

# O uso da metformina como adjuvante para reverter a redução da citotoxicidade da cisplatina na presença da alantoina

Paz, G.S.<sup>1</sup>, Amorim, G.C.<sup>1</sup>, Fernandes, J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Numpex-Bio, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

## Introdução

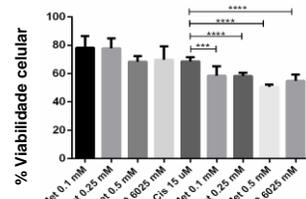
A síndrome da lise tumoral (SLT) é uma desordem metabólica que pode comprometer o funcionamento de diversos órgãos, tal como dos rins, neste caso associado a hiperuricemia. Para tratar a SLT vem sendo empregado a rasburicase, produzindo a alantoina. Recentemente, nosso grupo demonstrou que elevados níveis de alantoina, semelhante ao que é encontrado em pacientes oncológicos sob uso da rasburicase, promove o comprometimento da citotoxicidade da cisplatina em linhagem de leucemia mieloide crônica (K562). Visto a importância da manutenção do uso concomitante da cisplatina e da rasburicase, nosso grupo avaliou e demonstrou a capacidade da metformina em recuperar os efeitos citotóxicos da cisplatina na presença da alantoina na linhagem K562.

## Casuística e Métodos

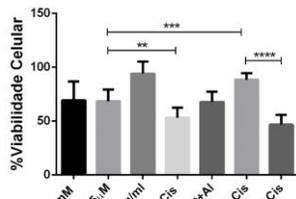
Este estudo visa compreender como a metformina promove a recuperação da citotoxicidade da cisplatina. Para este estudo, a linhagem K562 foi mantida em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,5% de penicilina-estreptomicina à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Durante os experimentos, as células foram incubadas em meio RPMI 1640 a baixa glicose (0,5mM) por 2h e então tratadas com metformina (0,5 a 3mM), cisplatina (15 a 33µM), alantoina (100 e 200µg/ml), rotenona (0,125 a 2µM) e suas combinações por 48h. Ensaios de viabilidade celular, RMN, análise de ciclo celular e de morfologia foram realizados.

## Resultados

Nossos resultados mostraram: (1) o sinergismo entre metformina e cisplatina, (2) a recuperação da citotoxicidade da cisplatina pela metformina, (3) alterações do efeito da cisplatina sobre o ciclo celular pela alantoina, (4) a ausência de interação entre a metformina e cisplatina, (5) a interação entre metformina e alantoina, (6) a capacidade da rotenona em restaurar a citotoxicidade da cisplatina na presença da alantoina e (7) o sinergismo entre a rotenona e a cisplatina.



**Fig. 1:** A combinação entre a metformina e a cisplatina promove maior citotoxicidade sobre as células de LMC (K562) em relação aos seus empregos em monoterapia. As células foram incubadas com metformina (0,1, 0,25, 0,5 e 0,6025 mM), cisplatina (15 µM) e suas combinações sob baixa disponibilidade de glicose (0,5 mM) por 48 h, e a viabilidade celular foi obtida por ensaio de MTT. As colunas representam a média ± DP dos três experimentos feitos em triplicata (n=3). \*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001

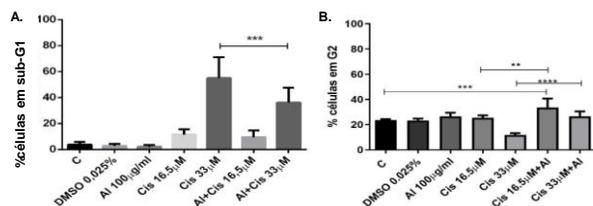


**Fig. 2:** Metformina restaura os efeitos citotóxicos da cisplatina na presença da alantoina em linhagem de LMC (K562). As células foram incubadas com metformina (0,5 mM), cisplatina (15 µM), alantoina (200 µg/ml) e suas combinações sob baixa disponibilidade de glicose (0,5 mM) por 48 h e a viabilidade celular foi obtida por MTT. As colunas representam a média ± DP dos três experimentos feitos em triplicata (n=3). \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001

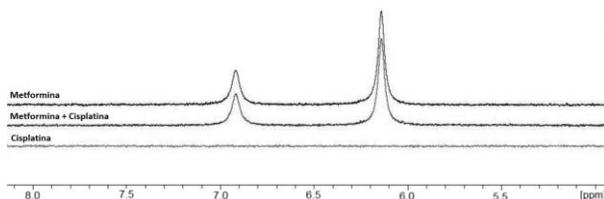
Fármaco	Dcom (µM)	IC <sub>50</sub> (D) (µM)	Dcom/IC <sub>50</sub> (D)	CI
Cisplatina	15	20	0,75	0,95
Metformina	500	2500	0,2	0,95

**Tabela 1:** Cálculo do índice de combinação (CI) para a determinação do efeito resultante da combinação entre metformina e cisplatina na linhagem K562. Dcom: concentração do fármaco que na combinação induz 50 % de viabilidade celular. IC<sub>50</sub>: concentração do fármaco que inibe 50 % da viabilidade celular. CI: índice de combinação resultante.

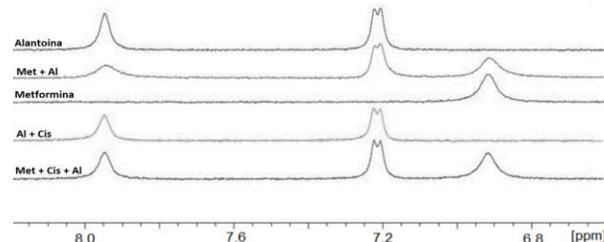
## Resultados



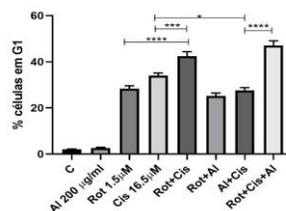
**Fig. 3:** O impacto da alantoina sobre as alterações no ciclo celular promovidas pela cisplatina. A. % da população celular em sub-G1. B. % da população celular em G2. As células foram tratadas com DMSO (0,025 %), alantoina (100 µg/ml), cisplatina (16,5 e 33 µM) e suas combinações sob baixa disponibilidade de glicose (0,5 mM) por 48 h e incubadas com a solução HFS por 1 h à 4°C, após a análise do ciclo celular ocorreu através de citometria de fluxo. As colunas representam a média ± DP dos três experimentos feitos em triplicata (n=3). \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.



**Fig. 4:** Ausência de interação entre a metformina e a cisplatina através de ensaio de RMN. Metformina (2,4 mM), cisplatina (40 µM) e sua combinação foram incubadas por 72 h à 37°C e os espectros foram obtidos através de H<sup>1</sup>RMN.



**Fig. 5:** Interação entre metformina e alantoina. Metformina (2,4 mM), cisplatina (40 µM), alantoina (380 µg/ml) e suas combinações foram incubadas por 72 h à 37°C e os espectros foram obtidos através de H<sup>1</sup>RMN.



**Fig. 6:** Rotenona reproduz o efeito adjuvante da metformina em recuperar os efeitos citotóxicos da cisplatina reduzidos pela alantoina em nível de ciclo celular. % da população celular em sub-G1. As células foram tratadas com rotenona (1,5 µM), cisplatina (16,5 µM), alantoina (200 µg/ml) e suas combinações sob baixa disponibilidade de glicose (0,5 mM) por 48 h e, posteriormente, incubadas com a solução HFS por 1 h à 4°C e a análise do ciclo celular foi realizada através de citometria de fluxo. As colunas representam a média ± DP dos três experimentos feitos em triplicata (n=3). \*p < 0,05, \*\*p < 0,001 e \*\*\*\*p < 0,0001.

Fármaco	Dcom (µM)	IC <sub>50</sub> (D) (µM)	Dcom/IC <sub>50</sub> (D)	CI
Cisplatina	8,25	20	0,41	0,66
Rotenona	0,125	0,5	0,25	0,66

**Tabela 2:** Cálculo do índice de combinação (CI) para a determinação do efeito resultante da combinação entre rotenona e cisplatina na linhagem K562. Dcom: concentração do fármaco que na combinação induz 50 % de viabilidade celular. IC<sub>50</sub>: concentração do fármaco que inibe 50 % da viabilidade celular. CI: índice de combinação resultante.

## Conclusões

Através deste estudo conclui-se que a metformina exerce o seu papel adjuvante ao recuperar os efeitos citotóxicos da cisplatina, antes reduzido pela alantoina, de forma independente e dependente dos seus efeitos mitocondriais.

## Contato

Grazielle Silva Paz – grazisilvapaz@gmail.com  
Janaina Fernandes – janainaf@biof.ufrj.br