

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

DANIELA FORTUNATO RÉGO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA EM CARCINOMA DE CABEÇA E
PESCOÇO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof^a Dr^a Eliete Neves da Silva Guerra

Brasília

Dezembro, 2014

DANIELA FORTUNATO RÊGO

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA METFORMINA EM CARCINOMA DE CABEÇA E
PESCOÇO

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 16 de dezembro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Eliete Neves da Silva Guerra (presidente)

Universidade de Brasília

Prof^a Dr^a Graziela de Luca Canto

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a Dr^a Angélica Amorim Amato

Universidade de Brasília

A Deus que me criou e foi criativo nesta tarefa.

AGRADECIMENTOS

À minha grandiosa família: Marly, por seu amor incondicional, Raimundo, por seu caráter exemplar e Isabela e Ricardo por seus cuidados incessantes.

À Profª Drª Eliete Neves da Silva Guerra, pelo apoio, confiança, conselhos, amizade e carinho. Exemplo de professora, pesquisadora, orientadora e, sobretudo, um exemplo de ser humano. Minha admiração pelo impecável rigor científico capaz de lapidar o meu caráter, dia após dia.

À Profª Drª Ana Carolina Acevedo-Poppe, com sua colaboração e trabalho ininterrupto de tornar realidade o sonho de construção e edificação do Laboratório de Histopatologia Bucal da Universidade de Brasília.

Ao Profº Drº Paulo Tadeu de Souza Figueiredo, ao Profº Drº André Ferreira Leite e à Profª Drª Nilce Santos de Melo, pelos exemplos de compromisso e motivação nos meus primeiros passos na carreira acadêmica.

À Profª Drª Lenora Gandolfi. Quando houve a minha boa ação, foi seu exemplo que me convenceu. Quando aprendi, foram suas lições que em mim permaneceram. Quando houve cansaço, foi sua coragem que me motivou. Minha eterna gratidão pelos sólidos princípios na paixão pela saúde pública.

Ao Profº Drº Francisco de Assis Rocha Neves e a Profª Drª Adriana Lofrano Alves-Porto pelo apoio institucional ao Laboratório de Histopatologia Bucal.

À Profª Drª Graziela De Luca Canto, da Universidade Federal de Santa Catarina, pela amizade e colaboração na orientação da revisão sistemática. Minha gratidão por acreditar nas minhas capacidades.

Ao Profº Drº Ricardo Della Coletta e ao técnico Fábio Haach Téo do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Departamento de Biologia Celular e Molecular da Universidade Estadual de Campinas em São Paulo, na cooperação no experimento de análise do ciclo celular. Meu reconhecimento pela ajuda e esforços despendidos para contribuição nesse trabalho.

À Drª Silvia Taveira Elias pela grande disposição em estender-me a mão quando foi preciso. Sua paciência e determinação foram essenciais para a elaboração desse trabalho.

À técnica Maria da Gloria pela ajuda, pelas conversas amigas e pela companhia.

Aos meus colegas de pós-graduação que compartilham das vitórias e das experiências: Ana Elizia Mascarenhas, Ludmila Cardoso, Gabriel Álvares, Cinthia Gabriel, Sarah Caixeta, Olívia Laquis, Ana Luiza Cantarutti, Caroline Lourenço, Cláudio Rodrigues, Daniele Assad e Fabiana Tolentino.

Aos colegas da Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar da Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis, do Departamento de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. Pelas grandes amizades e compreensão nos momentos que fui ausente.

Aos amigos sempre presentes e aos amores incentivadores da minha existência.

*“O correr da vida embrulha tudo.
A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”*

(João Guimarães Rosa)

RESUMO

O objetivo desse trabalho é avaliar os potenciais efeitos da metformina no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC) e realizar um estudo de revisão sistemática para evidenciar os potenciais efeitos clínicos da metformina no tratamento dessa doença. Para subsidiar essa análise, utilizaram-se linhagens de células de carcinoma espinocelular de boca (SCC9 e SCC-25) e orofaringe (FaDu). Para efeito de comparação e controle, utilizou-se as linhagens de carcinoma espinocelular cervical (HeLa) e queratinócito humano (HaCat). Um teste de viabilidade celular mensurou a porcentagem de citotoxicidade celular nessas linhagens e por meio dele foi calculada a concentração capaz de inibir 50% das células (CI50). Para verificar se a metformina era seletiva para o HNSCC, o índice de seletividade tumoral foi calculado. A fim de averiguar o papel da metformina na regulação do ciclo celular, a citometria de fluxo quantificou a porcentagem de células paralisadas nas fases G0/G1, S e G2/M. Os resultados obtidos demonstraram que a metformina tem um maior efeito citotóxico nas linhagens FaDu, SCC-9 e HeLa, entretanto esse tratamento não foi seletivo apenas para as linhagens neoplásicas, sendo citotóxico também para a HaCat. Não houve diferença na paralisação do ciclo celular entre as células controle e as tratadas. Apenas 3 estudos associavam o uso da metformina ao HNSCC. Apesar disso, esses estudos relataram melhora na sobrevida global, sobrevida livre de doença e diminuição na metástase locorregional. Portanto, houve evidências de uma associação entre o uso de metformina e a melhora do prognóstico no HNSCC. Outros estudos serão necessários para comprovar o efeito *in vitro* da metformina e as evidências clínicas e epidemiológicas desse fármaco no risco do HNSCC.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the potential effects of metformin in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and conduct a systematic review study to highlight the potential clinical effects of metformin in the treatment of this disease. To support this analysis, we used squamous carcinoma cell lines mouth (SCC9 and SCC-25) and oropharynx (FaDu). For compare and control, was used the cervical squamous cell carcinoma cell lines (HeLa) and human keratinocyte (HaCaT). A cell viability assay measured the percentage of cellular cytotoxicity by these cell lines and it was calculated the concentration capable of inhibiting 50% of the cells (IC50). To verify that metformin was selectively to HNSCC, tumor selectivity index was calculated. In order to investigate the role of metformin in cell cycle regulation, flow cytometric quantify the percentage of cells in the paralyzed phase G0 / G1, S and G2 / M. The results showed that metformin has a greater cytotoxic effect on FaDu cell lines, HeLa and SCC-9, however this treatment is not selective for only the neoplastic cell lines, and is also cytotoxic to HaCaT. There was no difference in the arrest of the cell cycle between the control and the treated cells. Only 3 studies linked the use of metformin with HNSCC. Nevertheless, these studies reported improvement in overall survival, disease-free survival and decreased locoregional metastasis. Therefore, there was evidence of an association between improvement in the prognosis of HNSCC and use of metformin. Further studies are needed to confirm the *in vitro* effect of metformin and the clinical and epidemiological evidence that drug in the risk of HNSCC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da via PI3K/AKT/PTEN/mTOR.	5
Figura 2 - Transativação do EGFR induzida por GPCR.	6
Figura 3 - Ação da metformina na IRS1 e GPCR.	7
Figura 4 – Representação gráfica das curvas dose-resposta na linhagem FaDu em 24, 48 e 72 horas.	18
Figura 5 - Representação gráfica das curvas dose resposta na linhagem SCC-9 em 24, 48 e 72 horas.	18
Figura 6 - Representação gráfica das curvas dose resposta na linhagem SCC-9 em 24, 48 e 72 horas.	19
Figura 7 - Curva-dose resposta da linhagem SCC-25 nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	20
Figura 8 - Curva-dose resposta da linhagem HaCat nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	20
Figura 9 - Análise do ciclo celular.	22
Figura 10. Fluxograma da seleção dos artigos.	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores médios da citotoxicidade nas linhagens FaDu, SCC-9 e HeLa.	19
Tabela 2 - CI 50 e IST referentes às linhagens neoplásicas testadas, no tempo de 72 horas.	21
Tabela 3 – Artigos excluídos.	24
Tabela 4 - Resumo das características dos estudos clínicos selecionados.	27
Tabela 5 - Avaliação metodológica dos estudos selecionados com base em uma avaliação crítica CASP (modificado) para estudos de coorte.	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

° C – graus centígrados

AKT – proteína quinase/ serina treonina

AMP – adenosine monofosfato ativada

AMPK - adenosine monofosfato ativada por proteína quinase

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – adenosina trifosfato

Bax – regulador apoptótico BAX

Bcl-2 – proteína do tipo 4 Bcl-2

Bcl-xL – proteína linfoma - extra grande de células B

Ca²⁺ – íon cálcio

CASP – Critical Skills Appraisal Program

CI50 – Concentração inibitória capaz de inibir o crescimento de 50% das células

Cip/Kip – Proteína de interação de CDK / proteína inibidora da quinase

CDK – quinase dependente de ciclina

CO₂ – gás carbônico

COX – cicloxigenase

Ctrl – controle

DFR – Daniela Fortunato Rêgo

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA - ácido etilendiamino tetra-acético

EGFR – receptor do fator de crescimento epidermal

ENSG – Eliete Neves da Silva Guerra

FaDu – Linhagem celular de carcinoma espinocelular de orofaringe

G0 – Fase G0, a célula permanece indefinidamente na intérfase

G1 – Fase G1, período durante a intérfase, após citocinese e antes da fase S.

G2/M – Fase G2 e mitose

GPCR – Receptor acoplado à proteína G

GTP – Guanosina-5'-trifosfato

HaCat – Linhagem celular de queratinócito humano

HB-EGF – Fator de crescimento de ligação à heparina tipo EGF

HCL – ácido clorídrico

HeLa – Linhagem celular de carcinoma cervical

HNSCC – carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

HPV – Papiloma Vírus Humano

HR – hazard ratio

IC – intervalo de confiança

IGF-1 – fator de crescimento insulínico 1

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IRS-1 – substrato do receptor insulínico – 1

IST – índice de seletividade tumoral

INK4 – proteína supressora de tumor INK4

L – litro

LILACS – Literatura Latino Americana em Ciências da Saúde

LKB1 – quinase hepática B1

LRR – recorrência locorregional

MAPK – proteína quinase de ativação mitogênica

Met – metformina

Met⁺ – pacientes que fizeram uso de metformina

ml – mililitro

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

mmol – milimol

MMP – metaloproteinases

mTOR – mammalian targeted of rapamicym

mTORC1 – Complexo 1 de mTOR

N0 – nenhum nódulo

Nm – nanômetros

OR – odds ratio

OS – sobrevida global

PI3K – fosfatidilinositol 3- quinase

S – fase S (período sintético), entre G1 e G2.

SCC- 9 – Linhagem celular de carcinoma espinocelular de boca

SCC-25 – Linhagem celular de carcinoma espinocelular de boca

Src – proteína quinase proto-oncogene Src

p – p valor

p27 – é um inibidor de enzima que em seres humanos é codificada pelo gene CDKN1B

p53 – protein tumoral p53

PARP – poly (ADP-ribose) polymerase

PBS – tampão fosfato salino

PDK1 – 3-fosfoinositida dependente de proteína quinase-1

PI3K – fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase

PIP₃ – fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

PKA – proteína quinase A

PKC – proteína quinase C

pRb – proteína do retinoblastoma

PRISMA – Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

pTEN – gene que codifica a proteína phosphatase and tensin homolog

RAPTOR – proteína associada à regulação do mTOR

RHEB – “Ras homolog enriched in brain”, proteína ligada a GTP

RPM – rotações por minuto

STE – Silvia Taveira Elias

T1 – 1 sítio de localização tumoral primária

TPP – marca de equipamentos laboratoriais

TSC1 – gene que codifica a proteína “tuberous sclerosis 1”

TSC2 – gene que codifica a proteína “tuberous sclerosis 2”

TP53 – gene que codifica a “tumor protein p53”

EUA – Estados Unidos da América

VEGF – fator de crescimento vascular endotelial

vs – versus

µl – microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	1
1.1 Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: VIAS DE CARCINOGENESE.....	4
1.2 A METFORMINA e seus mecanismos de ação	6
1.3 A EVIDÊNCIA EPIDEMIOLÓGICA da metformina e o risco de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.....	8
2. OBJETIVOS	9
2.1 Objetivo geral	9
2.2 Objetivos específicos	9
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.1 Cultura de células	10
3.2 Teste de viabilidade celular	11
3.3 Curva dose - resposta	12
3.4 Citometria de fluxo	13
3.5 Análise estatística	13
3.6 Revisão Sistemática.....	14
3.6.1 Critérios de elegibilidade	14
3.6.2 Fontes de informação e estratégia de busca.....	14
3.6.3 Seleção dos estudos	15
3.6.4 Processo de coleta de itens e dados.....	15
3.6.5 Risco de viés em estudos individuais	15
3.6.6 Medidas de resumo	15
3.6.7 Síntese dos resultados	16
3.6.8 Risco de viés entre os estudos.....	16
4. RESULTADOS	17

4.1	Avaliação da atividade citotóxica da metformina em linhagens de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: curva dose-resposta e cálculo do CI-50	17
4.2	Índice de seletividade tumoral.....	20
4.3	Análise da interferência da metformina no ciclo celular na linhagem FaDu.....	21
4.4	Revisão Sistemática.....	22
4.4.1	Seleção dos estudos	22
4.4.2	Características dos estudos	26
4.4.3	Risco de viés dos estudos.....	29
4.4.4	Síntese dos resultados	31
4.4.5	Risco de viés entre os estudos.....	32
5.	DISCUSSÃO	33
6.	CONCLUSÃO.....	38
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

A relação entre câncer e metabolismo está sendo estudada há tempos. Em 1924, o bioquímico alemão Otto Warburg propôs que o câncer é causado pela alteração do metabolismo no processamento de energia na célula: “O câncer, mais do que todas as outras doenças, tem inúmeras causas secundárias. Entretanto, há apenas uma causa nobre: a substituição da respiração oxidativa das células normais do corpo através da fermentação de açúcar” (Warburg, 1956). A conversão excessiva de glicose com concomitante produção de lactato é chamada de "efeito Warburg" (glicólise aeróbica) e é característico das células malignas (DeBerardinis *et al.*, 2008, Vander Heiden *et al.*, 2009). A dificuldade no controle do fluxo glicolítico apenas em células malignas sem prejudicar as células normais para eliminar o câncer é evidente. Assim, a restrição calórica emergiu como uma estratégia natural para atenuar o crescimento tumoral.

Vários medicamentos incluindo a metformina, sulfonilureias, tiazolidinedionas, foram observados por afetar a morbidade e prognóstico do câncer (He *et al.*, 2012, He *et al.*, 2011). A metformina, em especial, desempenha importante função no metabolismo da glicose: suprime a produção hepática da glicose e aumenta a sensibilidade à insulina (o chamado efeito sistêmico); reduz a lipólise em adipócitos e a absorção de glicose a partir do intestino (Campbell *et al.*, 2007, Detaille *et al.*, 2002). Além disso, embora o mecanismo de ação exato da metformina não seja totalmente compreendido, o tratamento melhora o controle glicêmico e diminui a resposta inflamatória (Bulcão *et al.*, 2007, Fidan *et al.*, 2011), evitando o potencial efeito tumoral proliferativo (Yin *et al.*, 2013).

A metformina é um fármaco amplamente utilizado para tratamento do diabetes mellitus do tipo 2 (Giovannucci *et al.*, 2010, Knowler *et al.*, 2002). O seu uso em pacientes diabéticos tem sido associado à diminuição da incidência e mortalidade por câncer (Noto *et al.*, 2012, Franciosi *et al.*, 2013, Sandulache *et al.*, 2013). Em alguns estudos, a metformina inibe a proliferação celular em várias neoplasias humanas, incluindo o carcinoma gástrico (Kato *et al.*, 2012), o câncer de pâncreas (Bao *et al.*, 2012), o câncer medular da tireóide (Klubo-Gwiedzinska *et al.*, 2012), o carcinoma de mama (Zhuang *et al.*, 2011) e o carcinoma endometrial (Tan *et al.*, 2011). A metformina também suprimiu o crescimento tumoral em modelo animal de

câncer de ovário (Rattan *et al.*, 2011), de melanoma (Janjetovic *et al.*, 2011), de câncer da próstata (Ben Sahra *et al.*, 2008) e de carcinoma de mama (Anisimov *et al.*, 2005).

A redução do crescimento das células tumorais em resposta ao uso da metformina é causada em parte pela inibição da atividade do mTORC1 (Pollak, 2010), pela ativação do seu principal regulador e sensor crítico de bioenergia celular: a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) (Zakikhani *et al.*, 2006, Dowling *et al.*, 2007, Pollak, 2010). A tensão metabólica produzida pela metformina conduz a uma alta taxa de AMP/ATP, desencadeando assim a ativação de AMPK e a indução da síntese da proteína LKB1 (Kuhajda, 2008). Um dos efeitos dessa ativação é a preservação de energia celular e produção de mais ATP (Cantó, *et al.* 2009).

A ativação da AMPK induz a fosforilação do gene supressor de tumor TSC2 e o RAPTOR, uma subunidade de ligação do mTORC1, resultando na inibição do alvo da rapamicina em mamíferos, o mTOR. A via do mTOR desempenha um papel fundamental no controle do crescimento e metabolismo celular, que são eventos importantes na progressão do câncer (Shaw, 2009). Portanto, sugere-se que a metformina possa ser utilizada para a gestão metabólica do câncer (Sikka *et al.*, 2012).

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC), a maioria dos quais surgem na cavidade oral, configura um dos principais problemas de saúde pública (Vitale-Cross *et al.*, 2012). O câncer de boca e faringe, juntos, são o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, com alta incidência especialmente no sul e sudeste asiáticos, partes da Europa ocidental e oriental e partes da América do Sul (Warnakulasuriya, 2009). Segundo a estimativa de incidência para o ano de 2014 só na cavidade oral somaram-se 11.280 casos para homens e 4.010 para mulheres, o que representa o sétimo tipo de câncer mais incidente em ambos os sexos no Brasil. A distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo (exceto o câncer de pele não melanoma), tem o da cavidade oral ocupando a quinta posição e o de laringe a sétima posição, para homens (INCA, 2014).

O HNSCC compreende tumores da mucosa do trato aerodigestivo superior como cavidade oral (lábio, rebordo alveolar, mucosa bucal, trígono retromolar, assoalho da boca e língua), orofaringe, laringe e faringe (Warnakulasuriya, 2009, Belcher *et al.*, 2014). Dentre este subtipo constata-se que 48% dos casos são de câncer de boca e que 90% destes podem ser classificados como carcinoma espinocelular (Jemal *et al.*, 2009, Cooper *et al.*, 2009).

Os principais fatores de risco para o HNSCC são o álcool e o tabaco. Vários estudos confirmam o risco associado a estes dois hábitos de vida (Petti, 2009; Warnakulasuriya, 2009). Outro fator de risco comum nesse tipo de câncer é a infecção associada ao Papilomavírus Humano (HPV), razão pela qual as vias de carcinogênese são diretamente influenciadas pela expressão da proteína p16 (Molinolo *et al.*, 2012, Gillison *et al.*, 2012; Thavaraj *et al.*, 2011). O papel desse vírus na carcinogênese oral tem sido estudado desde meados da década de 80, mas a percepção de uma epidemia emergente de HNSCC associados ao HPV é relativamente recente (Chaturvedi *et al.*, 2008).

O tratamento para esse tipo de carcinoma compreende a quimioterapia, radioterapia e ressecção cirúrgica tumoral. A detecção na fase inicial do HNSCC oferece a melhor oportunidade para um bom prognóstico. Entretanto, em razão da detecção da doença em estágio avançado, a taxa de sobrevivência é de cinco anos (Clark *et al.*, 2010). Avanços no tratamento do HNSCC têm incluído a melhoria dos cuidados clínicos para esses pacientes (Belcher *et al.*, 2014).

Inibir o crescimento tumoral e a metástase, centrando-se em alvos de proteínas específicas ou nas vias de transdução de sinais, são algumas das novas abordagens. Agentes alvos para melhorar a eficácia da terapia atual incluem inibidores do EGFR (Cetuximab, Zalutumumab, Panitumumab), inibidores da EGFR tirosina-quinase (Gefitinib, Erlotinib), inibidores de VEGF (bevacizumab, Vandetanib), e vários inibidores de, por exemplo, Src-quinase, mTOR, PARP, proteassoma, COX e proteína de choque térmico (Kundu *et al.*, 2012).

1.1 Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: VIAS DE CARCINOGENESE

A via PI3K/AKT/mTOR é uma rede de cascata de sinalização em células de mamíferos, cujas operações coordenadoras promovem importantes atividades celulares. Essa via desempenha um papel crítico na sobrevivência e crescimento de células malignas (Martelli *et al.*, 2010). A rede oncogênica mTORC1 tem a função de reprogramação metabólica progressiva, que favorece a biossíntese, proliferação, sobrevivência e metástase (Zoncu *et al.*, 2011).

A ativação do mTORC1 pode resultar na atividade exacerbada do receptor do EGF (EGFR), que é superexpresso no HNSCC. Esse processo resulta na fosforilação e ativação da quinase lipídica PI3K ou na regulação negativa da expressão da proteína supressora de tumor pTEN. A pTEN atua como uma fosfatase lipídica que inibe a acumulação do produto enzimático da PI3K, fosfatidilinositol (3,4,5) –trifosfato (PIP₃) (Molinolo *et al.*, 2009). A PI3K é uma quinase lipídica que controla a formação de diferentes complexos de sinalização sobre a membrana das células (Carnero *et al.*, 2008).

A acumulação de PIP₃ estimula a quinase Akt, que inativa o complexo protéico supressor de tumor TSC1/TSC2, levando à estimulação da expressão de GTP ligada à Rheb, que por sua vez ativa o mTOR como parte do complexo de quinase do mTORC1 (Sengupta *et al.*, 2010). Além disso, essa acumulação resulta na ativação do PI3K e por consequência a ativação de PDK1 quinase. A PDK1 fosforila posteriormente a AKT serina/treonina, resultando na ativação de AKT, que por sua vez ativa e induz a fosforilação de múltiplos substratos, inclusive os complexos do mTOR, ocasionando a geração de sinais de proliferação e sobrevivência celular (Leemans *et al.*, 2011). (Figura 1).

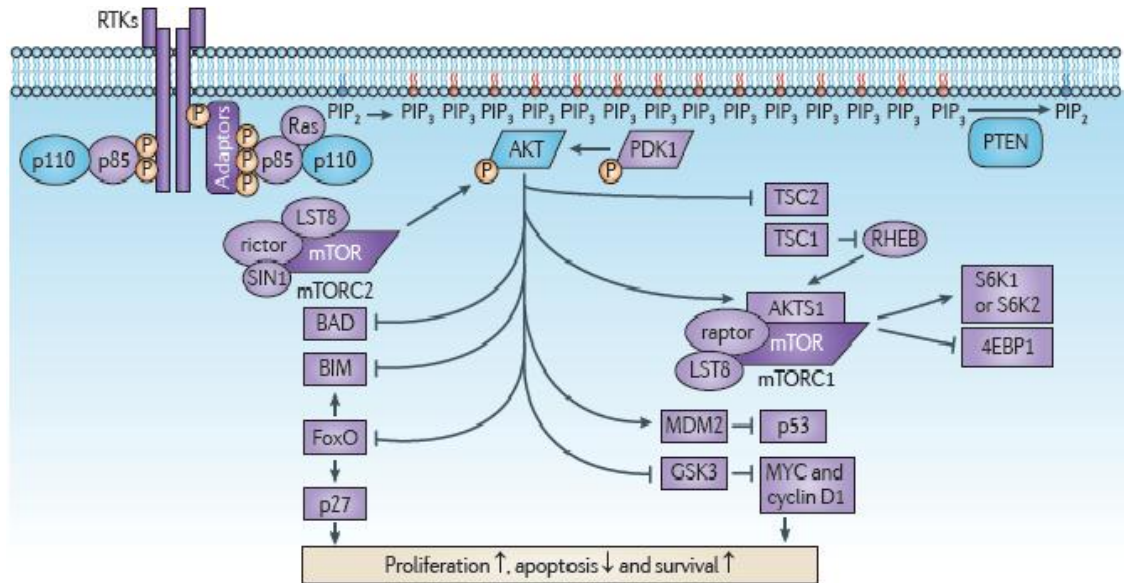


Figura 1. Esquema da via PI3K/AKT/PTEN/mTOR. Por meio da ativação da PI3K acoplada a receptores tirosina-quinases, a fosforilação de PIP2 para PIP3 desencadeia inúmeras sinalizações em proteínas envolvidas na via do mTOR, importante proteína responsável pela proliferação, apoptose e sobrevivência celular (Leemans *et al.*, 2011).

Além desses mecanismos já elucidados, é importante destacar que o aumento da expressão do EGFR no HNSCC tem sido correlacionado à diminuição da sobrevida dos pacientes, independentemente da terapia primária (Grandis *et al.*, 1998). O EGFR é um componente essencial das vias de transdução de sinais que regulam o crescimento do tumor, a sobrevivência, a migração e a resistência ao tratamento quimioterápico (Fischer *et al.*, 2003). Dessa forma, a intensidade da duração da transativação do EGFR pela ativação de vários estímulos extracelulares determina as diferentes respostas das células malignas frente aos tratamentos oncológicos (Hart *et al.*, 2005; Bhola *et al.*, 2008). Essa transativação de EGFR tem papel fundamental na regulação de muitos processos biológicos importantes, tais como a progressão tumoral, sendo realizada pelos receptores acoplados à proteína G (GPCR) (Blobel *et al.*, 2005) (Figura 2).

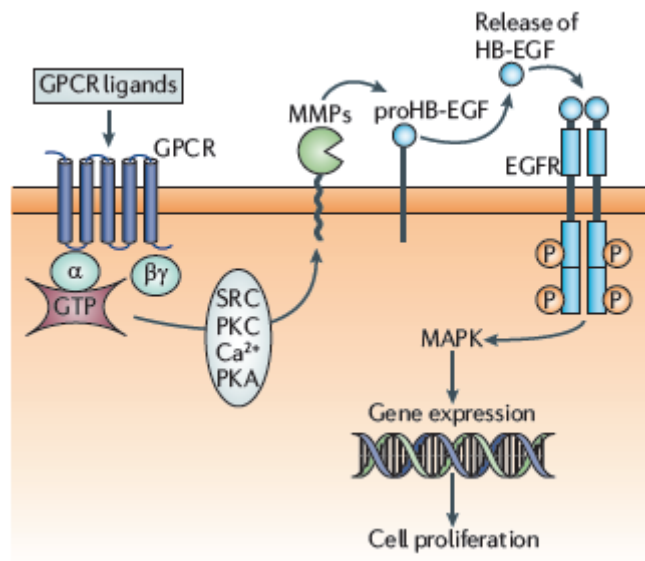


Figura 2. Transativação do EGFR induzida por GPCR. Os GPCRs induzem a transativação do EGFR pelos vários mediadores, incluindo SRC quinases, Ca^{2+} , a proteína quinase C (PKC) e PKA. A transformação de proHB-EGF em HB-EGF, que ocorre pela clivagem de matriz metaloproteinases (MMP), é necessária para a ativação da proteína EGFR e consequente transdução da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), que é largamente envolvida na expressão do gene e proliferação celular (Lapano, Maggiolini, 2011).

Os GPCRs são sete receptores transmembranares que medeiam o crescimento celular, motilidade e diferenciação através de estimulação por agonistas cognatos (Dorsam *et al.*, 2007). Em particular, o agonista do receptor de acetilcolina carbacol (LPA), as moléculas inflamatórias da prostaglandina E2 (PGE2) e as bradicininas, estimulam o crescimento e invasão de células pelo desencadeamento funcional entre os seus cognatos GPCRs (mediados por EGFR) no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (Thomas *et al.*, 2006).

1.2 A METFORMINA e seus mecanismos de ação

A metformina é uma biguanida derivada da “French lilac” (*Galega officinalis*), uma planta conhecida por vários séculos por reduzir os sintomas do diabetes mellitus. Como a fenformina e a buformina, a metformina foi originalmente desenvolvida para o tratamento da hiperglicemia e diabetes do tipo 2 (Campbell *et al.*, 2007). A atividade antineoplásica da metformina depende das características metabólicas dos

pacientes e é mediada principalmente por AMPK, embora outros mecanismos também tenham sido descritos (Pierotti *et al.*, 2013).

A ativação da AMPK é resultado da inibição de mTORC1, das vias do AKT, do IGF-1 e da regulação do ciclo celular mediado por p53. Esse processo promove, de acordo com o tipo e grau de estresse celular, mecanismos supressores adicionais que contribuem para estacionar a progressão tumoral ou induzir a morte celular (Kalender *et al.*, 2010). A inibição do IGF-1/insulina pela metformina, por uma via AMPK-dependente, é mediada pela fosforilação do IRS-1 em Serina 794, o que leva a uma diminuição da ativação do IRS-1, AKT e mTORC1. Com a inibição do mTORC1, mediado por LKB1, a metformina interrompe a relação entre o IGF-1/insulina e as vias GPCRs (Pierotti *et al.*, 2013)(Figura 3).

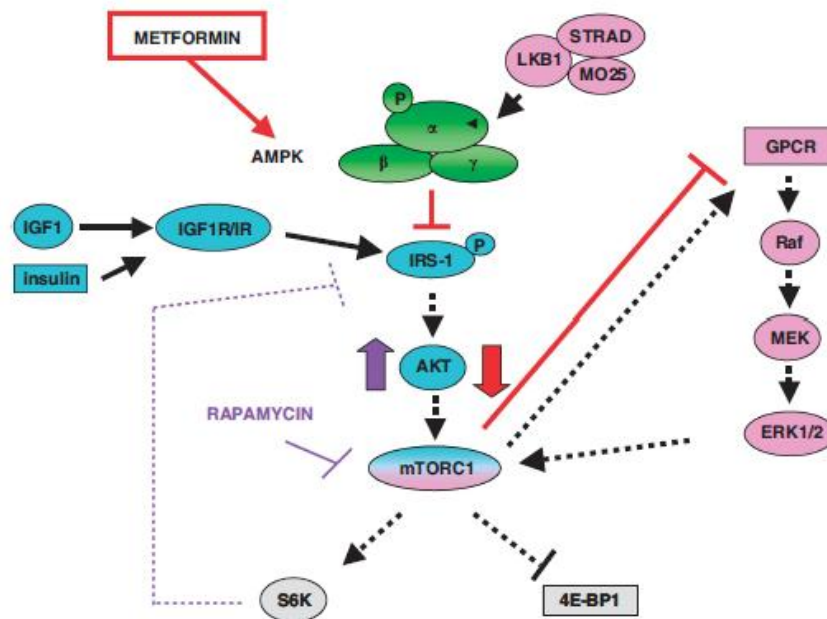


Figura 3. Ação da metformina na IRS1 e GPCR. Os diferentes efeitos da metformina e da rapamicina em AKT (Pierotti *et al.*, 2013).

Além disso, a metformina é capaz de inibir o crescimento do HNSCC, bloqueando a progressão do ciclo celular na fase G0/G1 e induzindo a apoptose. O tratamento com metformina também leva à diminuição significativa dos níveis de ciclina D1 e da fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb). As CDK4 e CDK6 também são diminuídas com a metformina. Do mesmo modo, há regulação negativa das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL e regulação positiva da proteína pró-apoptótica Bax (Luo *et al.*, 2012).

1.3 A EVIDÊNCIA EPIDEMIOLÓGICA da metformina e o risco de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

Alguns estudos observacionais recentes sugerem que alguns medicamentos utilizados para tratar a hiperglicemia têm reduzido o risco de câncer na população (Giovannucci *et al.*, 2010). Foram analisadas a sobrevida do paciente com câncer e demonstrou-se que diabéticos em uso de metformina monoterápica com 90 dias antes do diagnóstico de câncer tinham reduzido significativamente a mortalidade global (HR 0,85; IC de 0,78-0,93) em comparação com aqueles não diabéticos ou tratados com outros medicamentos (Currie *et al.*, 2012). Outro estudo clínico mostrou que a completa remissão do carcinoma de mama é mais frequente após quimioterapia neoadjuvante em pacientes diabéticos sob tratamento com metformina (24%) do que nos diabéticos não tratados com metformina (8%) ou pacientes não diabéticos (16%).

A metformina também tem sido associada a resultados clínicos favoráveis no HNSCC. Estudo de Yen e colaboradores (2014) demonstrou que a incidência de HNSCC foi 0,64 vezes menor em pacientes que tomam metformina em comparação com doentes que não tomam metformina ($p < 0,01$). Foram encontradas associações estatisticamente significantes entre o aumento da sobrevida livre de doença em pacientes que faziam uso de metformina. Demonstrou-se que há tendências de melhora na sobrevida do HNSCC em comparação aos não diabéticos e diabéticos não tratados com metformina (OR = 1,77 e 1,99, respectivamente) (Sandulache *et al.*, 2013).

A metformina pode reduzir risco do câncer por dois mecanismos principais: (1) o efeito mimético de restrição calórica, apoiado pela ativação de AMPK na qual, por sua vez, ativa os processos catabólicos e reduz o consumo de energia celular, incluindo a proliferação celular (Vazquez-Martin *et al.*, 2010, Hardie *et al.*, 2007, Zakikhani *et al.*, 2006), e (2) redução da resistência à insulina e, por conseguinte, de níveis insulínicos e outros marcadores de resistência à insulina, tais como a testosterona (Goodwin *et al.*, 2008, Goodwin *et al.*, 2011, Pollak *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da metformina no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a citotoxicidade da metformina em linhagens de células de HNSCC;
2. Identificar a dose necessária da metformina capaz de induzir 50% de toxicidade celular nas linhagens estudadas (concentração inibitória - CI);
3. Definir o índice de seletividade tumoral da metformina;
4. Detectar a interferência da metformina no ciclo celular das linhagens de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço;
5. Realizar estudo secundário, do tipo revisão sistemática, sobre o efeito da metformina no HNSCC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultura de células

Foram utilizadas nos experimentos linhagens de células imortalizadas provenientes de culturas humanas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (SCC-9, SCC-25 e FaDu). Para efeito de comparação e controle, utilizou-se ainda as linhagens de carcinoma espinocelular cervical (HeLa) e queratinócito humano (HaCat). Dentre as linhagens de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foram selecionadas a SCC-9 e SCC-25 provenientes de carcinoma de língua e a FaDu derivada de carcinoma de hipofaringe. As linhagens utilizadas nesse projeto estão descritas na ATCC, The Global Bioresource Center. Para o cultivo das linhagens FaDu, HaCat e HeLa o meio de cultura utilizado foi o Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e para as linhagens SCC-9 e SCC-25 utilizou-se o meio de cultura DMEM acrescido de meio F12 na proporção 1:1. Em ambos os meios de cultura foram adicionados soro fetal bovino a 10%, hidrocortisona, antibióticos penicilina e estreptomicina nas concentrações finais de 100µg/mL e 1µg/mL, respectivamente. Essas soluções foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,2µm e mantidos a 4°C, sendo aquecidos em banho-maria à temperatura de 37°C por aproximadamente 10 minutos, antes do uso. Todos os reagentes utilizados foram comprados da empresa Sigma Aldrich. As células foram mantidas em condições ideais, em uma incubadora com 5% de CO₂ e temperatura de 37°C.

O repique celular era realizado a cada dois dias: o meio de cultivo era descartado e as células lavadas uma vez com PBS pré-aquecido, sendo em seguida tratadas com solução de tripsina 0,25% acrescida de EDTA 5%, por 5 minutos, à temperatura de 37°C. Após o desprendimento das células da placa de cultivo por digestão enzimática, a tripsina era inativada por adição de 5 mL de meio de cultura completo. As células foram coletadas por centrifugação a 2.000 rpm por 5 minutos, sendo o sobrenadante descartado e o pellet de células ressuspenso em meio de cultivo completo. Dessa solução, foram utilizados 10µL para a contagem de células em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico invertido. O número total de células era calculado por meio da razão entre o número total das células contadas

nos quatro quadrantes x fator de diluição da suspensão de células x 10^4 , dividido por quatro:

$$\frac{(\text{n}^\circ \text{total células} \times \text{fator de diluição} \times 10^4)}{4}$$

A partir do número obtido por essa fórmula, é possível calcular a quantidade necessária de solução celular a ser plaqueada para a concentração desejada de cada experimento.

3.2 Teste de viabilidade celular

A citotoxicidade desencadeada pelo tratamento com a metformina foi aferida pelo teste de avaliação da atividade mitocondrial das células. Esse teste avalia a capacidade das enzimas mitocondriais das células tratadas em reduzir o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em formazam. Dessa forma, somente as células viáveis têm a capacidade de provocar essa redução. A absorvância é a medida do número de células viáveis, ou seja, o número de células que não sofreram toxicidade suficiente para reduzir sua atividade mitocondrial. O produto de formazam apresenta uma coloração arroxeada diferente da cor inicial dos sais de tetrazólio que, após serem diluídos em solvente de veículo alcoólico, podem ter sua absorvância aferida em uma leitora de microplaca (Thermo Plate TP reader) a 570 nm e comparada à absorvância dos controles.

Para a realização desse experimento todas as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços (TPP) na concentração de 5.000 células por poço e mantidas em incubadora em condições ideais por 24 horas. Após esse período as células foram tratadas com hidrocloreto de metformina (SIGMA ALDRICH) diluídos em PBS. A solução mãe de metformina foi diluída em meio de cultura (respectivo para cada linhagem celular) para obter as concentrações desejadas. A solução mãe foi diluída com 165,2 mg de metformina para cada 1ml de PBS. A partir dessa solução, eram feitas diluições seriadas até o alcance da concentração desejada. As células também foram tratadas com o controle negativo (PBS).

Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, as células foram retiradas da incubadora e para cada 100 μL de solução de meio com tratamento foi adicionado 10 μL de solução de MTT. As placas foram recobertas com papel alumínio e mantidas na incubadora por 4 horas. Após esse tempo, o meio de cultura foi aspirado com a solução de MTT e acrescentado 100 μL de isopropanol acidificado (25 mL de isopropanol mais 104 μL de HCl 100%). As placas foram agitadas por 10 minutos em um vortex à velocidade baixa. Por fim, a absorvância da amostra foi aferida. Para obter a citotoxicidade induzida pelo tratamento, a absorvância das células foi comparada ao controle negativo, estabilizado como 100% de células viáveis.

3.3 Curva dose - resposta

A fim de determinar se a resposta citotóxica é dose e tempo-dependente, foram realizadas curvas dose-resposta de citotoxicidade de células tratadas com concentrações decrescentes de metformina nas linhagens FaDu, SCC-9, SCC-25, HeLa e HaCat nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para isso, foram elencados 10 pontos de concentrações com intervalos (0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 50 e 100 mmol/L), a partir da solução mais concentrada (100 mmol/L) até o controle negativo em que foi adicionado ao meio de cultura, apenas a quantidade máxima de PBS utilizada para a diluição da metformina. A concentração de “zero” $\mu\text{g/mL}$ (adição de solvente, apenas) do tratamento com metformina foi considerada como tendo 100% de viabilidade. Após 24 horas de tratamento, as células viáveis remanescentes na placa de cultivo foram submetidas ao teste do MTT e a absorvância a 570 nm aferida em leitora de microplaca.

A concentração necessária de metformina capaz de induzir 50% de citotoxicidade celular (CI50) foi calculada e os dados obtidos permitiram estimar o índice de seletividade tumoral (IST) para o qual foi realizada a razão entre o CI50 obtido para a célula controle (HaCat) e as células malignas, conforme publicado anteriormente por Horii e colaboradores. O IST é igual a:

$$\frac{\text{CI50 células controle}}{\text{CI50 células neoplásicas}}$$

3.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido. Por meio de um aparelho de detecção óptico-eletrônico, são possíveis análises de características físicas e/ou químicas de uma simples célula. Foi utilizada, nesse trabalho, a identificação da ação da metformina nas fases do ciclo celular da linhagem FaDu.

Para a avaliação do ciclo celular, a linhagem FaDu foi plaqueada na concentração de 2×10^5 células/poço em placa de 6 poços e mantidas a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após 24 horas do plaqueamento, foi removido o meio de cultura com soro fetal bovino e acrescido novo meio de cultura sem soro, processo denominado cadenciamento celular. Transcorrido 24 horas do cadenciamento, o meio sem soro foi aspirado e acrescido à solução de metformina e meio de cultura. Essa solução correspondia à concentração referente ao CI50 da linhagem, obtido no teste de viabilidade celular.

Após 24, 48 e 72 horas de tratamento com a metformina e o controle negativo (semelhante ao do teste de viabilidade celular), as células foram recolhidas, fixadas com etanol 70% e mantidas à temperatura de -20°C por 24 horas. Para a marcação das fases do ciclo celular, as células foram coradas com 50 µg/mL de iodeto de propídeo (Sigma-Aldrich, EUA) e mantidas no escuro à 4°C por pelo menos 1 h. As amostras devidamente marcadas foram examinadas em citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences, EUA) no Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas em São Paulo. Um mínimo de 10.000 eventos foi analisado para cada amostra. Para a determinação da porcentagem de células em cada fase do ciclo, utilizou-se o programa ModFit LTTM (BD Biosciences, EUA).

3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com pelo menos três triplicatas independentes para o teste de viabilidade celular e 2 duplicatas para a análise do ciclo celular. Os testes de citotoxicidade foram submetidos à análise One-way ANOVA, teste de

comparação múltipla de Tukey. As curvas dose-resposta foram feitas por regressão não linear, com variável “slope” da dose de inibição versus reposta e cálculo do CI50. Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPadPrism versão 5.0. Os valores com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.1 Revisão Sistemática (Métodos)

Um estudo secundário do tipo revisão sistemática foi realizado baseado na lista de verificação validada pelo PRISMA (Moher *et al.*, 2009).

3.1.1 Critérios de elegibilidade

Foram selecionados os artigos que tratavam primariamente do efeito da metformina no HNSCC com localização no lábio e/ou cavidade oral, faringe, laringe, cavidade nasal ou seios paranasais. Estudos que avaliaram indivíduos de qualquer idade que tiveram carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e fizeram uso da metformina, em comparação com pacientes sem tratamento ou que utilizaram outro tipo de tratamento para essa doença (drogas ou radioterapia), foram considerados. O desenho do estudo incluiu estudos clínicos randomizados ou não randomizados, estudos de coorte e estudos de caso-controle.

Além de revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e resumos de conferências, foram excluídos os estudos que: (1) não utilizaram a metformina no tratamento do HNSCC; e (2) associaram a metformina ao tratamento do HNSCC somente em estudos experimentais (*in vitro* ou *in vivo* – modelo animal) e ensaios clínicos (fase 1, 2, ou 3).

3.1.2 Fontes de informação e estratégia de busca

Os estudos considerados nos critérios de inclusão foram identificados utilizando uma estratégia de busca para cada base eletrônica bibliográfica de dados: Cochrane, EMBASE, MEDLINE, LILACS (Literatura Latino Americana em Ciências da Saúde) e PubMed. A lista de referência dos artigos selecionados foi verificada no final da pesquisa. As pesquisas foram realizadas nas bases de dados, com artigos publicados até 28 de junho de 2014. As referências em situação de duplicidade foram removidas manualmente.

3.1.3 Seleção dos estudos

Os artigos foram selecionados em 2 fases. Na fase 1, duas autoras (DFR e STE) selecionaram os estudos que satisfaziam os critérios de inclusão por meio da leitura somente dos títulos e resumos de todas as referências, de maneira independente. Na fase 2, as mesmas autoras selecionaram os artigos escolhidos na fase 1, por meio da leitura completa de todos os estudos. As divergências na primeira ou segunda fase foram resolvidas por meio de discussão e acordo mútuo entre as duas autoras. Caso ainda não houvesse consenso para a decisão, uma terceira autora (ENSG) foi consultada para o desempate e decisão final.

3.1.4 Processo de coleta de itens e dados

A primeira autora (DFR) coletou as informações necessárias dos artigos selecionados, tais como: autores, ano de publicação, país, objetivo principal, desenho do estudo, população de origem, ajustes, registro ou hospital, mediana de idade, amostras, grupos referenciados, variáveis de ajuste, resultados e principais conclusões. A segunda autora (STE) conferiu todas as informações recuperadas. Mais uma vez, as divergências foram resolvidas por discussão e acordo mútuo entre as duas autoras. A terceira autora (ENSG) tornou a ser consultada, quando necessário, para tomar a decisão final.

3.1.5 Risco de viés em estudos individuais

Os autores avaliaram metodologicamente todos os estudos selecionados de acordo com uma lista de verificação modificada com base na "Critical Appraisal Skills Program" (CASP, 2011). Duas revisoras (DFR e ENSG) responderam 12 questões que avaliaram o risco de viés dos estudos incluídos. No final, os artigos foram classificados como "alto", "baixo" ou "moderado", de acordo com a análise de cada estudo. As divergências entre as duas revisoras foram resolvidas por uma terceira revisora (STE).

3.1.6 Medidas de resumo

Nesta revisão, a avaliação dos resultados considerou algumas medidas e índices, tais como razões de risco, razão de chances (OR), diferenças de risco para

desfechos dicotômicos, diferenças médias ou diferenças médias padronizadas para resultados contínuos.

3.1.7 Síntese dos resultados

Foi planejada uma meta-análise caso os dados dos estudos incluídos fossem considerados homogêneos.

3.1.8 Risco de viés entre os estudos

A avaliação do risco de viés entre os estudos seria aplicada se fosse realizada uma meta-análise.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade citotóxica da metformina em linhagens de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: curva dose-resposta e cálculo do CI-50

Com o objetivo de averiguar qual a concentração ideal de metformina necessária para induzir toxicidade considerável, CI50 (igual ou maior que 50%) nas linhagens estudadas, foi feita uma curva dose-resposta. A partir desses resultados foi possível calcular a dose necessária para induzir 50% de citotoxicidade celular (CI50) nas linhagens neoplásicas HeLa, SCC-9, SCC-25 e FaDu e na linhagem utilizada como controle, HaCat. Na FaDu e SCC-9, a metformina apresentou curva de toxicidade crescente com curvatura maior e aparente nas maiores concentrações, o que sugere que sua ação é dose-dependente (Figuras 4 e 5). A CI50 na FaDu e SCC-9 no tempo de 72 horas foram de 99,18 e 197,5 mmol/L, respectivamente. Na HeLa, demonstrou-se que a curva de toxicidade crescente foi mais acentuada com ligeira formação de um platô a partir do oitavo ponto de concentração (Figura 6). A CI50 nessa linhagem nos tempos de 24, 48 e 72 horas foram 69,63; 57,19 e 44,57 mmol/L, respectivamente.

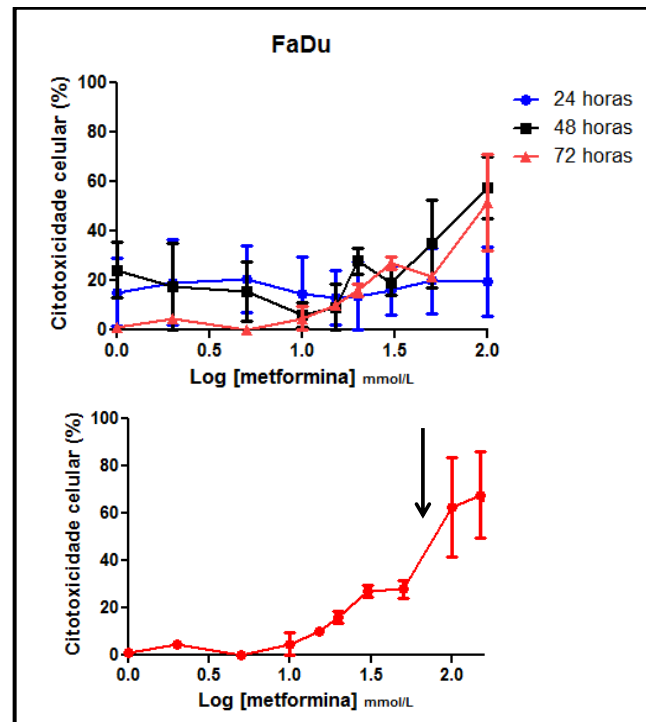


Figura 4. Representação gráfica da curva dose-resposta na linhagem FaDu em 24, 48 e 72 horas. A CI50 foi encontrada na concentração de 98,8 mmol/L, no tempo de 72 horas.

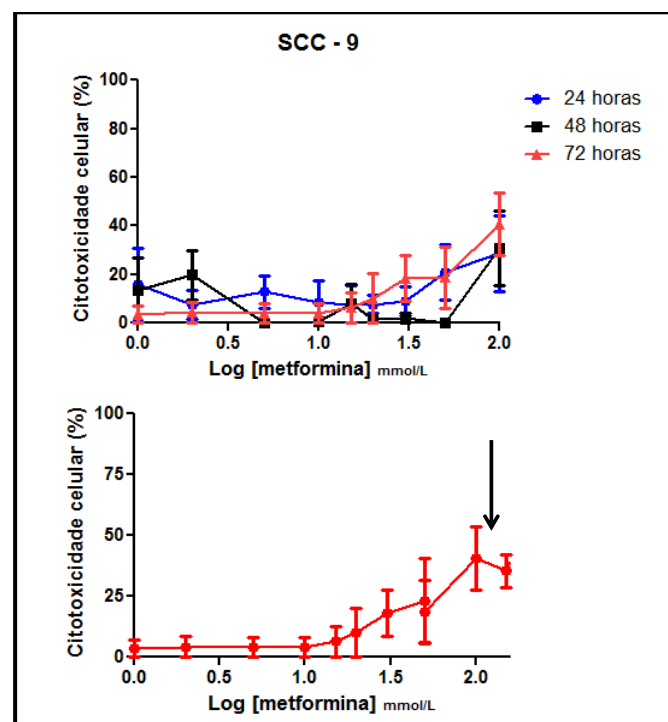


Figura 5. Representação gráfica da curva dose resposta em 24, 48 e 72 horas na linhagem SCC-9. A CI50 foi encontrada na concentração de 110 mmol/L, no tempo de 72 horas.

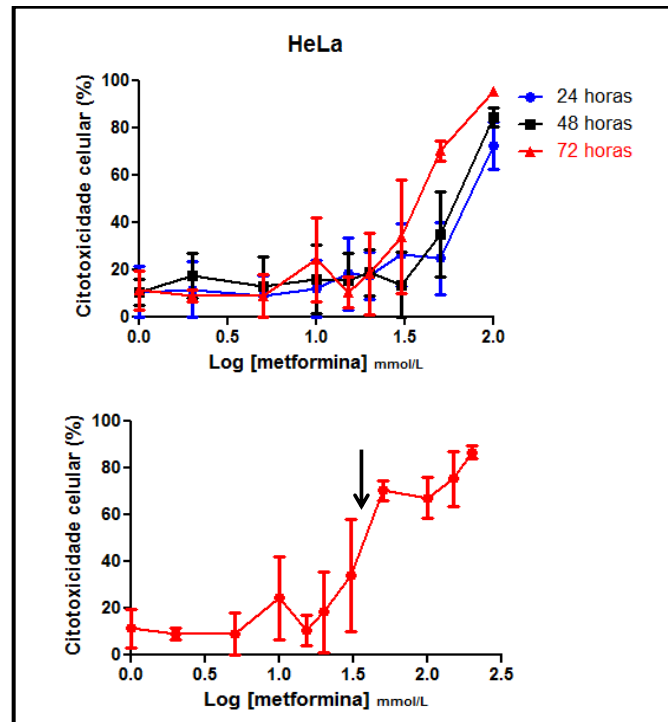


Figura 6. Representação gráfica da curva dose resposta em 24, 48 e 72 horas na linhagem HeLa. A CI50 foi encontrada na concentração de 82 mmol/L, no tempo de 72 horas.

Foi observado que a toxicidade celular, nessas três linhagens, foi maior no tempo de 72 horas, o que sugere que a metformina também pode ter uma ação tempo-dependente (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios das triplicatas da citotoxicidade nas linhagens FaDu, SCC-9 e HeLa.

Linhagem	Tempo		
	24h	48h	72h
FaDu	19,79	57,5	62,62
SCC-9	28,62	30,67	54,22
HeLa	72,51	84,53	91,31

Na linhagem SCC-25, foi obtido um comportamento anormal com curva de toxicidade ligeiramente crescente no tempo de 72 horas. A triplicata não apresentou reprodutibilidade o que justifica os grandes erros encontrados (Figura 7). Para essa linhagem, a CI50 encontrada no tempo de 72 horas foi de 173mmol/L.

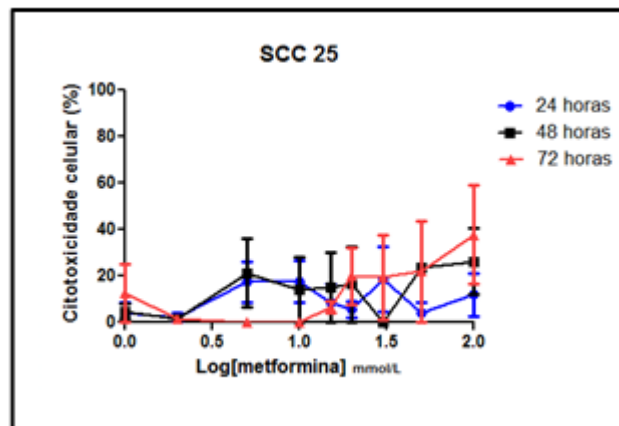


Figura 7. Curva dose-resposta nos tempo de 24, 48 e 72 horas na linhagem SCC-25.

A linhagem de queratinócito humano, HaCat, utilizada como controle positivo para esse teste demonstrou a formação de uma curva mais acentuada nas concentrações mais altas nos três tempo de tratamento. No tempo de 72 horas, sugere-se que houve maior toxicidade celular a partir do sétimo ponto da curva. O CI50 em 24, 48 e 72 horas foram, respectivamente, 366,7; 93,22 e 31,36 mmol/L.

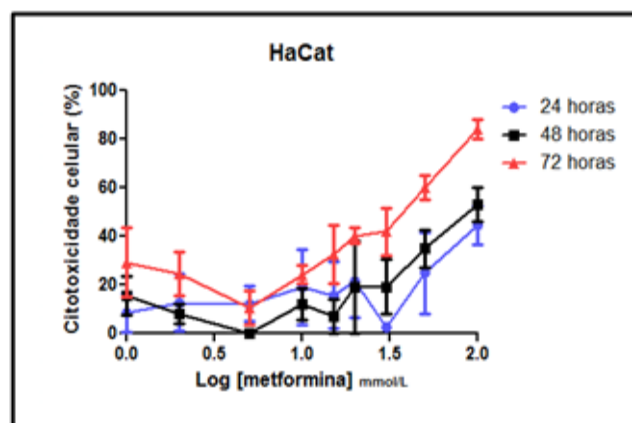


Figura 8. Curva dose-resposta na linhagem HaCat nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

4.2 Índice de seletividade tumoral

As concentrações inibitórias obtidas permitiram calcular o IST para o qual foi feita a razão entre o CI50 obtido para a célula controle (HaCat) e as células neoplásicas

FaDu, SCC-9, SCC-25 e HeLa (Horii *et al.*, 2012). Os valores obtidos estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. CI 50 e IST referentes às linhagens neoplásicas testadas, no tempo de 72 horas. O CI 50 da HaCat, utilizado para esse cálculo foi de 31,36 mmol/L, conforme já foi mencionado.

Linhagem celular	CI50	IST
Fadu	99,18mmol/L	0,31
HeLa	44,57mmol/L	0,70
SCC-9	197,5mmol/L	0,15
SCC-25	173mmol/L	0,15

Índice de seletividade igual a 1 significa que não há seletividade entre as linhagens estudadas, < que 1 que o tratamento é mais citotóxico para a linhagem de queratinócitos do que para a linhagem neoplásica e > que 1 que há seletividade para a linhagem tumoral estudada. Portanto, a metformina demonstrou ser mais citotóxica para os queratinócitos e não seletiva para as 4 linhagens estudadas, com destaque para a HeLa, que obteve o IST mais próximo de 1 em comparação com as outras linhagens analisadas.

4.3 Análise da interferência da metformina no ciclo celular na linhagem FaDu

Na figura 9A observa-se que na linhagem FaDu, no grupo controle, 55% dos eventos foram marcados na fase G0/G1, 27% na fase S e 3% na fase G2/M. Já as células tratadas com metformina, apresentaram-se com 53% na fase G0/G1, 26% na fase S e 4% na fase G2/M. Esse dado deixa claro que o tratamento com a

metformina não teve efeito evidente na paralisação do ciclo celular, revelando resultados semelhantes nas células tratadas e não tratadas.

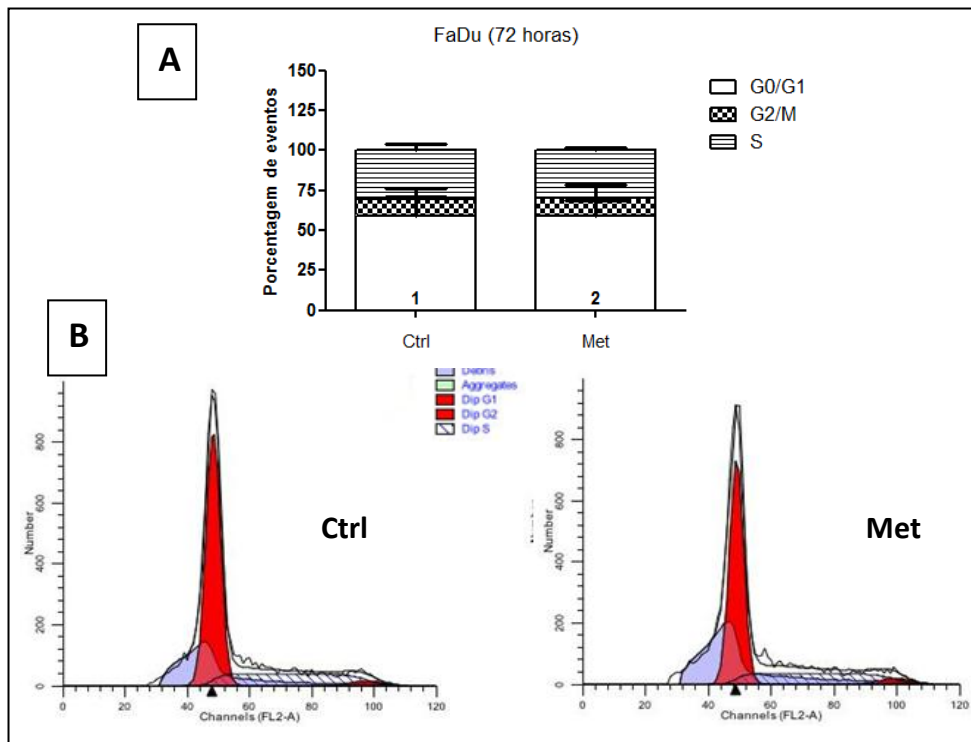


Figura 9: A - Distribuição dos eventos por fase do ciclo celular após 72 horas de tratamento com metformina. B- Distribuição dos eventos marcados no histograma: picos vermelhos representam respectivamente a fase G0/G1 e G2/M e pico tracejado a fase S.

4.4 Revisão Sistemática (Resultados)

4.4.1 Seleção dos estudos

Na fase de seleção dos estudos, fase 1, 313 artigos foram identificados através da busca nas cinco bases de dados. Após a remoção dos artigos duplicados, restaram apenas 262 artigos. A avaliação abrangente dos resumos foi concluída e 238 artigos foram excluídos. Dessa forma, apenas 24 artigos foram selecionados após a fase 1. Não houve estudos adicionais incluídos após a conferência das listas

de referência dos estudos identificados. Na fase 2, dos 24 artigos recuperados para conduzir uma revisão de texto completa, foram excluídos 21 (Tabela 3). No final, apenas três artigos (Sandulache *et al.*, 2013, Skinner *et al.*, 2012, Yen *et al.*, 2014) foram selecionados. Um fluxograma detalhado do processo de identificação, inclusão e exclusão dos artigos é demonstrado na Figura 10.

Tabela 3. Artigos excluídos.

Autor, ano	Razões de exclusão
Ansari <i>et al.</i> , 2013	1
Beadle <i>et al.</i> , 2012	2
Chaudhary <i>et al.</i> , 2012	1
Hahn <i>et al.</i> , 2014	3
Kuo <i>et al.</i> , 2012	2
Lee <i>et al.</i> , 2013	2
Lin <i>et al.</i> , 2014	3
Luo <i>et al.</i> , 2012	3
Ma <i>et al.</i> , 2012	3
Mackenzie <i>et al.</i> , 2010	3
Patel <i>et al.</i> , 2013	3
Sanaiha <i>et al.</i> , 2013	2
Sandulache <i>et al.</i> , 2012	3
Sandulache <i>et al.</i> , 2011	3
Seok <i>et al.</i> , 2013	2
Sikka <i>et al.</i> , 2012	3
Vitale-Cross <i>et al.</i> , 2012	3
Wang <i>et al.</i> , 2014	3
Woo <i>et al.</i> , 2014	2
Yeo <i>et al.</i> , 2014	2
Zhang <i>et al.</i> , 2014	2

1- Metformina não utilizada para tratamento do HNSCC (n=2), 2 - Revisões, cartas, opiniões pessoais, capítulos de livros e resumos de congressos (n = 8), e 3- Estudos do tipo experimentais (in vitro ou in vivo, em animais) e ensaios clínicos de associação de metformina com o tratamento de HNSCC (n = 11);

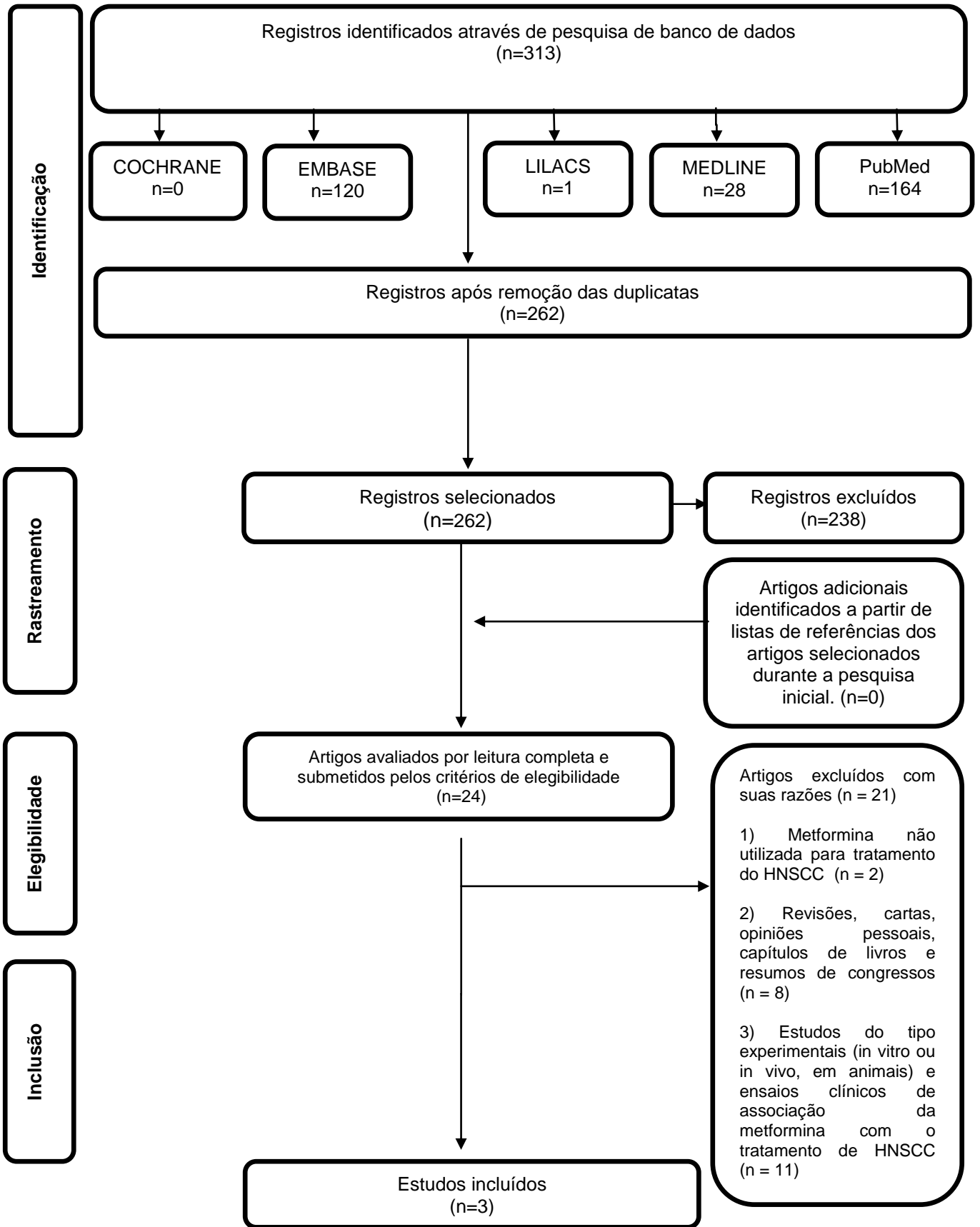


Figura 10. Fluxograma de seleção dos artigos.

4.4.2 Características dos estudos

Os estudos selecionados foram realizados em dois países diferentes: Estados Unidos da América (Sandulache *et al.*, 2013, Skinner *et al.*, 2012) e Taiwan (Yen *et al.*, 2014). Todos os três estudos foram publicados recentemente (1 artigo em 2012 e dois artigos em 2014) e escritos em Inglês. Todos os artigos selecionados foram estudos de coorte prospectivos e retrospectivos. Um resumo das características descritivas desses artigos é dado na Tabela 4.

Tabela 4. Resumo das características dos estudos clínicos selecionados.

Autor e ano	País	Objetivo principal	Desenho do estudo	População fonte	Idade em anos (Madiana)	Amostra		Grupo de referência	Variáveis ajustadas	Resultados	Conclusões
						Eventos /participantes	Controle (pacientes)				
Sandulache <i>et al.</i> , 2014	EUA	Determinar o impacto da metformina na sobrevida em pacientes com carcinoma de laringe	Coorte retrospectiva	Pacientes com diabetes em uso de metformina ou cuidados habituais no "Veterans Affairs Medical Center". Dois anos de acompanhamento.	63	21/43	162	Não-metformina ^a	Média de idade, raça, tabagista, etilista, estágio tumoral	Met ⁺ apresentam com uma maior percentagem de tumores precoces (T1; 48% Met ⁺ vs 27% Met ⁻) e menos metástases regionais (N0; 81% Met ⁺ vs 50% Met ⁻). Met ⁺ exibiu uma tendência de melhora da OS em comparação com não-diabéticos ([OR], 2,23; [IC], 0,9-5,6; p = 0,04)	Met ⁺ apresentaram uma melhor evolução clínica do CA de laringe em comparação com Met ⁻ ou não diabéticos.
Skinner <i>et al.</i> , 2012	EUA	Investigar o uso da metformina para HNSCC e identificar seu impacto (taxa LRR, taxa de OS, TP53 status)	Coorte prospectiva	Os pacientes foram avaliados a cada 2 a 3 meses um ano após o tratamento, a cada 3 a 4 meses no ano seguinte e, depois a cada 6 meses.	-	10/30	20	Não-metformina ^b (somente radiação)	Estágio tumoral, margem cirúrgica ou extensão extracapsular, local, sexo, tabagismo e TP53 status	Uso da metformina associada com a diminuição da LRR (p = 0,04), e melhora da OS (p = 0,01)	Os dados clínicos referentes a metformina revelam vantagens. Porém, apenas um pequeno número de pacientes foram tratados com o fármaco no momento da radiação.

Yen <i>et al.</i> , 2014	Taiwan	Identificar os potenciais efeitos inibitórios e preventivos do HNSCC em pacientes com diabetes	Coorte prospectiva	Pacientes com diabetes inscritos no Programa Nacional de Seguro de Saúde de Taiwan. Acompanhamento: 1996-2011.	< 40 =4,452 40-65 =18,321 >65 = 10,527	195/33,300	290	Não-metformina ^c	Sexo, idade, mediana de idade, comorbidades, distribuição geográfica, renda mensal, recorrência do HNSCC	Incidência do HNSCC, era de 0,64 vezes menor em Met + e o local mais prevalente foi a cavidade oral (53,6%). Met + pacientes > 65 tiveram importantes taxas de redução de risco de câncer (IRR = 0,53; p <0,01)	Pacientes com diabetes recém-diagnosticados e tratados com metformina teve incidência 0,66 vezes menor no desenvolvimento do HNSCC.
-----------------------------	--------	--	--------------------	--	--	------------	-----	-----------------------------	--	---	---

1

a Pacientes com diagnóstico de carcinoma de laringe foram verificados quanto ao impacto da metformina sobre a sobrevida livre de doença e sobrevida global.

b Grupo de pacientes com HNSCC, tratados com PORT e em uso de metformina.

c Grupos: pacientes em uso de metformina e outras terapias à base de insulina (não-metformina).

4.4.3 Risco de viés dos estudos

A qualidade metodológica dos três estudos incluídos é descrita na Tabela 5. Os estudos incluídos variaram de moderado a alto risco potencial de viés. Algumas fragilidades comuns foram identificadas, a saber: incapacidade de calcular ou ajustar o tamanho da amostra, falhas na identificação das variáveis de exposição e confusão entre os grupos teste e controle, insuficiência na demonstração das análises estatísticas. Os artigos selecionados não utilizaram o desenho de estudo de maior nível de evidência clínica disponível (ensaio clínico randomizado) para responder a pergunta clínica apresentada. No entanto, como eram estudos do tipo coortes prospectivos e retrospectivos, não se considera que haja um grande risco de viés, já que certas medidas de viés foram irrelevantes para estudos ou impossíveis de serem calculadas.

Tabela 5. Avaliação metodológica dos estudos selecionados com base em uma avaliação crítica CASP (modificado) para estudos de coorte.

	Skinner et al., 2012	Sandulache et al., 2014	Yen et al., 2014
1. O objeto do estudo está claramente definido?	NI	S	S
2. Os autores usam métodos adequados para responder às perguntas?	S	S	S
3. A coorte foi recrutada de uma forma aceitável?	NI	S	S
4. Para minimizar o risco de viés, a exposição foi delimitada com precisão?	NI	S	S
5. Para minimizar o risco de viés, o desfecho foi delimitado com precisão?	NI	S	S
6. A. Os autores identificaram todos os fatores de confusão importantes para a pesquisa?	N	NI	N
B. Os fatores de confusão foram considerados no desenho ou na análise do estudo?	S	S	S
7. A. O acompanhamento foi aceitável e completo?	S	S	S
B. O tempo de acompanhamento foi suficiente?	S	S	S
8. Os resultados estão claramente definidos no estudo?	S	S	S
9. Quão precisos são os resultados?	PP	P	P
10. Você acredita nos resultados?	S	S	S
11. Os resultados podem ser aplicados para a população local?	S	S	S
12. Será que os resultados deste estudo se encaixam com outras evidências disponíveis?	S	S	S
13. Risco potencial de viés	A	B	M

²

² Abreviação: S=Sim; N=Não; NI= Não informado; P=Preciso; NP=Não preciso; PP=Pouco preciso; B=Baixo; M=Moderado; A=Alto).

4.4.4 Síntese dos resultados

O estudo de Skinner e colaboradores (2012) encontrou uma diminuição significativa na taxa de recorrência locorregional e melhorou a sobrevida global em pacientes tratados com metformina em comparação com os controles ($p=0,04$ e $0,01$, respectivamente). A taxa de sobrevida global em 5 anos foi de 87% em pacientes tratados com metformina, em comparação com 41% no restante dos pacientes ($p = 0,04$).

O trabalho de Sandulache e colaboradores (2014) demonstrou que os pacientes que tomaram metformina apresentaram-se com uma maior porcentagem de tumores em estágio inicial (tumores T1: 48% dos pacientes que tomaram metformina vs. 27% dos doentes que não tomaram metformina) e menos metástase locorregional (N0: 81% dos pacientes que tomaram metformina vs. 50% dos doentes que não tomaram metformina). Do mesmo modo, 76% dos pacientes que fizeram uso desse medicamento sobreviveram, em comparação com 41% para os diabéticos não tratados com metformina e 51% dos não-diabéticos. Os pacientes que tomaram metformina tiveram uma taxa de sobrevida global significativamente maior em comparação com pacientes diabéticos que não tomavam metformina (OR = 3, 95%; intervalo de confiança [IC] = 1,04-8,4; $p = 0,04$). Foram encontradas associações significativas entre a sobrevida livre de doença e as localizações do tumor. Os pacientes que faziam uso de metformina mostraram tendências para a melhoria da sobrevida em comparação aos não diabéticos e diabéticos que não usavam metformina (OR = 1,77 e 1,99, respectivamente).

Yen e colaboradores (2014) demonstrou que a incidência de câncer de cabeça e pescoço era 0,64 vezes menor em pacientes que tomaram metformina em comparação com os que não fizeram uso ($p<0,01$). Verificou-se então que as taxas de incidência foram menores nos subgrupos de pacientes de câncer de cabeça e pescoço que fizeram uso da metformina: de 40 a 65 anos ou maior que 65 anos de idade em comparação com pacientes que não tomaram a metformina nas mesmas faixas etárias (taxa de incidência = 0,70 e 0,53, respectivamente; $p <0,01$ para ambos). No grupo de pacientes que

fizeram uso da metformina, a incidência de carcinoma de nasofaringe foi de 0,08% (relação ajustada de risco, “harzard ratio” = 0,50, 95% IC = 0,31-0,80) e a de orofaringe foi de 0,03%. A sobrevida livre de doença de pacientes com HNSCC foi significativamente maior no grupo dos que tomavam metformina em comparação com os que não faziam uso. Não houve diferença significativa na sobrevida global dos diabéticos que fizeram uso ou não da metformina.

4.4.5 Risco de viés entre os estudos

Os estudos selecionados utilizaram desenhos e métodos de análises semelhantes, o que reduziu a possibilidade de viés de interpretação. Os estudos selecionados para esta análise foram considerados relativamente homogêneos, entretanto não tiveram dados compatíveis que permitissem a realização de uma meta-análise.

5. DISCUSSÃO

O tratamento do HNSCC permanece sendo um grande desafio para a medicina. Os exatos mecanismos de carcinogênese ainda precisam de claras elucidações (Shah e Gil, 2009). A introdução da radiação ionizante, em razão da descoberta dos radioisótopos, trouxeram grandes ganhos para o tratamento não cirúrgico do HNSCC. Entretanto, na maioria dos pacientes em caso de carcinomas avançado, é escolhida a radioterapia após o tratamento cirúrgico. Os fármacos quimioterápicos para o carcinoma de boca eram considerados paliativos nas décadas de 50, 60 e 70. Por conseguinte, a introdução da cisplatina em estudos clínicos demonstrou boas respostas em um número significativo de pacientes (Endicott, *et al.*, 1987).

O estudo da metformina como terapia para o tratamento do carcinoma espinocelular é tido como um novo paradigma já que os potenciais efeitos clínicos desse medicamento são conhecidos (Vitale-Cross *et al.*, 2012). Em contrapartida, é mandatório que os protocolos de tratamento quimioterápico incorporem agentes farmacológicos em que sejam comprovadas sua eficácia, tolerabilidade, estabelecimento mínimo de segurança e mínima toxicidade para o paciente (Klass e Shin, 2007). A metformina é uma droga antiga que agora está ganhando cada vez mais a atenção dos estudiosos como um agente antineoplásico (Wurth *et al.*, 2014).

Os carcinomas de boca e de orofaringe têm a mesma origem embriológica epidermal, porém demonstram diferentes respostas no que tange aos diversos tratamentos submetidos (Belcher *et al.*, 2014). Algumas evidências clínicas apontam que o carcinoma de boca parece ser mais agressivo, e menos responsivo ao tratamento em comparação ao câncer de orofaringe. Notou-se que os experimentos realizados apontaram diferentes respostas entre as linhagens FaDu, SCC-9 e SCC-25. A linhagem derivada do tumor de orofaringe (FaDu), se mostrou mais sensível à metformina que as derivadas do tumor de língua (SCC-9 e SCC-25). Dessa forma, é possível inferir que a depender do sítio tumoral primário identificado no paciente, a resposta à metformina é diferente.

Um estudo publicado por Sandulache, em 2011, sugeriu que a inibição farmacológica da produção de glicose pode reduzir significativamente a proliferação e sobrevivência de HNSCC. A metformina tem efeitos na inibição da proliferação celular nesse carcinoma, inclusive em combinação com outros fármacos (Lin *et al.*, 2014, Sandulache *et al.*, 2012). Conforme os testes de viabilidade celular, a metformina foi citotóxica para todas as linhagens de células testadas, com resultados melhores para as linhagens FaDu, SCC-9 e HeLa. Luo e colaboradores (2012) comprovaram que o efeito desse fármaco nas linhagens de HNSCC pode ser destacado, principalmente, no tempo de 72 horas em concentrações mais elevadas, tanto nos testes de viabilidade celular quanto nos ensaios de formação de colônias de células.

Dessa forma, as linhagens aqui estudadas também obtiveram essa resposta, o que é possível inferir que a metformina pode ter um efeito dose e tempo-dependente. Zhao e colaboradores (2011), também comprovaram o efeito dose e tempo dependente da metformina em uma linhagem de carcinoma nasofaríngeo. Aproximadamente 83% da taxa de proliferação celular foi encontrada pelo teste de viabilidade celular em 24 horas e 55% no tempo de 72 horas, nesse caso em específico. Na linhagem FaDu, SCC-9 e HeLa, a citotoxicidade celular na CI50 no tempo de 72 horas foi de aproximadamente 58%, 43% e 62%, respectivamente. Os valores médios da citotoxicidade celular no teste de viabilidade celular apresentaram um aumento progressivo nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Em contrapartida com esses resultados, a metformina não apresentou uma ação seletiva nas linhagens analisadas. Isso significa que quanto maior a dose de metformina nas linhagens neoplásicas, mais tóxica ela é na linhagem de queratinócito humano, HaCat. Quanto mais próximo o IST de 1 mais seletivo é o fármaco para certa doença. A linhagem Fadu obteve IST no valor de 0,31, o mais alto de todas as linhagens estudadas de HNSCC, no tempo de 72 horas. A seletividade tumoral não é amplamente estudada no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço com o uso da metformina. Entretanto, um estudo publicado por Horii *et al.*, 2012, analisou a seletividade tumoral no HNSCC com

extrato de plantas. Esse tipo de análise é cada vez mais necessária e eminente no estudo para ao tratamento do HNSCC.

Alguns estudos já demonstraram que há consistentes mudanças na expressão do TSC 2 em linhagens celulares de HNSCC HPV⁺ (Molinolo *et al.*, 2012). Diferente do HNSCC, a linhagem Hela, de carcinoma cervical HPV-18 positiva, apresenta expressão da LKB1 diminuída (Corradetti *et al.*, 2004). Tal evidência pode sugerir as respostas distintas encontradas nessa linhagem celular, já que a expressão diminuída de LKB1 também ocasiona diminuição na ativação de AMPK, importante regulador da via AKT/mTOR (Molinolo *et al.*, 2012). A ação da metformina teria um efeito expressivo em LKB1, regulando todo o processo de progressão e metabolismo celular. Pode ser que haja uma regulação de AMPK por meio de outras vias, independente da ação da metformina em LKB1. A CI50 e o valor médio da citotoxicidade da Hela foi a menor dentre as linhagens neoplásicas, demonstrando assim que a metformina foi mais tóxica para essa célula, em comparação com as outras. Entretanto, o IST dessa linhagem foi o maior das linhagens neoplásicas. Dessa forma, um estudo que compare a ação da metformina tanto no HNSCC quanto no carcinoma cervical terá grande importância na descoberta das vias de sinalização AMPK/AKT/mTOR e na influência do vírus HPV nessa doença.

A análise da transição da fase G1 para S é de fundamental importância já que muitas alterações genéticas que levam a progressão do câncer provocam justamente a desregulação do ciclo nesta interface (Foster *et al.*, 2010). A fase G1 do ciclo celular é controlada por uma interação dinâmica entre as ciclinas D1 e E, CDKs (2, 4 e 6) e inibidores de CDK (Cip / Kip e a família INK4). Durante a transição da fase G1, os níveis de Kip1 / p27 diminuem a fim de permitir que o complexo ciclina/Cdks inicie a transcrição de genes necessários para progressão G1-S (Chu *et al.*, 2008). Tem sido relatado que a metformina tem ação na diminuição da expressão da CDKs e Ciclinas (Ben Sahra *et al.*, 2008)

Conforme demonstrado, nosso estudo não evidenciou regulação do ciclo celular causado pela metformina. Não houve diferença na porcentagem de

células na fase G0/G1 entre o controle e o tratamento. No entanto, um estudo publicado por Zhao *et al.*, em 2011, revelou que o tratamento com metformina em uma linhagem de carcinoma espinocelular de nasofaringe, resultou em uma parcial parada do ciclo celular na fase G1. Em outro estudo, a metformina impediu a progressão do ciclo celular. Na linha celular FaDu, todos os tratamentos causaram um aumento da população de células em fase G1 de maneira dose e tempo dependente (Sikka, *et al.*, 2012). Apesar de pesquisas incipientes, a metformina se configura como um potencial fármaco capaz de inibir a proliferação celular e paralisar o ciclo celular.

Na revisão sistemática realizada, foram investigados os efeitos e potencial associação de metformina com o HNSCC. Vários estudos têm fornecido dados sobre esta relação, mas na maioria deles os estudos foram experimentais *in vitro* ou em animais (Luo *et al.*, 2012, e Vitale-Cross *et al.*, 2012). Foram encontrados apenas três estudos de coorte para inclusão nesta revisão, e todos eles apoiaram uma associação entre a metformina e a melhora de prognóstico e diminuição do risco de HNSCC (Sandulache *et al.*, 2013, Skinner *et al.*, 2012, Yen *et al.*, 2014). Estes estudos demonstraram os efeitos da metformina sobre o tratamento do câncer de cabeça e pescoço. A principal análise mostrou que os indivíduos que fizeram uso de metformina diminuíram as taxas de recorrência locorregional e metástase cervical. As taxas de sobrevivência de sobrevida global e livre de doença melhoraram em comparação com indivíduos que não usam metformina (grupo controle). Observou-se ainda que a incidência de HNSCC foi menor em indivíduos que tomam metformina em comparação com aqueles que não fazem uso.

Foram identificados 11 artigos com estudos experimentais *in vitro* e em estudos em animais que analisaram os efeitos da metformina em HNSCC (Patel *et al.*, 2013, Skinner *et al.*, 2012, Luo *et al.*, 2012, Vitale-Cross *et al.*, 2012, Hanh *et al.*, 2014, Lin *et al.*, 2014, Ma *et al.*, 2012, Sandulache *et al.*, 2012, Sandulache *et al.*, 2011, Sikka *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2014). Vitale-Cross e colaboradores demonstraram que a metformina reduziu o crescimento de células de HNSCC e diminuiu a sua atividade de mTORC1 por ambos os mecanismos: dependentes de AMPK e independente de AMPK. Também

demonstraram que a metformina inibe o mTORC1, o que resultou na diminuição da proliferação celular em lesões orais potencialmente malignas. Sandulache e colaboradores, (2012), demonstraram que a inibição da respiração celular pela metformina aumentou a dependência glicolítica em células que expressam o tipo selvagem TP53 havendo um efeito potencial de inibição glicolítica sobre a toxicidade de radiação. Estes dois trabalhos mostraram os potenciais benefícios clínicos da metformina usando como agente alvo quimiopreventivo e quimioterápico no controle do desenvolvimento e tratamento para HNSCC.

Essa é a primeira revisão sistemática dos efeitos da metformina sobre o tratamento do HNSCC, apresentando evidências de uma associação entre a diminuição do risco de HNSCC e uso de metformina. Embora Decensi e colaboradores (2010) tivessem realizado uma revisão sistemática e meta-análise de metformina e risco de câncer em pacientes diabéticos, não foram analisados pacientes com HNSCC.

Algumas limitações metodológicas nessa revisão sistemática devem ser consideradas. Em primeiro lugar, apenas 3 artigos preencheram os critérios de inclusão, talvez porque o tema desta revisão seja recente (2012 e 2014). De 313 citações identificadas, apenas 3 estudos preencheram os critérios de inclusão e foram utilizados na análise qualitativa.

Os resultados apresentados neste trabalho e outros observados na literatura confirmam que o uso da metformina para tratamento do HNSCC pode ser uma possível alternativa clínica em potencial. Além das evidências clínicas demonstradas na revisão sistemática, pode-se destacar o potencial efeito antineoplásico da metformina contra HNSCC. A especificidade da ação desse fármaco em células de carcinoma oral e a paralisação da fase G1 do ciclo celular, segundo a literatura, pode ter um grande significado no seu potencial clínico, porém mais estudos para investigação dessas variáveis após esse estudo são necessários. Posteriormente, a análise das alterações das proteínas envolvidas no processo de progressão celular, da apoptose e da via PI3K/AKT/mTOR são indispensáveis.

6. CONCLUSÃO

Frente aos objetivos propostos podemos concluir que:

- 1- A metformina foi citotóxica para as linhagens estudadas, com destaque para FaDu, SCC-9 e HeLa;
- 2- A concentração de metformina necessária para inibir 50% das células neoplásicas foi mais citotóxica ao tratamento com 72 horas e nas concentrações mais elevadas, sugerindo que a metformina tem um efeito citotóxico tempo e dose-dependente;
- 3- A metformina não apresentou uma ação seletiva nas linhagens de carcinoma analisadas, significando que o medicamento foi mais tóxico para a linhagem de queratinócito que as linhagens neoplásicas;
- 4- Não se observou interferência da metformina no ciclo celular das linhagens de células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço;
- 5- A revisão sistemática realizada mostrou associação entre a diminuição do risco de HNSCC e uso de metformina. Embora existam poucos estudos, a metformina parece melhorar a sobrevida global dos pacientes com HNSCC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Anisimov VN, Berstein LM, Egormin PA, Piskunova TS, Popovich IG, Zabezhinski MA, Kovalenko IG, Poroshina TE, Semenchenko AV, Provinciali M, Re F, Franceschi C. Effect of metformin on life span and on the development of spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice. *Exp Gerontol* 2005;40:685–693.

Ansari M, Guo S, Fakhri S, Citardi MJ, Blanco A, Patino M, Buryanek J, Amato R, Karni R, Brown RE. Sinonasal undifferentiated carcinoma (SNUC): morphoproteomic-guided treatment paradigm with clinical efficacy. *Ann Clin Lab Sci*. 2013;43:45-53.

Bao B, Wang Z, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, Banerjee S, Kong D, Li Y, Thakur S, Sarkar FH. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res* 2012, 5:355–364.

Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol* 2014;110:551-74.

Beadle BM, Skinner HD, Morrison WH, Rosenthal DI, Gunn G, Frank SJ, Ang K, William WN, Myers JN, Garden AS. Impact of Metformin on Outcomes in Patients With Oropharynx Cancer Treated With IMRT. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2012;84:S469.

Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene* 2008;27:3576–3586.

Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auberger P, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S, Bost F. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res* 2011;71:4366–72.

Bhola NE, Grandis JR. Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer. *Front Biosci* 2008;13,1857–1865.

Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2005;6; 32–43.

Brasil, 2014. www.inca.gov.br/estimativa/2014. Acessado em 05 de novembro de 2014 às 21:02h.

Bulcão C, Ribeiro-Filho FF, Sañudo A, Roberta Ferreira SG. Effects of simvastatin and metformin on inflammation and insulin resistance in individuals with mild metabolic syndrome. *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; 7:219 –224.

Campbell IW, Ritz P. Understanding the glucose-lowering actions of metformin. In: Bailey CJ, Campbell IW, Chan JCN, Davidson JA, Howlett HCS, Ritz P, editors. *Metformin the Gold Standard*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2007, p.77– 88.

Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, Elliott PJ, Puigserver P, Auwerx J. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009; 458:1056-60.

Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF. The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:187-98.

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008;1;26:612-9.

Chaudhary SC, Kurundkar D, Elmets CA, Kopelovich L, Athar M. Metformin, an antidiabetic agent reduces growth of cutaneous squamous cell carcinoma by targeting mTOR signaling pathway. *Photochem Photobiol* 2012;88:1149-56.

Chu IM, Hengst L, Slingerland JM. The Cdk inhibitor p27 in human cancer: prognostic potential and relevance to anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:253-67.

Clark C, Shah S, Herman-Ferdinandez L, Ekshyyan O, Abreo F, Rong X, McLarty J, Lurie A, Milligan EJ, Nathan CO. Teasing out the best molecular marker in the AKT/mTOR pathway in head and neck squamous cell cancer patients. *Laryngoscope* 2010;120:1159-65.

Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, Gay EG, Langer CJ. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck* 2009;31:748–58.

Corradetti MN, Inoki K, Bardeesy N, DePinho RA, Guan KL. Regulation of the TSC pathway by LKB1: evidence of a molecular link between tuberous sclerosis complex and Peutz-Jeghers syndrome. *Genes Dev* 2004;18:1533–8.

Critical Appraisal Skills Programme (CASP). Making sense of evidence about clinical effectiveness: 12 questions to help you make sense of cohort study. (http://www.casp-uk.net/wp-content/uploads/2011/11/CASP_Cohort_Appraisal_Checklist_4oct14.pdf). Acessado em 4 de outubro de 2014).

Currie CJ, Poole CD, Jenkins-Jones S, Gale EA, Johnson JA, Morgan CL. Mortality after incident cancer in people with and without type 2 diabetes: impact of metformin on survival. *Diabetes Care* 2012; 35: 299–304.

DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 2008;7:11–20.

Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res* 2010;3:1451-61.

Detaille D, Guigas B, Leverve X, Wiernsperger N, Devos P. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem Pharmacol* 2002;63:1259–1272.

Dorsam R, Gutkind S. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Canc* 2007; 7:79–94.

Dowling RJ, Zakikhani M, Fantus IG, Pollak M, Sonenberg N. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67:10804–12.

Endicott N, Jensen R, Lyman G, et al. Adjuvant chemotherapy for advanced head and neck squamous carcinoma. *Cancer* 1987;60:301–11.

Fidan E, Onder Ersoz H, Yilmaz M, Kocak M, Karahan C, Erem C. The effects of rosiglitazone and metformin on inflammation and endothelial dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2011;48: 297–302.

Fischer OM, Hart S, Gschwind A, Ullrich A. EGFR signal transactivation in cancer cells. *Biochem Soc Trans* 2003; 31, 1203–1208.

Foster DA, Yellen P, Xu L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes Cancer* 2010;1:1124-31.

Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GF, Pellegrini F, Nicolucci A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS One* 2013;8:e71583.

Gillison ML, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra WH, Trotti A, Spencer S, Harris J, Chung CH, Ang KK. Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2012;30:2102–2111.

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;33:1674-85.

Goodwin PJ, Pritchard KI, Ennis M, Clemons M, Graham M, Fantus IG. Insulin lowering effects of metformin in women with early breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2008; 8: 501–505.

Goodwin PJ, Stambolic V, Lemieux J, Chen BE, Parulekar WR, Gelmon KA, Hershman DL, Hobday TJ, Ligibel JA, Mayer IA, Pritchard KI, Whelan TJ, Rastogi P, Shepherd LE. Evaluation of metformin in early breast cancer: a modification of the traditional paradigm for clinical testing of anti-cancer agents. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126: 215–220.

Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Tweardy DJ. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head

and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:824–32.

Hahn SS, Tang Q, Zheng F, Zhao S, Wu J, Chen J. Repression of integrin-linked kinase by antidiabetes drugs through cross-talk of PPAR γ - and AMPK α -dependent signaling: role of AP-2 α and Sp1. *Cell Signal* 2014;26:639-647.

Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 774–785.

Hart S, Fischer OM, Prenzel N, Zwick-Wallasch E, Schneider M, Hennighausen L, Ullrich A. GPCR-induced migration of breast carcinoma cells depends on both EGFR signal transactivation and EGFR-independent pathways. *Biol. Chem* 2005;386:845–855.

He X, Esteva F, Ensor J, Hortobagyi G, Lee MH, Yeung SC. Metformin and thiazolidinediones are associated with improved breast cancer-specific survival of diabetic women with HER2+ breast cancer. *Ann Oncol* 2012;23:1771–1780.

He X-X, Tu SM, Lee MH, Yeung SC. Thiazolidinediones and metformin associated with improved survival of diabetic prostate cancer patients. *Ann Oncol* 2011;22:2640–2645.

Horii H, Suzuki R, Sakagami H, Umemura N, Ueda JY, Shirataki Y. Induction of nonapoptotic cell death in human oral squamous cell carcinoma cell lines by *Rhinacanthus nasutus* extract. *In Vivo* 2012;26:305-9.

Janjetovic K, Harhaji-Trajkovic L, Misirkic-Marjanovic M, Vucicevic L, Stevanovic D, Zogovic N, Sumarac-Dumanovic M, Micic D, Trajkovic V. In vitro and in vivo anti-melanoma action of metformin. *Eur J Pharmacol* 2011; 668:373–382.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2009;59:225-249.

Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé 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: 390–401.

Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, Nomura K, Mimura S, Kobayashi M, Aritomo Y. The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 2012, 11:549–560.

Klass CM, Shin DM. Current status and future perspectives of chemoprevention in head and neck cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2007;7:623–32.

Klubo-Gwiedzinska J, Jensen K, Costello J, Patel A, Hoperia V, Bauer A, Burman K, Wartofsky L, Vasko V. Metformin inhibits growth and decreases resistance to anoikis in medullary thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2012, 19:447–456.

Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM; Diabetes Prevention Program Research Group. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393–403.

Kuhajda FP. AMP-activated protein kinase and human cancer: cancer metabolism revisited. *Int J Obes* 2008; 32:36-41.

Kundu SK, Nestor M. Targeted therapy in head and neck cancer. *Tumour Biol* 2012;33:707-21.

Kuo SZ, Honda TK, Abhold EL, Wang-Rodriguez J, Altuna X, Ongkeko WM. Metformin protects head and neck cancer stem cells against DNA damage induced apoptosis. *Cancer Res* 2012;72: 3378.

Lappano R, Maggiolini M.G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:47-60.

Lee, DeWees T, Dyk P, Gay H, Thorstad W. Outcomes of Diabetic Metformin Versus Nonmetformin Users With Oropharynx Carcinoma Treated With IMRT. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2013;87;S434.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:9-22.

Lin YC, Wu MH, Wei TT, Lin YC, Huang WC, Huang LY, Lin YT, Chen CC. Metformin sensitizes anticancer effect of dasatinib in head and neck squamous cell carcinoma cells through AMPK-dependent ER stress. *Oncotarget* 2014;5:298-308.

Luo Q, Hu D, Hu S, Yan M, Sun Z, Chen F. In vitro and in vivo anti-tumor effect of metformin as a novel therapeutic agent in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 2012;12:517.

Ma L, Niknejad N, Gorn-Hondermann I, Dayekh K, Dimitroulakos J. Lovastatin induces multiple stress pathways including LKB1/AMPK activation that regulate its cytotoxic effects in squamous cell carcinoma cells. *PLoS One* 2012;7:e46055.

Mackenzie MJ, Ernst S, Johnson C, Winkist E. A phase I study of temsirolimus and metformin in advanced solid tumours. *Invest New Drugs* 2012;30:647-52.

Martelli AM, Chiarini F, Evangelisti C, Grimaldi C, Ognibene A, Manzoli L, Billi AM, McCubrey JA. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin signaling network and the control of normal myelopoiesis. *Histol Histopathol* 2010;25:669-80.

Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement *Open Med*. 2009;3:e123-30.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 2009;45:324–34.

Molinolo AA, Marsh C, El Dinali M, Gangane N, Jennison K, Hewitt S, Patel V, Seiwert TY, Gutkind JS. mTOR as a molecular target in HPV-associated oral and cervical squamous carcinomas. *Clin Cancer Res* 2012;18:2558-68.

Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Noda M. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2012;7:e33411.

Patel H, Younis RH, Ord RA, Basile JR, Schneider A. Differential expression of organic cation transporter OCT-3 in oral premalignant and malignant lesions: potential implications in the antineoplastic effects of metformin. *J Oral Pathol Med* 2013;42:250-6.

Petti S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol* 2009; 45:340–350.

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

Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 915–928.

Pollak M. Metformin and other biguanides in oncology: advancing the research agenda. *Cancer Prev Res* 2010;3:1060–5.

Rattan R, Graham RP, Maguire JL, Giri S, Shridhar V. Metformin suppresses ovarian cancer growth and metastasis with enhancement of cisplatin cytotoxicity in vivo. *Neoplasia* 2011;13:483–491.

Sanaiha Y, Thompson C, Elashoff D, Kim B, Wang M, John M. Metformin use and recurrence in patients with oral cavity/oropharynx squamous cell carcinoma. *The FASEB Journal* 2014; 28.

Sandulache VC, Ow TJ, Pickering CR, Frederick MJ, Zhou G, Fokt I, Davis-Malesevich M, Priebe W, Myers JN. Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer* 2011;117:2926-38.

Sandulache VC, Skinner HD, Ow TJ, Zhang A, Xia X, Luchak JM, Wong LJ, Pickering CR, Zhou G, Myers JN. Individualizing antimetabolic treatment strategies for head and neck squamous cell carcinoma based on TP53 mutational status. *Cancer* 2012;118:711-721.

Sandulache VC, Hamblin JS, Skinner HD, Kubik MW, Myers JN, Zevallos JP. Association between metformin use and improved survival in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Head and Neck* 2013;36:1039-43.

Sengupta S, Peterson TR, Laplante M, Oh S, Sabatini DM. mTORC1 controls fasting-induced ketogenesis and its modulation by ageing. *Nature* 2010;468:1100–4.

Seok J, Kim H, Lee WY, Choi HG, Kim DW, Rah YC, et al. Analysis of the effect of metformin in the treatment of oral and oropharyngeal cancer: Retrospective study. *Oral Oncology* 2013;49:S111.

Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer-surgery. *Oral Oncol* 2009;45:394-401.

Shaw RJ. LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth. *Acta Physiol* 2009;196:65-80.

Sikka A, Kaur M, Agarwal C, Deep G, Agarwal R. Metformin suppresses growth of human head and neck squamous cell carcinoma via global inhibition of protein translation. *Cell Cycle* 2012;11:1374-82.

Skinner HD, Sandulache VC, Ow TJ, Meyn RE, Yordy JS, Beadle BM, Fitzgerald AL, Giri U, Ang KK, Myers JN. TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clin Cancer Res* 2012;18:290-300.

Tan BK, Adya R, Chen J, Lehnert H, Sant Cassia LJ, Randeve HS. Metformin treatment exerts antiinvasive and antimetastatic effects in human endometrial carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2011, 96:808–816.

Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, Okpokam A, Sloan P, Odell E, Robinson M. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol* 2011;64:308-12.

Thomas SM, Bholra NE, Zhang Q, Contrucci SC, Wentzel AL, Freilino ML, Gooding WE, Siegfried JM, Chan DC, Grandis JR. Cross-talk between G protein coupled receptor and epidermal growth factor receptor signaling pathways contributes to growth and invasion of head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66: 11831–11839.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009; 324:1029–1033.

Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin and energy metabolism in breast cancer: from insulin physiology to tumour-initiating stem cells. *Curr Mol Med* 2010; 10: 674–691.

Vitale-Cross L, Molinolo AA, Martin D, Younis RH, Maruyama T, Patel V, Chen W, Schneider A, Gutkind JS. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res* 2012;5:562-73.

Wang F, Xu J, Xia F, Liu Z, Zhao S, Liu H, Zhao S, Liu H, Jiang Z.. Effects of metformin on human oral cancer KB cell proliferation and apoptosis in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2014;34:159-63.

Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 123:309–314.

Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J* 2009;207:471-5.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309-16.

Woo SH, Sandulache VC, Yang L, Skinner HD. Evaluating response to metformin/cisplatin combination in cancer cells via metabolic measurement and clonogenic survival. *Methods Mol Biol* 2014;1165:11-8.

Wurth R, Barbieri F, Florio T. New molecules and old drugs as emerging approaches to selectively target human glioblastoma cancer stem cells. *Biomed Res Int* 2014;2014:126586.

Yen YC, Lin C, Lin SW, Lin YS, Weng SF. Effect of metformin on the incidence of head and neck cancer in diabetics. *Head Neck*. 2014 May 7.

Yeo JEJP, Kyungmin K, Hyung-Jun J, Kwang-Jae C, Min-Sik K. Metformin with radiotherapy enforces growth retardation of head and neck squamous cell carcinoma. *The FASEB Journal* 2014;28;S655.9.

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;18:1248-55.

Zakikhani M, Dowling R, Fantus IG, Sonenberg N, Pollak M. Metformin is an AMP kinase-dependent growth inhibitor for breast cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66:10269–10273.

Zhang M, Li X, Lu X. Metformin inhibits the proliferation of hypopharyngeal carcinoma Fadu cells and enhances the chemotherapeutic sensitivity of cells. *Zhonghua Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi* 2014;49:317-22.

Zhao L, Wen ZH, Jia CH, Li M, Luo SQ, Bai XC. Metformin induces G1 cell cycle arrest and inhibits cell proliferation in nasopharyngeal carcinoma cells. *Anat Rec* 2011;294:1337-43.

Zhuang Y, Miskimins WK. Metformin induces both caspase-dependent and poly (ADP-ribose) polymerase-dependent cell death in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2011, 9:603–615.

Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011; 12:21–35.

**APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO SISTEMÁTICA “Effects of metformin
on head and neck cancer: A systematic review”**

Effects of metformin on head and neck cancer: A systematic review

Running Title: Effects of metformin on HNSCC: A systematic review

Authors:

Daniela Fortunato Rêgo, DDS¹; dani.se.ela@gmail.com

Ludmila Madeira Cardoso Pavan, DDS¹; - ludmadeira@hotmail.com

Silvia Taveira Elias, DDS, MSc¹; silvinhaelias@hotmail.com

Graziela De Luca Canto, DDS, MSc, PhD²; delucacanto@gmail.com

Eliete Neves Silva Guerra, DDS, MSc, PhD^{1*}; elieteneves@unb.br

Affiliation:

¹Oral Histopathology Laboratory, Health Sciences Faculty, University of Brasília, Brasília, Brazil.

²Department of Dentistry, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, Brazil, and Department of Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Canada.

*Corresponding author: Eliete Neves Silva Guerra

Address: SQN 205, Bloco H, apto 201, Asa Norte, Brasília, DF, Brazil. Zip Code: 70.843-080

Tel.: +55-61-96684988.

E-mail address: elieteneves@unb.br

Conflict of interest statement

None declared.

Abstract

Conventional therapeutic approaches for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) are associated with many adverse effects that reduce quality of life. Therefore, identification of new less cytotoxic treatments is highly important. Metformin, which is commonly used for type 2 diabetes, may reduce cancer risk. A few clinical studies have examined the association between HNSCC and metformin. Therefore, the aim of this systematic review was to synthesize the available literature of the potential effect of metformin on HNSCC. This study followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses checklist. Studies were gathered by searching PubMed, MEDLINE, EMBASE, LILACS, and the Cochrane database before June 28, 2014, with no time or language restrictions. Studies that evaluated individuals of any age that underwent metformin and had HNSCC and compared with patients without treatment or patients that use other kind of treatment for HNSCC (drugs or radiotherapy) were considered. Selected articles were evaluated according to the Critical Appraisal Skills Programs. Of 313 identified citations, 3 studies met the inclusion criteria and were used for qualitative analysis. These studies demonstrated that individuals taking metformin had decreased rates of locoregional recurrence and metastasis and improved overall survival and disease-free survival rates. Individuals taking metformin had a lower incidence of HNSCC than those not taking metformin. Though there are only a few studies on the topic, currently available evidence suggests an association between HNSCC and metformin use. Metformin reportedly improves the overall survival of HNSCC patients.

Keywords: Evidence-based medicine; Head and neck; Metformin; Squamous cell carcinoma; Systematic review

Introduction

Metformin (1,1-dimethylbiguanide hydrochloride) is a biguanide derived from the French lilac (*Galega officinalis*). Several centuries ago, it was discovered that French lilac reduces the symptoms of diabetes mellitus [1]. Approximately 120 million people use metformin worldwide [2] and its cost low [3]. It is indicated for treatment of type 2 diabetes, metformin is also used for polycystic ovarian syndrome, metabolic syndrome, and diabetes prevention [4,5]. The use metformin in diabetic patients has been associated with significantly lower risks of cancer incidence and mortality [6,7,8]. The most evident reported side effects are nausea and diarrhea [9].

Results from epidemiologic surveys confirm that metformin has significant effects on tumorigenesis [10,11]. The antineoplastic activity of metformin depends on the metabolic characteristics of patients and the molecular pathology of tumors. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) is the main mediator of the anticancer effects of metformin, though other mechanisms have also been described. Activation of AMPK has been proposed as the main direct mechanism by which metformin inhibits tumor growth. This enzyme influences cellular energy homeostasis, acting as a metabolic master switch that regulates several intracellular systems [12,13,14].

Oral and pharyngeal cancer, grouped together, are the sixth most common type of cancer in the world [15]. Moreover, the concept of using metformin as a chemopreventive agent to control head and neck carcinogenesis is promising [16,17,18]. Therefore, the aim of this systematic review was to synthesize the available literature of the potential effect of metformin on HNSCC.

Materials and Methods

This systematic review was conducted following as closely as possible the PRISMA checklist [19]. We did not register a protocol.

Eligibility criteria

We selected articles that dealt primarily with the effect of metformin on HNSCC located in the lip and/or oral cavity, pharynx, larynx, nasal cavity, or paranasal sinuses [20]. Studies that evaluated individuals of any age that underwent metformin and had HNSCC and compared with patients without treatment or patients that use other kind of treatment for HNSCC (drugs or radiotherapy) were considered. The study design included randomized or non-randomized clinical trials, cohort studies, and case-control studies.

Studies were excluded for the following reasons: (1) different target conditions, such as metformin was not used as a coadjuvante in cancer treatment; (2) reviews, letters, personal opinions, book chapters, and conference abstracts; and (3) associations between metformin and HNSCC treatment in experimental studies (*in vitro* or *in vivo* animal studies) and clinical trials (phase 1, 2, or 3).

Information sources and search strategy

Studies to be considered for inclusion were identified using a search strategy for each electronic bibliographic database: the Cochrane Library, EMBASE, MEDLINE, LILACS (Literatura Latino Americana em Ciências da Saúde), and PubMed (Appendix 1). The reference list will be checked at the end of search. We conducted all searches across all databases from the beginning dates through June 28, 2014. We managed the references manually and removed duplicate hits.

Study selection

We selected articles for inclusion in 2 phases. In phase 1, 2 authors (D.F.R. and S.T.E.) independently reviewed the titles and abstracts of all the references. These authors selected articles that appeared to meet the inclusion criteria based on their abstracts. In phase 2, 2 authors (D.F.R. and S.T.E.) read the full text of all selected articles and excluded studies that did not meet the inclusion criteria. The same 2 authors independently reviewed all full text articles. Any disagreements in the first or second phases were resolved by discussion and mutual agreement between the 2 authors. If the 2 authors could not reach a consensus, a third author (E.N.S.G.) was involved to make a final decision.

Data collection process and items

One author (D.F.R.) collected the required information from the selected articles: authors, year of publication, country, main objective, study design, source population, setting, register or hospital, median age, samples, referenced group, adjusting variables, results and main conclusions. A second author (S.T.E.) crosschecked all the retrieved information. Again, any disagreements were resolved by discussion and mutual agreement between the 2 authors. The third author (E.N.S.G.) became involved, when required, to make a final decision.

Risk of bias in individual studies

The authors methodologically appraised all of the selected studies according to a modified check list based on the Critical Appraisal Skills Programs (CASP)[21]. No attempt was made to validate the selected criteria. Two reviewers (D.F.R and E.N.S.G.) answered 12 questions that were able to assess the quality of the included studies. In the end, the articles were categorized as “high,” “low,” or “moderate” according to the

analysis of each study. Disagreements between the 2 reviewers were resolved by a third reviewer (S.T.E).

Summary measures

Any outcome measurements were considered in this review (risk ratios, odds ratios [OR], or risk differences for dichotomous outcomes; mean differences or standardized mean differences for continuous outcomes).

Synthesis of results

A meta-analysis was planned since the data from the included studies was considered relatively homogeneous.

Risk of bias across studies

Only to be applied if meta-analysis was possible.

Results

Study selection

In phase 1 of study selection, 313 citations were identified across the five electronic databases. After the duplicate articles were removed, only 262 citations remained. Comprehensive evaluation of the abstracts was completed and 238 articles were excluded, so 24 articles remained after phase 1. No additional studies from the reference lists of the identified studies. From the 24 articles retrieved to conduct a full text review. This process led to exclusion of 21 studies (Appendix 2). In the end, only 3 articles [8,22,23] were selected. A flow chart detailing the process of identification, inclusion, and exclusion of studies is shown in Figure 1.

Study characteristics

The studies were conducted in 2 different countries: the United States of America [8, 22] and Taiwan [23]. All 3 studies were published recently (1 article in 2012 and 2 articles in 2014) and were written in English. All selected articles were prospective cohort studies. A summary of descriptive characteristics for the studies is given in Table 1.

Risk of bias within studies

The reported methodological quality of the 3 included studies is outlined in Table 2. Included studies ranged from moderate to high risk of potential bias. Common weaknesses identified were: failure to calculate or justify sample sizes, failure to identify and account for exposure variability between control and test groups, failure to identify and account for all confounding variables, insufficient statistical reporting and analysis. The selected studies did not the best level of evidence available to answer the clinical question presented in this systematic review, however, as they were retrospective cohorts in design, there is inherently a large risk of bias as certain measures of potential bias were irrelevant to the studies or impossible to fulfill. (Table 2)

Synthesis of results

A study by Skinner et al., published in 2012[22], found a significantly decreased locoregional recurrence rate and improved overall survival in patients treated with metformin compared to controls ($p = 0.04$ and 0.01 , respectively). The 5-year overall survival rate was 87% in patients treated with metformin, compared to 41% in the remaining patients ($p = 0.04$).

A study by Sandulache et al., published in 2014[8], found that patients taking metformin presented with a greater percentage of early stage tumors (T1 tumors: 48%

of patients taking metformin vs. 27% of patients not taking metformin) and less metastasis (N0: 81% of patients taking metformin vs. 50% of patients not taking metformin). Furthermore, 76% of patients taking metformin were alive, compared to 41% for diabetics not on metformin and 51% of non-diabetics. Patients taking metformin had a significantly higher overall survival rate compared to diabetic patients not taking metformin (OR = 3, 95% confidence interval [CI] = 1.04–8.4; $p = 0.04$). Significant associations were found between disease-free survival and disease subsite, and patients who were taking metformin showed trends toward improved survival compared to non-diabetics and diabetics not taking metformin (OR = 1.77 and 1.99, respectively).

A study by Yen et al., published in 2014[23], found that the incidence of head and neck cancer was 0.64 times lower in a cohort of patients taking metformin compared to patients not taking metformin ($p < 0.01$). There were significantly lower incidence rates of head and neck cancer in subgroups of patients taking metformin who were 40 to 65 years old or >65 years old compared to patients not taking metformin in the same age subgroups (incidence ratio rate = 0.70 and 0.53, respectively; $p < 0.01$ for both). In the cohort of patients taking metformin, the incidence of nasopharyngeal cancer was 0.08% (adjusted hazard ratio = 0.50, 95% CI = 0.31–0.80) and the incidence of oropharyngeal cancer was 0.03% (hazard ratio = 0.36, 95% CI = 0.17–0.74). The disease-free survival of patients without head and neck cancer was significantly higher in the metformin cohort versus the cohort of patients not taking metformin. Patients with diabetes who did or did not take metformin who subsequently developed head and neck cancer did not have significantly different overall survival.

Risk of bias across studies

The selected studies used similar methods, which reduced the possibility of misinterpretation. The studies selected for this analysis were considered to be relatively homogeneous, but they did not have compatible data that would allow a meta-analysis.

Discussion

Summary of evidence

Oral and pharyngeal cancer is a serious and growing problem in many parts of the globe [15]. There is a wide geographical variation in the incidence of this cancer. The areas characterized by high incidence rates for oral cancer are found in the South and Southeast Asia (e.g. Sri Lanka, India, Pakistan and Taiwan), parts of Western (e.g. France) and Eastern Europe (e.g. Hungary, Slovakia and Slovenia), parts of Latin America and the Caribbean (e.g. Brazil, Uruguay and Puerto Rico) and in Pacific regions [24]. The most important etiological factors for these cancers are cigarette smoking and alcohol consumption [25]. Although high-risk human papillomavirus (HPV), particularly HPV-16, is an independent risk factor for a subset of HNSCC patients, and there is a strong association between HPV infection and tonsil carcinoma [26]. Advanced stage cancers are often treated with combination therapy, which includes surgical resection followed by adjuvant radiation with or without chemotherapy [27]. All therapeutics are associated with many adverse effects that reduce quality of life. Therefore, identification of new effective therapies that are less cytotoxic is very important.

Metformin, which is widely used for patients with type 2 diabetes, may reduce cancer risk [28]. A comprehensive systematic review and meta-analysis performed by DeCensi

et al. in 2010 [3] showed that metformin was associated with a 30% reduction in cancer incidence in individuals with type 2 diabetes compared to patients receiving other diabetic treatments. The authors also observed promising trends in overall cancer mortality for pancreatic and hepatocellular cancer patients and, to a lesser extent, for colon, breast, and prostate cancer patients. Metformin is an old drug that is now gaining increasing attention as an anticancer agent [29].

It is thought that metformin exerts anticancer effects through inhibition of insulin and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways [30]. Studies have found that mTOR plays a key role in the control of cell growth, proliferation, and metabolism and mediates the phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway, which is frequently deregulated in human cancers [31]. AMPK activation results in downregulation of mTOR complex 1 (mTORC1), which is 1 of the 2 signaling complexes formed by mTOR and the insulin-like growth factor 1/Akt pathway [32]. Metformin primarily works by blocking a step in the aerobic production of the cellular energy molecule adenosine triphosphate, which activates a signaling pathway that involves sensing of cellular energetic stress by the enzyme AMPK. Though metformin activates AMPK, it has been shown to work independently of this enzyme [33, 34].

Recent discoveries involving 2 tumor suppressor proteins, liver kinase B1 (LKB1) and ataxia telangiectasia mutated (ATM), help explain the mechanism by which metformin mediates activation of AMPK [35, 36]. LKB1 is a well-recognized tumor suppressor that functions as an upstream regulator of AMPK. Its ability to activate AMPK might explain, at least in part, the ability of LKB1 to act as a tumor suppressor. LKB1 may also be an upstream kinase for other members of the AMPK-like subfamily of protein kinases [37]. Similarly to LKB1, ATM is also a tumor suppressor protein. ATM is

involved in DNA repair and cell cycle control. In response to metformin, ATM may phosphorylate LKB1, therefore mediating the phosphorylation that activates AMPK. Alternatively, ATM might activate AMPK independently of LKB1, or reduce blood glucose levels through pathways entirely independent of AMPK [35].

In this systematic review, we investigated the effects and the potential association of metformin with HNSCC. Several studies have provided evidence about this relationship, but most of them have been *in vitro* or *in vivo* animal studies [37, 38]. We found only 3 prospective cohort studies for inclusion in this review, and all of them supported an association between metformin and decreased risk of HNSCC [8, 22, 23]. These studies demonstrated the effects of metformin on the treatment of head and neck cancer. The main analysis based on these 3 cohort studies showed that individuals taking metformin had decreased rates of locoregional recurrence and neck metastasis and improved overall survival and disease-free survival rates compared to individuals not taking metformin (control group). Furthermore, the incidence of HNSCC was lower in individuals taking metformin versus those not taking metformin.

Two other clinical studies of the association between metformin and HNSCC were not included in this review: a phase 1 clinical trial and a retrospective case-control study [39, 40]. The phase 1 study included an analysis of temsirolimus and metformin in advanced solid tumors. That study included only 1 HNSCC patient, and that patient experienced a partial response [39]. The case-control study, which was performed in the United Kingdom, analyzed the relationship between antidiabetic drugs and the risk of head and neck cancer [40]. The authors concluded that antidiabetic drugs were not associated with HNSCC risk, but their data suggested that long-term metformin use had a protective effect against laryngeal cancer.

We identified 11 articles with experimental studies that were *in vitro* and *in vivo* animal studies that analyzed the effect of metformin in HNSCC [16, 22, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47] 2 of these studies presented the most important and complete results. Vitale-Cross *et al.* [38] showed that metformin reduced the growth of HNSCC cells and diminished their mTORC1 activity by both AMPK-dependent and AMPK-independent mechanisms. They also found that metformin specifically inhibited mTORC1 in the basal proliferating epithelial layer of oral premalignant lesions. Remarkably, the authors found that metformin prevented the development of HNSCC. In the same year (2012), Sandulache *et al.* [44] demonstrated that inhibition of respiration by metformin increased glycolytic dependence in wild-type TP53 expressing cells and potentiated the effects of glycolytic inhibition on radiation toxicity. These two works showed the potential clinical benefits of using metformin as a targeted chemopreventive and chemotherapy agent in the control of HNSCC developing and treatment.

In summary, this is the first systematic review of the effects of metformin on HNSCC treatment, and the first review to present evidence of a positive association between decrease of HNSCC and metformin use. Although DeCensi *et al.* (2010)[3] performed a systematic review and meta-analysis of metformin and cancer risk in diabetic patients, they did not analyze head and neck cancer patients.

Currently available evidence suggests an association between metformin and HNSCC, although there are only a few studies that confirm that statement. Metformin appears to improve the overall survival of HNSCC patients.

Limitations

Some methodological limitations of this review should be considered. First, only 3 articles met the inclusion criteria, maybe because the subject of this review is very new.

Of 313 identified citations, only 3 studies met the inclusion criteria and were used in the qualitative analysis. Furthermore, all of the included studies were very recent (from 2012 and 2014) demonstrating that use of metformin in HNSCC is a new concept.

It should be noted that, according to the CASP [21], the authors have not identified all important confounding factors. This systematic error can compromise the internal validity of the study. The failure to not include in the study the variables most relevant to the analysis and association in question leads to a bias of confounding. Another limitation is an insufficient reporting of losses of individuals throughout the research to permit judgment. We suggest that strong future research could eliminate these risks of bias.

Funding

None declared.

Conflict of interest statement

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Acknowledgements

The authors would like to thank the contribution of Dr Carlos Flores-Mir for providing important comments.

References

- [1] Campbell IW, Ritz P. Understanding the glucose-lowering actions of metformin. In: Bailey CJ, Campbell IW, Chan JCN, Davidson JA, Howlett HCS, Ritz P, editors. *Metformin the Gold Standard*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd; 2007, p.77–88.
- [2] Ben Sahra I, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Bost F. Metformin in cancer therapy: a new perspective for an old antidiabetic drug? *Mol Cancer Ther* 2010;9:1092–9.
- [3] Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, et al. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res*. 2010;11:1451-61.
- [4] Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care*. 2010;7:1674-85.
- [5] Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002;346:393–403.
- [6] Noto H, Goto A, Tsujimoto T, Noda M. Cancer risk in diabetic patients treated with metformin: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2012,7:e33411.
- [7] Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GF, Pellegrini F, Nicolucci A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS One* 2013;8:e71583.
- [8] Sandulache VC, Hamblin JS, Skinner HD, Kubik MW, Myers JN, Zevallos JP. Association between metformin use and improved survival in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Head and Neck*. 2013;36:1039-43.

- [9] Goodwin PJ, Ligibel JA, Stambolic V. Metformin in breast cancer: time for action. *J Clin Oncol* 2009;27:3271–3.
- [10] Bodmer M, Meier C, Krahenbuhl S, Jick SS, Meier CR. Long-term metformin use is associated with decreased risk of breast cancer. *Diabetes Care* 2010;33:1304–8.
- [11] Leone A, Di Gennaro E, Bruzzese F, Avallone A, Budillon A. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Cancer Treat Res*. 2014;159:355-76.
- [12] Del Barco S, Vazquez-Martin A, Cufí S, Oliveras-Ferraros C, Bosch-Barrera J, Joven J, et al. Metformin: multi-faceted protection against cancer. *Oncotarget*. 2011;2:896-917.
- [13] Pollak M. Energy metabolism, cancer risk, and cancer prevention. *Recent Results Cancer Res*. 2009;181:51–4.
- [14] Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*. 2001; 108:1167–1174.
- [15] Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45:309-16.
- [16] Patel H, Younis RH, Ord RA, Basile JR, Schneider A. Differential expression of organic cation transporter OCT-3 in oral premalignant and malignant lesions: potential implications in the antineoplastic effects of metformin. *J Oral Pathol Med*. 2013;42:250-6.
- [17] Bao B, Wang Z, Ali S, Ahmad A, Azmi AS, Sarkar SH, et al. Metformin inhibits cell proliferation, migration and invasion by attenuating CSC function mediated by

- deregulating miRNAs in pancreatic cancer cells. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5:355–364.
- [18] Kato K, Gong J, Iwama H, Kitanaka A, Tani J, Miyoshi H, et al: The antidiabetic drug metformin inhibits gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2012;11:549–560.
- [19] Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement *Open Med*. 2009;3:e123-30.
- [20] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. UICC TNM classification of malignant tumours. 7th ed. New York: Wiley-Liss, 2009.
- [21] Critical Appraisal Skills Programme (CASP). Making sense of evidence about clinical effectiveness: 12 questions to help you make sense of cohort study. (http://www.casp-uk.net/wp-content/uploads/2011/11/CASP_Cohort_Appraisal_Checklist_14oct14.pdf)(4 October 2014, date last accessed).
- [22] Skinner HD, Sandulache VC, Ow TJ, Meyn RE, Yordy JS, Beadle BM, et al. TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence. *Clin Cancer Res*. 2012;18:290-300.
- [23] Yen YC, Lin C, Lin SW, Lin YS, Weng SF. Effect of metformin on the incidence of head and neck cancer in diabetics. *Head Neck*. 2014 May 7.
- [24] IARC. Cancer incidence in five continents, vol IX. Available from: <http://wwwdep.iarc.fr>.
- [25] Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer--an appraisal of controversies. *Br Dent J*. 2009;207:471-5.

- [26] Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*. 2011;64:308-12.
- [27] Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol*. 2014;110:551-74.
- [28] Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005;330:1304-5.
- [29] Würth R, Barbieri F, Florio T. New molecules and old drugs as emerging approaches to selectively target human glioblastoma cancer stem cells. *Biomed Res Int*. 2014;2014:126586.
- [30] Ashinuma H, Takiguchi Y, Kitazono S, Kitazono-Saitoh M, Kitamura A, Chiba T, et al. Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2012;28:8-14.
- [31] Martini M, Ciraolo E, Gulluni F, Hirsch E. Targeting PI3K in Cancer: Any Good News? *Front Oncol*. 2013;3:108.
- [32] Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab*. 2010;11:390-401.
- [33] Miller RA, Birnbaum MJ. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J Clin Invest*. 2010;120:2267-70.
- [34] Foretz M, Hébrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*. 2010;120:2355-69.

- [35] Birnbaum MJ, Shaw RJ. Genomics: Drugs, diabetes and cancer. *Nature*. 2011;470:338-9.
- [36] Hawley SA, Boudeau J, Reid JL, Mustard KJ, Udd L, Mäkelä TP, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol*. 2003;2:28.
- [37] Luo Q, Hu D, Hu S, Yan M, Sun Z, Chen F. In vitro and in vivo anti-tumor effect of metformin as a novel therapeutic agent in human oral squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*. 2012;12:517.
- [38] Vitale-Cross L, Molinolo AA, Martin D, Younis RH, Maruyama T, Patel V, et al. Metformin prevents the development of oral squamous cell carcinomas from carcinogen-induced premalignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012;5:562-73.
- [39] MacKenzie MJ, Ernst S, Johnson C, Winqvist E. A phase I study of temsirolimus and metformin in advanced solid tumours. *Invest New Drugs*. 2012;30:647-52.
- [40] Becker C, Jick SS, Meier CR, Bodmer M. Metformin and the risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Diabetes Obes Metab*. 2014;16:1148-54.
- [41] Hahn SS, Tang Q, Zheng F, Zhao S, Wu J, Chen J. Repression of integrin-linked kinase by antidiabetes drugs through cross-talk of PPAR γ - and AMPK α -dependent signaling: role of AP-2 α and Sp1. *Cell Signal*. 2014;26:639-647.
- [42] Lin YC, Wu MH, Wei TT, Lin YC, Huang WC, Huang LY, et al. Metformin sensitizes anticancer effect of dasatinib in head and neck squamous cell carcinoma cells through AMPK-dependent ER stress. *Oncotarget*. 2014;5:298-308.
- [43] Ma L, Niknejad N, Gorn-Hondermann I, Dayekh K, Dimitroulakos J. Lovastatin induces multiple stress pathways including LKB1/AMPK activation that regulate its cytotoxic effects in squamous cell carcinoma cells. *PLoS One*. 2012;7:e46055.

- [44]Sandulache VC, Skinner HD, Ow TJ, Zhang A, Xia X, Luchak JM, et al. Individualizing antimetabolic treatment strategies for head and neck squamous cell carcinoma based on TP53 mutational status. *Cancer*. 2012;118:711-721.
- [45]Sandulache VC, Ow TJ, Pickering CR, Frederick MJ, Zhou G, Fokt I, et al. Glucose, not glutamine, is the dominant energy source required for proliferation and survival of head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer*. 2011;117:2926-38.
- [46]Sikka A, Kaur M, Agarwal C, Deep G, Agarwal R. Metformin suppresses growth of human head and neck squamous cell carcinoma via global inhibition of protein translation. *Cell Cycle*. 2012;11:1374-82.
- [47]Wang F, Xu J, Xia F, Liu Z, Zhao S, Liu H, et al. Effects of metformin on human oral cancer KB cell proliferation and apoptosis in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2014;34:159-63.

Legend

Figure 1. Flow Diagram of literature search and selection criteria adapted from PRISMA[19]

Appendix S1. Database Search.

Database	Search
COCHRANE (June 28, 2014)	#1 'metformin and head and neck cancer'; #2 'metformin and squamous cell carcinoma'; #3 metformin and squamous cell cancer; #1 or #2 or #3
EMBASE (June 28, 2014)	#1 metformin.mp.; #2 oral cancer.mp.; #3 oral carcinoma.mp.; #4 head carcinoma.mp.; #5 neck carcinoma.mp.; #6 head cancer.mp.; #7 neck cancer.mp., squamous cell carcinoma.mp; #2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8; #1 and #9 [mp=title, abstract, subject headings, heading word, drug trade name, original title, device manufacturer, drug manufacturer, device trade name, keyword]
LILACS (June 28, 2014)	#1 'metformin and head and neck cancer'; #2 'metformin and squamous cell carcinoma'; #3 metformin and squamous cell cancer; #1 or #2 or #3
MEDLINE (June 28, 2014)	#1 metformin.mp.; #2 oral cancer.mp.; #3 oral carcinoma.mp.; #4 head carcinoma.mp.; #5 neck carcinoma.mp.; #6 head cancer.mp.; #7 neck cancer.mp., squamous cell carcinoma.mp; #2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8; #1 and #9 [mp=title, abstract, original title, name of substance word, subject heading word, keyword heading word, protocol supplementary concept word, rare disease supplementary concept word, unique identifier]
PubMed (June 28, 2014)	#1 'metformin'; #2 'oral cancer'; #3 'oral carcinoma'; #4 'head cancer'; #5 'head carcinoma'; #6 'neck cancer'; #7 'neck carcinoma'; #8 'squamous cell carcinoma'; #9 (#2 or #3 or #4 or #5 or #6 or #7 or #8); #10 (#1) and #9

