

## ESTUDO DOS EFEITOS DA METFORMINA NA VIA DE TRANSDUÇÃO DA MTOR/S6KS EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO

Ana Paula Morelli<sup>1\*</sup>, Isadora Carolina Betim Pavan<sup>1</sup>, Fernando Riback Silva<sup>1</sup>, Tharcísio Citrangulo Tortelli Jr<sup>2</sup>, Roger Chammas<sup>2</sup>, Fernando Moreira Simabuco<sup>1</sup>

1. Laboratório de Distúrbios do Metabolismo (LabDiMe) — Faculdade de Ciências Aplicadas (FCA) — Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

2. Instituto do Câncer (ICUSP) — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)

### Resumo:

A via metabólica da proteína mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) está associada ao controle do balanço energético do organismo, reconhecendo a disponibilidade de nutrientes e sinalizando para gasto ou armazenamento energético. Dentre as doenças associadas à regulação ou disfunção dessa via, podemos destacar o câncer. A metformina, tratamento do diabetes capaz de inibir mTOR, tem apresentado importante papel no combate ao câncer e sua combinação a quimioterápicos vem sendo bastante efetiva no tratamento da doença. Por isso, o presente trabalho visou estudar os efeitos do tratamento com metformina na via de mTOR em células de câncer de pulmão em combinação à cisplatina, tratamento comum nesse câncer. Para isso, células A549 de câncer de pulmão foram submetidas ao tratamento com metformina e cisplatina para identificar os efeitos na modulação da via de sinalização da mTOR e os efeitos dessa modulação para a célula, como na proliferação e no tamanho celular.

**Palavras-chave:** Metformina, Câncer, mTOR.

**Apoio financeiro:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

### Introdução:

A via da mTOR está envolvida em diferentes distúrbios metabólicos, como obesidade, diabetes e câncer e tem como papel chave agir como um sensor da disponibilidade de nutrientes, estimulada por aminoácidos, ATP e insulina<sup>1,3</sup>. Uma vez estimulada, a via é capaz de promover processos anabólicos e o crescimento celular e inibir o catabolismo. Atualmente, o câncer é tido como uma das doenças mais importantes e um dos fatores mais relevantes de

mortalidade em países desenvolvidos<sup>4</sup>, sendo o câncer de pulmão um dos mais importantes na mortalidade global. Mesmo com o desenvolvimento de métodos de diagnóstico precoce e novas modalidades de tratamento, o prognóstico ainda é baixo<sup>5</sup>, enfatizando a necessidade de respostas acerca do câncer de pulmão e seu tratamento.

As terapias convencionais do câncer de pulmão consistem em quimioterapias baseadas em fármacos contendo platina, combinados a outro fármaco citotóxico ou radioterapia<sup>6</sup>. A metformina, usada no tratamento do diabetes tipo 2, a partir de 2005 passou a ser associada à menor incidência de câncer, sendo alvo de pesquisas nesta área. Existem diversos mecanismos de ação já determinados para a atuação da metformina contra o câncer, divididos em mecanismos dependentes e independentes de AMPK, uma das proteínas-chave que regulam seus efeitos no diabetes<sup>7</sup>. Além dos efeitos sistêmicos, que incluem a diminuição da glicemia e aumento da captação da glicose pelo músculo, existem efeitos diretos da metformina que estão relacionados à inibição do complexo de mTOR em diferentes níveis: inibição do complexo 1 da mitocôndria, inibição das RAG GTPases pela proteína Ragulator, inibição de AMPK através de LKB1 e inibição da inflamação via NF-κB<sup>7</sup>.

A combinação de metformina e cisplatina tem mostrado bastante eficácia no câncer de pulmão, mas os mecanismos isolados e combinados destes tratamentos ainda não estão claros. Por isso, este projeto teve como objetivo analisar os efeitos do tratamento com metformina em células A549 de câncer de pulmão, a fim de encontrar possíveis mecanismos moleculares de ação nessa doença, especialmente relacionados à modulação da via da mTOR, visto que ela exerce papel chave na síntese proteica, crescimento e proliferação celular.

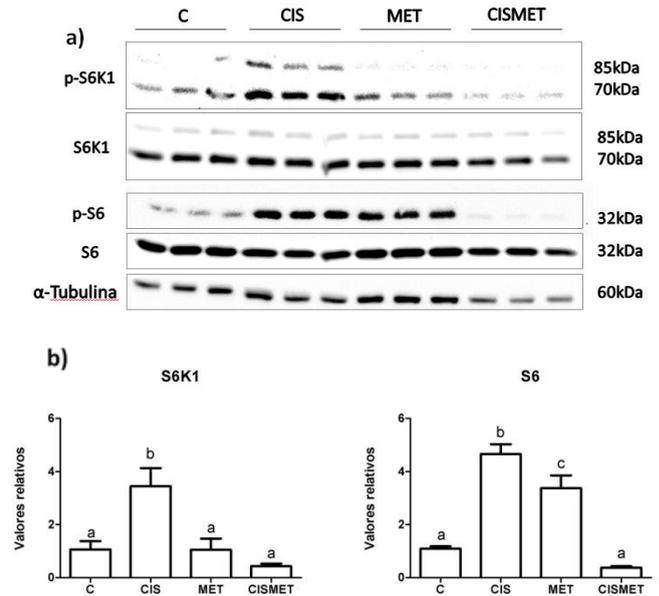
## Metodologia:

O trabalho foi realizado com base em 3 procedimentos principais: a farmacoterapia em cultura de células, a técnica de *western blotting* e a técnica de citometria de fluxo. Células A549 de câncer de pulmão foram obtidas através do Instituto do Câncer (ICESP) em colaboração com a Faculdade de Medicina da Universidade do Estado de São Paulo (FMUSP) e, quando cultivadas, foram tratadas com cisplatina 10 mM, metformina 10 mM ou rapamicina 100 nM nos experimentos de citometria. Na técnica de *western blotting*, os extratos proteicos das células foram transferidos para uma membrana de nitrocelulose para analisar a modulação das proteínas da via da mTOR, como S6K1 e S6, através de anticorpos específicos. Para a citometria, foi utilizado o citômetro BD Accuri C6 e, no experimento de ciclo celular, as células foram submetidas à marcação com iodeto de propídeo antes da análise.

## Resultados e Discussão:

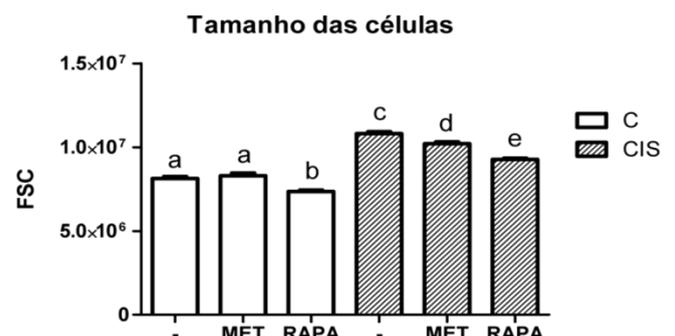
Ensaios na literatura<sup>8</sup> mostram que as células A549 possuem uma mutação no gene que codifica a proteína LKB1, que potencializa a transformação de células pré-neoplásicas e impede a ação da metformina via AMPK. Por isso, avaliamos se existe diferença na resposta à metformina na linhagem A549 e em uma linhagem de câncer que possui LKB1 funcional (PC3, câncer de próstata). Após tratá-las com metformina por duas e quatro horas, é possível observar que a atividade de AMPK aumenta gradativamente em células PC3, mas não em células A549. Por isso, acredita-se que os efeitos positivos da metformina ocorrem de forma independente de LKB1-AMPK em células A549.

As células foram submetidas então ao tratamento com cisplatina (comum neste tipo de câncer), metformina ou a combinação de ambas por 72 horas. Podemos ver que quando são tratadas com cisplatina, as células apresentam aumento da fosforilação de proteínas da via da mTOR, S6K1 e S6 (figura 1). O estímulo à via e seus efeitos leva ao crescimento e proliferação celular, uma resposta não desejada relacionada a este tratamento. Esse estímulo da via pode ser revertido com o tratamento com metformina, uma vez que ela é capaz de reduzir a fosforilação dessas proteínas quando combinada à cisplatina.



**FIGURA 1– Metformina é capaz de aumentar os efeitos da cisplatina revertendo o aumento da sinalização de mTOR/S6Ks.** Células A549 foram tratadas com metformina 10mM, cisplatina 10mM ou a combinação destas por 72 horas (n=3). Os gráficos (figura 1B) mostram a densitometria das bandas da análise por *western blotting* (figura 1A). As letras representam a diferença entre os tratamentos com significância  $p < 0,05$  usando o pós-teste de *Bonferroni* pela análise estatística *One-Way ANOVA*

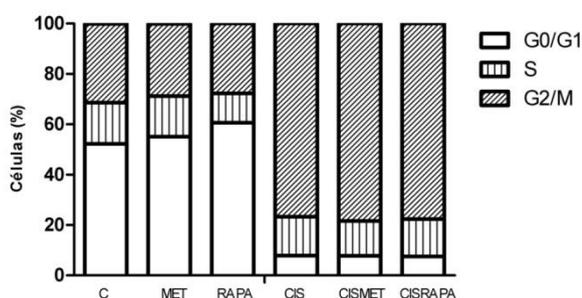
Durante os tratamentos, foi observado através de microscopia ótica que as células apresentaram um aumento de tamanho após o tratamento com cisplatina. Através de uma análise por citometria de fluxo, o aumento do tamanho celular foi confirmado. Após a exposição prévia à cisplatina, as células foram então submetidas ao tratamento com metformina ou rapamicina, um inibidor específico de mTOR, por 24 horas. Foi observada a reversão do crescimento induzido por cisplatina (figura 2), indicando uma relação promissora entre as alterações da via da mTOR e o crescimento nessa linhagem celular.



**FIGURA 2– Cisplatina é capaz de aumentar o tamanho celular, que pode ser reduzido em**

**combinação à metformina.** As células tratadas com cisplatina 10 mM foram submetidas ao tratamento com metformina 10mM ou rapamicina 100mM por 24 horas (c=3). As letras representam a diferença entre os tratamentos com significância  $p < 0,05$  utilizando pós-teste de Tukey pela análise estatística *One-Way ANOVA*.

Para explicar a interferência do tratamento no tamanho celular, as células foram submetidas à citometria de fluxo para análise do ciclo celular. Foi possível observar que as células controle tendem a se acumular em G0/G1, enquanto que, após o tratamento com cisplatina, passam a se acumular em G2/M, independentemente da combinação com metformina.



**FIGURA 3– Cisplatina altera as fases do ciclo celular em células A549.** Células tratadas com cisplatina 10 mM por 72 horas foram posteriormente tratadas com metformina 10 mM ou rapamicina 10 mM por mais 72 horas (n=3). O gráfico representa o conjunto das fases do ciclo celular.

### Conclusões:

O estudo mostrou que cisplatina aumenta o tamanho das células e que a metformina é capaz de diminuir esses efeitos. O aumento no tamanho celular induzido pela cisplatina foi acompanhado pela modulação da via da mTOR, a qual foi revertida pelo tratamento com metformina. Foi comprovado também que a cisplatina modifica as fases do ciclo celular, porém, não houve efeitos significativos da metformina nessa mudança. Os resultados deste estudo preliminar remetem fortemente a uma relação entre o tratamento e a via da mTOR/S6Ks, porém, mais estudos são necessários para identificar globalmente seu mecanismo de ação.

### Referências bibliográficas:

1. ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v.12, n.1, p.21-35.

2011.

2. HALL, M. N. mTOR-what does it do? **Transplant Proceedings**, v.40, n.10, p. 5-8, dec.2008.

3. DANN, S. G.; SELVARAJ, A.; THOMAS, G. mTOR complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v.13, n.6, p.252-259, apr. 2007.

4. BRAY F.; JEMAL A.; GREY N.; FERLAY J.; FORMAN D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **The Lancet Oncology**, v.13, n.8, 2012.

5. WANG, J.; GAO, Q.; WANG, D.; WANG, Z.; HU, C. Metformin inhibits growth of lung adenocarcinoma cells by inducing apoptosis via the mitochondria-mediated pathway. **Oncology Letters**, v.10, p. 1343-1349, 2015.

6. YAZDI, M.T.; SCHINKELSHOEK, M.S.; LOOF, N.M.; TAUBE, C.; HIEMSTRA, P.S.; WELTERS, M.J.P.; VAN DER BURG, S. H. Standard radiotherapy but not chemotherapy impairs systemic immunity in non-small cell lung cancer. **Oncoimmunology**, v.5, n.12, p. 1-9, 2016.

7. PERNICOVA, I.; KORBONITS, M. Metformin – mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. **Nature Reviews Endocrinology**, v.10, n.3, p. 143-156, jan. 2014.

8. XIAO, P.; SUN, L.; WANG, J.; HAN, R.; MA, Q.; ZHONG, D. LKB1 gene inactivation does not sensitize non-small cell lung cancer to mTOR inhibitor in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.36, p. 1107-1112, 2015.