



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

“Efecto de metformina sobre los niveles miR-145 y miR-23b en células de cáncer de ovario epitelial”

Memoria para optar al título profesional de
Bioquímico

Ignacio Bastián Alfaro Castro

Directora

Maritza Paola Garrido Palma

Laboratorio de Endocrinología y Biología
de la Reproducción, Hospital Clínico
Universidad de Chile.

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular, Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Patrocinante

Maritza Paola Garrido Palma

Laboratorio de Endocrinología y Biología
de la Reproducción, Hospital Clínico
Universidad de Chile.

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular, Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Diciembre, 2023

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado a través del siguiente proyecto:

FONDECYT REGULAR N° 1220479 (IP: Carmen Romero Osses)

PRODUCTIVIDAD

Ignacio Alfaro, Margarita Vega, Carmen Romero, Maritza P. Garrido “Mechanisms of regulation of the expression of miRNAs and lncRNAs by metformin in ovarian cancer.

Artículo publicado en la revista “Pharmaceuticals”.

AGRADECIMIENTOS

Quiero partir agradeciendo a mi directora de tesis, Dra. Maritza Garrido por guiarme, enseñarme y apoyarme durante mi proceso de titulación. Así como también la preocupación, usted hace patente que la ciencia es ante todo una actividad humana integral. De verdad, muchas gracias.

A mis compañeros de laboratorio, que me acompañaron y apoyaron durante y después del trabajo realizado en esta memoria de título. Allison y Álvaro muchas gracias por las charlas, por las risas y por los detalles entregados durante este proceso. Gracias por ser tan buenos compañeros y amigos.

Agradecer a mi familia y a mi madre por siempre creer en mí, por apoyarme en momentos de dificultades y celebrarme cada pequeño logro que iba teniendo a lo largo de este proceso. Mamá, desde pequeño que me sigues inspirando a cada día ser una mejor persona y a no dejar de soñar.

Finalmente, agradecer a mi polola Camila por apoyarme incondicionalmente, por tu cariño y amor que me levantaron en los momentos más difíciles. Gracias por ser mi compañera en esta etapa de mi vida y por siempre creer en mí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Cáncer de ovario	5
1.2. microRNAs	6
1.3. microRNAs en cáncer	7
1.4. Rol de miR-145 y miR-23b en COE	8
1.5. Metformina y cáncer de ovario	9
1.6. Metformina y microRNAs en COE	10
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS	12
3.1. Objetivo General	12
3.2. Objetivos específicos	12
4. METODOLOGÍA	13
4.1. Líneas celulares	13
4.2. Cultivo Celular	13
4.3. Tratamiento con metformina	13
4.4. Extracción de RNA y cuantificación de microRNAs por RT-PCR en tiempo real	13
4.5. Análisis estadístico	14
5. RESULTADOS	15
5.1. Efecto de concentraciones micromolares de metformina sobre los niveles de miR-23b	15
5.2. Efecto de concentraciones milimolares de metformina sobre los niveles de miR-23b	15
5.3. Efecto de concentraciones micromolares de metformina sobre los niveles de miR-145	17
5.4. Efecto de concentraciones milimolares de metformina sobre los niveles	17

de miR-145	
6. DISCUSIÓN	20
6.1. Concentraciones micromolares de metformina regulan de manera diferencial la expresión de miR-23b en líneas celulares de COE	21
6.2. Concentraciones micromolares de metformina regulan de manera diferencial la expresión de miR-145 en líneas celulares de COE	23
6.3. Metformina en concentraciones supra terapéuticas incrementa los niveles de miR-23b y miR-145	28
7. CONCLUSIONES	31
8. PROYECCIONES	32
9. BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Niveles de miR-23b en líneas de cáncer ovárico epitelial tratadas con concentraciones crecientes de metformina	16
Figura 2	Niveles de miR-23b en líneas de cáncer ovárico epitelial tratadas con concentraciones crecientes de metformina	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Partidores utilizados en PCR en tiempo real.	14
Tabla 2	Porcentaje de cambio de los niveles de miR-23b en células de cáncer de ovario tratadas con metformina respecto a la condición control	17
Tabla 3	Porcentaje de cambio de los niveles de miR-23b en células de cáncer de ovario tratadas con metformina respecto a la condición control	19

ABREVIATURAS

- 3'UTR:** Región 3' no traducida (del inglés 3' untranslated región)
- AMP:** Adenosín monofosfato (del inglés adenosine monophosphate)
- AMPK:** Proteína quinasa activada por AMP (del inglés AMP-activated protein kinase)
- ATCC:** American Type Culture Collection
- ATP:** Adenosín trifosfato (del inglés adenosine triphosphate)
- ceRNA:** RNA endógenos competitivos (del inglés competing endogenous ceRNA)
- c-MYC:** Factor de transcripción oncogénico
- COE:** Cáncer ovárico epitelial
- DGCR8:** Subunidad compleja de microprocesador DGCR8 (del inglés DGCR8 microprocessor complex subunit)
- DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2
- ECACC:** European Collection of Authenticated Cell Cultures
- ETC:** Cadena transportadora de electrones (del inglés electron transport chain Factor)
- LncRNA:** RNA largo no codificante (del inglés long non-coding RNAs)
- MATE:** Multidrug and Toxin Extruders
- MMP16:** Metaloproteínasa-16 (del inglés Matrix Metalloproteinase-16)
- mRNA:** RNA mensajero (del inglés messenger RNA)
- MUC1:** Mucina-1 (del inglés Mucin short variant S1)
- NGF:** Factor de crecimiento nervioso (del inglés Nerve Growth Factor)
- OCT:** Transportador de cationes orgánicos (del inglés organic cation transport)
- oncomiR:** microRNA oncogénico
- p70s6k:** Quinasa p70s6k (del inglés p70S6 kinase)
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)
- Pre-miRNA:** miRNA precursor
- Pri-miRNA:** miRNA primario
- RISC:** Complejo de silenciamiento inducido por RNA (del inglés RNA-induced silencing complex)
- RNA:** Ácido ribonucleico (del inglés Ribonucleic Acid)
- RNU6:** RNA nuclear pequeño U6
- RPMI:** Roswell Park Memorial Institute
- RT:** Retro transcripción

SFB: Suero fetal bovino

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés Vascular Endothelial Growth)

RESUMEN

El cáncer ovárico epitelial (COE) posee la tasa de mortalidad más alta entre los cánceres ginecológicos en el mundo, siendo en Chile la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas. El COE se caracteriza por una sintomatología inespecífica y suele diagnosticarse tardíamente, cuando las tasas de supervivencia son bajas. El principal tratamiento es la cirugía cito reductora, seguida de ciclos periódicos de quimioterapia. Si bien muchas pacientes diagnosticadas tempranamente responden positivamente al tratamiento, durante etapas avanzadas la mayoría de ellas desarrollan recurrencia y quimioresistencia. Con el fin de mejorar los tratamientos y aumentar la supervivencia de las pacientes afectadas por COE, se está investigando el uso de terapias que complementen y mejoren los tratamientos actuales. En este contexto, el fármaco antidiabético metformina ha recibido mucha atención, debido a que se ha demostrado que tiene efectos antitumorales directos sobre células de cáncer de ovario. Además, el consumo de metformina se ha asociado a una menor incidencia, menor mortalidad y un mejor pronóstico en pacientes diabéticas que sufren de esta neoplasia.

Los mecanismos antitumorales de metformina involucran la modulación de los niveles de microRNAs. Los microRNAs son RNAs pequeños no codificantes que regulan la expresión de genes a través del silenciamiento postranscripcional, participando en procesos celulares relacionados con la proliferación, apoptosis y metabolismo. En el contexto de cáncer, pueden actuar como oncogenes o como genes supresores de tumores. En el desarrollo del COE se ha descrito que ocurre una disminución de diferentes microRNAs supresores de tumores, entre ellos miR-23b y miR-145. Estos microRNAs están involucrados en procesos tumorales como la proliferación, migración e invasión, y se ha descrito que su sobreexpresión en células de COE tiene efectos inhibitorios sobre estos procesos. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que metformina incrementa los niveles de miR-23b y miR-145 en células de COE, y este efecto coincide con una disminución de la proliferación celular y una menor expresión de oncoproteínas involucradas en la proliferación y angiogénesis; ambos procesos importantes para las células tumorales de ovario. Sin embargo, los efectos sobre estos microRNAs se observaron utilizando concentraciones de metformina mucho más elevadas en comparación con las concentraciones que se han descrito en sangre y tumores ováricos de pacientes diabéticas usuarias de este fármaco. Por lo tanto, en esta memoria de título se estudió el efecto de metformina sobre los niveles de miR-23b y miR-145 en células de COE, utilizando concentraciones crecientes que

contemplaron valores de concentración terapéuticas.

Hipótesis: El tratamiento con metformina aumenta de manera proporcional a la dosis los niveles de miR-145 y miR-23b en diferentes líneas celulares de cáncer ovárico epitelial.

Objetivo general: Evaluar si la metformina aumenta los niveles de miR-145 y miR-23b de manera dosis-dependiente en líneas celulares de COE.

Metodología: Las líneas celulares de COE A2780, SKOV3 y OV90, fueron incubadas con diferentes concentraciones de metformina durante 24 y 48 horas. Después de cada tratamiento, los niveles de miR-23b y miR-145 en cada célula fueron evaluados por RT-PCR en tiempo real.

Resultados: Metformina en concentraciones milimolares (supra terapéuticas) incrementa los niveles de miR-23b y miR-145 en todas las líneas celulares de COE. Por otra parte, metformina en concentraciones micromolares (terapéuticas) regula de manera diferencial la expresión de miR-23b y miR-145 aumentando o disminuyendo su abundancia en las líneas celulares estudiadas.

Conclusión: Metformina puede regular la expresión de miR-145 y miR-23b en concentraciones terapéuticas y supraterapéuticas, dependiendo de la línea celular estudiada y la temporalidad en que se efectuó la medición. El comportamiento del incremento en los niveles de miR-145 y miR-23b no es proporcional a la dosis de metformina.

ABSTRACT

“Effect of metformin on miR-145 and miR-23b levels in epithelial ovarian cancer cells”

Epithelial ovarian cancer (EOC) has the highest mortality rate among gynecological cancers worldwide, and in Chile, it is the second leading cause of death from gynecological neoplasms. EOC is characterized by nonspecific symptoms and is often diagnosed at a late stage when survival rates are low. The primary treatment is cytoreductive surgery, followed by periodic cycles of chemotherapy. Even though many patients diagnosed early respond positively to treatment, during advanced stages, most of them develop recurrence and chemotherapy resistance. To improve treatments and increase the survival of patients affected by EOC, research is being conducted to investigate the use of therapies that complement and enhance current treatments. In this context, the antidiabetic drug metformin has received a lot of attention, as it has been shown to have direct antitumor effects on ovarian cancer cells. Furthermore, the use of metformin has been associated with a lower incidence, mortality, and a better prognosis in diabetic patients who suffer from this neoplasm.

The antitumor mechanisms of metformin involve the modulation of microRNA levels. MicroRNAs are small non-coding RNAs that regulate gene expression through post-transcriptional silencing, participating in cellular processes related to proliferation, apoptosis, and metabolism. In the context of cancer, they can act as oncogenes or tumor suppressor genes. In the development of EOC, a decrease in different tumor-suppressor microRNAs has been described, including miR-23b and miR-145. These microRNAs are involved in tumor processes such as proliferation, migration, and invasion, and their overexpression in EOC cells has been reported to have inhibitory effects on these processes. Our research group has demonstrated that metformin increases the levels of miR-23b and miR-145 in EOC cells, and this effect coincides with a decrease in cell proliferation and lower expression of oncoproteins involved in proliferation and angiogenesis, both of which are important processes for ovarian tumor cells. Nevertheless, the effects on these microRNAs were observed using much higher concentrations of metformin compared to the concentrations that have been described in the blood and ovarian tumors of diabetic patients using this drug. Therefore, in this thesis, the effect of metformin on the levels of miR-23b and miR-145 in EOC cells was studied, using increasing concentrations that included therapeutic concentration values.

Hypothesis: Metformin treatment increases dose-proportional levels of miR-145 and miR-23b in different cell lines of epithelial ovarian cancer.

General Objective: To evaluate if metformin increases the levels of miR-145 and miR-23b in a dose-dependent manner in epithelial ovarian cancer cell lines.

Methodology: Epithelial ovarian cancer cell lines A2780, SKOV3, and OV90 were incubated with different concentrations of metformin for 24 and 48 hours. After each treatment, the levels of miR-23b and miR-145 in each cell were assessed by real-time RT-PCR.

Results: Metformin at millimolar concentrations (supra-therapeutic) increases the levels of miR-23b and miR-145 in all epithelial ovarian cancer cell lines. On the other hand, metformin at micromolar concentrations (therapeutic) differentially regulates the expression of miR-23b and miR-145, increasing or decreasing their abundance in the studied cell lines.

Conclusion: Metformin can regulate the expression of miR-145 and miR-23b at therapeutic and supra-therapeutic concentrations, depending on the cell line and the timing of the measurement. The behavior of the increase in miR-145 and miR-23b levels is not proportional to the dose of metformin.

INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer de ovario

El cáncer de ovario es una neoplasia maligna heterogénea que, según su origen celular, puede clasificarse en tres diferentes tipos: cáncer de ovario epitelial (COE), de células germinales y estromal. Entre ellos, el COE es el más común y representa más del 85% de los casos de cáncer de ovario que se diagnostican alrededor del mundo y son responsables de la mayoría de las muertes relacionada a cáncer de ovario (*Ovarian Cancers*, 2016).

Si bien la incidencia del cáncer de ovario es más baja en comparación a la de otros cánceres ginecológicos como el cáncer de endometrio y de cuello uterino, posee la tasa de mortalidad más alta entre los cánceres ginecológicos (Siegel et al., 2019). En Chile, el cáncer de ovario es la segunda causa de muerte por neoplasias malignas ginecológicas (MINSAL, 2020). De esta manera, el cáncer de ovario se posiciona como una de las neoplasias malignas más letales que afectan a las mujeres a nivel nacional e internacional.

La alta mortalidad de las pacientes con cáncer de ovario se explica por una sintomatología inespecífica, que suele confundirse con la de otras enfermedades ginecológicas, gastrointestinales o genitourinarias, dificultando su detección (Jayde et al., 2009). Además, en la actualidad, los métodos de detección de la enfermedad no son lo suficientemente sensibles y específicos para detectar el cáncer de manera temprana, es decir, mientras se encuentre confinado en el ovario (Chandra et al., 2019). Son por estas razones que el cáncer de ovario se suele diagnosticar tardíamente y en etapas muy avanzadas, cuando la metástasis del cáncer ya ha ocurrido, lo que trae como consecuencia tasas de supervivencia muy bajas (Jessmon et al., 2017).

El principal tratamiento del COE es la cirugía citorreductora para extraer la masa tumoral, y para aquellas pacientes con COE de estadios avanzados se indica cirugía citorreductora seguida de ciclos periódicos de quimioterapia (Kuroki & Guntupalli, 2020). Los fármacos más utilizados en la quimioterapia de primera línea son cisplatino y paclitaxel (Ledermann, 2018). Si bien una proporción significativa de mujeres que han sido diagnosticadas a tiempo responden positivamente al tratamiento, durante etapas avanzadas del COE la mayoría de las pacientes desarrollan recurrencia y el tumor se vuelve resistencia a la quimioterapia (Jayson et al., 2014; Jelovac & Armstrong, 2011).

Las dificultades en el diagnóstico y el tratamiento del COE señaladas anteriormente, han

impulsado diversos estudios a explorar el uso de terapias alternativas que complementen y mejoren los tratamientos actuales con el objetivo de incrementar la supervivencia de las pacientes afectadas por esta neoplasia (Garrido et al., 2021). Para este fin, los microRNAs han sido explorados como blancos terapéuticos en el tratamiento del COE, así como también fármacos capaces modular los niveles de microRNAs en células malignas, como metformina (Alimoradi et al., 2021; S.-N. Chen et al., 2019).

1.2. microRNAs

Los microRNA son una clase de ácidos ribonucleicos (RNA) no codificantes pequeños, de alrededor de 22 nucleótidos de longitud, que regulan la expresión de hasta el 60% de los genes codificantes de proteína del genoma humano (Friedman et al., 2009). Participan en el control de muchos procesos biológicos a nivel celular, incluyendo la división celular, proliferación, diferenciación, metabolismo y apoptosis (Vidigal & Ventura, 2015). Estos ejercen su función al interactuar mediante apareamiento por complementariedad de bases con las regiones no traducidas tres prima (3'-UTR) de los RNA mensajeros (mRNA) de sus genes blanco, silenciando la expresión a nivel post transcripcional, ya sea promoviendo la degradación del mRNA o la inhibición de su traducción (Iwakawa & Tomari, 2015). Ambos mecanismos de silenciamiento están determinados por el grado de complementariedad entre la 3'UTR del mRNA blanco y el extremo 5' de los microRNA, en donde se encuentra una región entre los nucleótidos 2-7 conocida como región semilla. Una complementariedad imperfecta conduce a la represión de la traducción y una complementariedad perfecta conduce a la degradación del mRNA (Iwakawa & Tomari, 2015). De esta manera, debido a que la complementariedad perfecta no es estrictamente requerida, un único microRNA es capaz de regular la expresión de cientos de mRNAs, mientras que un mRNA puede ser regulado por múltiples microRNA, conformando así un robusto sistema de regulación de la expresión génica para mantener la homeostasis celular (Peter, 2010; Selbach et al., 2008).

La biogénesis de los microRNAs comienza en el núcleo, donde los genes de microRNA son transcritos por la RNA polimerasa II a microRNAs primarios (pri-miRNA), que poseen una estructura en forma de horquilla tallo-bucle con una caperuza y una cola poli-adeninas en sus extremos 5' y 3', respectivamente (Lee et al., 2004). El pri-miRNA es procesado a un intermediario con forma de horquilla más pequeño, llamado microRNA precursor (pre-miRNAs), por un complejo proteico denominado complejo microprocesador (Denli et al., 2004). El complejo microprocesador consiste en una endonucleasa de la familia de las

RNasas III, llamada Drosha, y una proteína de reconocimiento a RNA de doble hebra llamada DGCR8. DGCR8 actúa como una subunidad reguladora que permite el reconocimiento de motivos específicos en el pri-miRNA, mientras que Drosha funciona como la subunidad catalítica. Posteriormente, el pre-miRNA es exportado desde el núcleo hacia el citoplasma con la ayuda de la exportina-5 (Bohnsack et al., 2004). Una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs son reconocidos y procesados por otra endonucleasa RNasa III llamada Dicer, que corta y elimina la estructura de bucle de los pre-miRNA, generando un dúplex de microRNA maduro de aproximadamente 22 nucleótidos (Hutvagner et al., 2001). Finalmente, el dúplex de microRNA se ensambla a proteínas de la familia argonauta dentro del complejo ribonucleoproteico silenciador RISC, el cual selecciona una de las dos hebras del dúplex para convertirse en la cadena madura responsable de dirigir el silenciamiento post transcripcional (J. Liu et al., 2004; Su et al., 2009). La cadena que se incorpora al complejo RISC se denomina “hebra guía” y la otra cadena, conocida como “hebra pasajera”, se degrada en el citoplasma (Shin, 2008).

1.3. microRNAs en cáncer

En cáncer, los microRNAs desempeñan un rol importante en procesos tumorales como proliferación, migración, invasión y angiogénesis (Peng & Croce, 2016). Pueden actuar como oncogenes (oncomiRs) o como genes supresores de tumores, regulando la expresión de proteínas supresoras de tumores o proteínas oncogénicas, respectivamente. En el cáncer, los perfiles de expresión de microRNAs se encuentran desregulados con respecto a tejidos normales, y los niveles de oncomiRs se encuentran exacerbados, mientras que los de microRNAs oncosupresores se encuentran disminuidos (Lujambio & Lowe, 2012). La desregulación de ambos tipos de microRNAs resulta en un incremento de la expresión de oncogenes y una disminución en la expresión de genes oncosupresores, favoreciendo así el crecimiento y desarrollo tumoral (Y. Chen et al., 2014). Se ha observado que la desregulación en la expresión de microRNAs puede estar asociado a mutaciones en secuencias promotoras o codificantes, alteraciones epigenéticas, modificaciones postranscripcionales aberrantes y/o defectos en la maquinaria de biogénesis de microRNAs (S. Chen et al., 2022).

La restauración de la expresión de microRNAs supresores de tumores ha demostrado prometedores resultados *in vitro* e *in vivo*, así como la inhibición de la expresión de oncomiRs (Smolarz et al., 2022). De esta manera, los microRNAs están siendo

considerados como importantes moléculas blanco para la terapia tumoral.

1.4. Rol de miR-145 y miR-23b en COE

La desregulación de una amplia variedad de microRNAs en COE se ha asociado a alteraciones en la proliferación celular, migración, invasión, metástasis, y respuesta a quimioterapia; contribuyendo así a su progresión y desarrollo (Nguyen et al., 2020). miR-145 y miR-23b son dos importantes microRNAs oncosupresores cuyos niveles disminuyen durante la progresión del COE (Garrido, Torres, et al., 2020; Retamales-Ortega et al., 2017). Además, la disminución de los niveles de expresión de miR-145 y miR-23b se han asociado a un mal pronóstico en pacientes con COE (Kim et al., 2015; W. Li et al., 2014).

Existe vasta evidencia que demuestra que miR-145 regula negativamente la expresión de diversas proteínas oncogénicas en células de COE, y que la sobreexpresión de miR-145 disminuye la proliferación celular, migración, invasión y desarrollo tumoral de células de COE (X. Chen et al., 2015; Dong et al., 2014; Hua et al., 2019; Kim et al., 2015; J. Li et al., 2017, 2021; Wang et al., 2017; H. Wu et al., 2013; W. Zhang et al., 2014). Nuestro grupo de laboratorio ha demostrado que miR-145 es capaz de disminuir la expresión de proteínas involucradas en la proliferación celular y la angiogénesis en células de COE, como c-MYC y VEGF, respectivamente (Garrido, Torres, et al., 2020). Además, se observó que la sobreexpresión de miR-145 disminuye el crecimiento tumoral y la metástasis en un modelo de ratón *in vivo* de COE (Garrido, Torres, et al., 2020). También se ha explorado el efecto de este microRNA sobre el metabolismo tumoral de células de COE: miR-145 es capaz de inhibir el efecto Warburg y el metabolismo de glutamina, ambos procesos importantes para suplir la demanda energética celular y sostener la biosíntesis de macromoléculas para mantener altas tasas proliferativas (J. Li, Li, et al., 2019; J. Li, Zhang, et al., 2019; S. Zhang et al., 2018). Además, miR-145 es capaz de inhibir la actividad mitocondrial y disminuir los niveles de ATP, contribuyendo aún más al estrés energético en células de COE (Zhao et al., 2021).

Otros estudios han demostrado que miR-145 participa en la resistencia a quimioterapia. Los niveles de miR-145 se encuentran disminuidos en tejidos de cáncer de ovario resistentes a paclitaxel y cisplatino, en comparación a tejidos sensibles (Sheng et al., 2020; Zhu et al., 2014). La sobreexpresión de miR-145 regula negativamente los niveles y actividad de proteínas de eflujo de fármacos, permitiendo la acumulación de paclitaxel al interior de células de COE resistentes, aumentando así la sensibilidad a este fármaco *in vitro* e *in vivo*

(Zhu et al., 2014).

Por otra parte, se ha reportado que miR-23b también regula negativamente la expresión de proteínas oncogénicas relevantes en la progresión del COE, y la sobreexpresión de miR-23b en células de COE inhibe la proliferación, migración e invasión *in vitro* y el crecimiento tumoral en un modelo de ratón *in vivo* de COE (W. Li et al., 2014; Yan et al., 2016). Es importante señalar que nuestro equipo de laboratorio ha demostrado que la estimulación de células de COE con el factor de crecimiento nervioso (NGF) favorece la proliferación, migración y capacidad angiogénica, lo que se acompaña con una disminución en los niveles de miR-23b y miR-145, sugiriendo que los mecanismos proliferativos y pro-angiogénicos de NGF en COE dependen, al menos en parte, de la regulación de estos microRNAs (Garrido, Torres, et al., 2020; Retamales-Ortega et al., 2017). Por lo tanto, aumentar los niveles de miR-145 y miR-23b podría ser una posible estrategia terapéutica en COE, pudiendo contribuir a inhibir su progreso y aumentar la eficacia de los tratamientos de primera línea. Entre las alternativas terapéuticas que se están estudiando en el cáncer de ovario, se encuentra metformina, fármaco cuyo efecto ha sido evaluado en células de COE por nuestro grupo de laboratorio, ocurriendo un incremento en los niveles de expresión de miR-145 y miR-23b (Garrido et al., 2018).

1.5. Metformina y cáncer de ovario

La metformina es una biguanida sintética (1,1-dimetilbiguanida) comúnmente utilizada como fármaco normoglicemiante. En los últimos años se ha convertido en el medicamento de primera línea para pacientes diagnosticados con diabetes mellitus tipo 2 (DM2), siendo recomendada por las guías clínicas a nivel internacional (Ahmad et al., 2020; Flory & Lipska, 2019). Entre los efectos beneficiosos que metformina tiene en pacientes diabéticos se encuentra la disminución de la glucogénesis hepática, el incremento en la captación y utilización de glucosa, y el aumento de la sensibilidad a insulina (Viollet et al., 2012). Diversos estudios han demostrado el potencial terapéutico de metformina más allá de sus efectos metabólicos en pacientes con DM2, lo que ha despertado el interés en su reposicionamiento como tratamiento complementario de varias enfermedades, incluido el cáncer (Triggle et al., 2022).

Existe una asociación bien establecida entre la diabetes y el riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer (Bjornsdottir et al., 2020; Harding et al., 2014). Debido a que la metformina es comúnmente recetada como tratamiento para la DM2, se ha explorado la idea de que la

metformina puede tener un efecto beneficioso en varios tipos de cáncer, lo que ha llevado a un creciente interés en la investigación de sus efectos antitumorales durante las últimas décadas. De esta manera, estudios epidemiológicos, preclínicos y clínicos han reportado efectos antitumorales directos de metformina en las células de cáncer, y una disminución en la incidencia y mortalidad por diferentes tipos de cáncer en pacientes usuarios de este fármaco (Chae et al., 2016).

Con relación al cáncer de ovario, estudios retrospectivos recientes han mostrado que el tratamiento con metformina se asocia a una menor incidencia, mortalidad y un mejor pronóstico en pacientes diabéticas que sufren esta neoplasia (Guo et al., 2022; Shi et al., 2019; Yao et al., 2022). Además, el efecto antitumoral de este fármaco ha sido demostrado consistentemente en células de COE (Garrido et al., 2018; Garrido, Salvatierra, et al., 2020; Irie et al., 2016; P. Garrido et al., 2019; Urpilainen et al., 2020). Importantemente, los resultados de un ensayo clínico de fase II realizado en pacientes no diabéticas indica que metformina es bien tolerada y disminuye la subpoblación de células madre cancerosas en tumores de pacientes con COE avanzado (Broekman et al., 2020; Brown et al., 2020). Si bien aún se requieren estudios preclínicos más avanzados, estos hallazgos permiten proponer a la metformina como una alternativa prometedora para el tratamiento del cáncer de ovario.

1.6. Metformina y microRNAs en COE

El ovario expresa transportadores de cationes orgánicos (OCTs) y transportadores de extrusión de múltiples fármacos y toxinas (MATEs) mediante los cuales metformina lograría ingresar y salir de las células de ovario (Andreev et al., 2016; Ota et al., 2007). Se ha demostrado que este fármaco es capaz de acumularse en biopsias de tumores de ovario humano y de ratón, así como también, su uso disminuye el crecimiento tumoral, la metástasis, e incrementa la efectividad de cisplatino en un modelo de ratón *in vivo* de COE (X. Liu et al., 2016; Rattan et al., 2011). Estudios realizados en células de COE, han descrito que la metformina es capaz de inhibir la actividad y expresión del complejo I de la cadena transportadora de electrones (ETC) mitocondrial, disminuyendo el crecimiento celular y promoviendo apoptosis (Y. Wu et al., 2018). La interrupción de la actividad del complejo I de la ETC mitocondrial produce una disminución en la producción de adenosina trifosfato (ATP) con el consiguiente aumento en la proporción de adenosina monofosfato (AMP)/ATP citoplasmático, que facilita la fosforilación mediada por la quinasa hepática B1 de la subunidad catalítica de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), produciendo su

activación (Hardie et al., 2012; Hawley et al., 2010; Shaw et al., 2004). AMPK es uno de los blancos moleculares mejor descritos de metformina y es un regulador clave en el metabolismo energético de las células que inhibe procesos anabólicos asociados al crecimiento celular.

En los últimos años se han descubierto nuevos blancos moleculares de este fármaco asociados a los procesos de crecimiento y metabolismo tumoral, inflamación, angiogénesis y quimioresistencia (Daugan et al., 2016; Pernicova & Korbonits, 2014; Urpilainen et al., 2020). Esto incluye la modulación de los niveles de microRNAs. En este contexto, un estudio reportó que metformina es capaz de regular la expresión de Dicer para ejercer efectos antitumorales y regular la expresión de microRNAs (Blandino et al., 2012). Consistentemente, varios estudios han demostrado que metformina es capaz de alterar la expresión de una amplia variedad de microRNAs para ejercer efectos antitumorales en diferentes tipos de cáncer (Alimoradi et al., 2021). En COE, nuestro equipo de laboratorio ha demostrado que metformina es capaz de disminuir los efectos proliferativos y angiogénicos de NGF mediante el aumento de la expresión de miR-145 y miR-23b (Garrido et al., 2018; Garrido, Salvatierra, et al., 2020).

Considerando su establecido perfil de seguridad y su bajo costo, así como también sus propiedades antitumorales que involucran la regulación de microRNAs, metformina se perfila como un candidato atractivo como terapia complementaria en el tratamiento del COE. Sin embargo, debido a que las dosis de metformina administradas en estudios *in vitro* son mucho más elevadas que las dosis alcanzadas en sangre de pacientes usuarias de este fármaco, es necesario estudiar si los efectos antitumorales de este fármaco son logrados en concentraciones terapéuticas. Por lo que en esta memoria de título se estudió si metformina logra elevar los niveles de miR-145 y miR-23b en líneas celulares de COE, utilizando concentraciones crecientes que contemplen concentraciones terapéuticas.

1. HIPÓTESIS

“El tratamiento con metformina aumenta de manera proporcional a la dosis los niveles de miR-145 y miR-23b en diferentes líneas celulares de cáncer ovárico epitelial”

2. OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS

3.1. Objetivo general

Evaluar si la metformina aumenta los niveles de miR-145 y miR-23b de manera dosis-dependiente en líneas celulares de COE.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar los niveles de miR-23b en líneas celulares de COE estimuladas con concentraciones crecientes de metformina.
2. Evaluar los niveles de miR-145 en líneas celulares de COE estimuladas con concentraciones crecientes de metformina.

3. METODOLOGÍA

4.1. Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares de COE A2780, SKOV3 y OV90. La línea celular A2780 deriva de un adenocarcinoma primario de ovario proveniente de una paciente que no recibió tratamiento y fueron adquiridas de European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC). Las líneas celulares SKOV3 y OV90 derivan de la ascitis maligna y metástasis de pacientes con COE respectivamente, y ambas fueron adquiridas de American Type Culture Collection (ATCC).

4.2. Cultivo celular

Las líneas celulares se cultivaron en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% en un incubador que mantiene una temperatura de 37°C y una atmósfera con 5% de CO₂. Al alcanzar una confluencia del 80%, las células adheridas se lavaron con tampón fosfato salino, se disociaron con tripsina durante 5 minutos (A2780 y SKOV-3) o 3 minutos (OV-90) a 37°C, y se resuspendieron en medio RPMI 10% SFB. El número de células se determinó utilizando el contador automatizado LUNA (BioRad, Hercules, California, Estados Unidos) para evaluar la cantidad de suspensión celular a sembrar en los experimentos.

4.3. Tratamiento con metformina

Se sembraron 500.000 células en placas de cultivo de 6 pocillos y se incubaron en medio RPMI 10% SFB durante 24 h para permitir la adhesión de las células. Una vez adheridas las células, se reemplazó el medio de cultivo por RPMI 2% SFB y se estimularon con 1 µM, 10 µM, 100 µM, 1mM y 10mM de metformina (Sigma-Aldrich, San Luis, Misuri, Estados Unidos) durante 24 y 48 h, utilizando agua bidestilada como vehículo y control de tratamiento.

4.4. Extracción de RNA y cuantificación de miRNAs por RT-PCR en tiempo real

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento con metformina, se removió el medio de cultivo y las células se lavaron con tampón fosfato salino. Para la extracción de RNA se realizó una lisis celular utilizando reactivo QIAzol (Qiagen, Hilden, Alemania) y un raspador

de células. El producto de la lisis celular se transfirió a tubos eppendorf y se continuó la extracción, utilizando el kit miRNeasy (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La retrotranscripción de RNA se realizó utilizando el kit miScript II RT (Qiagen) que permite la retrotranscripción selectiva de microRNAs maduros, siguiendo el protocolo del fabricante. Para cuantificar los niveles de miR-145 y miR-23b se utilizó el kit miScript SYBR Green qPCR (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante, y el termociclador StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Específicamente, se midió miR-23b-3p y miR-145-5p ya que a estas hebras se les atribuye el efecto biológico observado para cada microRNA (Garrido, Torres, et al., 2020; Grossi et al., 2018). Los partidores utilizados para amplificar miR-145 y miR-23b se detallan en la Tabla 1 y fueron adquiridos a través de Qiagen. Se usó el RNA nuclear pequeño U6 (RNU6) como control endógeno y normalizador, cuya secuencia no es especificada por el proveedor (Qiagen), y como control negativo se utilizó agua libre de nucleasas.

miRNA	Secuencia (5'-3')
miR-145-5p	GUCCAGUUUUGCCAGGAAUCCCU
miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC

Tabla 1. Partidores utilizados en PCR en tiempo real.

El programa de temperatura utilizado para llevar a cabo las reacciones comprende un periodo inicial de activación de 15 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de periodos de denaturación a 94°C por 15 segundos, alineamiento a 55°C durante 30 segundos y extensión a 70°C durante 30 segundos. El programa de temperatura finaliza con una curva de fusión de 60 a 95°C.

4.5. Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados con la prueba estadística de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn, o la prueba estadística de Mann-Whitney, según corresponda. Se consideró un valor de $p < 0.05$ como criterio de significancia. Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 8.

5. RESULTADOS

5.1. Efecto de concentraciones micromolares de metformina sobre los niveles de miR-23b

Como se indica en la Figura 1 y Figura 2, las dosis de metformina con las que se trataron las diferentes líneas celulares se dividieron en concentraciones micromolares y milimolares. Se empleó esta separación para facilitar la descripción de los resultados en cada uno de los objetivos específicos, comenzando por concentraciones micromolares (1, 10 y 100 μM) de metformina y finalizando con concentraciones milimolares (1 y 10 mM).

Los resultados indican que solo en la línea celular A2780, concentraciones del orden micromolar de metformina incrementaron de manera significativa los niveles de miR-23b respecto a la condición control (Figura 1 y Tabla 2). Metformina 1 μM incrementó en un 78% los niveles de miR-23b tras 48 h de tratamiento, mientras que concentraciones de 10 μM produjeron un incremento del 40% (24 h) y 69% (48 h). Por otra parte, en células OV90, concentraciones micromolares de metformina produjeron una disminución del 29% (1 μM) y 45% (10 y 100 μM) en los niveles de miR-23b transcurridas 48 h de tratamiento (Figura 1C). No se observaron cambios significativos en los niveles de miR-23b en células SKOV3 al tratar con concentraciones micromolares de metformina (Figura 1B).

5.2 Efecto de concentraciones milimolares de metformina sobre los niveles de miR-23b

Respecto a las concentraciones más altas de metformina ensayadas (orden milimolar), los resultados muestran que el tratamiento durante 24 y 48 h con metformina 10 mM incrementó significativamente los niveles de miR-23b respecto a la condición control en todas las líneas celulares de cáncer de ovario (Figura 1 y Tabla 2). En células A2780, el incremento en los niveles de miR-23b fue del 154% (24 h) y 189% (48 h), en células SKOV3 el incremento fue del 120% (24 h) y 150% (48h), y en células OV90, se observó un incremento del 55% (24 h) y 61% (48 h) en los niveles de miR-23b. Por otra parte, el tratamiento con metformina 1 mM incrementó significativamente los niveles de miR-23b respecto a sus niveles basales únicamente en células A2780, logrando un aumento del 53% tras 24 h de tratamiento (Figura 1A). De forma contraria, en células OV90, el tratamiento con metformina 1mM disminuyó de manera significativa los niveles de miR-23b en un 30% tras 48 h (Figura 1C). No se observaron cambios en los niveles de miR-23b en células SKOV3 luego del

tratamiento con metformina 1 mM (Figura 1B).

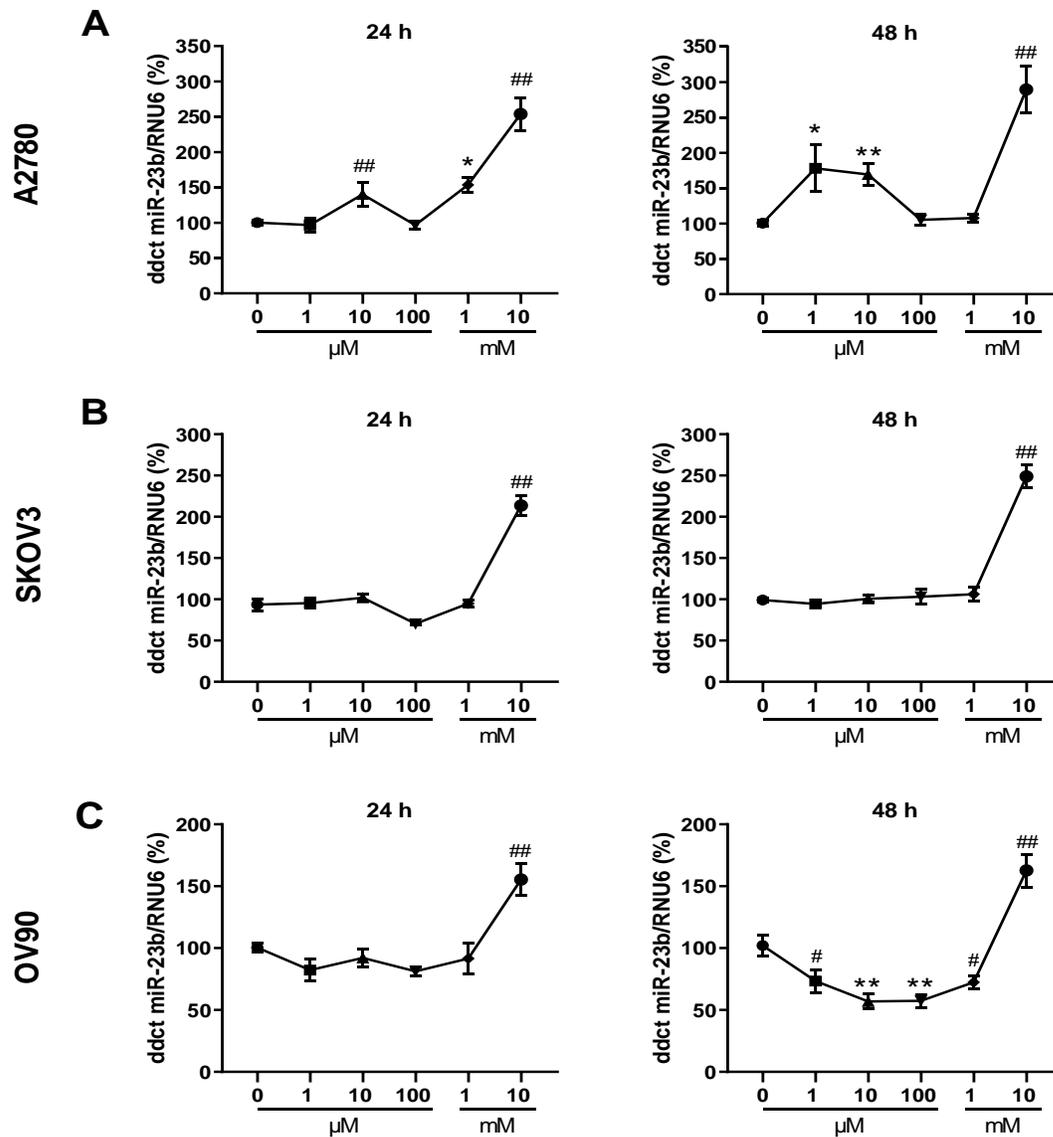


Figura 1. Niveles de miR-23b en líneas de cáncer ovárico epitelial tratadas con concentraciones crecientes de metformina. Las células A2780 (A), SKOV3 (B) y OV90 (C) fueron incubadas con diferentes concentraciones de metformina durante 24 y 48 h. Después de cada tratamiento, los niveles de miR-23b fueron evaluados por RT-PCR en tiempo real. Se utilizó el ARN nuclear pequeño U6 (RNU6) como control endógeno y normalizador. N=3 experimentos independientes en duplicado. * = $p < 0.05$ y ** = $p < 0.01$ con respecto a la condición control (concentración 0) de acuerdo con la prueba estadística de Kruskal Wallis y post-test de Dunn. # = $p < 0.05$ y ## = $p < 0.01$ con respecto al control de acuerdo con la prueba estadística de Mann-Whitney. Los resultados están expresados como la

Línea celular	Concentración de metformina									
	1 μ M		10 μ M		100 μ M		1 mM		10 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
A2780	-4%	78%	40%	69%	-4%	-5%	53%	-7%	154%	189%
SKOV3	2%	-5%	8%	2%	-23%	4%	1%	7%	120%	150%
OV90	-18%	-29%	-8%	-45%	-19%	-45%	-9%	-30%	55%	61%

Tabla 2. Porcentaje de cambio de los niveles de miR-23b en células de cáncer de ovario tratadas con metformina respecto a la condición control. Los cambios estadísticamente significativos respecto a la condición control se encuentran destacados en negrita.

5.3. Efecto de concentraciones micromolares de metformina sobre los niveles de miR-145

En la línea celular SKOV3, el tratamiento con concentraciones micromolares de metformina produjo un incremento significativo de los niveles de miR-145 respecto a la condición control (sin estímulo), el que alcanzó un incremento del 58% tras el tratamiento con metformina 10 μ M durante 24 h (Figura 2B). Por el contrario, en células A2780, el tratamiento con 100 μ M de metformina durante 24 h produjo una disminución significativa del 30% en los niveles de miR-145 (Figura 2A). En células OV90, el tratamiento con 1 μ M y 10 μ M de metformina produjo una disminución significativa a las 48 h del 31% y 36% respectivamente en los niveles de miR-145 (Figura 2A y 2C).

5.4. Efecto de concentraciones milimolares de metformina sobre los niveles de miR-145

El tratamiento con 10 mM de metformina fue el único tratamiento que logró incrementar de manera significativa los niveles de miR-145 respecto a la condición control en todas las líneas celulares de COE a las 24 y 48 h de tratamiento (Figura 2). En células A2780, los niveles de miR-145 incrementaron en un 167% (24 h) y 369% (48 h), en células SKOV3 el incremento en los niveles de miR-145 fue de un 70% (24 h) y 84% (48 h), y en células OV90, se registró un aumento del 61% (24 h) y 71% (48 h) en los niveles de miR-145 respecto a la condición control. Por otra parte, el tratamiento con 1 mM de metformina produjo cambios significativos en los niveles de miR-145 únicamente en células SKOV3, logrando un incremento del 50% tras 24 h de tratamiento (Figura 2B). No se observaron cambios significativos en los niveles de miR-145 en células A2780 u OV90 al tratar con 1 mM de

metformina (Figura 2A y 2B).

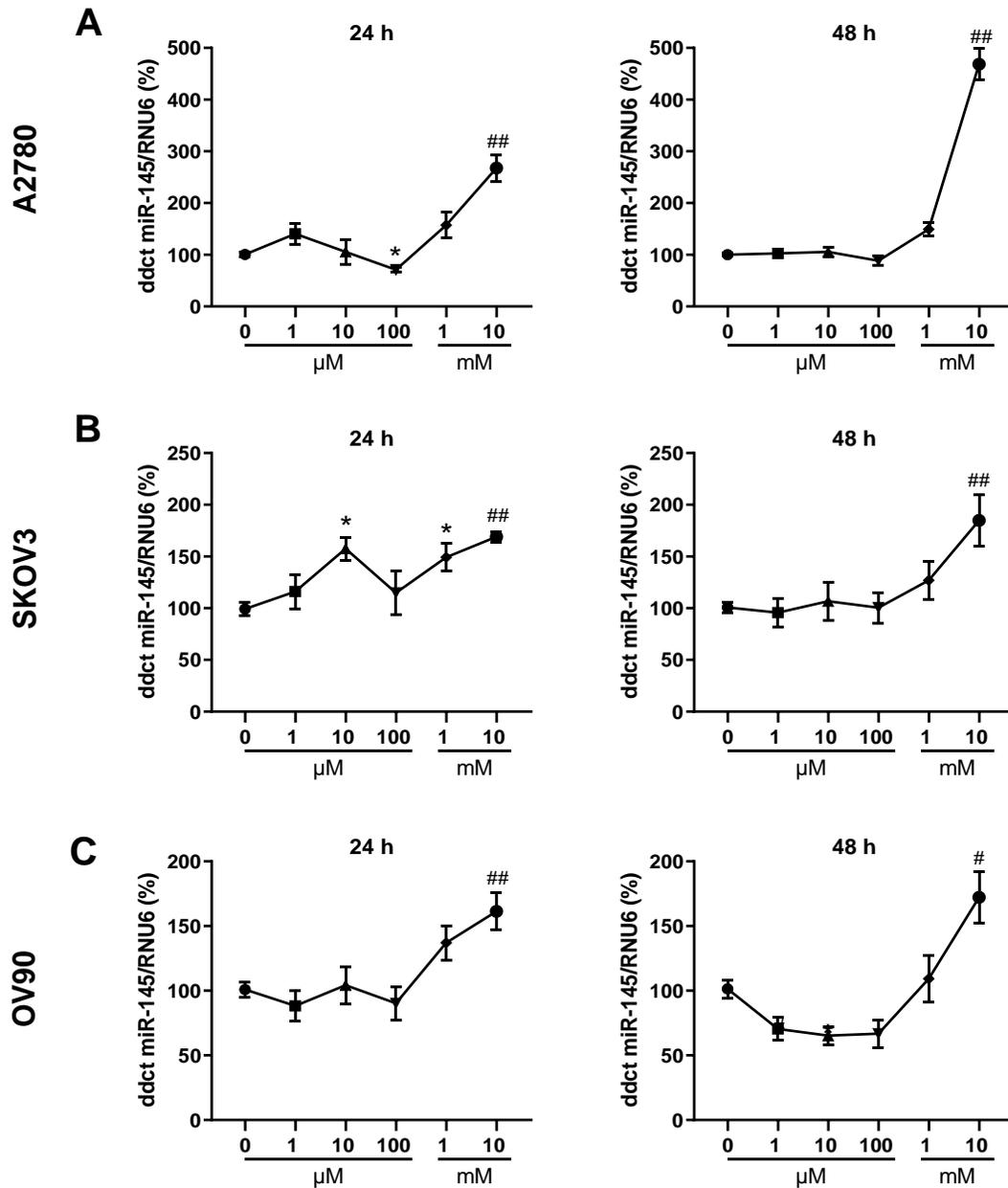


Figura 2. Niveles de miR-145 en líneas de cáncer ovárico epitelial tratadas con concentraciones crecientes de metformina Las células A2780 (A), SKOV3 (B) y OV90 (C) fueron incubadas con diferentes concentraciones de metformina durante 24 y 48 h. Después de cada tratamiento, los niveles de miR-145 fueron evaluados por RT-PCR en tiempo real. Se utilizó el ARN nuclear pequeño U6 (RNU6) como control endógeno y normalizador. N=3 experimentos independientes en duplicado. * = $p < 0.05$ con respecto al control de acuerdo con la prueba estadística de Kruskal Wallis y post-test de Dunn. # = $p < 0.05$ y ## = $p < 0.01$ con respecto al control de acuerdo con la prueba estadística de Mann-Whitney. Los resultados están expresados como la media \pm error estándar de la media (SEM).

Línea celular	Concentración de metformina									
	1 μ M		10 μ M		100 μ M		1 mM		10 mM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
A2780	40%	3%	5%	6%	-30%	6%	57%	49%	167%	369%
SKOV3	17%	-5%	58%	6%	16%	0%	50%	26%	70%	84%
OV90	-13%	-31%	3%	-36%	-11%	-35%	36%	8%	61%	71%

Tabla 3. Porcentaje de cambio de niveles de miR-145 en células de cáncer de ovario tratadas con metformina respecto a la condición control. Los cambios estadísticamente significativos respecto a la condición control se encuentran destacados en negrita.

6. DISCUSIÓN

Actualmente, la metformina es el medicamento de primera línea para tratar y prevenir la diabetes mellitus tipo 2, siendo indicado por la mayoría de las guías clínicas a nivel internacional (Ahmad et al., 2020; Flory & Lipska, 2019). Durante la última década, estudios retrospectivos han reportado efectos beneficiosos de metformina en el contexto del cáncer, por ejemplo, se ha asociado el uso de este fármaco con un mejor pronóstico en pacientes diabéticas que sufren de cáncer de ovario (Guo et al., 2022; Shi et al., 2019; Yao et al., 2022). Debido a que el perfil de seguridad y farmacocinética de metformina ya son conocidos, el reposicionamiento de este fármaco ha despertado interés como posible terapia complementaria en el tratamiento de esta enfermedad. En coherencia con estos hallazgos, estudios realizados en modelos preclínicos de cáncer de ovario, han demostrado que metformina ejerce efectos antitumorales e incrementa la eficacia de fármacos quimioterápicos, lo que ha perfilado a este fármaco como un candidato atractivo para su uso en el tratamiento de COE (P. Garrido et al., 2019; Urpilainen et al., 2020).

Se ha descrito que los efectos de metformina en células de cáncer son pleiotrópicos y pueden involucrar diferentes mecanismos como la regulación de la expresión de microRNAs, los cuales a su vez pueden regular la expresión de cientos de mRNA y cuyas proteínas se asocian a la progresión del cáncer (Alimoradi et al., 2021; Garrido, Salvatierra, et al., 2020). En células de COE, nuestro grupo de laboratorio ha observado que metformina incrementa los niveles de los microRNAs oncosupresores miR-145 y miR-23b, efecto que coincide con una disminución de la proliferación celular y una menor expresión de oncoproteínas como c-MYC y VEGF, involucradas en la proliferación y angiogénesis, procesos importantes para las células tumorales (Garrido et al., 2018; Garrido, Salvatierra, et al., 2020). Ambos microRNAs disminuyen durante la progresión del COE y regulan negativamente procesos tumorales como proliferación celular, crecimiento tumoral, metástasis y resistencia a quimioterapéuticos, tanto en líneas celulares como en modelos animales de COE (Garrido, Torres, et al., 2020; Retamales-Ortega et al., 2017; Zhu et al., 2014), por lo que el incremento de la expresión de estos microRNAs por parte de metformina constituye un atractivo efecto terapéutico.

La mayoría de los estudios que evalúan el efecto de metformina en células de cáncer de ovario, emplean concentraciones en el rango de 1 a 100 mM, cuya relevancia farmacológica ha sido cuestionada, ya que los regímenes de dosificación clínica de metformina

generalmente dan como resultados concentraciones plasmáticas de hasta 20 μM (Graham et al., 2011). Además, se ha demostrado que la metformina alcanza valores del orden micromolar, tanto en suero como en biopsias de tumores de pacientes con cáncer ovárico (X. Liu et al., 2016). Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo se analizaron los niveles de miR-145 y miR-23b en líneas celulares de COE tratadas con concentraciones crecientes de metformina, contemplando valores micromolares que podrían ser clínicamente relevantes. Además, tomando en cuenta la heterogeneidad intratumoral y las características clínico patológicas, las líneas celulares de COE utilizadas representan diferentes subtipos histológicos y moleculares de cáncer de ovario (Beaufort et al., 2014), y derivan de pacientes en diferentes estadios del cáncer. Las células A2780 derivan de un tumor primario de una paciente sin tratamiento; las células SKOV3 fueron aisladas de ascitis maligna de una paciente con COE; mientras que las células OV90 provienen de tejido metastásico pulmonar de una paciente con COE seroso de alto grado, el tipo más agresivo de la enfermedad (Lisio et al., 2019).

Si bien en este trabajo de memoria de título no se investigan los efectos de metformina sobre miR-145 y miR-23b en células no tumorales, estudios preliminares realizados por nuestro laboratorio indicaron que metformina incrementa los niveles de miR-145 y miR-23b en células HOSE (células epiteliales de la superficie ovárica no tumorales) (Garrido, Salvatierra, et al., 2020) Sin embargo, no se observaron efectos antitumorales y tampoco cambios en la expresión de oncoproteínas por tratamiento con metformina (Garrido et al., 2018; Garrido, Salvatierra, et al., 2020).

6.1. Concentraciones micromolares de metformina regulan de manera diferencial la expresión de miR-23b en líneas celulares de COE

Los resultados del primer objetivo específico planteado en este trabajo indicaron que concentraciones del orden micromolar de metformina incrementaron los niveles de miR-23b únicamente en células A2780, mientras que en células SKOV3 los niveles de miR-23b permanecieron inalterados, y en células OV90 ocurrió una disminución significativa en los niveles de miR-23b, con respecto al control (Tabla 2). Esto puede explicarse debido a que cada línea celular posee diferentes características moleculares y mutaciones específicas que podrían influenciar la respuesta a estímulos externos, como metformina. Los resultados obtenidos indican que metformina posee efectos diferenciales sobre los niveles de miR-23b en las diferentes líneas celulares estudiadas.

Un estudio realizado en células A2780 y SKOV3 mostró que es necesario alcanzar concentraciones de al menos 300 μ M y 1 mM de metformina para inhibir la proliferación de células A2780 y SKOV3, respectivamente (Shank et al., 2012). Este antecedente, sumado a los resultados obtenidos en esta memoria de título sugieren que en células A2780 el incremento en los niveles de miR-23b podría estar involucrado en los mecanismos anti proliferativos de metformina a concentraciones micromolares, no así en células SKOV3. Si bien en este trabajo no fue evaluado, es importante estudiar en el futuro si la magnitud del incremento en los niveles de miR-23b efectivamente tienen algún efecto sobre procesos tumorales de células A2780.

Una posible explicación del efecto diferencial de metformina observado en los niveles de miR-23b en células A2780 y SKOV3, puede estar relacionado a los niveles basales de este microRNA en cada línea celular, por lo que los efectos de metformina sobre el incremento en los niveles de miR-23b podrían ser más notorios en aquellas células con niveles basales más bajos de miR-23b, especialmente utilizando concentraciones bajas de metformina. Nuestro grupo ha observado previamente que los niveles basales de miR-23b están más elevados en células SKOV3 que en células A2780 (Garrido, Salvatierra, et al., 2020), lo que explicaría que los niveles de miR-23b en células SKOV3 permanezcan inalterados, mientras que en células A2780 aumenten de manera significativa, ante el estímulo de concentraciones micromolares de metformina (Tabla 2). Es importante considerar que estos efectos se estudiaron a temporalidades de 24 y 48 h, y sería importante dilucidar si existen cambios en los niveles de miR-23b en células SKOV3 a tiempos más prolongados de tratamiento, con metformina en concentraciones micromolares.

En el caso de células OV90, la disminución de los niveles de miR-23b resulta interesante e indicaría que metformina regula de manera diferencial los niveles de un mismo microRNAs según el tipo celular en el cual actúe. El COE se puede clasificar dependiendo de las características morfológicas y moleculares en tumores tipo I y tipo II (Kurman & Shih, 2016) Las células OV90 son representativas de un COE tipo II seroso de alto grado, que a diferencia de células A2780 y SKOV3, que representan un COE tipo I (Beaufort et al., 2014), es cromosómicamente inestable y posee mutaciones recurrentes que afectan a proteínas como p53, retinoblastoma y la vía de señalización Notch (Garrido et al., 2021). Esto puede llevar a pensar que probablemente el efecto de metformina sobre los niveles de miR-23b sea diferente en estas células (disminución) y que obedezca a un mecanismo antitumoral diferente, al menos a concentraciones micromolares de este fármaco. La discusión de este

comportamiento en células OV90 será abordada en mayor profundidad en la sección 5.2, en conjunto con los resultados sobre miR-145 en donde se obtuvo un comportamiento similar.

Por otra parte, la efectividad de metformina 1 y 10 μM en células A2780 sobre el incremento de los niveles de miR-23b es similar tras 48 h de tratamiento, y no aumentó a concentraciones más altas de 100 μM (Tabla 2). Estos resultados tienen una proyección clínica relevante, ya que el incremento en los niveles de miR-23b ocurrió a concentraciones bajas, del orden micromolar, y son cercanas a los valores de concentración de metformina que se han registrado en sangre de pacientes usuarios de este fármaco (hasta 20 μM) y tumores ováricos de pacientes (hasta 4 μM) (Graham et al., 2011; X. Liu et al., 2016). Además, en pacientes, la metformina se administra diariamente y durante periodos extendidos, por lo que este fármaco puede acumularse en tejidos ováricos, es decir, las pacientes se exponen por tiempos prolongados a la metformina y con refuerzos, pudiendo tener un efecto mayor en cuanto al aumento de miR-23b. En este sentido, es importante considerar que el aumento de miR-23b obtenido con metformina 10 μM en células A2780 fue mayor a tiempos largos (48h) comparado con las 24 h, sin embargo, sería importante estudiar a futuro si los efectos de metformina sobre los niveles de miR-23b en esta línea celular persisten en tiempos más prolongados de tratamiento. Finalmente, estos resultados sugieren que este fármaco podría ser útil en el tratamiento de tumores primarios (representados por las células A2780) de pacientes con COE en concentraciones clínicamente relevantes. Sin embargo, es necesario realizar estudios preclínicos en modelos animales para afirmar esto.

6.2. Concentraciones micromolares de metformina regulan de manera diferencial la expresión de miR-145 en líneas celulares de COE.

Al analizar los resultados del tratamiento con metformina a concentraciones del orden micromolar se observó que los niveles de miR-145 incrementaron únicamente en células SKOV3, mientras que en células A2780 y OV90 los niveles disminuyeron (Tabla 3). En este caso, de forma similar a los resultados obtenidos en miR-23b, los efectos diferenciales de metformina sobre los niveles de miR-145, pueden atribuirse a las diferencias que existen entre las líneas celulares. Nuestro grupo ha observado que los niveles basales de miR-145 son más bajos en células SKOV3 que en células A2780 (Garrido, Salvatierra, et al., 2020),

lo que explicaría en parte el incremento de miR-145 observado en células SKOV3 a concentraciones micromolares de metformina.

Las células SKOV3 son altamente migratorias e invasivas en comparación a otras líneas celulares de COE, como células A2780 (Hallas-Potts et al., 2019). miR-145 es considerado un supresor de la migración e invasión celular en diversas neoplasias malignas humanas (Xu et al., 2019), y en células de cáncer de ovario, incluyendo células SKOV3, posee blancos relacionados a estos procesos, como mucina-1 (MUC1) y metaloproteinasa-16 (MMP16) (J. Li et al., 2021; H. Wu et al., 2013). Además, metformina reduce la migración e invasión de células SKOV3 (Garrido, Salvatierra, et al., 2020), y se ha observado que a concentraciones micromolares reduce la expresión de proteínas asociadas a estos procesos (R. Zhang et al., 2015), lo que sugiere que el incremento en los niveles de miR-145 por el tratamiento de metformina en concentraciones micromolares observado en células SKOV3 podría tener un efecto inhibitorio sobre la migración e invasión.

De manera similar a como se señaló anteriormente, los resultados obtenidos en células SKOV3 tienen una proyección clínica relevante, ya que el incremento en los niveles de miR-145 se observó con el tratamiento de metformina 10 μM , concentraciones cercanas a los valores encontrados en sangre de pacientes usuarios de este fármaco (hasta 20 μM) y tumores ováricos de pacientes (hasta 4 μM) (Graham et al., 2011; X. Liu et al., 2016). A su vez, es importante destacar que metformina a bajas dosis produce tempranamente (24 h) un aumento en los niveles de miR-145 en células SKOV3 (Tabla 3). Este resultado sugiere que el tratamiento de metformina a dosis clínicamente relevantes puede ser efectiva durante periodos tempranos del tratamiento en pacientes con COE, así como también sugiere que podría ser importante en la prevención de ascitis maligna y la diseminación de células metastásicas a otros órganos. No obstante, sería importante estudiar estos efectos en modelos animales, así como también otras temporalidades de tratamiento y si la magnitud del incremento en los niveles de miR-145 obtenidos con concentraciones bajas de metformina ejerce un efecto negativo sobre procesos relacionados a migración e invasión en células SKOV3.

El trabajo en esta memoria de título mostró que en células A2780, concentraciones de 100 μM de metformina disminuyeron los niveles de miR-145, no así a concentraciones mayores (10 mM), donde se observó un aumento de los niveles de miR-145 (Tabla 3). Efectos antiproliferativos de metformina en concentraciones micromolares han sido observados en

otros estudios realizados en células A2780 (Shank et al., 2012). Esto sugiere que la disminución de los niveles de miR-145 en estas células podría ser necesaria para los efectos antitumorales de metformina en estas concentraciones. Este efecto se obtuvo tras 24 h de tratamiento, sin embargo, no se observaron cambios luego de 48 h. Sería importante evaluar a tiempos más prolongados de tratamiento si este comportamiento persiste y si efectivamente la disminución de miR-145 está asociada a mecanismo antitumorales de metformina. Por otra parte, debido a que metformina tiene efectos pleiotrópicos, es importante considerar posibles efectos compensatorios que podrían influenciar los cambios en los niveles de miR-145 en células de COE.

Al respecto, se ha demostrado en células de cáncer de ovario que la maduración de miR-145 está regulada por la quinasa p70s6k, que desfavorece la acción de DICER sobre pri-miR-145 (Lam et al., 2016). La quinasa p70s6k se encuentra río debajo de la señalización celular mediada por AKT, vía de señalización que en células de cáncer de ovario se encuentra sobre estimulada (Gao et al., 2004). La evidencia muestra que metformina inhibe la vía AKT de señalización y la activación de la quinasa p70s6k en células de cáncer de ovario (C. Li et al., 2012), por lo que es posible que el incremento en miR-145 observado en células SKOV3 tenga que ver con la inhibición de la vía AKT por metformina. Sin embargo, también se ha observado que metformina puede inducir la señalización por AKT como consecuencia de efectos compensatorios, a través de la activación de muerte celular y la inhibición de mTOR2 (Carew et al., 2011; Leclerc et al., 2013). Considerando estos antecedentes, la disminución en los niveles de miR-145 mediada por metformina en células A2780 podría ser producto de efectos compensatorios que favorezcan la señalización de AKT y en consecuencia la activación de p70s6k que inhibiría la maduración de miR-145, efectos que podrían ser más pronunciados a concentraciones bajas de metformina.

Por otra parte, los niveles de miR-23b en células A2780 incrementaron con el tratamiento de metformina en concentraciones micromolares (Tabla 2), y se ha observado que miR-23b es capaz de disminuir la expresión de p70s6k, lo cual podría favorecer la maduración de miR-145, pero también podría inducir un efecto compensatorio en favor de la señalización por AKT y p70s6k, y en consecuencia disminuir los niveles de miR-145 maduro. Entonces, dependiendo del contexto celular y la temporalidad escogida para la observación, es posible que metformina pueda aumentar o disminuir los niveles de miR-145. Considerando los efectos pleiotrópicos de metformina, en estudios futuros sería importante considerar los mecanismos regulación de microRNA que existen en cada célula, así como también los

mecanismos mediante los cuales metformina logra regular la expresión de estos microRNAs, para dilucidar estos hallazgos.

En células OV90, el tratamiento con metformina disminuyó los niveles de miR-145 (Tabla 3). Como se mencionó anteriormente, este comportamiento es similar al que se observó en los niveles de miR-23b, los cuales también disminuyeron en células OV90 (Tabla 2). En ambos casos, la disminución en los niveles de microRNAs ocurrieron a tiempos de tratamiento prolongados (48 h), mientras que no se observaron cambios a temporalidades de menores (24 h). Estos resultados sugieren que, en esta línea celular, metformina a bajas dosis requiere de tiempos prolongados de tratamiento para disminuir la expresión de miR-23b y miR-145. El efecto de metformina (a dosis bajas) en los procesos tumorales de las células OV90 no ha sido evaluado hasta la fecha, por lo que se requiere de más estudios para dilucidar si la disminución de los niveles de miR-23b y miR-145 efectivamente obedece a un mecanismo antitumoral de metformina. Sin embargo, se ha observado que miR-23b actúa como un microRNA oncogénico en líneas celulares de cáncer de pulmón (Wang et al., 2020) y considerando que las células OV90 provienen de un tejido metastásico pulmonar de una paciente con COE, se podría pensar que en estas células miR-23b pudiese actuar como un microRNA oncogénico debido a la influencia del microambiente tumoral existente en el pulmón. De esta manera la disminución de miR-23b por efecto de metformina en esta línea celular pudiese obedecer a un mecanismo antitumoral en el contexto celular de OV90. Sería importante estudiar el comportamiento de los microRNAs de células de cáncer ovárico según los diferentes microambientes tumorales a las que se expongan como consecuencia de metástasis a diferentes órganos, así como también la influencia que tiene metformina sobre los microRNAs en ese contexto, con el fin de evaluar la acción terapéutica de metformina en pacientes con COE avanzado.

Estudios científicos destacan la importancia de distinguir los efectos que tiene metformina a concentraciones suprafisiológicas de aquellos que se consiguen en concentraciones terapéuticas. Por ejemplo, se han propuesto diferentes modelos de la supresión de la producción de glucosa hepática en función de las concentraciones de metformina, pudiendo diferenciar mecanismos distintos para lograr el mismo efecto según se utilicen dosis supraterapéuticas o supratrapéuticas (He & Wondisford, 2015). Además, se ha sugerido que los estudios que emplean altas concentraciones de metformina pueden enmascarar los mecanismos que se observan a bajas concentraciones (He & Wondisford, 2015). En cuanto a los efectos en cáncer de ovario, el grupo de Erices et al., ha reportado que

concentraciones elevadas (dosis suprafarmacológicas) de metformina poseen efectos citotóxicos, mientras que metformina a concentraciones bajas (dosis terapéuticas), no induce muerte celular o altera el ciclo celular, pero si incrementa la eficacia de fármacos quimioterapéuticos en células de COE, lo que explicaría el efecto beneficioso de metformina observado en estudios retrospectivos en pacientes diabéticas con cáncer de ovario (Erices et al., 2013, 2017). En concordancia con esto, Yu et al., ha demostrado que dosis micromolares de metformina incrementan la sensibilidad a paclitaxel de células A2780 y SKOV3 resistentes y que su mecanismo de acción involucra la regulación del microRNA oncosupresor miR-3127 (Yu et al., 2022). Sin duda estas observaciones reflejan la diversidad y complejidad de la acción de metformina, así como también la necesidad de distinguir sus diferentes efectos según la dosis y dilucidar los mecanismos de acción sobre células de cáncer de ovario.

A su vez, es importante considerar que la actividad y expresión de los microRNAs están sujetos a regulación por la actividad de RNA endógenos competitivos (ceRNA), como los RNAs largos no codificantes (lncRNAs). Los lncRNAs, al igual que los mRNAs pueden poseer sitios de unión a microRNAs y competir por la unión a estos últimos, resultando una menor disponibilidad de microRNAs para silenciar mRNAs (Salmena et al., 2011). Estas interacciones entre lncRNAs, miRNAs y mRNAs, forman redes complejas de regulación génica, y se ha descrito que están involucradas en los mecanismos tumorales del cáncer ovárico (Braga et al., 2020; López-Camarillo et al., 2021). Se ha demostrado que metformina es capaz de regular la expresión de lncRNAs oncogénicos que están involucrados en estas redes de interacción en COE (Alimoradi et al., 2021), como por ejemplo la interacción que existe entre el lncRNA SNHG7 y miR-3127, en donde se demostró que concentraciones micromolares de metformina disminuyen la expresión de SNHG7 y aumentan la expresión de miR-3127 de manera concomitante en líneas celulares de COE (Yu et al., 2022). Esto indicaría que los mecanismos por el cual metformina incrementa la expresión de microRNAs supresores de tumores están asociados a su capacidad de regular negativamente lncRNAs oncogénicos. Si bien aún no se han descrito que miR-145 y miR-23b participen de este tipo de interacciones en el contexto del COE, sería interesante explorar estos mecanismos para dilucidar los efectos diferenciales de metformina observados bajo concentraciones micromolares en este trabajo de memoria de título.

Los antecedentes expuestos y la evidencia mostrada en este trabajo indica que, posiblemente los aumentos de miR-145 y miR-23b podrían estar implicados en los efectos antitumorales de metformina en bajas dosis (micromolares), en las líneas celulares A2780 y SKOV3. Así mismo, la disminución de miR-23b y miR-145 en células OV90 por efecto de metformina en bajas dosis también podría estar involucrada en los efectos antitumorales de este fármaco. Sin embargo, es importante considerar que metformina tiene efectos pleiotrópicos, por lo que el aumento o disminución de estos microRNAs corresponden a solo una parte que explica los efectos antitumorales de metformina, y que, según la dosis, el tiempo y la línea celular, metformina puede actuar de forma diferencial, ejerciendo mecanismos antitumorales diferentes.

6.3. Metformina en concentraciones supra terapéuticas incrementa los niveles de miR-23b y miR-145

En cuanto a los resultados del tratamiento con metformina a concentraciones del orden milimolar, se observó que la concentración 1 mM los niveles de miR-23b son similares a los obtenidos a concentraciones micromolares, es decir, incrementaron en células A2780, permanecieron inalterados en células SKOV3 y disminuyeron en células OV90 (Tabla 2). Este resultado sugiere que metformina 1 mM puede tener efectos equivalentes a los obtenidos en concentraciones micromolares. En cuanto a los niveles de miR-145, el tratamiento con metformina 1 mM aumentó los niveles únicamente en células A2780, mientras que en células A2780 y OV90 permanecieron inalterados (Tabla 3).

Nuestro equipo de laboratorio previamente demostró que el tratamiento con metformina 10 mM durante 48 h incrementa la abundancia de miR-145 y miR-23b en células A2780 y SKOV3 (Garrido, Salvatierra, et al., 2020). En el presente trabajo, se logró replicar estos resultados en ambas líneas celulares utilizando las mismas concentraciones, y además se obtuvieron resultados similares trabajando en otra temporalidad (24 h de tratamiento) (Tabla 2 y Tabla 3). Adicionalmente, el incremento de los niveles de expresión de miR-145 y miR-23b también se observó en células OV90, línea celular con la que no se había trabajado en este contexto previamente.

A diferencia de los resultados obtenidos con concentraciones más bajas de metformina, la estimulación con metformina 10 mM produjo un aumento en los niveles de ambos microRNAs, pero de diferente magnitud entre las líneas celulares de COE utilizadas. El incremento de miR-23b y miR-145 a una misma temporalidad estudiada, fue mayor en

células A2780, seguido de SKOV3 y OV90, indicando que cada línea celular posee diferente sensibilidad al tratamiento con metformina. En concordancia con esto, otros estudios han observado que metformina inhibe la proliferación celular mostrando una concentración inhibitoria del 50% (IC_{50}) de 9.89 mM y 41.7 mM en células A2780 y SKOV3, respectivamente (Cui et al., 2020). Esto indica que efectivamente, las células A2780 son más sensibles que las células SKOV3 a la acción de metformina. Si bien no se tiene referencia del IC_{50} de metformina en células OV90, se esperaría una eficacia menor de este fármaco comparado con células A2780 (de manera similar a lo encontrado en células SKOV3).

Esta diferencia puede tener relación con que este fármaco ingresa a las células a través de OCTs y escapa de la célula mediante MATEs, de manera que la abundancia de estos, así como también las mutaciones que puedan presentar, determinaría las concentraciones intracelulares que puede alcanzar metformina cada línea celular (Zolk, 2012). De acuerdo a esto, hay autores que, en líneas celulares de cáncer de ovario, han observado efectos diferenciales de metformina de acuerdo a los niveles de expresión de OCTs (Segal et al., 2011). Esto no se ha estudiado en las líneas celulares utilizadas en este trabajo, no obstante, los resultados sugieren que las células A2780 poseen mayor nivel de expresión de OCT comparado con las células SKOV3 y OV90. Por otra parte, si bien la relación entre la expresión de MATEs y la respuesta a metformina no ha sido estudiada en células de cáncer de ovario, se ha demostrado que algunas líneas celulares de cáncer poseen simultáneamente alta expresión de OCTs y baja expresión de MATEs, lo que incrementa sustancialmente la concentración intracelular y la sensibilidad a los efectos antiproliferativos de metformina en comparación a otras líneas celulares que no presentan estas características (Chowdhury et al., 2016). Por consiguiente, es necesario estudiar en el futuro los niveles de estos transportadores en las líneas celulares de COE, ya que podría ayudar a comprender mejor las diferencias en la sensibilidad a metformina que se encontraron en este estudio.

Finalmente, considerando la literatura descrita y los hallazgos realizados en este trabajo de memoria de título, se concluye que metformina puede regular la expresión de miR-145 y miR-23b en concentraciones terapéuticas y supraterapéuticas, y se sugiere que ambos microRNAs podrían estar implicados en los efectos antitumorales de metformina bajo estas condiciones en líneas celulares de COE. Es necesario considerar el estudio de dosis terapéuticas de metformina para entender de mejor forma los mecanismos antitumorales

de metformina como una aproximación clínica. Además, teniendo en consideración la heterogeneidad molecular del cáncer ovárico y los efectos diferenciales de metformina en las diferentes líneas celulares estudiadas, se propone que, si bien metformina exhibe efectos antitumorales que involucran la modulación de microRNAs, es necesario un mejor entendimiento de cómo actúa este fármaco en el contexto del cáncer, así como también qué tipo de pacientes (de acuerdo a las características del cáncer) obtendrían mayor beneficio de este fármaco con el propósito de mejorar y personalizar las opciones terapéuticas para pacientes con COE.

7. CONCLUSIONES

- Metformina en concentraciones terapéuticas y supraterapéuticas modula los niveles de expresión de miR-23b y miR-145 en líneas celulares de COE de manera diferencial, dependiendo de la línea celular estudiada y la temporalidad en la que se efectúe la medición.
- El comportamiento del aumento en los niveles de miR-145 y miR-23b observado en las diferentes líneas celulares no permiten concluir que es proporcional a la dosis de metformina, como planteaba la hipótesis.
- La evidencia acumulada en la literatura científica y los resultados obtenidos en este trabajo permiten sugerir que miR-23b y miR-145 pueden estar implicados en los efectos antitumorales de metformina a concentraciones terapéuticas (micromolares).
- Es necesario considerar el estudio de dosis terapéuticas de metformina para entender de mejor manera los mecanismos antitumorales de metformina como aproximación clínica.

8. PROYECCIONES

Dada la heterogeneidad molecular del COE es necesario un mejor entendimiento de cómo actúa metformina en este contexto. La modulación de los niveles de miR-145 y miR-23b por parte de metformina a concentraciones terapéuticas, y observada en las diferentes líneas celulares que representan diferentes estadios de la progresión del COE, es una buena aproximación para sentar las bases de futuros estudios preclínicos que permitan comprender los efectos y mecanismos antitumorales de metformina en las diferentes manifestaciones clínicas del COE.

Debido a la importancia de miR-145 y miR-23b en el desarrollo y progresión del COE, así como también la capacidad de metformina de regular estos microRNAs como parte de sus mecanismos antitumorales, sería importante explorar alternativas terapéuticas más eficientes y eficaces basadas en estas moléculas, como por ejemplo nano formulaciones. Al respecto, nuestro grupo de investigación ha realizado estudios *in vitro* en donde se evalúa la administración de miR-145 mediante nanopartículas de oro diseñadas para proporcionar selectividad a células de COE, logrando efectos antitumorales en modelos de cultivos de líneas celulares de COE 2D y 3D (Salas-Huenuleo et al., 2022). Además, actualmente, se está investigando una estrategia para administrar de manera conjunta metformina y microRNAs (miR-23b y miR-145), para el desarrollo de una posible terapia anticancerígena sinérgica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, E., Sargeant, J. A., Zaccardi, F., Khunti, K., Webb, D. R., & Davies, M. J. (2020). Where Does Metformin Stand in Modern Day Management of Type 2 Diabetes? *Pharmaceuticals*, *13*(12), 427. <https://doi.org/10.3390/ph13120427>
- Alimoradi, N., Firouzabadi, N., & Fatehi, R. (2021). How metformin affects various malignancies by means of microRNAs: A brief review. *Cancer Cell International*, *21*(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-01921-z>
- Andreev, E., Brosseau, N., Carmona, E., Mes-Masson, A.-M., & Ramotar, D. (2016). The human organic cation transporter OCT1 mediates high affinity uptake of the anticancer drug daunorubicin. *Scientific Reports*, *6*(1), 20508. <https://doi.org/10.1038/srep20508>
- Beaufort, C. M., Helmijr, J. C. A., Piskorz, A. M., Hoogstraat, M., Ruigrok-Ritstier, K., Besselink, N., Murtaza, M., van IJcken, W. F. J., Heine, A. A. J., Smid, M., Koudijs, M. J., Brenton, J. D., Berns, E. M. J. J., & Helleman, J. (2014). Ovarian cancer cell line panel (OCCP): Clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One*, *9*(9), e103988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103988>
- Bjornsdottir, H. H., Rawshani, A., Rawshani, A., Franzén, S., Svensson, A.-M., Sattar, N., & Gudbjörnsdottir, S. (2020). A national observation study of cancer incidence and mortality risks in type 2 diabetes compared to the background population over time. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73668-y>
- Blandino, G., Valerio, M., Cioce, M., Mori, F., Casadei, L., Pulito, C., Sacconi, A., Biagioni, F., Cortese, G., Galanti, S., Manetti, C., Citro, G., Muti, P., & Strano, S. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nature Communications*, *3*(1), 865. <https://doi.org/10.1038/ncomms1859>
- Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent

- dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>
- Braga, E. A., Fridman, M. V., Moscovtsev, A. A., Filippova, E. A., Dmitriev, A. A., & Kushlinskii, N. E. (2020). LncRNAs in Ovarian Cancer Progression, Metastasis, and Main Pathways: ceRNA and Alternative Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8855. <https://doi.org/10.3390/ijms21228855>
- Broekman, K. E., Hof, M. A. J., Touw, D. J., Gietema, J. A., Nijman, H. W., Lefrandt, J. D., Reyners, A. K. L., & Jalving, M. (2020). Phase I study of metformin in combination with carboplatin/paclitaxel chemotherapy in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Investigational New Drugs*, 38(5), 1454–1462. <https://doi.org/10.1007/s10637-020-00920-7>
- Brown, J. R., Chan, D. K., Shank, J. J., Griffith, K. A., Fan, H., Szulawski, R., Yang, K., Reynolds, R. K., Johnston, C., McLean, K., Uppal, S., Liu, J. R., Cabrera, L., Taylor, S. E., Orr, B. C., Modugno, F., Mehta, P., Bregenzer, M., Mehta, G., ... Buckanovich, R. J. (2020). Phase II clinical trial of metformin as a cancer stem cell-targeting agent in ovarian cancer. *JCI Insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.133247>
- Carew, J. S., Kelly, K. R., & Nawrocki, S. T. (2011). Mechanisms of mTOR inhibitor resistance in cancer therapy. *Targeted Oncology*, 6(1), 17–27. <https://doi.org/10.1007/s11523-011-0167-8>
- Chae, Y. K., Arya, A., Malecek, M.-K., Shin, D. S., Carneiro, B., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., Altman, J. K., Plataniias, L., & Giles, F. (2016). Repurposing metformin for cancer treatment: Current clinical studies. *Oncotarget*, 7(26), 40767–40780. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8194>
- Chandra, A., Pius, C., Nabeel, M., Nair, M., Vishwanatha, J. K., Ahmad, S., & Basha, R. (2019). Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes. *Cancer Medicine*, 8(16), 7018–7031. <https://doi.org/10.1002/cam4.2560>

- Chen, S., Wang, Y., Li, D., Wang, H., Zhao, X., Yang, J., Chen, L., Guo, M., Zhao, J., Chen, C., Zhou, Y., Liang, G., & Xu, L. (2022). Mechanisms Controlling MicroRNA Expression in Tumor. *Cells*, *11*(18), 2852. <https://doi.org/10.3390/cells11182852>
- Chen, S.-N., Chang, R., Lin, L.-T., Chern, C.-U., Tsai, H.-W., Wen, Z.-H., Li, Y.-H., Li, C.-J., & Tsui, K.-H. (2019). MicroRNA in Ovarian Cancer: Biology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(9), 1510. <https://doi.org/10.3390/ijerph16091510>
- Chen, X., Dong, C., Law, P. T. Y., Chan, M. T. V., Su, Z., Wang, S., Wu, W. K. K., & Xu, H. (2015). MicroRNA-145 targets TRIM2 and exerts tumor-suppressing functions in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, *139*(3), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.10.008>
- Chen, Y., Fu, L. L., Wen, X., Liu, B., Huang, J., Wang, J. H., & Wei, Y. Q. (2014). Oncogenic and tumor suppressive roles of microRNAs in apoptosis and autophagy. *Apoptosis*, *19*(8), 1177–1189. <https://doi.org/10.1007/s10495-014-0999-7>
- Chowdhury, S., Yung, E., Pintilie, M., Muaddi, H., Chaib, S., Yeung, M., Fusciello, M., Sykes, J., Pitcher, B., Hagenkort, A., McKee, T., Vellanki, R., Chen, E., Bristow, R. G., Wouters, B. G., & Koritzinsky, M. (2016). MATE2 Expression Is Associated with Cancer Cell Response to Metformin. *PLoS ONE*, *11*(12), e0165214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165214>
- Cui, Y., Zhou, J., & Rong, F. (2020). Combination of metformin and RG7388 enhances inhibition of growth and induction of apoptosis of ovarian cancer cells through the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *533*(4), 665–671. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.09.135>
- Daugan, M., Dufaÿ Wojcicki, A., d'Hayer, B., & Boudy, V. (2016). Metformin: An anti-diabetic drug to fight cancer. *Pharmacological Research*, *113*, 675–685. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.10.006>

- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), Article 7014. <https://doi.org/10.1038/nature03049>
- Dong, R., Liu, X., Zhang, Q., Jiang, Z., Li, Y., Wei, Y., Li, Y., Yang, Q., Liu, J., Wei, J.-J., Shao, C., Liu, Z., & Kong, B. (2014). miR-145 inhibits tumor growth and metastasis by targeting metadherin in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncotarget*, 5(21), 10816–10829.
- Erices, R., Bravo, M. L., Gonzalez, P., Oliva, B., Racordon, D., Garrido, M., Ibañez, C., Kato, S., Brañes, J., Pizarro, J., Barriga, M. I., Barra, A., Bravo, E., Alonso, C., Bustamante, E., Cuello, M. A., & Owen, G. I. (2013). Metformin, at concentrations corresponding to the treatment of diabetes, potentiates the cytotoxic effects of carboplatin in cultures of ovarian cancer cells. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20(12), 1433–1446. <https://doi.org/10.1177/1933719113488441>
- Erices, R., Cubillos, S., Aravena, R., Santoro, F., Marquez, M., Orellana, R., Ramírez, C., González, P., Fuenzalida, P., Bravo, M. L., Oliva, B., Kato, S., Ibañez, C., Brañes, J., Bravo, E., Alonso, C., García, K., Arab, C., Torres, V. A., ... Owen, G. I. (2017). Diabetic concentrations of metformin inhibit platelet-mediated ovarian cancer cell progression. *Oncotarget*, 8(13), 20865–20880. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15348>
- Flory, J., & Lipska, K. (2019). Metformin in 2019. *JAMA*, 321(19), 1926. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.3805>
- Friedman, R. C., Farh, K. K.-H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Gao, N., Flynn, D. C., Zhang, Z., Zhong, X.-S., Walker, V., Liu, K. J., Shi, X., & Jiang, B.-H. (2004). G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by

- PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 287(2), C281–C291. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00422.2003>
- Garrido, M. P., Fredes, A. N., Lobos-González, L., Valenzuela-Valderrama, M., Vera, D. B., & Romero, C. (2021). Current Treatments and New Possible Complementary Therapies for Epithelial Ovarian Cancer. *Biomedicines*, 10(1), 77. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10010077>
- Garrido, M. P., Salvatierra, R., Valenzuela-Valderrama, M., Vallejos, C., Bruneau, N., Hernández, A., Vega, M., Selman, A., Quest, A. F. G., & Romero, C. (2020). Metformin Reduces NGF-Induced Tumour Promoter Effects in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *Pharmaceuticals*, 13(10), 315. <https://doi.org/10.3390/ph13100315>
- Garrido, M. P., Torres, I., Avila, A., Chnaiderman, J., Valenzuela-Valderrama, M., Aramburo, J., Oróstica, L., Durán-Jara, E., Lobos-Gonzalez, L., & Romero, C. (2020). NGF/TRKA Decrease miR-145-5p Levels in Epithelial Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7657. <https://doi.org/10.3390/ijms21207657>
- Garrido, M. P., Vera, C., Vega, M., Quest, A. F. G., & Romero, C. (2018). Metformin prevents nerve growth factor-dependent proliferative and proangiogenic effects in epithelial ovarian cancer cells and endothelial cells. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 175883591877098. <https://doi.org/10.1177/1758835918770984>
- Graham, G. G., Punt, J., Arora, M., Day, R. O., Doogue, M. P., Duong, J. K., Furlong, T. J., Greenfield, J. R., Greenup, L. C., Kirkpatrick, C. M., Ray, J. E., Timmins, P., & Williams, K. M. (2011). Clinical pharmacokinetics of metformin. *Clinical Pharmacokinetics*, 50(2), 81–98. <https://doi.org/10.2165/11534750-000000000-00000>
- Grossi, I., Salvi, A., Baiocchi, G., Portolani, N., & De Petro, G. (2018). Functional Role of

- microRNA-23b-3p in Cancer Biology. *MicroRNA (Sharjah, United Arab Emirates)*, 7(3), 156–166. <https://doi.org/10.2174/2211536607666180629155025>
- Guo, M., Shang, X., & Guo, D. (2022). Metformin Use and Mortality in Women with Ovarian Cancer: An Updated Meta-Analysis. *International Journal of Clinical Practice*, 2022, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2022/9592969>
- Hallas-Potts, A., Dawson, J. C., & Herrington, C. S. (2019). Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas. *Scientific Reports*, 9(1), 5515. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41941-4>
- Hardie, D. G., Ross, F. A., & Hawley, S. A. (2012). AMPK: A nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(4), Article 4. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>
- Harding, J. L., Shaw, J. E., Peeters, A., Cartensen, B., & Magliano, D. J. (2014). Cancer Risk Among People With Type 1 and Type 2 Diabetes: Disentangling True Associations, Detection Bias, and Reverse Causation. *Diabetes Care*, 38(2), 264–270. <https://doi.org/10.2337/dc14-1996>
- Hawley, S. A., Ross, F. A., Chevtzoff, C., Green, K. A., Evans, A., Fogarty, S., Towler, M. C., Brown, L. J., Ogunbayo, O. A., Evans, A. M., & Hardie, D. G. (2010). Use of Cells Expressing γ Subunit Variants to Identify Diverse Mechanisms of AMPK Activation. *Cell Metabolism*, 11(6), 554–565. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.04.001>
- He, L., & Wondisford, F. E. (2015). Metformin Action: Concentrations Matter. *Cell Metabolism*, 21(2), 159–162. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.01.003>
- Hua, M., Qin, Y., Sheng, M., Cui, X., Chen, W., Zhong, J., Yan, J., & Chen, Y. (2019). miR-145 suppresses ovarian cancer progression via modulation of cell growth and invasion by targeting CCND2 and E2F3. *Molecular Medicine Reports*, 19(5), 3575–3583. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10004>

- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, É., Tuschl, T., & Zamore, P. D. (2001). A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science*, 293(5531), 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>
- Irie, H., Banno, K., Yanokura, M., Iida, M., Adachi, M., Nakamura, K., Umene, K., Nogami, Y., Masuda, K., Kobayashi, Y., Tominaga, E., & Aoki, D. (2016). Metformin: A candidate for the treatment of gynecological tumors based on drug repositioning. *Oncology Letters*, 11(2), 1287–1293. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4075>
- Iwakawa, H., & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*, 25(11), 651–665. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.011>
- Jayde, V., White, K., & Blomfield, P. (2009). Symptoms and diagnostic delay in ovarian cancer: A summary of the literature. *Contemporary Nurse*, 34(1), 55–65. <https://doi.org/10.5172/conu.2009.34.1.055>
- Jayson, G. C., Kohn, E. C., Kitchener, H. C., & Ledermann, J. A. (2014). Ovarian cancer. *Lancet (London, England)*, 384(9951), 1376–1388. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62146-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7)
- Jelovac, D., & Armstrong, D. K. (2011). Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(3), 183–203. <https://doi.org/10.3322/caac.20113>
- Jessmon, P., Boulanger, T., Zhou, W., & Patwardhan, P. (2017). Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 17(5), 427–437. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1299575>
- Kim, T. H., Song, J., Park, H., Jeong, J., Kwon, A., Heo, J. H., Kang, H., Kim, G., & An, H. J. (2015). miR-145, targeting high-mobility group A2, is a powerful predictor of patient outcome in ovarian carcinoma. *Cancer Letters*, 356(2, Part B), 937–945.

<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.011>

Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis. *The American Journal of Pathology*, 186(4), 733–747.

<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.011>

Kuroki, L., & Guntupalli, S. R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ*, m3773.

<https://doi.org/10.1136/bmj.m3773>

Lam, S. S. N., Ip, C. K. M., Mak, A. S. C., & Wong, A. S. T. (2016). A novel p70 S6 kinase-microRNA biogenesis axis mediates multicellular spheroid formation in ovarian cancer progression. *Oncotarget*, 7(25), 38064–38077.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.9345>

Leclerc, G. M., Leclerc, G. J., Kuznetsov, J. N., DeSalvo, J., & Barredo, J. C. (2013). Metformin Induces Apoptosis through AMPK-Dependent Inhibition of UPR Signaling in ALL Lymphoblasts. *PLOS ONE*, 8(8), e74420.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074420>

Ledermann, J. A. (2018). First-line treatment of ovarian cancer: Questions and controversies to address. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 10, 1758835918768232.

<https://doi.org/10.1177/1758835918768232>

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>

Li, C., Liu, V. W. S., Chan, D. W., Yao, K. M., & Ngan, H. Y. S. (2012). LY294002 and Metformin Cooperatively Enhance the Inhibition of Growth and the Induction of Apoptosis of Ovarian Cancer Cells. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 22(1), 15–22. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e3182322834>

Li, J., Li, X., Wu, L., Pei, M., Li, H., & Jiang, Y. (2019). miR-145 inhibits glutamine metabolism through c-myc/GLS1 pathways in ovarian cancer cells. *Cell Biology International*,

43(8), 921–930. <https://doi.org/10.1002/cbin.11182>

Li, J., Lu, J., Ye, Z., Han, X., Zheng, X., Hou, H., Chen, W., Li, X., & Zhao, L. (2017). 20(S)-Rg3 blocked epithelial-mesenchymal transition through DNMT3A/miR-145/FSCN1 in ovarian cancer. *Oncotarget*, 8(32), 53375–53386. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18482>

Li, J., Zhang, S., Wu, L., Pei, M., & Jiang, Y. (2021). Berberine inhibited metastasis through miR-145/MMP16 axis in vitro. *Journal of Ovarian Research*, 14(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00752-2>

Li, J., Zhang, S., Zou, Y., Wu, L., Pei, M., & Jiang, Y. (2019). miR-145 promotes miR-133b expression through c-myc and DNMT3A-mediated methylation in ovarian cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4291–4301. <https://doi.org/10.1002/jcp.29306>

Li, W., Liu, Z., Chen, L., Zhou, L., & Yao, Y. (2014). MicroRNA-23b is an independent prognostic marker and suppresses ovarian cancer progression by targeting runt-related transcription factor-2. *FEBS Letters*, 588(9), 1608–1615. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.055>

Lisio, M.-A., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z., & Telleria, C. (2019). High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 952. <https://doi.org/10.3390/ijms20040952>

Liu, J., Carmell, M. A., Rivas, F. V., Marsden, C. G., Thomson, J. M., Song, J.-J., Hammond, S. M., Joshua-Tor, L., & Hannon, G. J. (2004). Argonaute2 Is the Catalytic Engine of Mammalian RNAi. *Science*, 305(5689), 1437–1441. <https://doi.org/10.1126/science.1102513>

Liu, X., Romero, I. L., Litchfield, L. M., Lengyel, E., & Locasale, J. W. (2016). Metformin Targets Central Carbon Metabolism and Reveals Mitochondrial Requirements in Human Cancers. *Cell Metabolism*, 24(5), 728–739.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.09.005>

López-Camarillo, C., Ruíz-García, E., Salinas-Vera, Y. M., Silva-Cázares, M. B., Hernández-de la Cruz, O. N., Marchat, L. A., & Gallardo-Rincón, D. (2021). Deciphering the Long Non-Coding RNAs and MicroRNAs Coregulation Networks in Ovarian Cancer Development: An Overview. *Cells*, 10(6), Article 6. <https://doi.org/10.3390/cells10061407>

Lujambio, A., & Lowe, S. W. (2012). The microcosmos of cancer. *Nature*, 482(7385), Article 7385. <https://doi.org/10.1038/nature10888>

Ministerio de Salud. Análisis descriptivo y de tendencias de la mortalidad por cáncer en Chile entre 1990 y 2015 [Internet]. Santiago de Chile; 2019 [citado 2 de junio de 2023] Disponible en: [https:// goo.gl/oe2iVt](https://goo.gl/oe2iVt)

Nguyen, V. H. L., Yue, C., Du, K. Y., Salem, M., O'Brien, J., & Peng, C. (2020). The Role of microRNAs in Epithelial Ovarian Cancer Metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), Article 19. <https://doi.org/10.3390/ijms21197093>

Ota, K., Ito, K., Akahira, J., Sato, N., Onogawa, T., Moriya, T., Unno, M., Abe, T., Niikura, H., Takano, T., & Yaegashi, N. (2007). Expression of Organic Cation Transporter SLC22A16 in Human Epithelial Ovarian Cancer: A Possible Role of the Adriamycin Importer. *International Journal of Gynecological Pathology*, 26(3), 334–340. <https://doi.org/10.1097/01.pgp.0000236951.33914.1b>

Ovarian Cancers: Evolving Paradigms in Research and Care. (2016). National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/21841>

P. Garrido, M., Vega, M., & Romero, C. (2019). Antitumoral Effects of Metformin in Ovarian Cancer. In *Metformin [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88911>

Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal*

Transduction and Targeted Therapy, 1, 15004.

<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>

Pernicova, I., & Korbonits, M. (2014). Metformin—Mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nature Reviews Endocrinology*, 10(3), 143–156.

<https://doi.org/10.1038/nrendo.2013.256>

Peter, M. E. (2010). Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: The next step. *Oncogene*, 29(15), 2161–2164. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.59>

Qian, H., Wang, D., He, B., Liu, Q., Xu, Y., Wu, D., Chen, C., Zhang, W., Leong, D. T., & Wang, G. (2022). Assembling defined DNA nanostructures with anticancer drugs: A metformin/DNA complex nanoplatform with a synergistic antitumor effect for KRAS-mutated lung cancer therapy. *NPG Asia Materials*, 14(1), Article 1.

<https://doi.org/10.1038/s41427-022-00427-y>

Rattan, R., Graham, R. P., Maguire, J. L., Giri, S., & Shridhar, V. (2011). Metformin Suppresses Ovarian Cancer Growth and Metastasis with Enhancement of Cisplatin Cytotoxicity In Vivo. *Neoplasia*, 13(5), 483-IN28. <https://doi.org/10.1593/neo.11148>

Retamales-Ortega, R., Oróstica, L., Vera, C., Cuevas, P., Hernández, A., Hurtado, I., Vega, M., & Romero, C. (2017). Role of Nerve Growth Factor (NGF) and miRNAs in Epithelial Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 507.

<https://doi.org/10.3390/ijms18030507>

Salas-Huenuleo, E., Hernández, A., Lobos-González, L., Polakovičová, I., Morales-Zavala, F., Araya, E., Celis, F., Romero, C., & Kogan, M. J. (2022). Peptide Targeted Gold Nanoplatform Carrying miR-145 Induces Antitumoral Effects in Ovarian Cancer Cells. *Pharmaceutics*, 14(5), 958. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050958>

Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell*, 146(3), 353–358.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>

- Segal, E. D., Yasmeen, A., Beauchamp, M.-C., Rosenblatt, J., Pollak, M., & Gotlieb, W. H. (2011). Relevance of the OCT1 transporter to the antineoplastic effect of biguanides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414(4), 694–699. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.134>
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455(7209), Article 7209. <https://doi.org/10.1038/nature07228>
- Shank, J. J., Yang, K., Ghannam, J., Cabrera, L., Johnston, C. J., Reynolds, R. K., & Buckanovich, R. J. (2012). Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecologic Oncology*, 127(2), 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.07.115>
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., DePinho, R. A., & Cantley, L. C. (2004). The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(10), 3329–3335. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308061100>
- Sheng, Q., Zhang, Y., Wang, Z., Ding, J., Song, Y., & Zhao, W. (2020). Cisplatin-mediated down-regulation of miR-145 contributes to up-regulation of PD-L1 via the c-Myc transcription factor in cisplatin-resistant ovarian carcinoma cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 200(1), 45–52. <https://doi.org/10.1111/cei.13406>
- Shi, J., Liu, B., Wang, H., Zhang, T., & Yang, L. (2019). Association of metformin use with ovarian cancer incidence and prognosis: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 29(1), 140–146. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2018-000060>
- Shin, C. (2008). Cleavage of the Star Strand Facilitates Assembly of Some MicroRNAs into Ago2-containing Silencing Complexes in Mammals. *Molecules and Cells*, 26(3),

308–313.

- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(1), 7–34. <https://doi.org/10.3322/caac.21551>
- Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłło, K., & Hogendorf, P. (2022). miRNAs in Cancer (Review of Literature). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2805. <https://doi.org/10.3390/ijms23052805>
- Su, H., Trombly, M. I., Chen, J., & Wang, X. (2009). Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes & Development*, 23(3), 304–317. <https://doi.org/10.1101/gad.1749809>
- Triggle, C. R., Mohammed, I., Bshesh, K., Marei, I., Ye, K., Ding, H., MacDonald, R., Hollenberg, M. D., & Hill, M. A. (2022). Metformin: Is it a drug for all reasons and diseases? *Metabolism: Clinical and Experimental*, 133, 155223. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155223>
- Urpilainen, E., Puistola, U., Boussios, S., & Karihtala, P. (2020). Metformin and ovarian cancer: The evidence. *Annals of Translational Medicine*, 8(24), 1711–1711. <https://doi.org/10.21037/atm-20-1060>
- Vidigal, J. A., & Ventura, A. (2015). The biological functions of miRNAs: Lessons from in vivo studies. *Trends in Cell Biology*, 25(3), 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2014.11.004>
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., & Andreelli, F. (2012). Cellular and molecular mechanisms of metformin: An overview. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 122(6), 253–270. <https://doi.org/10.1042/CS20110386>
- Wang, L., Hu, Z., Guo, Q., Yang, L., Pang, Y., & Wang, W. (2020). MiR-23b functions as an oncogenic miRNA by downregulating Mcl-1S in lung cancer cell line A549. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(7), e22494. <https://doi.org/10.1002/jbt.22494>

- Wang, L., Wu, X., Wang, B., Wang, Q., & Han, L. (2017). Mechanisms of miR-145 regulating invasion and metastasis of ovarian carcinoma. *American Journal of Translational Research*, 9(7), 3443–3451.
- Wu, H., Xiao, Z., Wang, K., Liu, W., & Hao, Q. (2013). MiR-145 is downregulated in human ovarian cancer and modulates cell growth and invasion by targeting p70S6K1 and MUC1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 693–700. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.053>
- Wu, Y., Gao, W.-N., Xue, Y.-N., Zhang, L.-C., Zhang, J.-J., Lu, S.-Y., Yan, X.-Y., Yu, H.-M., Su, J., & Sun, L.-K. (2018). SIRT3 aggravates metformin-induced energy stress and apoptosis in ovarian cancer cells. *Experimental Cell Research*, 367(2), 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.03.030>
- Xu, W.-X., Liu, Z., Deng, F., Wang, D.-D., Li, X.-W., Tian, T., Zhang, J., & Tang, J.-H. (2019). MiR-145: A potential biomarker of cancer migration and invasion. *American Journal of Translational Research*, 11(11), 6739–6753.
- Yan, J., Jiang, J., Meng, X.-N., Xiu, Y.-L., & Zong, Z.-H. (2016). MiR-23b targets cyclin G1 and suppresses ovarian cancer tumorigenesis and progression. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 35, 31. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0307-1>
- Yao, K., Zheng, H., & Li, T. (2022). Association Between Metformin Use and the Risk, Prognosis of Gynecologic Cancer. *Frontiers in Oncology*, 12, 942380. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.942380>
- Yu, Z., Wang, Y., Wang, B., & Zhai, J. (2022). Metformin Affects Paclitaxel Sensitivity of Ovarian Cancer Cells Through Autophagy Mediated by Long Noncoding RNASNHG7/miR-3127-5p Axis. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 37(9), 792–801. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3390>
- Zhang, R., Zhang, P., Wang, H., Hou, D., Li, W., Xiao, G., & Li, C. (2015). Inhibitory effects

- of metformin at low concentration on epithelial–mesenchymal transition of CD44+CD117+ ovarian cancer stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 262.
<https://doi.org/10.1186/s13287-015-0249-0>
- Zhang, S., Pei, M., Li, Z., Li, H., Liu, Y., & Li, J. (2018). Double-negative feedback interaction between DNA methyltransferase 3A and microRNA-145 in the Warburg effect of ovarian cancer cells. *Cancer Science*, 109(9), 2734–2745.
<https://doi.org/10.1111/cas.13734>
- Zhang, W., Wang, Q., Yu, M., Wu, N., & Wang, H. (2014). MicroRNA-145 function as a cell growth repressor by directly targeting c-Myc in human ovarian cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 13(2), 161–168.
<https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500367>
- Zhao, S., Zhang, Y., Pei, M., Wu, L., & Li, J. (2021). miR-145 inhibits mitochondrial function of ovarian cancer by targeting ARL5B. *Journal of Ovarian Research*, 14, 8.
<https://doi.org/10.1186/s13048-020-00762-0>
- Zhu, X., Li, Y., Xie, C., Yin, X., Liu, Y., Cao, Y., Fang, Y., Lin, X., Xu, Y., Xu, W., Shen, H., & Wen, J. (2014). miR-145 sensitizes ovarian cancer cells to paclitaxel by targeting Sp1 and Cdk6. *International Journal of Cancer*, 135(6), 1286–1296.
<https://doi.org/10.1002/ijc.28774>
- Zolk, O. (2012). Disposition of metformin: Variability due to polymorphisms of organic cation transporters. *Annals of Medicine*, 44(2), 119–129.
<https://doi.org/10.3109/07853890.2010.549144>