foram realizadas pelo teste não paramétrico de *Mann-Whitney*. Análises de eficácia e toxicidade foram realizadas por meio de intenção de tratamento, considerando todos os pacientes que receberam, ao menos, uma dose de metformina. Intervalo de Confiança (IC) 95% foi calculada para a proporção de pacientes que atingiu taxa de controle de doença em seis meses. O método de *Kaplan-Meier* foi usado para estimar SLP de todos os pacientes e dos subgrupos de IMC (< 25 Kg/m^2 e ≥ 25 Kg/m^2). O método de *Kaplan-Meier* reverso foi usado para estimar o tempo e seguimento mediano considerando a data da progressão como evento. A comparação entre estes grupos foi feita pelo teste de log-rank. Associação entre os subgrupos de IMC e taxa de controle de doença em seis meses foi avaliada pelo teste de Qui-quadrado. A associação entre as variáveis do perfil glicêmico de jejum e taxa de controle de doença em seis meses foi avaliada pelo teste de *Mann -Whitney's*. Considerou-se o valor de $p < 0,05$ teste bicaudado. Na análise de sobrevida, as curvas de sobrevida e de risco foram construídas pelo método de *Kaplan-Meier*, sendo apresentadas as medianas dos tempos de sobrevida livre de progressão. Os graus de toxicidade foram tabulados, como variáveis categóricas. A variação máxima no tamanho tumoral foi reportada no gráfico em cascata, como porcentagem de mudança máxima no tamanho das lesões alvo a partir do tamanho inicial (excluindo novas lesões).

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características dos pacientes e das neoplasias

Todos os pacientes foram recrutados no ambulatório de tumores gastrointestinais do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo entre julho de 2014 até agosto de 2019. Durante este período, o estudo foi oferecido a 29 pacientes. Um paciente não consentiu participar, restando 28 pacientes incluídos. O estudo foi finalizado antes de completar o recrutamento planejado de 30 pacientes, por baixa taxa de recrutamento.

Do total de 28 pacientes, 53% eram do sexo masculino. A idade mediana foi 50 anos. Cerca de 50% dos pacientes apresentaram alguma comorbidade. Depressão foi a mais prevalente, sendo encontrada em 18% dos pacientes, seguida de hipertensão arterial sistêmica e hipotireoidismo, com 10% cada. DM-2 foi encontrada em 7% da população do estudo. O IMC mediano foi 27,05 kg/m^2, sendo 11 pacientes (39,3 %) com IMC< 25 Kg/m^2 e 17 pacientes (60,7%) com IMC≥ 25 Kg/m^2. O sítio primário mais comum foi intestino médio (43%), seguido de pâncreas (32%) e pulmão (14%). O sítio de metástase mais encontrado foi fígado com 96%. Em sua maioria, os tumores foram grau 2 (71%); a maioria (41%) com Ki-67 entre 3-10%. Somente quatro pacientes apresentaram tumor funcionante, sendo três deles com síndrome carcinoide. Entre os pacientes com síndrome carcinoide não foi encontrada redução de ácido 5-hidroxiindolacetico (5-HIAA) na urina de 24 horas com o uso de metformina. (Tabela 2).

Tabela 2 - Características da população (N=28)

Características	N	%
Idade, anos		
Mediana (anos)	50	
Intervalo	32-72	
Sexo		
Masculino	15	53.6
Feminino	13	46.4
Índice de massa corpórea (Kg/m^2)		
<25	11	39.3
≥25	17	60.7
ECOG		
0	21	75
1	6	21.4
2	1	3.6
Comorbidade		
Depressão	5	17.8
Hipotireoidismo	3	10.7
HAS	3	10.7
DM-2	2	7.1
Sítio primário tumoral		
Intestino Médio	12	43,9
Pâncreas	9	32,1
Pulmão	4	4,3
Desconhecido	2	7,1
Reto	1	3,6
Sítios de metástase		
Fígado	27	96,4
Osso	7	25
Linfonodo	6	21,4
Pulmão	3	10,7
Peritônio	3	10,7
Baço	1	3,5
Ovário	1	3,5
Pleura	1	3,5
TNE Funcionante		
Sim	4	14.2
Não	24	85,8
Síndrome		
Carcinoide	3	10,7
Cushing	1	3,6
Grau Tumoral		
Grau 1	8	28.6
Grau 2	20	71.4
Índice de proliferação		
Ki67 0-2%	8	28,5
Ki67 3-10%	12	43
Ki67 11-20%	8	28,5

N corresponde ao número absoluto, % corresponde à porcentagem do total

Na maioria dos pacientes, a metformina não foi a primeira linha de tratamento (75%). A mediana de tratamento pregresso foi de duas linhas. O tratamento pregresso mais utilizado foi análogo de somatostatina em 61,9%, seguido de quimioterapia em 42,8% (Tabela 3). Dos pacientes que foram tratados com quimioterapia o esquema mais utilizado foi Capox (capecitabina associado à oxaliplatina) em oito pacientes. (Tabela 4)

Tabela 3 - Tratamentos pregressos

Características	**N**	**%**
Tratamentos pregressos		
Sim	21	75
Não	7	25
Número de tratamentos		
1	11	39.3
2	5	17.8
3	4	14.3
4	0	0
5	1	3.6
Análogo de somatostatina		
Sim	13	61,9
Não	8	38,1
Interferon- alfa		
Sim	2	9,5
Não	19	90,5
^{177}Lu-Dotatate		
Sim	1	4,7
Não	20	95,3
TACE/TAE		
Sim	2	9,5
Não	19	90,5
Cirurgia citorredutora		
Sim	1	4,7
Não	20	95,3
Tumor primário ressecado		
Sim	9	32,1
Não	19	67,9
Quimioterapia		
Sim	9	42,8
Não	12	57,2

N corresponde ao número absoluto, % corresponde à porcentagem do total

Tabela 4 - Histórico de quimioterapias utilizadas

Esquema de quimioterapia	N
Capox	8
mFLOX	1
Cisplatina + Irinotecano	4
Cisplatina + Etoposideo	2
Dacarbazina	4
Carboplatina + Paclitaxel	1
Paclitaxel	1

N corresponde ao número de pacientes que receberam quimioterapia pregressa ao estudo

4.2 Eficácia

Na análise de eficácia em 180 dias (7+/- dias), a taxa de controle de doença foi 46%. Na população total do estudo, a SLP estimada foi 6,3 meses (95% IC: 3,2-9,3) (Figura 2).

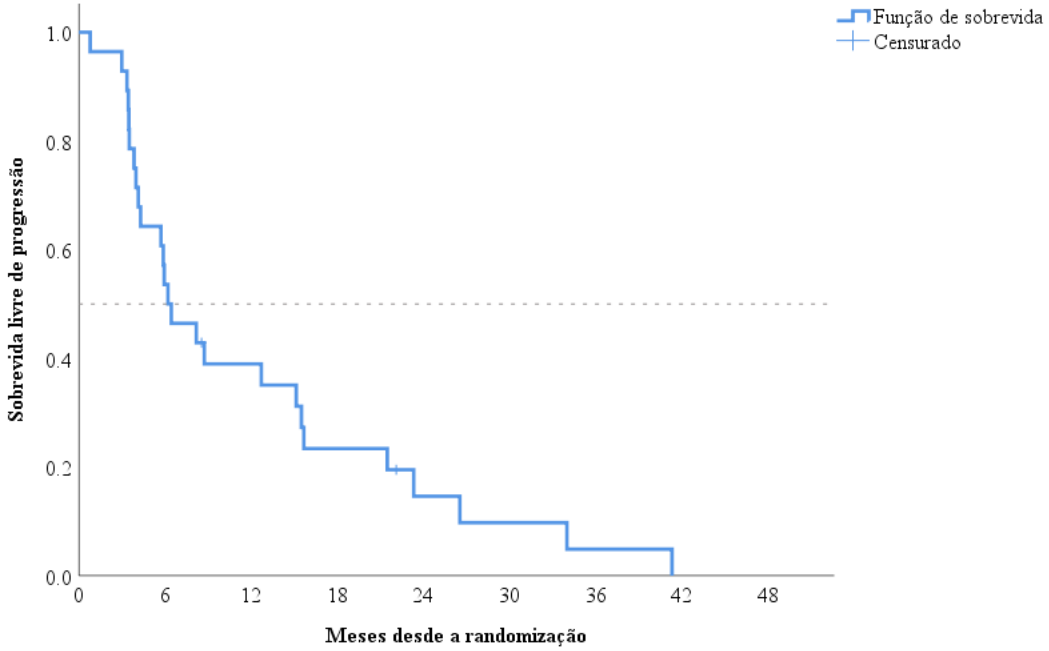


Figura 2 - Curva de Kaplan–Meier de sobrevida livre de progressão

Dividindo os pacientes, conforme o IMC, a SLP dos pacientes com IMC< 25 Kg/m^2 foi 2,9 meses ([IC] 95%: 2,5 - 23,22 meses) e a SLP dos pacientes com IMC ≥25 Kg/m^2 foi 6,3 meses ([IC] 95%: 3,38 - 9,21meses), sem significância estatística (p=0,933) (Figura 3). Não houve associação entre IMC ≥25 Kg/m^2 e controle de doença em seis meses (p=0,488).

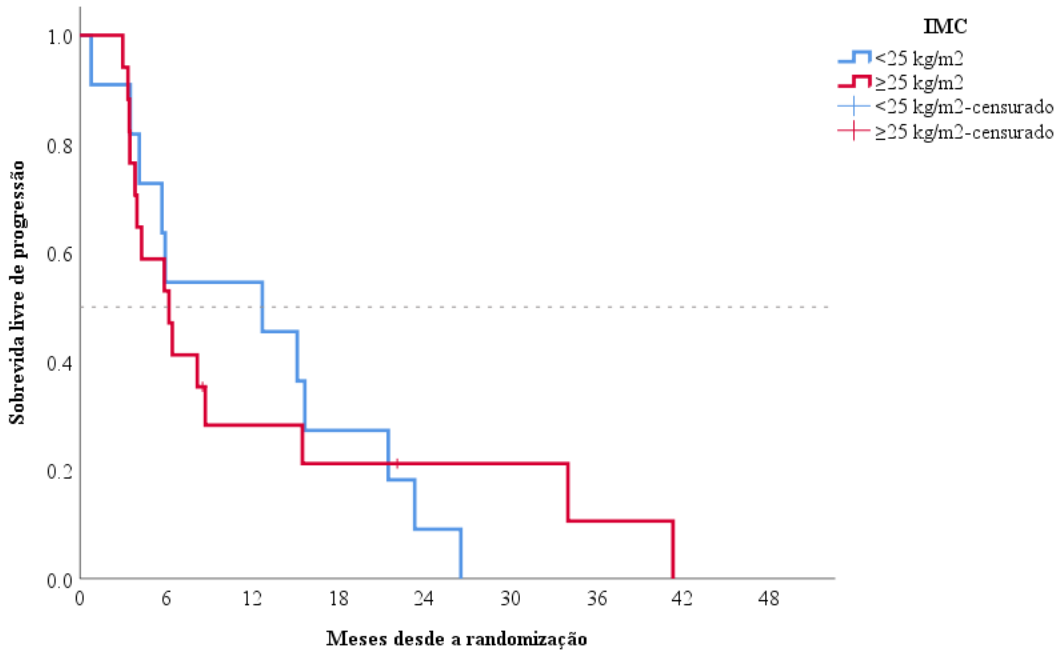
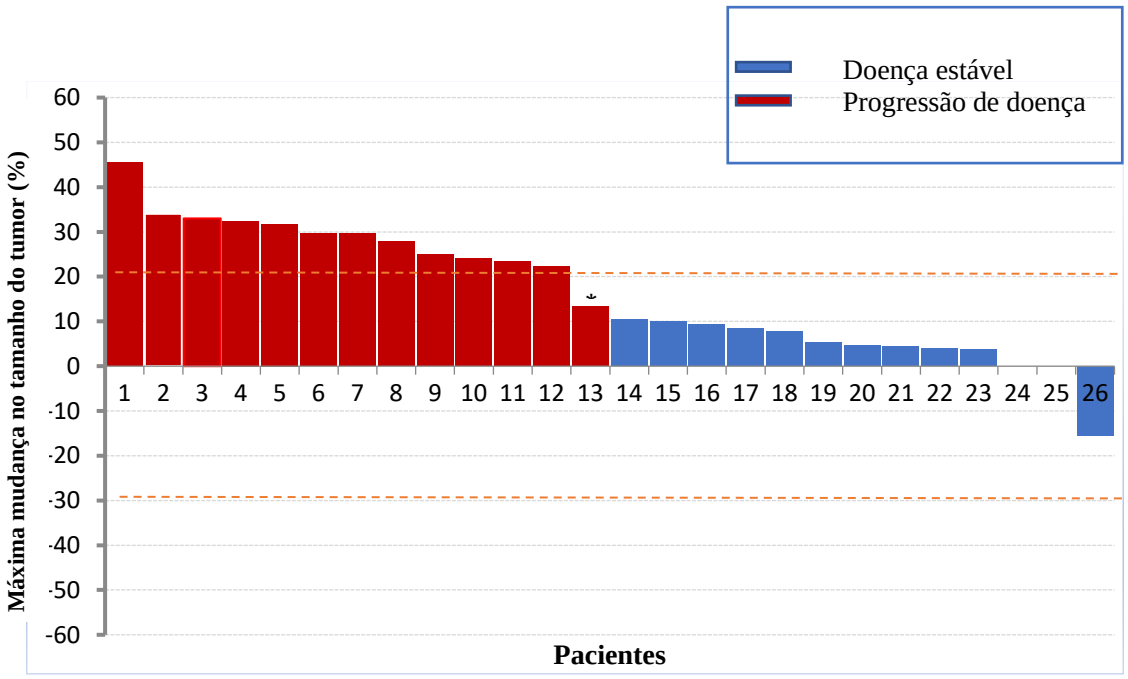


Figura 3 - Curva de *Kaplan–Meier* de sobrevida livre de progressão, conforme o índice de massa corpórea

Nenhum paciente apresentou resposta radiológica com o uso de metformina, pelos critérios de RECIST 1.1 [52]. Doença estável foi a melhor resposta, encontrada em 50% da população do estudo (Figura 4).



* Nova lesão alvo

Figura 4 - Máxima mudança no tamanho do tumor

4.3 Perfil glicêmico

Os níveis séricos do perfil glicêmico (insulina, glicemia, hemoglobina glicada e peptídeo C) foram analisados com intuito de avaliar um possível fator preditivo de efetividade da metformina. Os níveis séricos medianos das avaliações de eficácia no tempo zero, três meses e seis meses estão representados nos dados da Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil glicêmico

Perfil glicêmico em jejum	Mediana	Intervalo
Glucose (mg/dL)		
Linha de base	89	75-302
90 dias	86	64-162
180 dias	93	79-159
HbA1 (%)		
Linha de base	5.45	4.8-11.5
90 dias	5.40	4.3-9.8
180 dias	5.40	4.8-12.4
Insulina (μIU/ml)		
Linha de base	9.5	2.0-23.2
90 dias	7.30	1.6- 23.3
180 dias	10.10	2.1- 26.8
Peptídeo C (ng/ml)		
Linha de base	2.4	0.32- 4.8
90 dias	1.9	0.1-5.5
180 dias	2.07	0.7-5.1

Os dados são apresentados como mediana e intervalo

A variação entre as medianas do perfil glicêmico não se associou com controle de doença em 180 dias (7+/- dias), não tendo correlação estatisticamente significante (insulina p=0,54, glicemia p=0,33, hemoglobina glicada p= 0,069, peptídeo C p= 0,687) (Tabela 6). O gráfico de diagrama de caixa (Figura 5) demonstra a variação nos níveis séricos do perfil glicêmico entre o início do tratamento e a avaliação de 180 dias nos grupos de pacientes que tiveram controle de doença em 180 dias (7+/- dias) e no grupo de pacientes que apresentou progressão de doença em 180 dias (7+/- dias).

Tabela 6 - Perfil glicêmico na avaliação de 180 dias nos pacientes com doença estável e nos pacientes com progressão de doença

Perfil glicêmico em jejum	Mediana	Intervalo
Glicose (mg/dL)		
Doença estável	91	79-121
Progressão de doença	95	82-159
HbA1 (%)		
Doença estável	5,40	4,80 – 6,80
Progressão de doença	5,30	4,9-12,4
Insulina (μIU/ml)		
Doença estável	7,90	2,1 – 18,10
Progressão de doença	11,35	8,1- 26,8
Peptídeo - C (ng/ml)		
Doença estável	1,90	0,7- 3,0
Progressão de doença	3,11	1,7 a 5,0

Dados são apresentados como mediana e intervalo

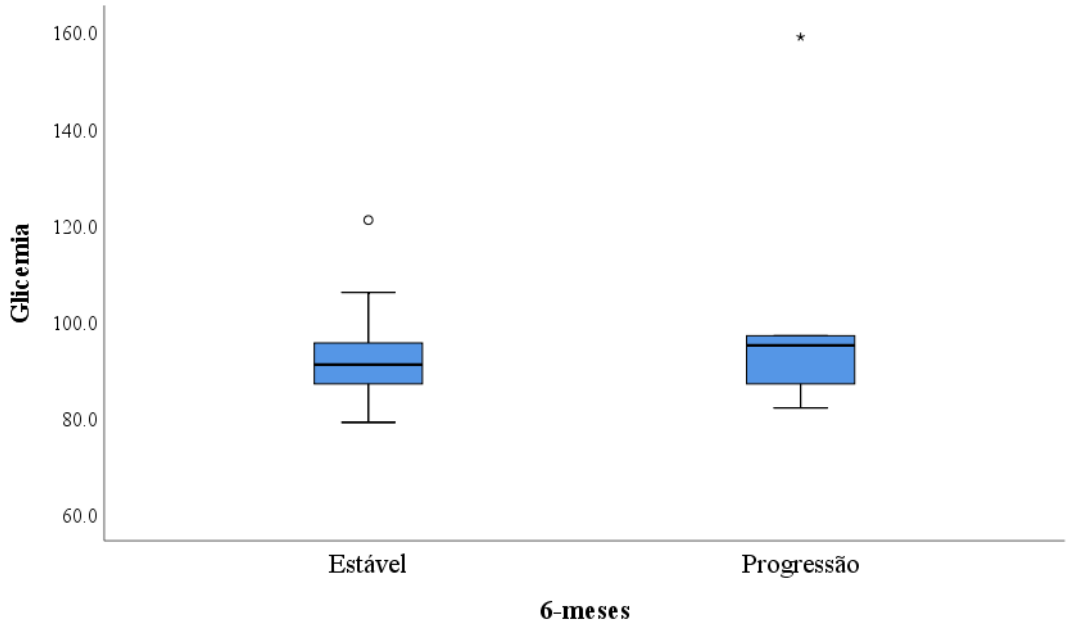


Figura 5 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação de glicemia sérica

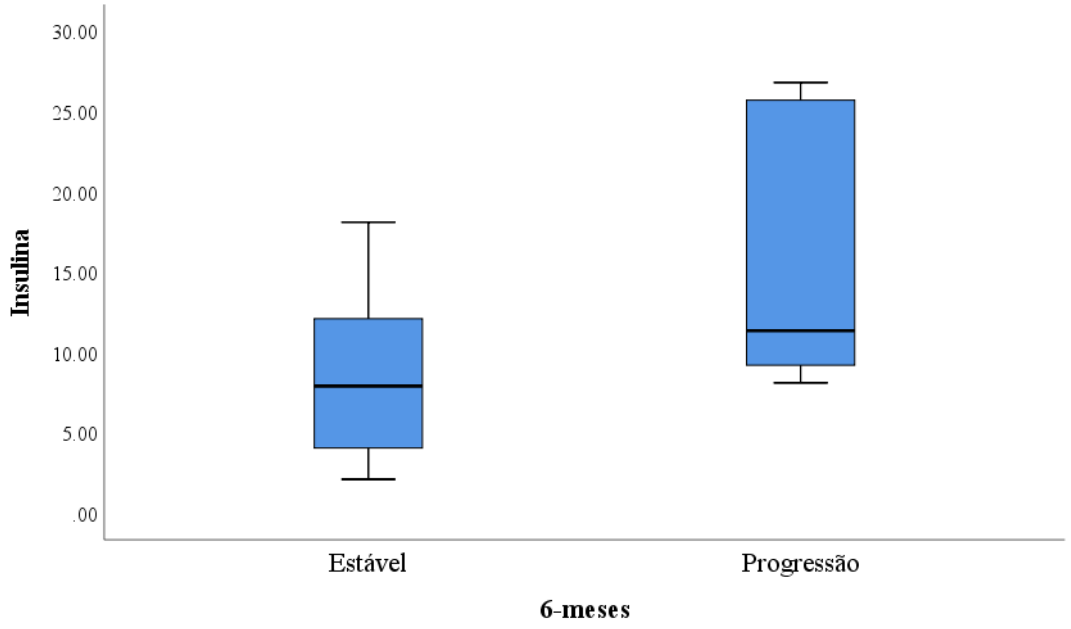


Figura 6 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação de insulina sérica

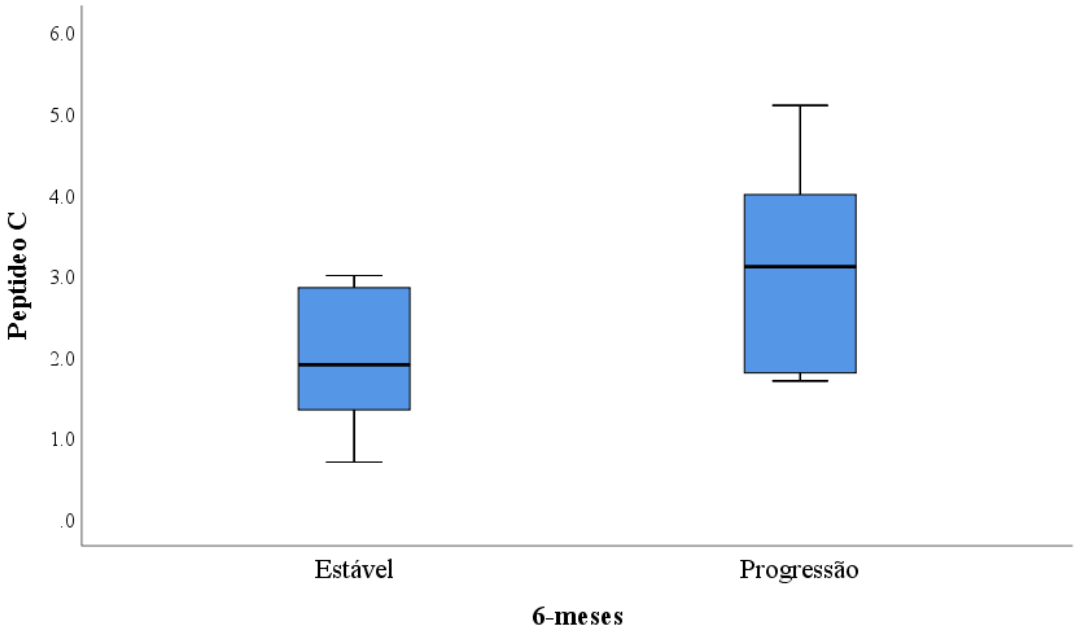


Figura 7 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação peptídeo C

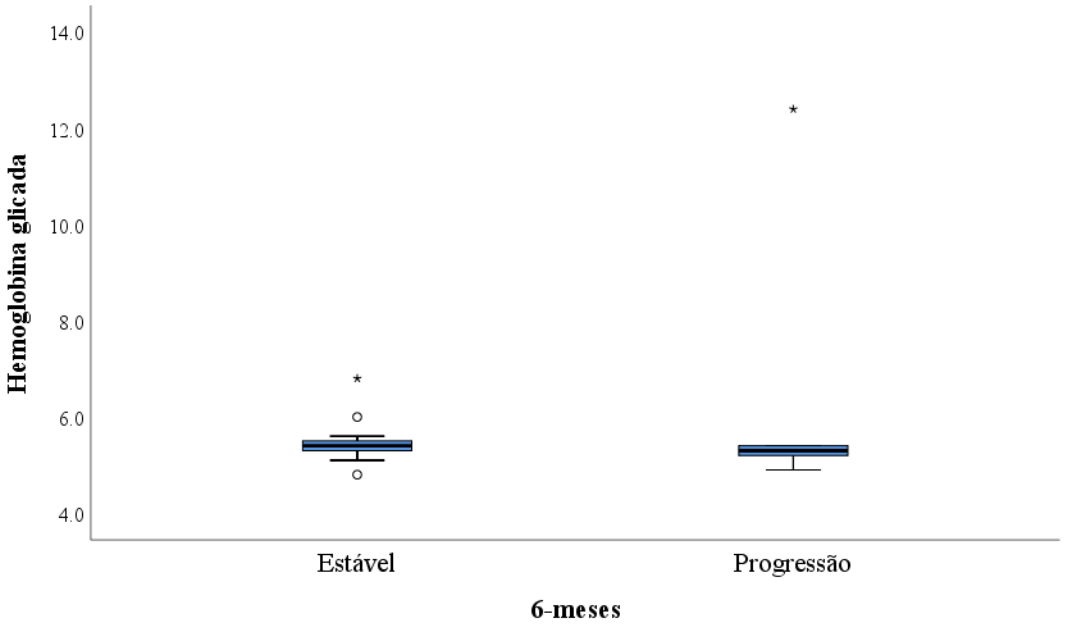


Figura 8 - Gráfico de diagrama de caixa com a variação da hemoglobina glicada

4.4 Toxicidades

O uso de metformina na dose de 850 mg duas vezes ao dia foi bem tolerado. A toxicidade mais prevalente foi diarreia, sendo 21% de diarreia grau 1-2 e 14% de toxicidade graus 3-4. Quatro pacientes precisaram reduzir a dose de metformina para um comprimido VO ao dia e nenhum paciente descontinuou o tratamento por toxicidade. (Tabela 7).

Tabela 7 - Eventos adversos relacionados ao tratamento

Toxicidade	***N***	**%**
Náusea		
Grau 1-2	6	21.4
Grau 3-4	0	0
Diarreia		
Grau 1-2	6	21,4
Grau 3-4	4	14.3
Vômito		
Grau 1-2	1	3.6
Grau 3-4	0	0
Dispepsia		
Grau 1-2	3	10.8
Grau 3-4	0	0
Dor abdominal		
Grau 1-2	4	14.3
Grau 3-4	0	0
Xerostomia		
Grau 1-2	1	3.6
Grau 3-4	0	0
Hiporexia		
Grau 1-2	2	7.2
Grau 3-4	0	0

Dados são apresentados como número de pacientes e porcentagem

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Características da população

Este estudo é o primeiro a avaliar de forma prospectiva a ação antitumoral da metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos. Apesar do número pequeno de pacientes, sua amostra foi representativa de diferentes sítios de primários de TNE, contendo tumores de origem pulmonar, pancreática, intestino médio, reto e sítio primário desconhecido. A população do estudo foi composta, em sua maioria, de pacientes que haviam recebido poucos tratamentos pregressos com uma mediana de dois, com maioria dos pacientes com Ki-67 entre 3-10%. Nenhum paciente havia recebido everolimo anteriormente, sendo o uso análogo de somatostatina a terapia mais utilizada.

5.2 Eficácia da metformina

Dadas as limitações de um estudo fase dois de braço único, o presente estudo demonstrou que o uso de metformina de forma isolada não teve ação antitumoral em TNE graus 1 e 2. A taxa de controle de doença encontrada em seis meses foi 46%, não atingindo o objetivo primário do estudo de controle de doença de mais de 50%. em seis meses. Este resultado assemelha-se ao encontrado no braço placebo de alguns dos principais estudos fase 3 em TNE. No estudo RADIANT-3 com TNE de origem pancreática, o braço placebo teve uma taxa de controle de doença em seis meses de 40% e o braço que recebeu everolimo teve cerca de 70% de taxa de

controle de doença em seis meses [31]. No estudo PROMID com TNE de origem de intestino médio em progressão, que foi tratado com octreotide de liberação prolongada ou placebo, o grupo placebo em seis meses teve uma taxa de controle da doença de 48%, enquanto o grupo que recebeu octreotide de liberação prolongada teve uma taxa de controle de doença de 71% [57]. No estudo RADIANT-4, a taxa de controle de doença em seis meses foi 36% no grupo placebo e 64% no grupo que recebeu everolimo [32]. Assim como no presente estudo, todos estes tinham como critério de inclusão a necessidade comprovada de progressão da doença e incluíram TNE G1 e G2 com Ki-67 até 20%.

Outra variável de eficácia analisada foi a porcentagem de redução tumoral e a taxa de resposta radiológica. Como demonstrado na Figura 4 (gráfico em cascata), apenas um paciente apresentou redução tumoral e nenhum paciente teve resposta radiológica objetiva por RECIST. No estudo RADIANT-3, 64% dos pacientes que receberam everolimo apresentaram algum grau de redução tumoral e cerca de 20% dos pacientes no grupo placebo apresentaram algum grau de redução tumoral. A taxa de resposta radiológica foi 5% no grupo que recebeu everolimo [31]. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo RADIANT-4, onde 64 % dos pacientes que receberam everolimo apresentaram algum grau de redução tumoral e a taxa de resposta objetiva com everolimo foi 2% [32].

A ausência de ação antitumoral da metformina demonstrada no presente estudo difere dos dados pré-clínicos com culturas de células de TNE. No estudo de Vlotides et al. [49], foram analisadas a ação antitumoral da metformina em três populações de células neuroendócrinas diferentes: pancreáticas (BON1), broncopulmonar (NCI-H727) e de intestino médio (GOT1). Todas foram tratadas

com concentrações crescentes de metformina (0.1-10mM). A metformina foi capaz de reduzir a viabilidade celular nos três tipos celulares com concentrações crescentes de metformina entre 5mM e 10mM. Com o intuito de analisar o mecanismo pelo qual a metformina age em TNE, foi avaliada a ativação de AMPK com uso de metformina. As células BON1 e GOT1 apresentaram ativação de AMPK, sugerindo um efeito da metformina dependente de AMPK (via direta). Já nas células NCI-H727, a ação antitumoral deu-se de forma independente de AMPK, sugerindo um outro mecanismo de ação (via indireta) [49]. Independente da via de ação, a metformina foi capaz de inibir mTOR nas três linhagens celulares. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Vitali et al., no qual a metformina inibiu a proliferação celular em cultura de células de TNE de origem pancreática (espécimes cirúrgicos) e culturas de células QGP-1. Este estudo também demonstrou que metformina foi capaz de reduzir a fosforilação de mTOR [58].

Um recente estudo japonês analisou a ação da metformina em células de TNE tanto *in vitro* como *in vivo*. Metformina foi capaz de inibir o ciclo celular na fase G_0/G_1 por meio da proteína ciclina D1, que age na modulação do ciclo celular com concentrações crescentes de metformina (0, 1, 3 e 5 mM). Esta ação antitumoral foi validada em modelo animal com camundongos, nos quais foram implantadas células de TNE pancreático QGP-1. Além de seu efeito na proliferação celular, a metformina foi capaz de induzir apoptose nessas células [59].

Uma possível explicação para os resultados divergentes encontrados nos estudos pré-clínicos e o presente estudo está na diferença de concentração de metformina atingida nos estudos pré-clínicos e clínicos. Sabemos que a concentração de metformina sérica, que é possível se atingir em estudos em seres humanos, é

muito menor que a concentração de metformina atingida nos estudos in vitro, podendo variar de um a 20 mM em estudos in vitro versus 18 mM em estudos in vivo [60]. Em todos os estudos *in vitro*, a ação antitumoral foi maior em concentrações maiores.

A atividade antitumoral da metformina demonstrada em estudos pré-clínicos foi diferente a depender do tipo celular. Apesar da metformina ter inibido a viabilidade das células de TNE analisadas em todos os ensaios realizados, o mecanismo pelo qual essa ação deu-se, foi diferente a depender do tipo celular. No estudo de Vlotides et al., as células humanas de TNE pancreático BON1 e as células humanas de TNE de intestino médio GOT1 apresentaram ativação de AMPK, sugerindo um efeito da metformina dependente de AMPK(via direta) [49]. O mesmo não ocorreu com as células humanas de TNE de origem bronquiolopulmonar NCI-H727, na qual a metformina levou à redução da fosforilação de AMPK, sugerindo uma ação independente desta (via indireta) [49]. Dados semelhantes foram encontrados no estudo de Vitali et al. no qual células de TNE de origem pancreáticas QGP-1 tratadas com metformina não tiveram fosforilação de Akt, diferentemente das células de TNE de origem broncopulmonar H727 nas quais a metformina reduziu a fosforilação de AKT sugerindo uma ação pela via indireta [50]. No presente estudo, cerca de 32% tinham tumores de origem pancreática e 44%, de origem de intestino médio. Nos estudos retrospectivos que sugerem uma possível ação antitumoral da metformina 100% da população apresentava TNE de origem pancreática. Em razão do pequeno tamanho da população do presente estudo, não foi possível avaliar algum subgrupo que pudesse apresentar atividade antitumoral, quando tratado com metformina.

5.3 Ação da metformina em associação ao everolimo

A ação antitumoral da metformina também foi analisada em associação ao everolimo. O mecanismo pelo qual se desenvolve resistência ao everolimo não é totalmente conhecido [61], especula-se que a inibição do feedback negativo que o mTOR ativado realiza sobre a via GFR-1/IRS-1/PI3K /Akt leve a ativação de Akt e consequente reativação de mTOR [61, 62]. Desta forma, a ação da metformina por meio da estimulação da fosforilação de IRS-1, levando à inibição da via IGFR-1/IRS-1/PI3K/Akt seria o racional, para um possível efeito sinérgico da metformina e everolimo na inibição de mTOR [40, 62]. Este possível efeito sinérgico do uso de metformina e everolimo foi analisado em um estudo recente com culturas de células QGP-1 (células de TNE de origem pancreática) e culturas de células H727 (células de TNE de origem pulmonar), que foram tratadas com metformina isolada, everolimo isolado e associação das duas drogas. Neste estudo, a associação de metformina e everolimo teve um efeito sinérgico a inibir a viabilidade celular em células QGP-1 quando comparada com a ação antitumoral de cada medicação administrada isoladamente. O mesmo não ocorreu com as células H727 (células de TNE de origem pulmonar), onde a associação de everolimo e metformina não foi superior a cada droga isolada na inibição de viabilidade celular. O sinergismo da associação de metformina e everolimo também foi encontrado, quando se tratou da associação destas duas em culturas de células extraídas de espécimes cirúrgicos de TNE de pâncreas [50].

Esse possível efeito sinérgico com a metformina foi sugerido em análises retrospectivas de pacientes portadores de DM-2 e TNE que foram tratados com

everolimo. O maior estudo até o momento, Prime-Net analisou 445 pacientes com TNE de pâncreas tratados em 24 centros médicos italianos. Todos receberam everolimo com ou sem análogo de somatostatina. Do total de pacientes, 236 eram portadores de DM-2 e 112 foram tratados com metformina e 124 com outras medicações para DM-2. Analisando os pacientes com DM-2, o uso de metformina associou-se com melhora de SLP de 44,2 versus 20,8 meses. Houve uma redução de 55% no risco de progressão ou morte nos pacientes tratados com metformina comparados aos não diabéticos (razão de risco: 0.45; [IC] 95%, 0.32–0.62; P < .00001) [51]. Um outro estudo francês avaliou de forma retrospectiva os pacientes tratados com metformina e everolimo. Cerca de 213 pacientes haviam sido tratados com everolimo e, destes, apenas 48 tinham DM-2. Do total de pacientes com DM-2, 19 receberam metformina. Neste pequeno grupo, não foi encontrada uma diferença estatisticamente em SLP no grupo que usou metformina em associação ao everolimo de 15,24 meses (19,88 - 49,43) versus everolimo isolado de 9,03 meses (4,01- 14,06) [24, 63]. No presente estudo, optou-se por utilizar metformina de forma isolada, pois everolimo não se encontra disponível para paciente com TNE no Sistema Público de Saúde brasileiro e, consequentemente, no ICESP.

5.4-Ação da metformina em pacientes portadores de DM-2

Um viés importante dos estudos retrospectivos do uso de metformina e câncer é o fato da população analisada ser formada por pacientes portadores de DM-2 que fizeram uso de metformina ou outro agente antidiabético [51, 63]. Acredita-se que a resistência à insulina dos pacientes com DM-2 levaria a um estado

hiperinsulinêmico, estimulando múltiplas cascatas de sinalização celular e fatores de crescimento, que se associariam a aumento da agressividade do câncer [64, 65]. O aumento de mortalidade de paciente com câncer e DM-2 foi avaliado em uma metanálise com 23 artigos, totalizando 127.232 pacientes. O risco de mortalidade dos pacientes diabéticos foi maior (razão de risco: 1,41 [IC] 95% 1,28 - 1,55) quando comparado com pacientes normoglicêmicos [66]. Em TNE, existem poucos estudos avaliando a associação entre DM-2 e mortalidade. Em um estudo que avaliou duas coortes de pacientes com TNE, sendo uma de paciente com TNE de pulmão (n=81) e outra de TNE do trato gastrointestinal incluindo pâncreas (n=100), em nenhuma das coortes os pacientes com DM-2 tiveram mortalidade maior comparada aos não diabéticos [67].

O papel prognóstico do DM-2 também foi analisado em uma análise *post hoc* do estudo fase III, duplo cego, placebo controlado, CLARINET, com uso de lanreotide 120 mg, em pacientes com TNE enteropancreático não funcional [68, 69]. Do grupo que recebeu lanreotide, 42 pacientes tinham DM-2 e do grupo que recebeu placebo, 37 tinham DM-2. A SLP foi 96 semanas no grupo intervenção e 98 semanas no grupo placebo, sem significância estatística (p=0,380) [68]. No estudo Prime-NET, dos pacientes com TNE de pâncreas tratados com everolimo, 209 pacientes não diabéticos tiveram uma mediana de SLP de 15,1 meses e 236 pacientes com diabetes tiveram uma SLP mediana de 32 meses (razão de risco: 0,63 [IC] 95%: 0,5 – 0,8) [51].

São crescentes as evidências que o tipo de tratamento de DM-2 nos pacientes com câncer influencia na efetividade de seu tratamento [70]. Em uma metanálise, recente reunindo dados de 20 publicações com um total de 13.008 pacientes com DM-2 e diversos tipos de câncer, o uso de metformina correlacionou-se com melhora

de sobrevida global e sobrevida câncer-específica (razão de risco: 0, 66; [IC] 95%: 0,55-0,79 e razão de risco: 0,62; [IC] 95%: 0,46-0,84, respectivamente), sugerindo que pacientes com DM-2 e câncer devem ser tratados com metformina [(71)]. No estudo Prime-Net et al., a SLP dos pacientes com TNE com DM-2 que foram tratados com metformina foi 44,2 meses versus 20,8 meses dos pacientes com DM-2 tratados com outros hipoglicemiantes [(51)]. No presente estudo, apenas dois pacientes eram portadores de DM-2 e ambos tiveram progressão de doença antes de seis meses de tratamento. A baixa representação desta população neste estudo não permite que se avalie uma possível ação antitumoral da metformina nesta população de pacientes. Os dados clínicos retrospectivos de uma possível ação da metformina em associação ao everolimo nesta população apresentam muitos vieses, como por exemplo, diferentes doses de metformina e mudanças de dose ao longo do tratamento para melhor controle da hiperglicemia. Outro viés apresentado é o fato desses pacientes já fazerem uso da metformina há muito tempo, antes do início do estudo, o que pode ter influenciado no processo de gênese do TNE, uma vez que a metformina modifica fatores metabólicos que podem influenciar neste processo.

5.5 Análise do perfil glicêmico como fator preditivo de ação antitumoral da metformina

Baseado nos estudos pré-clínicos que sugerem uma ação antitumoral da metformina, tanto pela via direta como pela via indireta foi avaliado o perfil glicêmico dos pacientes do presente estudo, com o intuito de encontrar possíveis fatores preditivos de ação antitumoral da metformina. O objetivo seria determinar se

a metformina poderia induzir alteração no perfil glicêmico destes pacientes e, se isso, associar-se-ia com uma possível ação antitumoral da metformina, sugerindo uma ação antitumoral pela via indireta. Ao analisar se a variação entre os níveis séricos basais e os de seis meses de tratamento, associou-se com controle da doença em 6 meses, não foi encontrada associação estatística nos parâmetros analisados. Por ser uma população formada, em sua maioria por pacientes normoglicêmicos, não é possível afirmar se essa associação poderia existir em uma amostra de pacientes com DM-2, na qual se espera uma mudança maior na variação dos níveis glicêmicos com o uso de metformina.

5.6 Obesidade como fator preditivo de ação antitumoral da metformina

Dentro das alterações metabólicas associadas ao câncer destaca-se a obesidade. Estima-se que entre 14 e 18% dos novos cânceres na América Latina estão ligados à obesidade [(72)]. Não se sabe ao certo quais os mecanismos envolvidos neste aumento de incidência de neoplasia. Dentre os possíveis mecanismos envolvidos destaca-se o aumento nos níveis de citocinas, insulina, *IGF*1, *IGF-binding protein 3* e leptina que são fatores pró mitogênicos conhecidos [(73-75)]. Outro mecanismo associando o excesso de peso e câncer são as citocinas pro-inflamatórias, incluindo TNF-alfa, interleucina 6, que determinam o estado de estresse hiperinflamatório gerado pelo excesso de gordura, que são associadas ao desenvolvimento de cânceres [(76, 77)]. Muitas vezes esse estado de inflamação gerado pelo excesso de gordura correlaciona-se com tumores mais agressivos em diferentes neoplasias. Esta relação entre obesidade e pior prognóstico não é clara em TNE. Em

um estudo caso controle, avaliou-se se há relação entre TNE com obesidade e síndrome metabólica. Foram analisados 96 casos e 96 controles, não encontrando associação entre IMC > 30 Kg/m^2 e TNE. No entanto, parâmetros da síndrome metabólica como circunferência abdominal, hipertrigliceridemia e aumento da glicemia de jejum, associaram-se fortemente à TNE [78]. A associação entre obesidade e maior agressividade em TNE foi avaliada em um estudo retrospectivo de quatro instituições acadêmicas norte americanas com 128 pacientes com TNE de pâncreas. Alteração no IMC não se relacionou com maior taxa de metástase a distância ou maior mortalidade [79]. Um outra análise retrospectiva de uma instituição sueca com 324 pacientes de TNE de pâncreas IMC não se associou com pior prognóstico [13]. No presente estudo, a SLP no grupo com IMC < 25 Kg/m^2 foi 12 meses comparado com 6,3 meses no grupo com IMC ≥ 25 Kg/m^2, não sendo encontrada diferença estatisticamente significante (p=0,933). Também foi analisado se IMC > 25 Kg/m^2 correlacionava-se com o controle de doença em seis meses, não tendo correlação estatisticamente significante (p=0,488). Por ser um estudo com uma amostra pequena não é possível afastar que o IMC não tenha nenhum papel prognóstico em TNE. Também não podemos concluir se existe algum subgrupo de pacientes com TNE, no qual o IMC tenha algum papel preditivo da ação antitumoral da metformina.

5.7 Análise do efeito metformina nas síndromes endócrinas associadas ao TNE

Um dos objetivos secundários deste estudo foi analisar se a metformina teria alguma atividade no controle das síndromes endócrinas em TNE funcionantes. O

racional para esta avaliação vem da capacidade do everolimo controlar algumas síndromes endócrinas [80-82]. No estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado RADIANT-2, os pacientes com TNE bem diferenciados graus 1-2 foram randomizados para receber everolimo associado à octreotide LAR ou placebo associado à octreotide LAR. O uso de everolimo associou-se a maiores quedas de 5-HIAA em urina de 24 horas ($p < 0,0001$) [30, 81]. Outra ação no controle das síndromes endócrinas do everolimo é vista no controle da hipoglicemia nos insulinomas [83, 84]. No presente estudo, quatro pacientes apresentaram tumores funcionantes, sendo um com síndrome de Cushing e três com síndrome carcinoide. O uso de metformina não demonstrou ação antissecretória nestes pacientes. Um paciente com síndrome carcinoide relatou melhora dos sintomas de rubor facial com o uso de metformina, apesar de não haver queda nos níveis de 5-HIAA em urina de 24 horas.

5.8 Perfil de toxicidade da metformina

Metformina é reconhecidamente uma droga com bom perfil de tolerância e segurança. Amplamente utilizada no tratamento de paciente com DM-2, costuma ser bem tolerada com a maioria dos efeitos adversos ligados a sintomas gastrointestinais. No presente estudo, a maioria dos eventos adversos associados à metformina foram Graus 1 e 2 pelo CTAE versão 4.03, sendo sobretudo náusea, dispepsia e vômitos. No entanto, 14% dos pacientes apresentaram diarreia Graus 3-4, necessitando de redução de dose da metformina para 850 mg ao dia. Não há dados na literatura médica de toxicidade de metformina em TNE. No ICESP, foram realizados dois

estudos com emprego de metfomina em pacientes oncológicos. Em um deles, metformina na dose de 850 mg duas vezes ao dia foi administrada em associação à quimioterapia para pacientes com câncer colorretal metastático. Neste estudo, foi encontrado 64% de diarreia Grau 1 ou 2, mas nenhuma diarreia Grau 3 ou 4 associada a metformina [85]. O segundo estudo empregou metformina 850 mg três vezes ao dia em associação à quimioterapia para pacientes adenocarcinoma de pâncreas metastático, encontrando 10% de diarreia Grau 3 e, consequentemente, reduzindo a dose de metformina para 850 mg duas vezes ao dia [55].

Em resumo, o uso de metformina de forma isolada não demonstrou ação antitumoral em pacientes com TNE bem diferenciados graus 1 e 2. Apesar dos dados pré-clínicos e das análises retrospectivas sugerirem possível ação antitumoral de metformina em TNE, não foi encontrada ação antitumoral de metformina na população deste estudo.

Novos estudos prospectivos devem ser feitos com intuito de analisar uma possível ação da metformina em associação a outras terapias, como o everolimo. Por ser um grupo de tumores heterogêneos, é necessário analisar esta possível ação em diferentes grupos de TNE, e em população de pacientes com DM-2 e normoglicêmicos.

5.9 Considerações finais

Apesar das limitações inerentes a um estudo piloto, fase II, exploratório, com pequeno tamanho de amostra e falta de um grupo controle placebo-controlado, o presente estudo foi capaz de fornecer dados comprovando a falta de efetividade da

metformina, quando administrada, como monoterapia em uma população de TNE bem diferenciada.

O efeito sinérgico de associação da metformina com everolimo descrito em estudos retrospectivos precisa ser avaliado em estudos prospectivos em diferentes populações de pacientes com TNE.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos dados aqui apresentados, podemos concluir que:

- Metformina não apresentou ação antitumoral em pacientes com TNE bem diferenciados graus 1 e 2, quando utilizada em monoterapia;
- A avaliação do perfil glicêmico em uma população de pacientes, em sua maioria normoglicêmicos, não se correlacionou com a ação antitumoral da metformina nesta amostra;
- O IMC acima da normalidade não se correlacionou com pior desfecho clínico de SLP quando comparado com pacientes com IMC dentro da normalidade;
- O IMC acima da normalidade não se correlacionou com controle de progressão de doença em seis meses com o uso de metformina.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

ANEXO A - SOLICITAÇÃO DE EXECUÇÃO DO ESTUDO

INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

São Paulo, 17 de fevereiro de 2014

Registro: NP 515/14

Ref. Solicitação de execução de estudo: ***Estudo de fase II piloto de MetFormina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados***

Pesquisador responsável: Dra Rachel S. P. Riechelmann / Dr. João Glasberg

CONSIDERAÇÕES

Estudo piloto prospectivo de braço único, unicêntrico, para avaliar o benefício do uso de metformina no tratamento de pacientes com tumor neuroendócrino G1 e G2 em progressão tumoral. Pacientes elegíveis receberão o tratamento até a progressão, toxicidade inaceitável ou retirada de consentimento.

O objetivo do estudo é avaliar eficácia da metformina no controle de doença em progressão nos pacientes com TNE G1 e G2.

OBRIGAÇÕES DO PESQUISADOR

Antes do início dos procedimentos relacionados ao estudo:

- Iniciar as atividades do estudo somente após aprovação/ciência do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP para execução no ICESP segundo a Res. 466/12;
- Após aprovação do CEP, fornecer cópia da Carta de Aprovação e Relatório Semestral com ciência do CEP ao NP- ICESP;
- Enviar mensalmente a lista de pacientes incluídos no estudo ao NP-ICESP;
- Enviar Publicação dos resultados do estudo;

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff
Diretor Geral

Prof. Dr. Paulo M. Hoff
Diretor Geral
ICESP

Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP) - Organização Social de Saúde

ANEXO B - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA FMUSP

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/03/2014, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **059/14** intitulado: **"ESTUDO DE FASE II PILOTO DE METFORMINA EM PACIENTES COM TUMORES NEUROENDÓCRINOS BEM DIFERENCIADOS "** apresentado pelo **Departamento de RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Rachel Simões Pimenta Riechelmann
Pesquisador (a) Executante: João Glasberg

CEP-FMUSP, 21 de Março de 2014.

Prof. Dr. Paulo Eurípedes Marchiori
Vice-Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

ANEXO C - Registro no Clinicaltrials.gov

NIH U.S. National Library of Medicine
ClinicalTrials.gov

Find Studies ▾ About Studies ▾ Submit Studies ▾ Resources ▾ About Site ▾ PRS Login

Home > Search Results > Study Record Detail

☐ Save this study

A Pilot Study of Metformin Treatment in Patients With Well-differentiated Neuroendocrine Tumors (MetNet)

The safety and scientific validity of this study is the responsibility of the study sponsor and investigators. Listing a study does not mean it has been evaluated by the U.S. Federal Government. Read our disclaimer for details.

ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02279758

Recruitment Status : Unknown
Verified October 2014 by Instituto do Cancer do Estado de São Paulo.
Recruitment status was: Recruiting
First Posted : October 31, 2014
Last Update Posted : October 31, 2014

Sponsor:
Instituto do Cancer do Estado de São Paulo

Information provided by (Responsible Party):
Instituto do Cancer do Estado de São Paulo

ANEXO D – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de fase II piloto de Metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados.

Pesquisador: Rachel Simões Pimenta Riechelmann

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 27921714.6.0000.0065

Instituição Proponente: FUNDACAO FACULDADE DE MEDICINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Outros

Detalhe: Carta de concordância do Hospital de Câncer de Barretos para participar do estudo.

Justificativa: Encaminho para análise a carta de Concordância de participação do Hospital de

Data do Envio: 08/11/2016

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.836.260

Apresentação da Notificação:

Estudo com objetivo de analisar o efeito da metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados. A presente notificação tem como objetivo incluir a participação do Hospital de Câncer de Barretos.

Objetivo da Notificação:

Inclusão de instituição participante do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliados anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

Projeto já aprovado por este comitê sob nº 562.806 de 19/03/2014.

Endereço: DOUTOR ARNALDO 251 21º andar sala 36
Bairro: PACAEMBU **CEP:** 01.246-903
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

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

Continuação do Parecer: 1.836.260

Notificação para inclusão do Hospital de Câncer de Barretos no estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já avaliados e aprovados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	DeclaracaoMETNET1concordancia.pdf	08/11/2016 11:17:53	Rachel Simões Pimenta Riechelmann	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 22 de Novembro 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)3893-4401 **E-mail:** cep.fm@usp.br

ANEXO E – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

Disponível em 20/04/10
Por: [illegible]
Pesquisa Clínica - ICESP

FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .:..... .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M □ F □
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....
ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....
BAIRRO: ..... CIDADE .....
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M □ F □
DATA NASCIMENTO.: ...../...../.....
ENDEREÇO: ..... Nº .....
APTO: .....
BAIRRO: .....
CIDADE: .....
CEP: .....
TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Estudo de fase II piloto de Metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos bem diferenciados**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: **Rachel S. P. Riechelmann** /PESQUISADOR EXECUTANTE: **Dr. João Glasberg**

CARGO/FUNÇÃO: **Médica Oncologista** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 98131 D

UNIDADE : **Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octavio Frias de Oliveira" – ICESP**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	□	RISCO MÉDIO	□
RISCO BAIXO	X	RISCO MAIOR	□

4.DURAÇÃODAPESQUISA:32meses :
.....

INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

Disponível em 26/04/16
Por: Bombonato
Pesquisa Clínica - ICESP

Título do Estudo: Estudo piloto do uso de metformina em pacientes com tumores neuroendócrinos Grau I e Grau II

PESQUISADORES: Dr. João Glasberg, médico assistente (CRM 127065) e Dra. Rachel Riechelmann, Coordenadora de Pesquisa Clínica e medica oncologista (CRM 98131)

UNIDADE: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo "Octavio Frias de Oliveira" – ICESP

INTRODUÇÃO:

Você está sendo convidado a participar voluntariamente de um estudo sobre o tratamento do tumor neuroendócrino. Leia com atenção as informações a seguir e questione, se houver alguma dúvida.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?

Você é portador de uma doença rara, o tumor neuroendócrino. Recentemente, novas pesquisas estão sendo feitas para ajudar a combater essa doença. Com intuito de pesquisar novos tratamentos para o tumor neuroendócrino desenvolvemos este estudo que irá avaliar o efeito da metformina, uma medicação utilizada para o tratamento do diabetes, no tratamento desse câncer raro. A razão para a escolha da metformina são as crescentes evidencias cientificas de que a metformina tenha um papel importante no combate e controle do câncer.

O QUE ACONTECERÁ CASO EU ACEITE PARTICIPAR DO ESTUDO?

Na primeira consulta você será informado sobre todos os detalhes da pesquisa, podendo esclarecer todas as dúvidas. Depois poderá decidir livremente se aceita participar do estudo. Caso não aceite, continuará a ser tratado pelo seu médico normalmente.

COMO É FEITO O ESTUDO?

Assim que aceitar participar do estudo, você começará a tomar a medicação metformina (na dose de 850 mg) 2 vezes ao dia por via oral.

A cada 30 dias você passará em consulta médica e fará exames de sangue para avaliarmos o efeito da medicação no seu tratamento. Avaliaremos a presença de reações adversas e o beneficio no tratamento do tumor neuroendócrino. A medicação apenas será mantida enquanto houver beneficio para você no controle da doença.

Disponível em 28/04/10
Por: [illegible]
Pesquisa Clínica - ICESP

INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

Se o médico achar necessário, você pode passar por mais consultas e exames de sangue. O exame de sangue é realizado a partir da retirada de aproximadamente 5 ml (1 colher de sopa) de sangue por punção da veia do braço (ou outro local). E é realizado antes do inicio do tratamento, antes de cada consulta com oncologista e/ou a critério médico.

Também será realizado um teste de gravidez, em casos de suspeita de gravidez.

Outros exames realizados serão exames para avaliar a extensão do tumor e sua resposta ao tratamento, que incluem tomografias de abdome, tórax e pelve. Esses exames serão realizados antes do início do tratamento, a cada 90 dias durante o tratamento e/ou a critério médico. A tomografia computadorizada pode necessitar de injeção de contraste, por punção da veia do braço (ou outro local).

Você também terá de preencher um diário de sintomas onde irá listar os sintomas relacionados ao tumor neuroendócrino que você apresentou durante uma semana. Esse diário de sintomas será preenchido antes do inicio do tratamento e a cada 30 dias durante o tratamento.

QUANTAS PESSOAS IRÃO PARTICIPAR?

Aproximadamente 30 pacientes.

QUAIS OS RISCOS?

A metformina é uma medicação usada há várias décadas no tratamento do diabetes, com pouco risco de intolerância e reações adversas .

Seus principais efeitos colaterais são diarreia, sensação de desconforto abdominal e redução do apetite. Geralmente estes sintomas quando presentes, são leves e transitórios, e tendem a melhorar com o uso o continuo da medicação. A metformina não oferece risco de hipoglicemia (açúcar baixo no sangue).

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS?

A metformina pode oferecer um beneficio no tratamento do tumor neuroendócrino, diminuindo o crescimento do tumor e o avanço da doença. Além disso, essa pesquisa também trará informações importantes sobre uma possível nova forma de tratamento do tumor neuroendócrino, beneficiando outros pacientes com essa doença.

INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

Disponível em 16/04/16
Por: Pesquisa Clínica - ICESP

EU POSSO SAIR DO ESTUDO?

Você poderá sair do estudo a qualquer momento e continuar o tratamento com seu médico normalmente, sem nenhum prejuízo a você.

TRATAMENTOS ALTERNATIVOS:

Não existe um tratamento padrão pata tumores neuroendócrinos e é comum os pacientes receberem vários tratamentos diferentes ao longo da vida. A ordem dos tratamentos não influencia o sucesso do tratamento. Se você decidir não participar deste estudo, o seu médico pode lhe oferecer outro tratamento como quimioterapia, octreotide, interferon, conforme cada caso e rotina do serviço. Participando deste estudo, você poderá receber esses tratamentos depois, sem prejuízo no controle geral da doença.

HAVERÁ CUSTO FINANCEIRO?

Você não terá nenhum custo financeiro. Também não será paga nenhuma gratificação por participar do estudo. Você tem direito a indenização por danos associados a pesquisa, conforme direito constitucional.

CONFIDENCIALIDADE

Todas as informações pessoais do seu tratamento serão mantidas confidenciais. Você não será identificado em nenhuma publicação ou apresentação deste estudo.

QUEM CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS?

Se você tiver dúvidas sobre o estudo ou tiver um problema relacionado ao mesmo, você pode contatar o médico do estudo no número de telefone abaixo:

Nome: João Glasberg

Telefone: 3893-2686

Caso não seja possível falar de forma imediata com seu médico, favor se identificar como paciente do estudo e deixar recado para que o mesmo entre em contato o mais breve possível.

Endereço: Av. Doutor Arnaldo, 251 – 5º andar Cerqueira César CEP 01246-000 – São Paulo – SP
Telefone: (55 11) 3893-2686 Fax:(55 11) 3893-2690

INSTITUTO DO CÂNCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
OCTAVIO FRIAS DE OLIVEIRA

FUNDAÇÃO FACULDADE DE MEDICINA

Disponível em 16/09/10
Por: Pesquisa Clínica - ICESP

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) –Av. Dr. Arnaldo, 455 – Instituto Oscar Freire – 2º andar– tel: 3061-8004, FAX: 3061-8004– E-mail: cep.fm@usp.br

FOLHA DAS ASSINATURAS

Eu _____ confirmo que li, discuti e entendi, todas as informações contidas neste termo e concordo de livre espontânea vontade em participar deste estudo.

_____ _____ ___/___/___

Nome do paciente (letra de forma) Assinatura Data

João Glasberg _____ ___/___/___

Investigador Principal Assinatura Data

Se necessário

(no caso do paciente ou seu responsável legal ser analfabeto/impossibilitado de ler)

_____ _____ ____/___/___

Testemunha 1 (letra de forma) Assinatura Data

_____ _____ ___/___/___

Testemunha 2 (letra de forma) Assinatura

ANEXO F- DIÁRIO DE SINTOMAS

Diário de Frequência de Sintomas

Você deve preencher este diário durante 1 semana anotando quantas vezes você apresentou cada um dos sintomas descritos abaixo em cada dia. Caso você tenha qualquer outro sintoma que não esteja descrito abaixo, anote na data referente qual o sintoma e quantas vezes você apresentou o sintoma neste dia.

Sintomas	**Segunda-feira** **Dia: / /**	**Terça-feira** **Dia: / /**	**Quarta-feira** **Dia: / /**	**Quinta-feira** **Dia: / /**	**Sexta-feira** **Dia: / /**	**Sábado** **Dia: / /**	**Domingo** **Dia: / /**
Diarreia	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes
Uso de loperamida	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes
Rubor Facial	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes
Outros	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes
Outros	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes
Outros	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes	Nº vezes

ANEXO G - ARTIGO PUBLICADO

ecancermedicalscience

METNET: a phase II trial of metformin in patients with well-differentiated neuroendocrine tumours

João Glasberg[1,2], Aley Talans[3,4], Thomás Rivelli Giollo[1], Débora Zachello Recchimuzzi[1], João Evangelista Bezerra Neto[1], Rossana Veronica Mendonza Lopez[5], Paulo Marcelo Gehm Hoff[1] and Rachel P Riechelmann[2,6]

[1]Department of Clinical Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, São Paulo, Brazil
[2]Post Graduate Program, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil
[3]Department of Medical Radiology, Fleury Group, São Paulo, Brazil
[4]Department of Medical Radiology, Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil
[5]Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, São Paulo, Brazil
[6]Department of Clinical Oncology, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Clinical Study

Abstract

Background: Preclinical studies have suggested that metformin has anti-tumour effects, likely due to blockage of mammalian target of rapamycin pathway through adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreased insulin levels. A retrospective study showed that metformin added to everolimus to treat type 2 diabetes mellitus offered longer progression-free survival (PFS) in patients with pancreatic neuroendocrine tumours (NET).

Aim(s): To evaluate the efficacy and safety of metformin monotherapy in patients with advanced/metastatic well-differentiated NET (WD-NET) of gastroenteropancreatic (GEP) or pulmonary origin.

Patients and methods: Single-arm phase II trial of metformin 850 mg PO twice daily until progression or intolerance for patients with progressive metastatic well-differentiated GEP or pulmonary NET. The primary endpoint was disease control rate (DCR) by RECIST 1.1 at 6 months. Secondary endpoints were response rate, PFS, toxicity and variations in glycaemic profiles (glycaemia, glycated haemoglobin and peptide C and insulin) at baseline, at 30 and 90 days.

Results: From 2014 to 2019, 28 patients were enrolled: median age was 50 years; 84% had non-functional NET, 86% were of GEP origin and 62% had G2 NET. At the time of last follow-up, 26 patients had progression, with 13 (46%) presenting DCR at 6 months and a median PFS of 6.3 months (95% confidence interval: 3.2–9.3). There was no objective response, but one patient with refractory carcinoid syndrome had complete symptom relief, lasting for more than 5 years. Variations in glycaemic profiles were not associated with DCR at 6 months. Diarrhoea was the most common adverse event, being grade 3 or 4 in 10% of the cases.

Conclusion: Metformin monotherapy offers modest anti-tumour activity in well-differentiated GEP or lung NET.

Keywords: *neuroendocrine tumours, metformin, cancer treatment*

Correspondence to: Rachel P Riechelmann
Email: rachel.riechelmann@accamargo.org.br

ecancer 2022, **16**:1369
https://doi.org/10.3332/ecancer.2022.1369

Published: 31/03/2022
Received: 18/10/2021

Publication costs for this article were supported by ecancer (UK Charity number 1176307).

Copyright: © the authors; licensee ecancermedicalscience. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Neuroendocrine tumours (NET) are rare neoplasms originating from neuroendocrine cells present throughout the body. In recent years, there has been an increase in the incidence of NETs, and their current rate of incidence is 6.98 cases per 100,000 individuals in the United States [1]. While this increase can be explained by early-stage disease incidentally detected through imaging and endoscopy tests, the incidence of advanced stage has also increased, with an estimated survival rate of 30% in 5 years [2].

In recent years, several new treatments have emerged to control this heterogeneous group of tumours. The treatments for metastatic NET include peptide receptor radionuclide therapy, somatostatin analogues, chemotherapy, multi-tyrosine kinase inhibitors and everolimus, a potent inhibitor of the mammalian target of rapamycin (mTOR) serine threonine kinase. The choice of electing one of these therapies depends on patients' clinical features and NET pathological parameters, such as mitotic rate, Ki-67 index, tumour volume and primary tumour site, making the treatment of NET a challenge [3].

The mTOR blockade leads to inhibition of the Phosphoinositide 3-kinase/AKT (PI3K/AKT)/mTOR pathway, which plays an important role in cell growth, protein translation, and cell metabolism in several types of neoplasms [4]. For example, a preclinical study in pancreatic NET (PNET) cell cultures demonstrated that mTOR inhibition by rapamycin reduced cell proliferation and induced apoptosis [5]. Thereafter, a series of placebo-controlled randomised clinical trials with everolimus in different populations of NET patients confirmed the anti-tumour effects of the mTOR inhibition in NET, as demonstrated by significant gains in progression-free survival (PFS) times [6–8]. Another characteristic of everolimus is its role in reducing hormonal secretion of functioning tumours such as metastatic insulinoma and NET patients with carcinoid syndrome [6, 9].

Metformin is widely used to treat individuals with type 2 diabetes mellitus (T2DM). Epidemiological studies in patients with T2DM suggest a possible protective role of metformin against the development of neoplasms [10, 11]. In addition, preclinical studies have shown that metformin reduced cell viability in neuroendocrine cell cultures [12,13], mainly through mTOR inhibition [14-16]. Clinical evidence has also pointed to anti-tumour properties of metformin. The larger retrospective series evaluated 445 Italian patients with metastatic pancreatic NET treated with everolimus with or without somatostatin analogues or somatostatin analogues alone. In this study, investigators reported a twice longer median PFS for patients who were administered metformin to treat T2DM, when compared with patients who received insulin, and a significant reduced risk of progression in comparison to normoglycaemic patients: median of 44.2 months for those treated with metformin [hazard ratio (HR): 0.81; 95% confidence interval (CI): 0.60–1.1; $p = 0.18$ versus normoglycaemic patients] and 20.8 months for those treated with others treatments (hazard ratio, 0.49; 95% confidence interval, 0.34–0.69; $p < 0.0001$) [17]. Yet, it remains to be determined whether metformin has anti-tumour activity in non-diabetic NET patients. While the mechanisms by which metformin exerts its anti-tumour effect are still not completely elucidated, studies have indicated two main mechanisms of action: (1) inhibition of mTOR, via the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase, which is a negative modulator of mTOR [18–22]; and (2) reduction of promitogenic factors such as insulin and insulin-like growth factor 1 (IGF-1), a known metformin effect on glucose metabolism [19].

Based on such preliminary evidence of NET-directed metformin, we conducted a phase II single-arm clinical trial to investigate the anti-tumour activity of metformin monotherapy in patients with advanced/metastatic well-differentiated NET (WD-NET) of gastroenteropancreatic (GEP) or pulmonary origin.

Methods – patients

The study participants were recruited from the gastrointestinal outpatient cancer clinic of the Instituto do Cancer do Estado de São Paulo, São Paulo, which is publicly funded, affiliated with the University of Sao Paulo and among the largest cancer centres in Brazil. The local ethics committee approved the study and all patients provided written informed consent. The trial was registered in ClinicalTrials.gov as NCT02279758.

Clinical Study

Eligible patients were older than 16 years, had a histological diagnosis of a WD grade 1 or 2 NET of GEP or pulmonary origin and metastatic disease, were Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) score of 0–2 and presented radiological progression of disease within the previous 3 months as per the attending physician's discretion. WD-NET was defined based on the WHO classification 2019 grade 1 and 2 for digestive NEN [23]; patients with typical or atypical lung NEN were also eligible. Any prior line of therapy was allowed, and somatostatin analogues could be used concurrently with metformin to control hormone-related symptoms of functioning NET. Exclusion criteria were inability to take oral tablets, clinically relevant laboratory abnormalities (haemoglobin < 8 g/dL, platelets < 100,000/mm^3, neutrophil count < 1,500/mm^3 and creatinine > 1.5 times the upper limit of normal range), decompensated hormonal syndrome or rapidly progressive disease requiring cytotoxic chemotherapy, current use of metformin or used this drug in the last 3 months prior to study enrolment, history of hypersensitivity to metformin, active infection, use of experimental therapies or simultaneous participation in another clinical trial, chemotherapy within 3 weeks of study enrolment and pregnant or lactating patients.

Methods – materials

In this single-institution, single-arm phase II clinical trial, we enrolled patients with WD-NET to receive metformin as a single agent until disease progression, unacceptable toxicity or consent withdrawal. Metformin was administered in 850 mg PO tablets twice a day with water and meals as monotherapy for patients with non-functioning tumours and in combination with somatostatin analogues for functioning NETs. In case of grade 3 or 4 toxicity, according to the National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events criteria (NCI-CTC AE) version 4.03, a dose reduction of metformin to 850 mg once daily was allowed after improvement of symptoms to grade 1. Patients who required more than 3 weeks to recover from drug-related adverse events or who could not tolerate metformin 850 mg per os (PO) once daily were discontinued from the trial – but continued to be followed with image tests to evaluate disease progression. Metformin was provided to patients by the study team at every medical visit. Drug adherence was monitored on every medical visit by the trial investigators, directly enquiring patients and performing drug accountability by checking empty blisters. We expected a minimal of 80% of the adherence of metformin throughout the study.

Clinical Study

After signing the informed consent, patients underwent the following baseline assessments: radiographic evaluation with computerised tomography (CT) and/or magnetic resonance imaging of thorax, abdomen and pelvis within 4 weeks of metformin first dose; clinical examination and consultation, serum routine laboratory tests (complete blood cell counts, sodium, potassium, urea, creatinine, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase), specific hormones/peptides for functioning NET and fasting glycaemic profile (fasting blood glucose, serum insulin, glycosylated haemoglobin and peptide C within 7 days of metformin first dose). Patients underwent medical examination and serum tests monthly (±7 days) and radiographic evaluation and specific hormones/peptides for functioning NET every 3 months (±7 days) until disease progression. Fasting glycaemic profiles were collected at baseline, in 3 and 6 months from metformin first dose.

The following demographics, clinical and NET-related data, were prospectively collected: age at study entry, sex, primary NET origin, if functioning NET (and related hormone/peptide), comorbid illnesses, concurrent medications, ECOG, weight and height, NET type (G1 or G2) and Ki-67 index.

Methods – endpoints and assessments

The primary endpoint of the trial was disease control rate (DCR) at 6 months from metformin initiation. DCR was defined as the proportion of patients without tumour progression (e.g., stable, partial or complete response), according to the response evaluation criteria in solid tumours (RECIST) 1.1 [24].Secondary endpoints were PFS, toxicity measured by the NCI-CTC AE version 4.03 and variations in glycaemic profiles throughout the study and their association with DCR at 6 months. PFS was defined as the time from first metformin dose to documented disease progression or death, according to the RECIST 1.1 [24]. We planned exploratory analyses of PFS and DCR by subgroups of body mass index (BMI <25 and ≥25 kg/m^2). The use of this cut-off was based on BMI scale, which is considered normal BMI between 18.5 and 24.9 kg/m^2.

Methods – statistical analysis

Descriptive statistics were used to summarises categorical and quantitative variables, with their respective measures of dispersion. Comparisons between quantitative variables were made using the Mann–Whitney's non-parametric test. Efficacy and toxicity analyses were performed by intent to treat, considering all patients who received at least one dose of metformin. 95% confidence intervals (CI) were calculated for the proportions of patients who achieved DCR. The Kaplan–Meier method was used to estimate PFS of all patients and by subgroups of body mass index (BMI <25 and ≥25 kg/m²). The reverse Kaplan–Meier method was used to estimate the follow-up time, considering date of progression as the outcome event. The comparison between such subgroups was made by the log-rank test. Associations between BMI subgroups and DCR at 6 months were evaluated by the Chi-square test. Associations between variations in fasting glycaemic profiles and DCR at 6 months were measured by Mann–Whitney's test. Two-sided *p*-values < 0.05 were considered significant. The best response achieved by each patient, reported as percentages of maximum changes in target NET lesions sizes from baseline (excluding new lesions), was presented in a waterfall plot.

The sample size was arbitrarily determined to be 30 patients, since this was the first prospective study addressing the efficacy of metformin for NET. For interpretation purposes, the study would be considered positive if at least half of the patients achieved the primary outcome of DCR at 6 months. This was based on the results of the phase III trials in NET, where approximately half of the patients are progression-free at 6 months [7, 8].

Results

From July 2014 to August 2019, 29 patients were offered the trial and 28 consented, composing the study population; one patient refused to participate because she was concerned with the possible metformin-associated side effects of weight loss. The majority (53%) were male, with a median age of 50 years and median BMI of 27.05 kg/m². Two (7%) patients had T2DM and both were taking insulin. The most common primary sites were midgut (*N* = 12; 43%) and pancreas (*N* = 9; 32%). Twenty-four (85%) patients had non-functioning NET and most had a grade 2 NET (*n* = 20; 71%). Of these grade 2 NET patients, 12 had Ki-67 between 3% and 10%, and 8 patients had Ki-67 between 11% and 20%. The great majority of patients (*N* = 21; 75%) received at least one prior systemic NET-directed therapy prior to metformin, with nearly 40% being pretreated with a somatostatin analogue. Four patients (14.2%) had functioning NETs and received metformin combined with a somatostatin analogue. Table 1 summarises the patients' characteristics.

Thirteen patients achieved disease control at 6 months, with a DCR of 46% (95% CI: 27–66%). There was no association between DCR at 6 months and BMI subgroups (p=0.48). In a median follow-up time of 6.3 months (95% CI: 2.5–10.1), median PFS was 6.2 months (95% CI: 3.2–9.3; Figure 1).

When patients were grouped according to BMI, the median PFS of patients with BMI of <25 and ≥25 kg/m² was 12.9 (95% CI: 2.5–23.22) and 6.3 (95% CI: 3.38–9.21) months, respectively (*p* = 0.93; Figure 2).

No patient presented objective radiological response. Stable disease was the best response achieved by 86% of the patients. Only four patients had functioning tumours, with three presenting carcinoid syndrome. No reduction in 5-hydroxyindoleacetic acid levels was observed in the 24-hour urine test with the use of metformin. However, one patient with refractory carcinoid syndrome to octreotide LAR 30 mg reported remission of symptoms with the use of metformin combined with octreotide, lasting for 3.3 years. Figure 3 shows a summary of the maximum changes in tumour sizes from baseline.

Glycaemic profiles

Median and mean serum levels of fasting insulin, glucose, glycated haemoglobin and C-peptide at baseline, at 3 months and 6 months, are shown in Table 2.

Clinical Study

Table 1. Characteristics of the study population.

Characteristic	Value
Age, years	50 (32–72)
Gender	
Male	15 (53.6)
Female	13 (46.4)
BMI (kg/m	
<25	11 (39.3)
≥25	17 (60.7)
ECOG	
0	21 (75)
1	6 (21.4)
2	1 (3.6)
Comorbidity	
T2DM	2 (7.1)
Depression	5 (17.8)
Hypothyroidism	3 (10.7)
HPB	3 (10.7)
Primary tumour site	
Rectum	1 (3.6)
Unknown	2 (7.1)
Lungs	4 (14.3)
Pancreas	9 (32.1)
Midgut	12 (43.9)
Functional NET	4 (14.2)
Carcinoid syndrome	3 (10.7)
Cushing syndrome	1 (3.5)
Tumour grade	
NET G1	8 (28.6)
NET G2	20 (71.4)
Treatments performed before study entry	21 (75)
Number of treatments	
1	11 (39.3)
2	5 (17.8)
3	4 (14.3)
4	0
5	1(3.6)

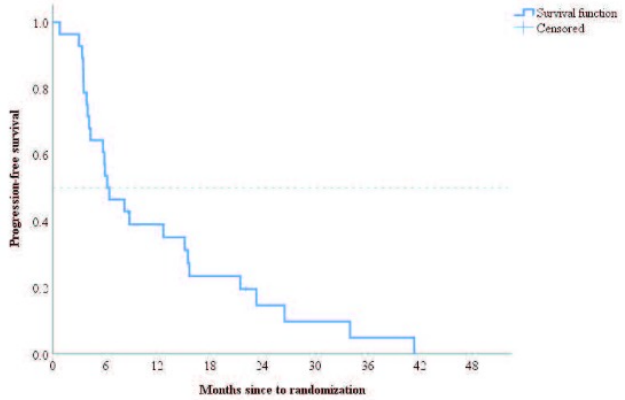
Clinical Study

Table 1. Characteristics of the study population. *(Continued)*

Somatostatin analogues	13(46.4)
Interferon-alpha	2 (7.1)
^{177}Lu-DOTATATE	1 (3.6)
TACE/TAE	2 (7.1)
Chemotherapy	9 (32.1)
Debulking surgery	1 (3.6)

Data are presented median and range or *n* (%).

ECOG PS= Eastern Cooperative Oncology Group performance status, T2DM = Diabetes mellitus type 2, HPB = High blood pressure, TACE = Transarterial chemoembolisation, TAE = transarterial embolisation, ^{177}Lu-DOTATATE = ^{177}Lu-tetraazacyclododecanetetraacetic acid-octreotide



N=28

Figure 1. Kaplan–Meier plot of progression-free survival.

No significant association was observed between variations in serum levels of fasting glycaemic profiles and DCR at 6 months (insulin, $p = 0.54$; blood glucose, $p = 0.33$; glycated haemoglobin, $p = 0.069$; C-peptide, $p = 0.68$). Table 3 shows the median and mean baseline glycaemic profile of patients who achieved DCR in 6 months versus those who did not.

Figure 4 shows box plots of fasting glycaemic profiles according to DCR at 6 months: disease stabilisation/response or tumour progression.

Clinical Study

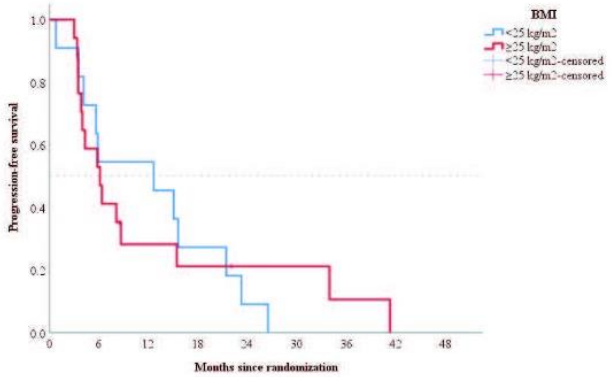
Toxicity

Metformin at a dose of 850 mg twice a day was generally well tolerated. The most prevalent toxicity was diarrhoea. Grade 1 or 2 was found in 21% of the patients and grade 3 or 4 in 14%. Four (14%) patients required dose reduction. All of them are related to diarrhoea grade 3 or 4. The use of metformin was suspended until the control of the symptoms to grade 1; then, it was reintroduced in one tablet per day. There is no patient who discontinued the treatment due to toxicity (Table 4). All patients achieved the minimum of 80% of drug adherence.

Discussion

This phase II trial, unlike preclinical and retrospective clinical studies in patients with metastatic WD NET [14, 15, 17, 25, 26], did not confirm the anti-tumour effects of metformin in patients with grade 1 or 2 NETs. Nearly two-thirds (64%) of the patients presented disease progression before completing 6 months of treatment, no patient experience radiological response and the median PFS was only 6.3 months, similar to what has been observed with placebo in randomised phase III trials. To explore predictive factors of DCR, variations in the glycaemic profile of patients from baseline to 6 months and baseline BMI were analysed but no associations were observed.

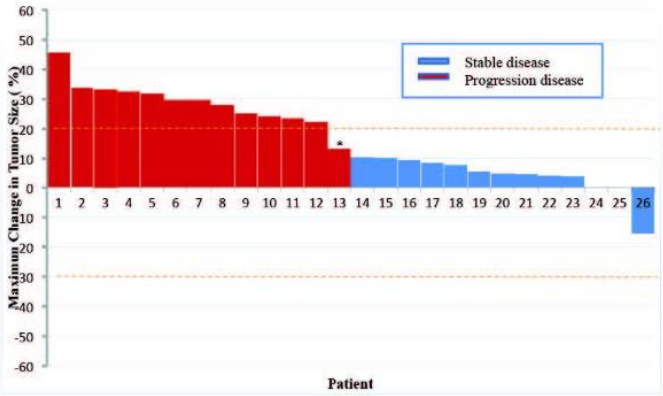
Despite the small sample size of our trial, the results presented here indicate a clear lack of tumour activity of metformin monotherapy in WD-NETs. Opposite results were reported in preclinical studies. Vlotides *et al* [15] studied metformin activity in three cell lines of NET: in three human tumour cell lines (BON1 human pancreatic NET cells, bronchopulmonary NCI-H727 and midgut GOT1); increasing concentrations of metformin (0.1–10 mM) led to inhibition of cell viability in all three cell populations [15]. It is possible that the dose used in our trial, the label dose of metformin for T2DM, is not enough to induce cancer-directed effects as metformin concentrations achieved in an *in vitro* study is much higher than what is achieved *in vivo* (1–20 mM versus 18 μM) [27].



N=< 25= 11

N= >25= 15

Figure 2. Kaplan–Meier plot according to baseline body mass index.



* New no target lesion

Figure 3. Waterfall plot.

Table 2. Fasting glycaemic profile.

Fasting glycaemic test	Median	Mean
Glucose (mg/dL)		
Baseline	89 (75–302)	99.64 ± 41.4
90 days	86 (64–162)	89.2 ± 20.1
180 days	93 (79–159)	96.7 ± 18.7
HbA1 (%)		
Baseline	5.45 (4.8–11.5)	6.0 ± 1.5
90 days	5.40 (4.3–9.8)	5.7 ± 1,1
180 days	5.40 (4.8-12.4)	5.8 ± 1.7
Insulin (µIU/mL)		
Baseline	9.5 (2.0–23.2)	10.7 ± 5.6
90 days	7.30 (1.6–23.3)	8.9 ± 4.9
180 days	10.10 (2.1–26.8)	10.81 ± 7.1
C-Peptide (ng/mL)		
Baseline	2.4 (0.32–4.8)	2.3 ± 1.1
90 days	1.9 (0.1–5.5)	2.2 ± 1.1
180 days	2.07 (0.7–5.1)	2.3 ± 1.1

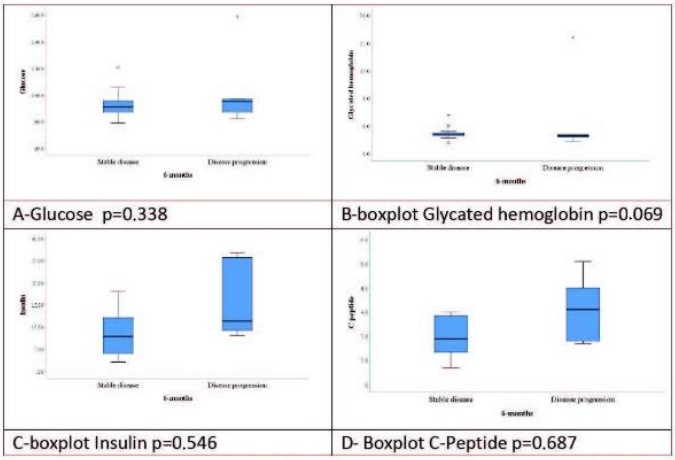
Data are presented as median (range) and mean ± SD
HbA1 = glycosylated haemoglobin

Clinical Study

Table 3. Glycaemic profiles during the trial.

Fasting glycaemic test	Baseline fasting glycaemic profile	
Glucose (mg/dL)	Median	Mean
Stable disease	91 (75–129)	95.9 ± 14.3
Disease progression	88 (78–302)	102 ± 55.8
HbA1 (%)		
Stable disease	5.4 (4.9–9.0)	5.88 ± 1.2
Disease progression	5.5 (4.8–11.5)	6.12 ± 1.8
Insulin (µIU/mL)		
Stable disease	7.7 (2–19.1)	8.8 ± 5.4
Disease progression	12.5 (5.5–23.2)	12.3 ± 5.5
C-Peptide (ng/ml)		
Stable disease	2.2 (0.5–2.8)	1.87 ± 0.7
Disease progression	2.6 (0.32–4.8)	2.7 ± 1.3

Data are presented as median (range) and mean ± SD
HbA1 = glycosylated haemoglobin



A-Glucose (mg/dL); B-glycated hemoglobin (%); C- Insulin (µIU/ml) D- C peptide (ng/ml)

Figure 4. Boxplot of fasting glycemic profiles.

Clinical Study

Table 4. Treatment-related adverse events.

Toxicity	N(%)
Nausea	
G1-2	6 (21.4)
G3-4	0
Diarrhoea	
G1-2	6 (21.4)
G3-4	4 (14.3)
Vomiting	
G1-2	1 (3.6)
G3-4	0
Dyspepsia	
G1-2	3 (10.8)
G3-4	0
Abdominal pain	
G1-2	4 (14.3)
G3-4	0
Xerostomia	
G1-2	1 (3.6)
G3-4	0
Hyporexia	
G1-2	2 (7.2)
G3-4	0

Data are presented as *n* (%)

Clinical Study

Based on the data obtained from an *in vitro* study that indicated a possible mTOR inhibition activity of metformin, there was increased interest in the study of metformin and everolimus. It is believed that this association could play a synergistic role in enhancing mTOR inhibition by everolimus, inhibiting a possible resistance mechanism to this drug. An *in vitro* study evaluated the association of metformin and everolimus in cell cultures taken from patients with PNETs and pulmonary NETs. In the PNET culture, the combination of metformin and everolimus was more effective in inhibiting cell proliferation than each of them administered individually [14]. The combination did not inhibit proliferation in pulmonary NET cells [14]. Clinical evidence of metformin in NET is mostly from retrospective studies and also in patients treated with everolimus [17, 25, 26]. The largest retrospective study, the PRIME-NET, analysed 445 PNETs patients treated in 24 Italian medical centres. In that study, all patients received everolimus with or without a somatostatin analogue. Of all patients, 236 developed T2DM: 112 were treated with metformin and 124 with other hypoglycaemic drugs, including insulin. The use of metformin among patients with T2DM, in comparison with those treated with other treatments, was associated with an improvement in median PFS from 20.8 to 44.2 months, with a 51% reduction in the risk of progression or death when compared to normoglycaemic patients (HR: 0.49; 95% CI: 0.34–0.69; $p < 0.00001$) [26]. Another study, conducted in France, retrospectively evaluated NET patients treated with metformin and everolimus. A total of 213 patients received everolimus, and of these, only 48 had baseline T2DM (19 received metformin). No significant difference in median PFS was noted in the group treated with metformin and everolimus: 15.24 months versus 9.0 months for everolimus alone (HR 0.87, 95% CI: 0.54–1.39; $p = 0.55$) [26].

Unfortunately, everolimus is not reimbursed for NET in the Brazilian public health system, where all patients were treated, which prevented us from exploring metformin co-administered with everolimus in a prospective study.

To date, all studies that have clinically evaluated metformin activity in NET are retrospective. Therefore, the studied population comprised patients with T2DM [17, 25, 26]. The association between T2DM and an increased incidence of cancer has already been demonstrated by several studies [11, 28]. It is believed that the insulin resistance in patients with T2DM would lead to hyperinsulinemia, which would stimulate multiple cell signalling cascades and growth factors. A recent meta-analysis that collected data from 20 publications with a total of 13,008 patients with T2DM and various cancer types showed that the use of metformin was associated with improvement in overall survival and cancer-specific survival (HR: 0.66; 95% CI: 0.55–0.79 and HR: 0.62; 95% CI: 0.46–0.84, respectively) [29], suggesting that patients with T2DM and cancer should be treated with metformin. Herrera-Martínez et al. retrospectively analysed two cohorts of patients with NETs (gastrointestinal NETs and pulmonary carcinoid). Patients with both T2DM and pulmonary carcinoid had more advanced diseases, larger tumours, higher pleural invasion rates and higher death rates [16]. In our study, we had two patients with T2DM and they experienced disease progression before 6 months of treatment.

The supposed anti-tumour effect of metformin via reduction of promitogenic factors such as hyperinsulinemia and increased IGF-1 led to the hypothesis that variations in fasting glycaemic profiles could be a predictor of metformin activity. Yet, we did not observe associations between variations in glycaemic profiles at baseline and at DCR at 6 months. In the PRIME-NET study, fasting baseline blood glucose levels were also not associated with PFS [17].

BMI was another factor explored in the present study. It is believed that fat would play a proinflammatory role and increase insulin resistance, ultimately leading to an increase in signalling pathways and cell proliferation [30]. In the present study, BMI was not found to be a predictor of DCR. The possible association between obesity and NET was analysed in a case/control study with 96 cases and 96 control subjects, and no association was noted between BMI and NET [31]. Similarly, in another retrospective analysis of 324 patients treated at a Swedish institution, BMI of ≥25 kg/m^2 was not found to predict a worse prognosis in PNET patients [32]. A similar result was found in the analysis of patients with resected PNET, in which BMI did not correlate with a higher rate of recurrence or mortality [21].

The limitations of this trial should be mentioned. This was a single-centre, uncontrolled phase II trial, which compromises its external validity. To improve internal validity, we enrolled patients with documented progressive disease. Another limitation of this study was not achieving the target sample of 30 patients planned. However, despite its limitations, our study did not identify anti-proliferative signals of metformin in NET, even when noticing that our patients were not heavily pretreated. Therefore, we do not think that further trials of metformin monotherapy are required to confirm our findings. Conversely, the evaluation of cancer-directed effects of metformin combined with everolimus should be sought. As an example, a single-arm phase II trial (NCT02294006) is recruiting patients to investigate the anti-proliferative potential of metformin with everolimus and octreotide LAR in NETs patients.

Conclusion

In conclusion, the use of metformin monotherapy did not demonstrate clinically significant anti-tumour effects in patients with well-differentiated grade 1 and 2 NET. We think that further trials of metformin combined with everolimus, in patients with or without related hyperglycaemia, are worth being conducted.

Funding

This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sector.

Authors' contributions

Conception and design: J Glasberg and R P Riechelmann. Collection and assembly of data: J Glasberg, A Talans, T R Giollo, R Canella and J E Bezerra Neto. Data analysis and interpretation: J Glasberg, R P Riechelmann and R V Mendonza Lopez. Manuscript writing: J Glasberg and R P Riechelmann. Final approval of manuscript: J Glasberg, A Talans, T Rivelli Giollo, R Canella, J E Bezerra Neto, P M Glenh Hoff and R P Riechelmann.

Conflicts of interest

R P Riechelmann: honoraria for lectures from Novartis.

J Glasberg, A Talans, T Rivelli Giollo, D Zachello Recchimuzzi, J E Bezerra Neto, R V Mendonza Lopez and P M Gehm Hoff: none.

References

1. Dasari A, Shen C, and Halperin D, *et al* (2017) **Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States** *JAMA Oncol* **3**(10) 1335–1342 https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0589 PMID: 28448665 PMCID: 5824320
2. Halfdanarson TR, Rabe KG, and Rubin J, *et al* (2008) **Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival** *Ann Oncol* **19**(10) 1727–1733 https://doi.org/10.1093/annonc/mdn351 PMID: 18515795 PMCID: 2735065
3. Riechelmann RP, Weschenfelder RF, and Costa FP, *et al* (2017) **Guidelines for the management of neuroendocrine tumours by the Brazilian gastrointestinal tumour group** *Ecancermedicalscience* **11** 716 https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.716 PMID: 28194228 PMCID: 5295846
4. Meric-Bernstam F and Gonzalez-Angulo AM (2009) **Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy** *J Clin Oncol* **27**(13) 2278–2287 https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.0766 PMID: 19332717 PMCID: 2738634
5. Chiu CW, Nozawa H, and Hanahan D (2010) **Survival benefit with proapoptotic molecular and pathologic responses from dual targeting of mammalian target of rapamycin and epidermal growth factor receptor in a preclinical model of pancreatic neuroendocrine carcinogenesis** *J Clin Oncol* **28**(29) 4425–4433 https://doi.org/10.1200/JCO.2010.28.0198 PMID: 20823411 PMCID: 3041788
6. Pavel ME, Hainsworth JD, and Baudin E, *et al* (2011) **Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study** *Lancet* **378**(9808) 2005–2012 https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61742-X PMID: 22119496
7. Yao JC, Shah MH, and Ito T, *et al* (2011) **Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors** *N Engl J Med* **364**(6) 514–523 https://doi.org/10.1056/NEJMoa1009290 PMID: 21306238 PMCID: 4208619
8. Yao JC, Fazio N, and Singh S, *et al* (2016) **Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study** *Lancet* **387**(10022) 968–977 https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00817-X
9. Matej A, Bujwid H, and Wronski J (2016) **Glycemic control in patients with insulinoma** *Hormones (Athens)* **15**(4) 489–499 https://doi.org/10.14310/horm.2002.1706

Clinical Study

10. Dowling RJ, Goodwin PJ, and Stambolic V (2011) **Understanding the benefit of metformin use in cancer treatment** *BMC Med* **9** 33 https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-33 PMID: 21470407 PMCID: 3224599

11. Vigneri P, Frasca F, and Sciacca L, *et al* (2009) **Diabetes and cancer** *Endocr Relat Cancer* **16**(4) 1103–1123 https://doi.org/10.1677/ERC-09-0087 PMID: 19620249

12. Quinn BJ, Kitagawa H, and Memmott RM, *et al* (2013) **Repositioning metformin for cancer prevention and treatment** *Trends Endocrinol Metab* **24**(9) 469–480 https://doi.org/10.1016/j.tem.2013.05.004 PMID: 23773243

13. Miranda VC, Barroso-Sousa R, and Glasberg J, *et al* (2014) **Exploring the role of metformin in anticancer treatments: a systematic review** *Drugs Today (Barc)* **50**(9) 623–640 https://doi.org/10.1358/dot.2014.50.9.2229920

14. Vitali E, Boemi I, and Tarantola G, *et al* (2020) **Metformin and everolimus: a promising combination for neuroendocrine tumors treatment** *Cancers (Basel)* **12**(8) 2143 https://doi.org/10.3390/cancers12082143

15. Vlotides G, Tanyeri A, and Spampatti M, *et al* (2014) **Anticancer effects of metformin on neuroendocrine tumor cells *in vitro*** *Hormones (Athens)* **13**(4) 498–508 https://doi.org/10.14310/horm.2002.1517

16. Herrera-Martinez AD, Pedraza-Arevalo S, and L-López F, *et al* (2019) **Type 2 diabetes in neuroendocrine tumors: are biguanides and statins part of the solution?** *J Clin Endocrinol Metab* **104**(1) 57–73 https://doi.org/10.1210/jc.2018-01455

17. Pusceddu S, Vernieri C, and Di Maio M, *et al* (2018) **Metformin use is associated with longer progression-free survival of patients with diabetes and pancreatic neuroendocrine tumors receiving everolimus and/or somatostatin analogues** *Gastroenterology* **155**(2) 479–489 e7 https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.04.010 PMID: 29655834

18. Pierotti MA, Berrino F, and Gariboldi M, *et al* (2013) **Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects** *Oncogene* **32**(12) 1475–1487 https://doi.org/10.1038/onc.2012.181

19. Pernicova I and Korbonits M (2014) **Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer** *Nat Rev Endocrinol* **10**(3) 143–156 https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256 PMID: 24393785

20. Daugan M, Dufay Wojcicki A, and d'Hayer B, *et al* (2016) **Metformin: an anti-diabetic drug to fight cancer** *Pharmacol Res* **113**(Pt A) 675–685 https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.006 PMID: 27720766

21. Cherenfant J, Stocker SJ, and Gage MK, *et al* (2013) **Predicting aggressive behavior in nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors** *Surgery* **154**(4) 785–791 https://doi.org/10.1016/j.surg.2013.07.004 PMID: 24074416

22. Zi F, Zi H, and Li Y, *et al* (2018) **Metformin and cancer: an existing drug for cancer prevention and therapy** *Oncol Lett* **15**(1) 683–690 PMID: 29422962 PMCID: 5772929

23. Pelosi G, Sonzogni A, and Harari S, *et al* (2017) **Classification of pulmonary neuroendocrine tumors: new insights** *Transl Lung Cancer Res* **6**(5) 513–529 https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.09.04 PMID: 29114468 PMCID: 5653522

24. Eisenhauer EA, Therasse P, and Bogaerts J, *et al* (2009) **New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)** *Eur J Cancer* **45**(2) 228–247 https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.026

25. Pusceddu S, Buzzoni R, and Vernieri C, *et al* (2016) **Metformin with everolimus and octreotide in pancreatic neuroendocrine tumor patients with diabetes** *Future Oncol* **12**(10) 1251–1260 https://doi.org/10.2217/fon-2015-0077 PMID: 26890290

26. Hue-Fontaine L, Lemelin A, and Forestier J, *et al* (2020) **Metformin and everolimus in neuroendocrine tumours: a synergic effect?** *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **44**(6) 954–960 https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.02.011 PMID: 32146090

27. Tucker GT, Casey C, and Phillips PJ, *et al* (1981) **Metformin kinetics in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus** *Br J Clin Pharmacol* **12**(2) 235–246 https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1981.tb01206.x PMID: 7306436 PMCID: 1401849

28. Giovannucci E, Harlan DM, and Archer MC, *et al* (2010) **Diabetes and cancer: a consensus report** *Diabetes Care* **33**(7) 1674–1685 https://doi.org/10.2337/dc10-0666 PMID: 20587728 PMCID: 2890380

29. Yin M, Zhou J, and Gorak EJ, *et al* (2013) **Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis** *Oncologist* **18**(12) 1248–1255 https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0111 PMID: 24258613 PMCID: 3868417

30. Lee DH and Giovannucci EL (2019) **The obesity paradox in cancer: epidemiologic insights and perspectives** *Curr Nutr Rep* **8**(3) 175–181 https://doi.org/10.1007/s13668-019-00280-6 PMID: 31129887

31. Santos AP, Santos AC, and Castro C, *et al* (2018) **Visceral obesity and metabolic syndrome are associated with well-differentiated gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors** *Cancers (Basel)* **10**(9) 293 https://doi.org/10.3390/cancers10090293 PMCID: 6162651

32. Ekeblad S, Skogseid B, and Dunder K, *et al* (2008) **Prognostic factors and survival in 324 patients with pancreatic endocrine tumor treated at a single institution** *Clin Cancer Res* **14**(23) 7798–7803 https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0734 PMID: 19047107

Clinical Study

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Dasari A, Shen C, Halperin D, Zhao B, Zhou S, Xu Y, Shih T, Yao JC. Trends in the incidence, prevalence, and survival outcomes in patients with neuroendocrine tumors in the United States. JAMA Oncol. 2017;3(10):1335-42.

2. Oberndorfer S. Karzinoide Tumoren des Dunndarms. Frankf Z fur Pathol. 1907;1:426-9.

3. de Herder WW, Rehfeld JF, Kidd M, Modlin IM. A short history of neuroendocrine tumours and their peptide hormones. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2016;30(1):3-17.

4. Modlin IM, Shapiro MD, Kidd M. Siegfried Oberndorfer: origins and perspectives of carcinoid tumors. Hum Pathol. 2004;35(12):1440-51.

5. Rindi G, Klimstra DS, Abedi-Ardekani B, Asa SL, Bosman FT, Brambilla E, Busam KJ, de Krijger RR, Dietel M, El-Naggar AK, Fernandez-Cuesta L, Klöppel G, McCluggage WG, Moch H, Ohgaki H, Rakha EA, Reed NS, Rous BA, Sasano H, Scarpa A, Scoazec JY, Travis WD, Tallini G, Trouillas J, van Krieken JH, Cree IA. A common classification framework for neuroendocrine neoplasms: an International Agency for Research on Cancer (IARC) and World Health Organization (WHO) expert consensus proposal. Mod Pathol. 2018;31(12):1770-86.

6. Scalettar BA, Jacobs C, Fulwiler A, Prahl L, Simon A, Hilken L, Lochner JE. Hindered submicron mobility and long-term storage of presynaptic dense-core granules revealed by single-particle tracking. Dev Neurobiol. 2012;72(9):1181-95.

7. Modlin IM, Oberg K, Chung DC, Jensen RT, de Herder WW, Thakker RV, Caplin M, Delle Fave G, Kaltsas GA, Krenning EP, Moss SF, Nilsson O, Rindi G, Salazar R, Ruszniewski P, Sundin A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. Lancet Oncol. 2008;9(1):61-72.

8. Kaltsas GA, Besser GM, Grossman AB. The diagnosis and medical management of advanced neuroendocrine tumors. Endocr Rev. 2004;25(3):458-511.

9. Vinik AI, Chaya C. Clinical presentation and diagnosis of neuroendocrine tumors. Hematol Oncol Clin North Am. 2016;30(1):21-48.

10. Oberg K. Pancreatic endocrine tumors. Semin Oncol. 2010;37(6):594-618.

11. Riechelmann RP, Weschenfelder RF, Costa FP, Andrade AC, Osvaldt AB, Quidute AR, Dos Santos A, Hoff AA, Gumz B, Buchpiguel C, Vilhena Pereira BS, Lourenço Junior DM, da Rocha Filho DR, Fonseca EA, Riello Mello EL, Makdissi FF, Waechter FL, Carnevale FC, Coura-Filho GB, de Paulo GA, Girotto GC, Neto JE, Glasberg J, Casali-da-Rocha JC, Rego JF, de Meirelles LR, Hajjar L, Menezes M, Bronstein MD, Sapienza MT, Fragoso MC, Pereira MA, Barros M, Forones NM, do Amaral PC, de Medeiros RS, Araujo RL, Bezerra RO, Peixoto RD, Aguiar S Jr, Ribeiro U Jr, Pfiffer T, Hoff PM, Coutinho AK. Guidelines for the management of neuroendocrine tumours by the Brazilian gastrointestinal tumour group. Ecancermedicalscience. 2017;11:716.

12. Mohamed A, Strosberg JR. Medical management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: current strategies and future advances. J Nucl Med. 2019;60(6):721-7.

13. Ekeblad S, Skogseid B, Dunder K, Oberg K, Eriksson B. Prognostic factors and survival in 324 patients with pancreatic endocrine tumor treated at a single institution. Clin Cancer Res. 2008;14(23):7798-803.

14. Kwekkeboom DJ, Krenning EP. Peptide receptor radionuclide therapy in the treatment of neuroendocrine tumors. Hematol Oncol Clin North Am. 2016;30(1):179-91.

15. Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. Cell. 2006;124(3):471-84.

16. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: progress and challenges. Cell Biosci. 2020;10:31.

17. Phan AT, Dave B. The pivotal role of mammalian target of rapamycin inhibition in the treatment of patients with neuroendocrine tumors. Cancer Med. 2016;5(10):2953-64.

18. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. Nat Cell Biol. 2002;4(9):648-57.

19 Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. Nat Rev Cancer. 2004;4(5):335-48.

20 Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell. 2007;12(1):9-22.

21 Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, della Peruta M, Piemonti L, Capurso G, Di Florio A, delle Fave G, Pederzoli P, Croce CM, Scarpa A. Pancreatic endocrine tumors: expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. J Clin Oncol. 2010;28(2):245-55.

22 Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, Noske A, Stenzinger A, Sasano H, Dietel M, Denkert C, Röcken C, Wiedenmann B, Weichert W. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. Endocr Relat Cancer. 2011;18(1):181-92.

23 Tamborero D, Gonzalez-Perez A, Perez-Llamas C, Deu-Pons J, Kandoth C, Reimand J, Lawrence MS, Getz G, Bader GD, Ding L, Lopez-Bigas N. Comprehensive identification of mutational cancer driver genes across 12 tumor types. Sci Rep. 2013;3:2650.

24 Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. Trends Mol Med. 2005;11(8):353-61.

25 Saxton RA, Sabatini DM. mTOR signaling in growth, metabolism, and disease. Cell. 2017;168(6):960-76.

26 Dan VM, Muralikrishnan B, Sanawar R, J SV, Burkul BB, Srinivas KP, Lekshmi A, Pradeep NS, Dastager SG, Santhakumari B, Santhoshkumar TR, Kumar RA, Pillai MR. Streptomyces sp metabolite(s) promotes Bax mediated intrinsic apoptosis and autophagy involving inhibition of mTOR pathway in cervical cancer cell lines. Sci Rep. 2018;8(1):2810.

27 Lee L, Ito T, Jensen RT. Everolimus in the treatment of neuroendocrine tumors: efficacy, side-effects, resistance, and factors affecting its place in the treatment sequence. Expert Opin Pharmacother. 2018;19(8):909-28.

28 Houghton PJ. Everolimus. Clin Cancer Res. 2010;16(5):1368-72.

29 Grozinsky-Glasberg S, Franchi G, Teng M, Leontiou CA, Ribeiro de Oliveira A, Jr., Dalino P, Salahuddin N, Korbonits M, Grossman AB. Octreotide and the mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) block proliferation and interact with the Akt-mTOR-p70S6K pathway in a neuro-endocrine tumour cell Line. Neuroendocrinology. 2008;87(3):168-81.

30 Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Hörsch D, Winkler RE, Klimovsky J, Lebwohl D, Jehl V, Wolin EM, Öberg K, Van Cutsem E, Yao JC; RADIANT-2 Study Group. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet. 2011;378(9808):2005-12.

31 Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med. 2011;364(6):514-23.

32 Yao JC, Fazio N, Singh S, Buzzoni R, Carnaghi C, Wolin E, Tomasek J, Raderer M, Lahner H, Voi M, Pacaud LB, Rouyrre N, Sachs C, Valle JW, Fave GD, Van Cutsem E, Tesselaar M, Shimada Y, Oh DY, Strosberg J, Kulke MH, Pavel ME; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumours, Fourth Trial (RADIANT-4) Study Group. Everolimus for the treatment of advanced, non-functional neuroendocrine tumours of the lung or gastrointestinal tract (RADIANT-4): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. Lancet. 2016;387(10022):968-77.

33 Yao JC, Lombard-Bohas C, Baudin E, Kvols LK, Rougier P, Ruszniewski P, Hoosen S, St Peter J, Haas T, Lebwohl D, Van Cutsem E, Kulke MH, Hobday TJ, O'Dorisio TM, Shah MH, Cadiot G, Luppi G, Posey JA, Wiedenmann B.. Daily oral everolimus activity in patients with metastatic pancreatic neuroendocrine tumors after failure of cytotoxic chemotherapy: a phase II trial. J Clin Oncol. 2010;28(1):69-76.

34 Zi F, Zi H, Li Y, He J, Shi Q, Cai Z. Metformin and cancer: An existing drug for cancer prevention and therapy. Oncol Lett. 2018;15(1):683-90.

35 Li D, Yeung SC, Hassan MM, Konopleva M, Abbruzzese JL. Antidiabetic therapies affect risk of pancreatic cancer. Gastroenterology. 2009;137(2):482-8.

36 Lee CK, Jung M, Jung I, Heo SJ, Jeong YH, An JY, Kim HI, Cheong JH, Hyung WJ, Noh SH, Kim HS, Rha SY, Chung HC. Cumulative metformin use and its impact on survival in gastric cancer patients after gastrectomy. Ann Surg. 2016;263(1):96-102.

37 Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, Groenier KH, Gans RO, Bilo HJ. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. Diabetes Care. 2010;33(2):322-6.

38 Bowker SL, Majumdar SR, Veugelers P, Johnson JA. Increased cancer-related mortality for patients with type 2 diabetes who use sulfonylureas or insulin. Diabetes Care. 2006(2):254-8.

39 Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, Pasanisi P, Pilotti S. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. Oncogene. 2013;32(12):1475-87.

40 Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat Rev Endocrinol. 2014;10(3):143-56.

41 Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. Nat Rev Cancer. 2009;9(8):563-75.

42 Brown KA, Samarajeewa NU, Simpson ER. Endocrine-related cancers and the role of AMPK. Mol Cell Endocrinol. 2013;366(2):170-9.

43 van Veelen W, Korsse SE, van de Laar L, Peppelenbosch MP. The long and winding road to rational treatment of cancer associated with LKB1/AMPK/TSC/mTORC1 signaling. Oncogene. 2011;30(20):2289-303.

44 Daugan M, Dufay Wojcicki A, d'Hayer B, Boudy V. Metformin: an anti-diabetic drug to fight cancer. Pharmacol Res. 2016;113(Pt A):675-85.

45 Barco SD, Vazquez-Martin A, Cufi S, Oliveiras-Ferraros C, Bosh-Barrera J, Joven J, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin: multi-faceted protection against cancer. Oncotarget. 2011;2(12):896-917.

46 Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brule S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. Cell Metab. 2010;11(5):390-401.

47 Pusceddu S, Vernieri C, Prinzi N, Torchio M, Coppa J, Antista M, Niger M, Milione M, Giacomelli L, Corti F, Prisciandaro M, Monteleone M, Colombo E, Di Bartolomeo M, de Braud F. The potential role of metformin in the treatment of

patients with pancreatic neuroendocrine tumors: a review of preclinical to clinical evidence. Therap Adv Gastroenterol. 2020;13:1756284820927271.

48 Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(23):8204-9.

49 Vlotides G, Tanyeri A, Spampatti M, Zitzmann K, Chourdakis B, Spottl G, Maurer J, Nölting S, Göke B, Auernhammer CJ. Anticancer effects of metformin on neuroendocrine tumor cells i*n vitro*. Hormones (Athens). 2014;13(4):498-508.

50 Vitali E, Boemi I, Tarantola G, Piccini S, Zerbi A, Veronesi G, Baldelli R, Mazziotti G, Smiroldo V, Lavezzi E, Spada A, Mantovani G, Lania AG. Metformin and everolimus: a promising combination for neuroendocrine tumors treatment. Cancers (Basel). 2020;12(8):2143.

51 Pusceddu S, Vernieri C, Di Maio M, Marconcini R, Spada F, Massironi S, Ibrahim T, Brizzi MP, Campana D, Faggiano A, Giuffrida D, Rinzivillo M, Cingarlini S, Aroldi F, Antonuzzo L, Berardi R, Catena L, De Divitiis C, Ermacora P, Perfetti V, Fontana A, Razzore P, Carnaghi C, Davì MV, Cauchi C, Duro M, Ricci S, Fazio N, Cavalcoli F, Bongiovanni A, La Salvia A, Brighi N, Colao A, Puliafito I, Panzuto F, Ortolani S, Zaniboni A, Di Costanzo F, Torniai M, Bajetta E, Tafuto S, Garattini SK, Femia D, Prinzi N, Concas L, Lo Russo G, Milione M, Giacomelli L, Buzzoni R, Delle Fave G, Mazzaferro V, de Braud F. Metformin use is associated with longer progression-free survival of patients with diabetes and pancreatic neuroendocrine tumors receiving everolimus and/or somatostatin analogues. Gastroenterology. 2018;155(2):479-89 e7.

52 Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, Dancey J, Arbuck S, Gwyther S, Mooney M, Rubinstein L, Shankar L, Dodd L, Kaplan R, Lacombe D, Verweij J. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer. 2009;45(2):228-47.

53 Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolismmin noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81(11):4059-67.

54 Bailey CJ, Turner RC. Metformin. N Engl J Med. 1996;334(9):574-9.

55 Braghiroli MI, de Celis Ferrari AC, Pfiffer TE, Alex AK, Nebuloni D, Carneiro AS, Caparelli F, Senna L, Lobo J, Hoff PM, Riechelmann RP. Phase II trial of metformin and paclitaxel for patients with gemcitabine-refractory advanced adenocarcinoma of the pancreas. Ecancermedicalscience. 2015;9:563.

56 U. S. Department of Health and Human Services. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE). Washington, D.C.: U. S. Department of Health and Human Services; 2010.

57 Rinke A, Muller HH, Schade-Brittinger C, Klose KJ, Barth P, Wied M, Mayer C, Aminossadati B, Pape UF, Bläker M, Harder J, Arnold C, Gress T, Arnold R; PROMID Study Group. Placebo-controlled, double-blind, prospective, randomized study on the effect of octreotide LAR in the control of tumor growth in patients with metastatic neuroendocrine midgut tumors: a report from the PROMID Study Group. J Clin Oncol. 2009;27(28):4656-63.

58 Vitali E, Boemi I, Piccini S, Tarantola G, Smiroldo V, Lavezzi E, Brambilla T, Zerbi A, Carnaghi C, Mantovani G, Spada A, Lania AG. A novel insight into the anticancer mechanism of metformin in pancreatic neuroendocrine tumor cells. Mol Cell Endocrinol. 2020;509:110803.

59 Yamana H, Kato K, Kobara H, Fujihara S, Fujita K, Namima D, Fujita N, Kobayashi K, Kamada H, Morishita A, Tsutsui K, Iwama H, Masaki T. Metformin inhibits proliferation and tumor growth of QGP-1 pancreatic neuroendocrine tumor cells by inducing cell cycle arrest and apoptosis. Anticancer Res. 2020;40(1):121-32.

60 Tucker GT, Casey C, Phillips PJ, Connor H, Ward JD, Woods HF. Metformin kinetics. in healthy subjects and in patients with diabetes mellitus. Br J Clin Pharmacol. 1981;12(2):235-46.

61 Vandamme T, Beyens M, de Beeck KO, Dogan F, van Koetsveld PM, Pauwels P, Mortier G, Vangestel C, de Herder W, Van Camp G, Peeters M, Hofland LJ. Long-term acquired everolimus resistance in pancreatic neuroendocrine tumours can be overcome with novel PI3K-AKT-mTOR inhibitors. Br J Cancer. 2016;114(6):650-8.

62 O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. Cancer Res. 2006;66(3):1500-8.

63 Hue-Fontaine L, Lemelin A, Forestier J, Raverot G, Milot L, Robinson P, Borson-Chazot F, Lombard-Bohas C, Walter T. Metformin and everolimus in neuroendocrine tumours: A synergic effect? Clin Res Hepatol Gastroenterol. 2020;44(6):954-60.

64 Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, Pollak M, Regensteiner JG, Yee D. Diabetes and cancer: a consensus report. Diabetes Care. 2010;33(7):1674-85.

65 Olatunde A, Nigam M, Singh RK, Panwar AS, Lasisi A, Alhumaydhi FA, Jyoti Kumar V, Mishra AP, Sharifi-Rad J. Cancer and diabetes: the interlinking metabolic pathways and repurposing actions of antidiabetic drugs. Cancer Cell Int. 2021;21(1):499.

66 Barone BB, Yeh H, Snyder CF, Peairs KS, Stein KB, Derr RL, Wolff AC, Brancati FL. Long term all cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus JAMA. 2008;300(23):2754-64.

67 Herrera-Martinez AD, Pedraza-Arevalo S, F LL, Gahete MD, Galvez-Moreno MA, Castano JP, Luque RM. Type 2 diabetes in neuroendocrine tumors: are biguanides and statins part of the solution? J Clin Endocrinol Metab. 2019;104(1):57-73.

68 Pusceddu S, Vernieri C, Di Maio M, Prinzi N, Torchio M, Corti F, Coppa J, Buzzoni R, Di Bartolomeo M, Milione M, Regnault B, Truong Thanh XM, Mazzaferro V, de Braud F. Impact of diabetes and metformin use on enteropancreatic neuroendocrine tumors: post hoc analysis of the CLARINET Study. Cancers (Basel). 2021;14(1):69.

69 Caplin ME, Pavel M, Cwikla JB, Phan AT, Raderer M, Sedlackova E, Cadiot G, Wolin EM, Capdevila J, Wall L, Rindi G, Langley A, Martinez S, Blumberg J, Ruszniewski P; CLARINET Investigators. Lanreotide in metastatic enteropancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med. 2014;371(3):224-33.

70 Shahid RK, Ahmed S, Le D, Yadav S. Diabetes and cancer: risk, challenges, management and outcomes. Cancers (Basel). 2021;13(22):5735.

71 Yin M, Zhou J, Gorak EJ, Quddus F. Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Oncologist. 2013;18(12):1248-55.

72 Arnold M, Pandeya N, Byrnes G, Renehan AG, Stevens GA, Ezzati M, Ferlay J, Miranda JJ, Romieu I, Dikshit R, Forman D, Soerjomataram I. Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. Lancet Oncol. 2015;16(1):36-46.

73 Kitahara CM, Trabert B, Katki HA, Chaturvedi AK, Kemp TJ, Pinto LA, Moore SC, Purdue MP, Wentzensen N, Hildesheim A, Shiels MS. Body mass index, physical activity, and serum markers of inflammation, immunity, and insulin resistance. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2014;23(12):2840-9.

74 Byers T, Sedjo RL. Does intentional weight loss reduce cancer risk. Diabetes Obes Metab. 2011;13(12):1063-72.

75 Wolin KY, Carson K, Colditz GA. Obesity and cancer. Oncologist. 2010;15(6):556-65.

76 van Kruijsdijk RC, van der Wall E, Visseren FL. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009;18(10):2569-78.

77 Cowey S, Hardy RW. The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer? Am J Pathol. 2006;169(5):1505-22.

78 Santos AP, Santos AC, Castro C, Raposo L, Pereira SS, Torres I, Henrique R, Cardoso H, Monteiro MP. Visceral obesity and metabolic syndrome are associated with well-differentiated gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. Cancers (Basel). 2018;10(9):293.

79 Cherenfant J, Stocker SJ, Gage MK, Du H, Thurow TA, Odeleye M, Schimpke SW, Kaul KL, Hall CR, Lamzabi I, Gattuso P, Winchester DJ, Marsh RW, Roggin KK, Bentrem DJ, Baker MS, Prinz RA, Talamonti MS. Predicting aggressive behavior in nonfunctioning pancreatic neuroendocrine tumors. Surgery. 2013;154(4):785-91; discussion 791-3.

80 Capdevila J, Diez Miranda I, Obiols G, Tabernero J. Control of carcinoid syndrome with everolimus. Ann Oncol. 2011;22(1):237-9.

81 Rubin de Celis Ferrari AC, Glasberg J, Riechelmann RP. Carcinoid syndrome: update on the pathophysiology and treatment. Clinics (Sao Paulo). 2018;73(suppl 1):e490s.

82 Grozinsky-Glasberg S, Davar J, Hofland J, Dobson R, Prasad V, Pascher A, Denecke T, Tesselaar MET, Panzuto F, Albåge A, Connolly HM, Obadia JF,

Riechelmann R, Toumpanakis C. European Neuroendocrine Tumor Society (ENETS) 2022 Guidance Paper for Carcinoid Syndrome and Carcinoid Heart Disease. J Neuroendocrinol. 2022;34(7):e13146.

83 Kulke MH, Bergsland EK, Yao JC. Glycemic control in patients with insulinoma treated with everolimus. N Engl J Med 2009;360(2):195-7.

84 Fiebrich HB, Siemerink EJ, Brouwers AH, Links TP, Remkes WS, Hospers GA, de Vries EG. Everolimus induces rapid plasma glucose normalization in insulinoma patients by effects on tumor as well as normal tissues. Oncologist. 2011;16(6):783-7.

85 Miranda VC, Braghiroli MI, Faria LD, Bariani G, Alex A, Bezerra Neto JE, Capareli FC, Sabbaga J, Lobo Dos Santos JF, Hoff PM, Riechelmann RP. Phase 2 trial of metformin combined with 5-fluorouracil in patients with refractory metastatic colorectal cancer. Clin Colorectal Cancer. 2016;15(4):321-8 e1.