AMANDA CAMPELO LIMA MELO FEITOSA

**IMPACTO DA VIA DE SINALIZAÇÃO AMPK NA
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE ANTITUMORAL POR
LINFÓCITOS T CD4⁺ E CD8⁺**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Niels Olsen Saraiva Câmara

Versão Original

São Paulo

2019

RESUMO

Campelo L. M. Feitosa, A. Impacto da via de sinalização AMPK na modulação da resposta imune antitumoral por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

Já foi descrito que o tratamento com metformina interfere no desenvolvimento e na progressão de tumores. Além da atuação direta através das modificações geradas no metabolismo, a metformina impacta a atividade das células do sistema imune e da célula tumoral, levando a modificações no microambiente tumoral que podem ser benéficas ou não. Sabendo que o efeito da metformina é em parte devido à ativação das vias AMPK e mTOR, formulamos a hipótese de que a ausência da via AMPK no linfócito T CD4⁺ e CD8⁺ influenciaria a progressão do melanoma murino B16F10. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar se o impacto da via metabólica da AMPK em linfócitos T é capaz de alterar o processo de desenvolvimento tumoral no modelo de melanoma murino, bem como compreender quais são os mecanismos imunes efetores envolvidos neste processo. Em um trabalho prévio já publicado pelo nosso grupo, mostramos que, *in vivo*, a metformina apresenta um efeito antitumoral significativo. Vimos que esse efeito é parcialmente dependente do sistema imune e que os linfócitos T possuem um importante papel nessa proteção. Sabendo disto, utilizamos animais do sistema Cre-lox que não possuíam AMPK (CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl}) e Raptor (CD4^{cre}+Raptor^{fl/fl}) no linfócito T CD4⁺ e CD8⁺. Vimos que os animais CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl} são protegidos do desenvolvimento tumoral nos dois modelos de melanoma analisados e que os pulmões com tumor destes animais possuem uma menor população de linfócitos T CD4⁺, CD4⁺PD-1⁺, T CD8⁺PD-1⁺, uma maior população de linfócitos T CD8⁺IFN-γ⁺ bem como uma menor população de linfócitos T CD4⁺ no baço e no tumor primário destes animais. Vimos ainda no pulmão dos animais CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl} com tumor, uma maior expressão relativa do genes *tnf-α* e *hk-2*. Quanto aos animais CD4^{cre}+Raptor^{fl/fl} observamos que estes possuem também um menor desenvolvimento de metástases pulmonares e uma maior sobrevivência em relação aos animais controle. Mostramos também que a deleção de AMPK não é capaz de alterar a proliferação de linfócitos T e nem interferir na diferenciação destas células em células Tregs. Já o tratamento de linfócitos T CD4⁺ ativados com metformina foi capaz de alterar a proliferação destas células de maneira independente de AMPK nos linfócitos T bem como interferiu na diferenciação de células Tregs apenas nos animais CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl}. Quanto ao metabolismo, vimos que a deleção de AMPK nos linfócitos T diminuiu a massa mitocondrial e o potencial de membrana de linfócitos T CD4⁺ ativados, porém não interferiu na respiração celular destas células (OXPHOS). Já quando tratamos estas células com metformina, notamos que os linfócitos T CD4⁺ de ambos os animais usados fazem menos OXPHOS, mostrando que esse efeito é independente da via AMPK nos linfócitos T, além de reduzir a massa mitocondrial de maneira dependente de AMPK nos linfócitos T. Juntos, estes resultados sugerem que AMPK e mTORC1 no linfócito T é prejudicial no contexto do melanoma murino B16F10 e que a deleção de AMPK nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ altera aspectos imunes e metabólicos.

Palavras-chave: Melanoma; Linfócito T; AMPK; mTOR; Metformina.

ABSTRACT

Campelo L. M. Feitosa, A. Impact of the AMPK signaling pathway on the modulation of the antitumor immune response by T cells CD4⁺ and CD8⁺ [Tese (Doutorado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2019.

It has been reported that metformin treatment interferes with the development and progression of tumors and, in addition to direct action through changes in metabolism, it is possible that alterations impact the activity of cells of the immune system, as well as the tumor cell, leading to modifications on the tumor microenvironment that may or may not be beneficial. Considering that the effect of metformin results, in part, by the activation of AMPK and mTOR pathways, we hypothesized that the absence of these pathways in CD4⁺ and CD8⁺ T cells would influence the progression of murine melanoma B16F10. Therefore, the purpose of this study is to evaluate whether the impact of AMPK metabolic pathway on T cells is able to cause modifications on tumor development process of the murine melanoma model, as well as to understand what are the effector immune mechanisms involved in this process. In previous work already published by our group, we demonstrated that *in vivo* metformin has a significant antitumor effect. We have seen that this effect is partially dependent on the immune system and that T cells plays an important role in this protection. Based on this, we used animals of the Cre-lox system that did not have AMPK (CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl}) and Raptor (CD4^{cre}+Raptor^{fl/fl}) in the CD4⁺ and CD8⁺ T cells. We have seen that CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl} animals are protected from tumor development in the two melanoma models analyzed and that the tumor lungs of these animals have a smaller CD4⁺, CD4⁺PD1⁺, CD8⁺PD-1⁺ T cell population, a larger population of CD8⁺IFN- γ ⁺ T cells, as well as a smaller population of CD4⁺ T cells in the spleen and primary tumor of these animals. We also verified a higher relative expression of the *tnf- α* and *hk-2* genes in the lung of CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl} animals with tumor. As for the CD4^{cre}+Raptor^{fl/fl} animals, we observed that they also have a lower development of lung metastases and a longer survival than control animals. We also demonstrated that AMPK deletion cannot change T cells' proliferation and cannot interfere on the differentiation of these cells into Tregs cells of the tested concentrations, but treatment of metformin-activated CD4⁺ T cells was able to modify proliferation of these cells of independently AMPK in T cells as well as interfered Tregs cell differentiation only in CD4^{cre}+AMPK^{fl/fl} animals. Regarding metabolism, we verified that deletion of AMPK in T cells decreased mitochondrial mass and membrane potential of activated CD4⁺ T cells, but did not interfere cellular respiration of these cells (OXPHOS). When we treated these cells with metformin, we noted that CD4⁺ T cells of both animals do less OXPHOS, demonstrating that this effect is independent of the AMPK pathway in T cells, in addition to reducing AMPK-dependent mitochondrial mass in T cells. Together, these results suggests that AMPK and mTORC1 in T cells is prejudicial in the context of murine melanoma B16F10 and that deletion of AMPK in CD4⁺ and CD8⁺ T cells changes immune and metabolic aspects.

Key-words: Melanoma; T cells; AMPK; mTOR; Metformin.

1. Introdução

1.1 Epidemiologia do câncer

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, ficando atrás somente de doenças do coração (1). Futuramente, acredita-se que o câncer será a principal causa de morte e a mais importante barreira para o aumento da expectativa de vida no século XXI (1, 2).

Segundo estimativas da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) da OMS (Organização Mundial da Saúde), em 2018, esta doença foi responsável por 9,6 milhões de óbitos, onde 70% destes ocorreram em países de baixa e média renda, correspondendo a um em cada seis mortes (3). Neste mesmo ano houve 17 milhões de novos casos de câncer e estima-se que em 2040 haverá 27,5 milhões de novos casos de câncer no mundo e 16,3 milhões de mortes por câncer devido ao crescimento e envelhecimento da população (2, 4).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que no biênio 2018-2019, a ocorrência de câncer será de aproximadamente 600 mil novos casos, onde o tipo de câncer mais frequente em homens será o de próstata e em mulheres será o de mama (5). Assim, podemos afirmar que o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, onde a prevenção e o controle devem ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas culturalmente, socialmente e economicamente até as mais desfavorecidas (6).

O câncer é uma doença caracterizada por um comportamento celular desregulado, na qual as células adquirem características oncogênicas, perdem as funções de supressão tumoral e adquirem estratégias de escape do sistema imune. Os linfócitos Tumorais possuem a capacidade de se proliferar de maneira ilimitada e se espalham para sítios distantes através do processo de metástase (7).

Nos últimos anos, têm-se buscado compreender os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de metástase, no qual o modelo proposto mais conhecido indica que há uma série sucessiva de eventos denominada “cascata metastática” através das quais as células neoplásicas: (1) proliferam localmente estabelecendo uma lesão primária, enquanto adquirem progressivamente alterações genéticas adicionais, invadem o microambiente local

e promovem a angiogênese; (2) migram para os vasos capilares ou linfonodos sentinela pré-existentes ou pré-formados para ocasionalmente cair na circulação; (3) permanecem como células tumorais circulantes (no inglês *circulating tumor cells* ou *CTCs*) até encontrarem condições favoráveis para o extravasamento; (4) extravasam e colonizam tecidos distantes até alcançarem um nicho (pré) metastático; e (5) permanecem em um estado relativamente quiescente como células tumorais disseminadas (no inglês *disseminated tumor cells* ou *DTCs*) ou como micrometástases até voltarem a se proliferar para estabelecer uma doença metastática detectável clinicamente (macrometástases) (8).

Hoje, está claro que o processo de metástase ocorre não apenas pelos mecanismos intrínsecos das células tumorais que conferem a estas novas funções como também pelos mecanismos sistêmicos e microambientais (9). Segundo a hipótese denominada “Semente e Solo”, a propensão mostrada por cada tipo de câncer para colonizar um órgão alvo específico seria determinado pelo fato de que as células tumorais poderem promover lesões metastáticas exclusivamente em microambientes característicos que são propícios ao crescimento tumoral (10). Nesse contexto, tornou-se extremamente relevante a caracterização do microambiente tumoral (MAT), com o intuito de auxiliar na compreensão e tratamento do câncer (11).

O MAT é extremamente complexo, consistindo de elementos diversos, tal como componentes da matriz extracelular (MEC), como a laminina e colágeno, fatores de crescimento, incluindo fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), nutrientes como a glicose e concentrações variáveis de oxigênio. Coletivamente, esses componentes providenciam a arquitetura necessária para a invasão e supre sinais que controlam os fenômenos celulares, incluindo diferenciação, crescimento e sobrevivência (12). Por conta disto, o MAT surgiu como um importante fator no contexto do melanoma, sendo crucial na iniciação desta neoplasia (12).

1.2 Melanoma: características, epidemiologia e tratamento

O melanoma é um tipo de câncer de pele que surge da transformação de células produtoras de pigmento, os melanócitos. A grande maioria dos melanomas aparece na pele, outros sítios de origem incluem a mucosa oral e anogenital,

esôfago, meninges, e notadamente os olhos (13-15). Estudos recentes mostraram que baixos níveis de oxigênio (hipóxia) podem ser essenciais para a transformação dos melanócitos (16), e que a MEC, condicionada por células agressivas de melanoma, pode transformar epigeneticamente os melanócitos normais em direção a um fenótipo de melanoma mais invasivo (17).

O melanoma era um tipo de câncer considerado raro, porém, nos últimos 50 anos a incidência deste tipo de câncer aumentou mais rapidamente que qualquer outro tipo (18-21). A taxa de incidência mundial do melanoma é de 3,3 por 100.000 habitantes, sendo considerado o 19º câncer mais frequente (5) e em relação à mortalidade, em 2012, o melanoma foi a causa de 55.488 óbitos no mundo e, no Brasil, ocorreram em 2015, 1.012 óbitos devido a esta neoplasia (22).

O melanoma acomete principalmente mulheres jovens e de meia idade e homens acima de 55 anos de idade (23). O principal fator de risco ambiental para o desenvolvimento do melanoma é a radiação ultravioleta do sol (UV), principalmente os raios UV-B (24). Sabe-se que o UV-A artificial também é um fator de risco ambiental e além destes fatores, os fatores de risco associados ao hospedeiro, como susceptibilidade genética e possuir um nevo melanocítico hereditário ou adquirido também são importantes no desenvolvimento desta neoplasia (25, 26). Desde modo, entender os fatores que promovem a transformação dos melanócitos e a progressão do melanoma são de extrema relevância (12).

Inúmeras alterações moleculares ocorrem nas células cancerígenas durante o desenvolvimento tumoral e a identificação destas alterações pode ser útil para melhor classificação do estadiamento tumoral bem como para o desenvolvimento de terapias direcionadas mais eficazes (27, 28).

No melanoma, comumente são encontradas mutações nos genes *braf* (*v-raf sarcome viral oncogene homolog B1*) e *nras* (*neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*), correspondendo a aproximadamente cerca de 40-60% e 20%, respectivamente (29). Estes dois genes estão envolvidos na via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) que regulam a proliferação e sobrevivência celular (30, 31). A mutação mais frequente no gene *braf* é a *missense* V600E, que altera a valina em ácido glutâmico e ocorre em aproximadamente 90% dos casos (32). Outro gene associado ao desenvolvimento do melanoma é o *cdkn2a*, onde a

mutação deste está presente em aproximadamente 50% de todos os melanomas (33).

Outra alteração molecular importante no melanoma é a via de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e da proteína quinase B (AKT), acometendo cerca de 3% dos casos (34). A mutação em c-kit, um receptor de membrana tirosina quinase, também é observada em muitos casos de melanoma (35). Outras alterações moleculares podem ocorrer em p53, no receptor melanocortina 1 e em caderinas (35, 36).

Quanto ao tratamento do melanoma, existem diversas estratégias terapêuticas, incluindo cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia fotodinâmica, com base nas características do tumor, como a localização, perfil genético e estadiamento (37).

Grande parte dos melanomas primários é curada cirurgicamente quando detectados precocemente (38-40). Quanto ao melanoma metastático, os pacientes diagnosticados possuem um péssimo prognóstico, onde apenas 15% sobrevivem por 3 anos além de possuir alta resistência à radioterapia convencional (39, 41).

Atualmente, a imunoterapia ou o uso de anticorpos monoclonais tem sido utilizado para melhorar a eficácia destas terapias para o melanoma (27). Nesse contexto, uma estratégia terapêutica promissora que tem se destacado no tratamento do melanoma é o uso de anticorpos que bloqueiam receptores de *checkpoints* imunes como CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*) e PD-1 (*programmed cell death 1*) (27). Esses receptores atuam como reguladores da resposta imune, prevenindo a autoimunidade (27) além de funcionar como estímulos co-inibitórios e co-estimuladores para os linfócitos T, participando da ativação destas células, bem como da sua função efetora e liberação de citocinas (42).

Nas células tumorais, as vias de *checkpoints* imunes são ativadas para reduzir as respostas imunes ao tumor e com isso, pesquisadores têm tentado achar agentes que bloqueiam essas vias (42). Um estudo recente mostrou que a inibição de CTLA-4 pelo Ipilimumab resultou em uma maior atividade de linfócitos T e levou a regressão tumoral (21). O sucesso desta droga na estabilização da doença e no aumento da sobrevida tem gerado interesse em utilizar a imunoterapia como opção para o tratamento do melanoma (6-9).

Outras drogas que foram aprovadas nos últimos anos incluem os inibidores de *braf* (Vemurafenib e Dabrafenib) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MEK) (Trametinib e Cobimetinib) (43, 44). Além disso, outras estratégias terapêuticas que estão na fase de pesquisa clínica no tratamento do melanoma são as vacinas gênicas, tratamento com células dendríticas (DCs) e a combinação de PD-1 e CTLA-4 (27).

1.3 Resposta imune antitumoral

Paul Ehrlich foi o primeiro a sugerir que o sistema imune poderia controlar o crescimento tumoral, contudo até muito recentemente o conhecimento dos mecanismos reguladores do sistema imunológico na interação tumor/hospedeiro em humanos era muito pequeno (43). Somente com o desenvolvimento das pesquisas e o avanço das técnicas imunobiológicas, como por exemplo, a caracterização molecular de antígenos tumorais reconhecidos por anticorpos autólogos e linfócitos T é que diversos mecanismos no campo da imunobiologia do câncer têm sido desvendados (44-46), levando inclusive aos conceitos de imunovigilância e imunoedição dos tumores (45-47).

Burnet e Thomas foram os primeiros a proporem o conceito de imunovigilância tumoral, onde diziam que as células do sistema imune estão constantemente buscando e potencialmente eliminando células mutadas ou neoplásicas. Em 2004, Robert Schreiber *et al.* trouxeram de volta este conceito acrescentando os três E's da imunoedição dos tumores: eliminação, equilíbrio e escape (47). A eliminação é a primeira fase da imunovigilância onde o sistema imune inato e adaptativo trabalham juntos para eliminar e controlar o crescimento dos tumores. No entanto, também é proposto que há um estado de equilíbrio onde as células tumorais acumulam alterações suficientes para resistir à morte celular mediada pelo sistema imune e permanecem em um estado quiescente (48).

A imunidade inata é a primeira a reconhecer as células tumorais e as principais células envolvidas nessa resposta incluem os macrófagos, células *NK* (no inglês *natural killers*) e as DCs (49, 50) (51).

As células *NK* foram identificadas inicialmente e denominadas baseadas na sua capacidade de matar células tumorais *in vitro* (52), porém, em humanos, sabe-

se pouco sobre a infiltração de células *NK* em tumores malignos (53). O primeiro indício de que as células *NK* tem um papel protetor contra tumores surgiu de experimentos com fibrossarcoma induzidos por metilcolantreno (MCA) onde as células *NK* foram depletadas por anticorpos contra NK1.1 (um receptor de lectina do tipo C que é expresso por células *NK* e *NKT*, no inglês *natural killer T cells*) em camundongos C57Bl/6. Este trabalho mostrou que os tumores cresceram em uma velocidade maior na ausência de células *NK* (54, 55). Estes achados foram confirmados por outro trabalho que utilizou camundongos que não possuíam ativação do receptor da proteína NKp46, um receptor expresso por células *NK* (56-58). Em humanos, foram descritos alguns casos de deficiência seletiva de células *NK*, porém a incidência de câncer não parece ser maior nestes pacientes do que na população em geral (59).

Em relação ao macrófagos, o papel destes na resposta imune anti-tumoral tem sido amplamente estudado, porém os mecanismos da resposta imune que envolvem estas células são contraditórios. Os macrófagos são frequentemente observados infiltrando tecidos tumorais, e estes podem eliminar células neoplásicas através da produção de TNF (fator de necrose tumoral) e dos intermediários reativos do oxigênio (ROIs) (60). Além disso, estas células realizam a fagocitose de células neoplásicas opsonizadas por anticorpos (61). Contudo, no microambiente tumoral, os macrófagos associados ao tumor (TAMs) podem favorecer a progressão tumoral através da liberação de fatores pró-angiogênicos, como o VEGF que induzem a vascularização tumoral como também podem induzir a produção de citocinas supressoras (IL-10 e IL-6) (62) que propiciam um ambiente imunossupressor promovendo o crescimento tumoral e metástase (60, 63-66).

Já a resposta imune adaptativa específica contra as células tumorais depende da apresentação de epítopos antigênicos pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Apesar de todas as células nucleadas expressarem moléculas de MHC I e, portanto, poderem apresentar antígenos endógenos ligados ao MHC de classe I para linfócitos T CD8⁺, apenas as *DCs* fazem uma coestimulação adicional necessária para ativar linfócitos T *naive* (67).

As DCs funcionam como ponte entre a resposta imune inata e a adaptativa e iniciam a resposta imune adaptativa por captação, processamento e apresentação de antígenos. Além de reconhecer e apresentar o antígeno tumoral para os linfócitos T CD8⁺, as DCs são também responsáveis por ativar linfócitos T CD4⁺ que produzem citocinas pró-inflamatórias direcionando a resposta imune para um efeito antitumoral (67, 68).

Os linfócitos T CD8⁺ possuem um papel importante na resposta específica ao tumor visto que estas células são importantes efetores antitumorais e estão envolvidos no reconhecimento de antígenos e rejeição tumoral. A atividade lítica destas células baseia-se principalmente na liberação de perforina e grânulos tóxicos bem como na ativação de receptores de morte celular como Fas e TRAIL (44). Em contraste, a compreensão sobre o papel dos linfócitos T CD4⁺ na imunidade antitumoral é muito menor visto a complexidade da biologia destas células, porém, sabe-se hoje que a função dos linfócitos T CD4⁺ no contexto do tumor vai muito além de fornecer sinais auxiliares para os linfócitos T CD8⁺ (69).

Os linfócitos T CD4⁺ possuem a capacidade de se diferenciar em diferentes subpopulações efectoras que podem mediar inúmeras funções, inclusive opostas. Em um dos primeiros trabalhos mostrando a relevância dos efeitos antitumorais dos linfócitos T CD4⁺, Greenberg *et al.* mostraram que a transferência adotiva de linfócitos T originados de camundongos singênicos vacinados com células tumorais irradiadas facilitou a erradicação da leucemia (70).

As subpopulações de linfócitos T CD4⁺ predominantes no tumor são Th1 e Th2, onde as células Th1 são dependentes da secreção de IL-2 e as células Th2 surgem na ausência de IL-12 e na dependência de IL-4 (71, 72). Há pouco tempo, observaram que as células Th2 exerceram um efeito antitumoral, na qual a transferência adotiva de células Th2 era capaz de eliminar tumor em camundongos (73). Os pesquisadores mostraram que a persistência das células Th2 *in vivo* está relacionada a uma imunidade prolongada. Apesar destes trabalhos terem mostrado a importância destas células no contexto do câncer, as células Th1 são consideradas a subpopulação de linfócitos T CD4⁺ mais importante na imunidade tumoral por conta das suas funções. Estas células secretam citocinas que ativam receptores na superfície das células tumorais, levando-as a morte (74). Além disto, as células Th1 ativam funções citotóxicas em DCs que erradicam o tumor de

maneira IFN- γ dependente e também fornecem uma fonte de antígenos associados ao tumor derivados de células tumorais mortas (75). As células Th1 também podem estabelecer respostas imunes de memória a longo prazo a tumores (76, 77) e recrutar eosinófilos e macrófagos através da secreção de IL-4 (78, 79).

Outra subpopulação de linfócitos T auxiliares são as células Th17 que são associadas à expressão do fator de transcrição ROR γ t (123,124) e induzidas por TGF- β e IL-6 (119,120). Estas células foram identificadas associadas a certos tipos de tumores, como próstata e linfomas cutâneos de linfócitos T (128,129). Um estudo mostrou a erradicação de um melanoma por células Th17 tumor específicas que foi criticamente dependente de IFN- γ (71). Neste trabalho, foi observado também que as células polarizadas para Th1 foram capazes de secretar altos níveis de IFN- γ , porém, as células Th17 foram mais eficazes na mediação da erradicação de melanomas avançados. Outro ponto relevante é a capacidade das células Th17 mediar a citotoxicidade direta em tumores positivos para MHC classe II (111,112). A transferência adotiva de linfócitos T de camundongos TCR-transgênicos usando células específicas para Trp1 (proteína 1 relacionada à tirosinase) mostrou que os linfócitos Th17 foram capazes de eliminar as células de melanoma B16 por um mecanismo granzima-dependente (130).

Apesar destes estudos mostrando o efeito protetor de células Th17 no contexto do tumor, há relatos aparentemente conflitantes mostrando que estas células também podem estar associadas à progressão tumoral em alguns tipos de câncer (80-83). Este fato pode ser associado à falha em caracterizar esta subpopulação apenas pela expressão de IL-17 (84), visto que essas células podem expressar outras citocinas características de outras subpopulações de células Th como IFN- γ e TNF- α (85), bem como podem expressar o fator de transcrição Foxp3 em tumores de cólon (86) e pulmão (87). Além disto, estudos sugerem que é possível acontecer a conversão de células Th17 em células Tregs no microambiente tumoral (88). Em geral, a plasticidade das células Th17 e os dados aparentemente contraditórios em diversos tipos de tumores requerem caracterizações mais minuciosas desta subpopulação de linfócitos T CD4⁺ (89).

Outra população de células relevante na resposta imune tumoral são as células Treg (90), visto que estas células exercem uma função relevante na manutenção da tolerância imunológica a antígenos próprios e não próprios (91).

Em 1995, Sakaguchi *et al.* caracterizaram estas células pela expressão da cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25) que foi identificada como um marcador central desta subpopulação de linfócito T CD4. Esse trabalho revelou também que a depleção destas células causa inúmeros fenótipos de doença autoimune em camundongos (91). Em 2003, este mesmo grupo mostrou também que Foxp3 é o fator de transcrição expresso em Tregs. Neste trabalho foi observado que Foxp3 estava envolvido em síndromes autoimunes e inflamatórias em humanos e em camundongos, sugerindo que Foxp3 seria o gene regulador-chave do desenvolvimento destas células (92).

Vários estudos *in vitro* demonstraram que um grande número de linfócitos CD4⁺CD25⁺ com atividade imunossupressora infiltrava tumores de vários tipos histológicos (92-95). Dentre estes, uns mostraram que a administração de um anticorpo monoclonal anti-CD25, que depleta linfócitos T CD25⁺, promove a rejeição de tumores como leucemia, mieloma, sarcoma (96, 97) e melanoma (98). Existem evidências consideráveis de que Tregs suprimem a resposta imune contra o tumor, que em parte pode explicar a ineficácia das vacinas contra o câncer, mesmo após a vacinação com linfócitos T citotóxicos tumor específico (99).

1.4 Alvos metabólicos na terapia do câncer

A tendência de células malignas para metabolizar glicose via glicólise aeróbica foi descrita pela primeira vez por Otto Warburg em 1924 (100), e somente durante a última década que alterações metabólicas das células cancerosas foram redescobertos por pesquisadores e clínicos (101).

Hoje, está claro que os rearranjos metabólicos que acompanham a transformação maligna não envolvem apenas a glicólise aeróbica, mas também um aumento do fluxo através da via pentose fosfato (PPP), taxas elevadas na biossíntese de lipídeos, consumo alto de glutamina, manutenção da homeostase redox e por níveis limitados de macroautofagia (102, 103).

Um estudo publicado em 2000 por Hanahan e Weinberg adicionou um estado de “energética celular desregulado” aos “*hallmarks*” clássicos associados ao câncer, defendendo a ideia de que o metabolismo celular é substancialmente alterado durante a oncogênese e progressão tumoral (104, 105). Além disso,

evidências clínicas e epidemiológicas também mostram que mudanças no metabolismo corporal influenciam a oncogênese, a progressão tumoral e a resposta à terapia quimioterápica (102, 105). Corroborando esse dado, estudos mostram que algumas condições metabólicas como obesidade, hiperglicemia, hiperlipidemia e resistência à insulina foram associados com um risco aumentado de desenvolver vários tipos de neoplasias e acelerar a progressão tumoral (106, 107).

Baseado nisto, dados clínicos indicam que algumas drogas usadas em síndrome metabólica como a metformina e a estatina podem reduzir a morbidade e mortalidade causada por câncer (108, 109). Com isso, estudos têm sido realizados com o intuito de identificar agentes que atuem especificamente em células neoplásicas com base nas suas alterações metabólicas (110, 111).

1.5 Metformina

A metformina e a fenformina foram descobertos na década de 1920 nos extratos da planta *Galega officinalis* (lilás francês) que tinha sido utilizada por muitos séculos para o tratamento da diabetes (112).

A metformina é uma biguanidina e tem sido utilizada desde 1957 na Europa e desde 1995 nos EUA pelos seus efeitos na redução dos níveis de glicose (112). Esse fármaco é atualmente a droga antidiabética mais prescrita no mundo (24), pois possui um ótimo perfil farmacocinético (alta biodisponibilidade oral, absorção lenta, ligação desprezível as proteínas do plasma, nenhum metabolismo hepático, interação limitada com outras drogas e rápida excreção urinária) bem como um excelente perfil de segurança (3 casos de acidose láctica por 100.000 doente/ano e uma gama limitada de efeitos colaterais gastrointestinais leves)(113, 114) além de ser utilizada para diabetes gestacional, síndrome dos ovários policísticos e síndrome metabólica (115). Contudo, apesar de ser o tratamento antidiabético mais prescrito no mundo, o seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido (112).

1.5.1 Metformina e diabetes

A metformina atua reduzindo os níveis de glicose e melhorando a sensibilidade à insulina (116) e possui também efeitos pleiotrópicos como a redução na ingestão de alimentos e diminuição do peso corporal em alguns estudos (117). Esta droga pode também influenciar positivamente vários marcadores de risco cardiovascular (incluindo perfil lipídico e esteatose hepática) (116, 118), modular marcadores inflamatórios (119, 120) e reduzir o risco de câncer (121).

A ação hipoglicemiante das biguanidinas é uma consequência principalmente da produção reduzida de glicose devido à inibição da gliconeogênese hepática (122) e possivelmente e, em menor escala, o aumento da captação de glicose mediada por insulina no músculo esquelético (123).

A metformina tem pouco efeito sobre a absorção de glicose no trato gastrointestinal, mas retarda ligeiramente o processo de absorção (124, 125). A mitocôndria é o primeiro alvo da metformina no interior celular onde este fármaco inibe o complexo I da cadeia transportadora de elétrons, levando a uma queda na carga de energia (126, 127). Como consequência do decréscimo na produção de ATP (adenosina-trifosfato) e aumento dos níveis de AMP (adenosina monofosfato) provavelmente conduz duas grandes vias: a inibição da síntese de cAMP (Adenosina monofosfato cíclico) induzida por glucagon e a ativação de AMPK (proteína quinase ativada por AMP)(128).

AMPK é um sensor de energia e coordenador mestre de um sistema integrado de sinalização que engloba vias metabólicas e vias de crescimento que atuam em sincronia para restaurar o balanço energético. AMPK é um heterodímero que possui uma subunidade catalítica (α) e duas subunidades reguladoras (β e γ) (129). Quando os níveis celulares de ATP estão baixos, o AMP ou o ADP (adenosina difosfato) podem se ligar diretamente às subunidades regulatórias de AMPK, levando a uma mudança conformacional que promove a fosforilação de AMPK (130, 131). Quando ativada, AMPK liga vias catabólicas que geram ATP e desliga vias anabólicas, vias que consomem ATP (132).

As biguanidinas são reconhecidas como ativadores indiretos de AMPK (128). Por cerca de uma década, a AMPK era tido como o principal mediador da

ação da metformina. No entanto, a hipótese da AMPK ser a principal força motriz por trás da redução da gliconeogênese hepática tem sido questionada (133-135). Esta questão foi discutida quando a metformina baixou a produção de glicose no fígado de camundongos transgênicos que não possuíam AMPK ou seu ativador montante LKB1 (*liver kinase B*) (135). Os pesquisadores deste estudo sugeriram que a ação antidiabética de metformina requer LKB1 (122), refletida em possíveis benefícios no eixo LKB1-AMPK para a lipotoxicidade em animais alimentados com uma dieta rica em gordura, ao invés de um efeito direto sobre a gliconeogênese (135). No entanto, acredita-se que alguns efeitos da metformina ainda sejam atribuídos a modulação da via da AMPK (136).

1.5.2 Metformina e câncer

Diabetes tem sido associada com um aumento na incidência de câncer e um estudo mostrou que metformina reduz o risco em aproximadamente 40% em relação com qualquer outro tratamento antidiabético (121). Estudos mostraram que esta droga reduziu o marcador de proliferação Ki67 (antígeno Ki-67) em amostras de biópsias obtidas de mulheres não diabéticas com câncer de mama tratadas com metformina (137). Porém, os mecanismos pelos quais a metformina atua na atenuação da progressão tumoral não estão bem definidos, e uma limitação relevante é a de que a metformina inibe a proliferação celular *in vitro* em concentrações supra fisiológicas que são difíceis de ser administradas em pacientes (138).

Quanto aos efeitos sistêmicos da metformina sobre a tumorigênese, pode-se dizer que a hiperinsulinemia tem sido associada com prognóstico desfavorável em vários tipos de câncer, como de mama, cólon e próstata (138). No quadro de resistência à insulina, a metformina atua no fígado diminuindo a glicemia e melhorando a hiperinsulinemia secundária, evitando os efeitos desta no crescimento e na progressão tumoral. Este efeito indica que a metformina pode afetar os tecidos neoplásicos sensíveis à insulina indiretamente, sem necessidade de acumular nas células tumorais (138). Além disso, provavelmente outros hormônios, citocinas e intermediários metabólicos que influenciam a tumorigênese, também sejam afetados pela metformina (113).

Já quanto aos efeitos diretos da metformina, este é independente dos níveis de insulina (139). Inúmeros trabalhos mostram que esta droga tem uma ação direta em células neoplásicas e neste contexto, mecanismos dependentes de AMPK e independente de AMPK têm sido descritos (132, 140, 141).

1.5.3 Efeitos da metformina AMPK-dependentes em câncer

A supressão da via de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) LKB1-dependente e AMPK-dependente é possivelmente a via mais importante do efeito antineoplásico da metformina. A inibição de mTOR altera a síntese de proteínas e consequentemente a proliferação de células tumorais. A perda de LKB1 é comum no câncer e uma mutação germinativa nesta molécula é responsável pela Síndrome de Peutz-Jeghers, uma condição que predispõe o câncer (50, 142).

A estrutura do mTOR consiste em uma subunidade catalítica de dois complexos multiprotéicos, os mTORC1 e mTORC2. Estas estruturas são centrais na regulação do crescimento celular e integram a entrada de várias sinalizações hormonais e vias energéticas, incluindo a insulina, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), IGF-2 e vias de AMPK (143). A “downregulação” de mTOR dependente de AMPK resulta na ativação de genes supressores de tumor, TSC1 (complexo tuberosa esclerososa 1) e TSC2, que formam um complexo inibidor de mTOR e, além disso, a AMPK inibe diretamente a molécula RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*), um regulador positivo da mTOR (144).

A metformina pode inibir a sinalização da insulina pela molécula IGF-1 através da fosforilação dependente de AMPK de IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*) que transmite os sinais do receptor de insulina e do receptor IGF-1 via PI3K-AKT. Este efeito tem também o potencial para regular negativamente a sinalização por mTOR (145). A proteína supressora de tumor, p53, ativa inúmeros genes que podem inibir a AKT e a via de mTORC1 porém, o papel da metformina na ativação deste gene ainda é controversa (145, 146). Além disso, a metformina induz a expressão de DICER1, uma enzima que está envolvida na síntese de microRNA e a essa indução pode ser um mecanismo antineoplásico adicional. Este fármaco também inibe os proto-oncogenes *c-myc* e fator induzível pela hipóxia (HIF-1 α)

através de AMPK (147). Vale ressaltar que AMPK e HIF-1 α têm um papel fundamental na transformação metabólica do câncer (132).

Embora fatores de crescimento regulem mTORC1 através do eixo de PI3K-AKT-TSC1-TSC2, aminoácidos podem ativar a sinalização de mTORC1 através da família RAG de GTPases, independente de AMPK (148, 149). Seguindo a sua ativação pelo complexo regulatório, as RAG GTPases recrutam mTORC1 para a superfície lisossomal, onde é ativado por RHEB (*ras homolog enriched in brain*). Metformina pode inibir a sinalização mTORC1 pela inativação do complexo regulatório (140) e esse mecanismo de ação pode ser importante em certos tipos de câncer e, paralelo à dieta de restrição de energia, na prevenção do câncer (**Figura 1**)(132, 150).

Figura 1. Efeitos propostos da metformina em câncer. O efeito antitumoral da metformina é provavelmente uma combinação de efeitos indiretos (sistêmicos) ou diretos (132) (Adaptado).

1.5.4 AMPK, metformina e linfócito T efetor

Linfócitos T são células efetoras centrais na resposta imune adaptativa e sua função é crítica para a memória imunológica contra patógenos. A ativação dos linfócitos T inicia programas de transcrição específicos e altera o metabolismo celular que direcionam a diferenciação destas células e sua função efetora (151, 152). Durante a ativação celular, os linfócitos T efetores aumentam consideravelmente sua captação celular de vários nutrientes, como glicose e

aminoácidos. As mudanças na metabolização de glicose pelos linfócitos T efetores ocorrem, principalmente, através da diminuição da fosforilação oxidativa e pelo aumento da via glicolítica (151, 153-155).

As alterações no metabolismo dos linfócitos T efetores são importantes por inibir reguladores metabólicos essenciais como mTORC1 (156), e assim, regular a expressão de moléculas citolíticas efetoras, quimiocinas e receptores de adesão em linfócitos T efetores e na transição de linfócitos T CD8⁺ efetores para células de memória. Esta molécula também é necessária para sobrevivência *in vivo* de CTLs (linfócitos T citolíticos) após a retirada do estímulo imunológico (157).

Outra molécula relevante nesse contexto é AMPK, onde a sinalização através desta via permite que os linfócitos T efetores retornem a um estado metabólico de quiescência para gerar respostas aceleradas após um reestímulo (157).

A ideia de que AMPK é um importante regulador das funções dos linfócitos T foi reforçada pelo trabalho de Rao *et al.* em 2015. Eles mostraram que a ativação de AMPK promove a sobrevivência e função antitumoral de linfócitos T, particularmente de linfócitos T CD8⁺, resultando em uma maior supressão tumoral *in vivo*. Observaram também que a expressão de AMPK é dispensável para o desenvolvimento de linfócitos T, em contrapartida, a deleção genética de AMPK induz a morte de linfócitos T durante a ativação *in vitro* e o desenvolvimento tumoral *in vivo*. Além disso, viram que fosfatases são mediadores chave dos efeitos AMPK-dependentes na morte celular e a inibição da atividade destas proteínas restaura a sobrevivência e função dos linfócitos T (158).

Outro estudo mostrou que metformina inibe a geração de linfócitos T efetores e promove a de linfócitos T de memória (Tmem) (159-161), porém, eles ressaltam que esta droga atua apenas indiretamente na via de AMPK e, portanto, possui muitos efeitos sobre o metabolismo celular que não são mediados por esta via (113, 135, 162). Confirmando esta hipótese, uma pesquisa mostrou que metformina regula o crescimento celular e proliferação de linfócitos T ativados por antígenos, modulando a mudança metabólica necessária para a diferenciação de linfócitos T efetores além de inibir a via de sinalização por mTORC1 e a expressão dos fatores de transcrição c-Myc e HIF-1 α . Mostraram também que estes efeitos inibidores da metformina sob linfócitos T não dependem da expressão de AMPK nestas células (163).

Outro trabalho recente mostrou a plasticidade no metabolismo do linfócito T efetor em alterar a disponibilidade de nutrientes requeridos para mudança do estado de ativação destas células (164). Foi visto que linfócitos T ativados possuem um *checkpoint* metabólico sensível à glicose controlado por AMPK que regula a tradução do RNAm e o metabolismo mitocondrial dependente de glutamina para manter o metabolismo bioenergético e a viabilidade dos linfócitos T (164). Foi mostrado que AMPK também é essencial para auxiliar a diferenciação de linfócitos T *naive* em linfócitos T Th1 e Th17 em resposta a infecções bacterianas e virais *in vivo*. Este estudo concluiu que a regulação da homeostase metabólica dependente de AMPK é o regulador chave na imunidade adaptativa mediada por linfócitos T (164).

Pearce *et al.* em 2009 realizaram um estudo com camundongos que possuíam uma deleção de TRAF6 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 6*), uma proteína adaptadora do receptor de TNF e de interleucina IL-1R, e mostraram que esta proteína regula o desenvolvimento de Tmem após uma infecção bacteriana pela modulação do metabolismo de ácidos graxos. O grupo mostrou também que o tratamento com metformina restaurava a oxidação de ácidos graxos e a geração de Tmem na ausência de TRAF6 (160).

Em 2015, um trabalho realizado por Eikawa *et al.* mostrou que o efeito antitumoral da metformina pode ser mediado principalmente pelo sistema imune. Neste trabalho, esta droga aumentou o número de linfócitos T CD8⁺ infiltrantes no tumor (TILs) e protegeu estas células da apoptose e exaustão caracterizada pela redução na produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ , sugerindo que o efeito direto da metformina em T CD8⁺ é crítica para proteção contra a exaustão destas células no microambiente tumoral (165).

Em 2016, Delgoffe *et al.* mostraram que o metabolismo desregulado das células tumorais é um obstáculo para a imunidade antitumoral por gerar um microambiente de hipóxia e que a metformina foi capaz de reverter essa condição de hipóxia *in vitro* e *in vivo* no ambiente intratumoral. Eles observaram também que a combinação de metformina e o bloqueio de PD-1 resultaram na melhora na função das linfócitos T intratumorais e erradicação do tumor (166).

Diante desses achados, conduzimos um estudo em nosso laboratório para avaliar o papel da metformina no modelo de melanoma B16F10 bem como avaliar

os impactos desta droga na imunidade antitumoral. Esse estudo gerou um trabalho onde mostramos que a metformina atua diretamente nas células B16F10 bem como no microambiente tumoral (167). *In vitro*, a metformina induziu a morte destas células e, *in vivo*, esta droga apresentava um efeito antitumoral significativo. Vimos que esse efeito é parcialmente dependente do sistema imune e que os linfócitos T possuem um importante papel nessa proteção. Finalmente, mostramos que a combinação de metformina com rapamicina e sitagliptina apresentava um maior efeito antitumoral. Assim, nosso trabalho sugere que a metformina possui um acentuado efeito nas células de melanoma, incluindo uma potente resposta imune antitumoral, levando ao controle do crescimento tumoral e a combinação com outros agentes metabólicos aumenta o efeito protetor observado (167).

7. Conclusões

Baseados nos resultados apresentados, podemos concluir que:

- I. Os animais que não possuem AMPK nos linfócitos T ($CD4^{cre+}AMPK^{fl/fl}$) são protegidos do desenvolvimento tumoral nos dois modelos de melanoma analisados neste trabalho;
- II. Os pulmões dos animais $CD4^{cre+}AMPK^{fl/fl}$ com tumor possuem uma menor população de linfócitos T $CD4^+$ e $CD4^+PD-1^+$. Vimos também uma maior população de linfócitos T $CD8^+IFN-\gamma^+$ bem como uma menor população de T $CD8^+PD-1^+$. Observamos também uma menor população de linfócitos T $CD4^+$ no baço e no tumor primário dos animais analisados;
- III. Os pulmões dos animais $CD4^{cre+}AMPK^{fl/fl}$ possuem uma menor expressão relativa do gene *tnf- α* e *hk-2*;
- IV. Os animais que não possuem RAPTOR nos linfócitos T ($CD4^{cre+}RAPTOR^{fl/fl}$) são protegidos do desenvolvimento de metástases pulmonares e mostraram uma maior sobrevida em relação aos animais controle;
- V. A deleção de AMPK não é capaz de alterar a proliferação de linfócitos T nem a diferenciação destas células em células Treg;
- VI. Linfócitos T ativados e tratados com metformina possuem uma menor proliferação e esse efeito é independente da via AMPK nestas células;
- VII. O tratamento com metformina interfere na diferenciação de células Tregs nos animais $CD4^{cre+}AMPK^{fl/fl}$;
- VIII. A deleção de AMPK no linfócito T diminuiu a massa mitocondrial e o potencial de membrana de linfócitos T $CD4^+$ ativados, porém não interferiu na respiração celular destas células (OXPHOS);
- IX. Linfócitos T ativados e tratados com metformina fazem menos OXPHOS nos dois animais analisados ($CD4^{cre+}AMPK^{fl/fl}$ e $CD4^{cre-}AMPK^{fl/fl}$), ou seja, esse efeito da metformina é independente da via AMPK nos linfócitos T; e
- X. Linfócitos T ativados e tratados com metformina tiveram a massa mitocondrial reduzida de maneira dependente de AMPK nos linfócitos T.

Referências bibliográficas

1. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 2nd Edition. Atlanta: American Cancer Society.2011.
2. American Cancer Society. Global Cancer Facts & Figures 4th Edition. Atlanta: American Cancer Society2018.
3. Organização Pan americana de Saúde. Folha informativa - Câncer 2018 [Available from: https://www.paho.org/bra.../index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=1094.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2018;68(6):394-424.
5. INCA. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro, RJ: INCA; 2018.
6. (INCA) INdCJAGdS. Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil. 2014.
7. Focusing on the cell biology of cancer. Nat Cell Biol. 15. England2013. p. 1.
8. Massagué J, Obenauf AC. Metastatic Colonization. Nature. 2016;529(7586):298-306.
9. Peinado H, Zhang H, Matei IR, Costa-Silva B, Hoshino A, Rodrigues G, et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. Nat Rev Cancer. 2017;17(5):302-17.
10. Paget S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer Metastasis Rev. 1989;8(2):98-101.
11. Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer. 2009;9(4):239-52.
12. Postovit LM, Seftor EA, Seftor RE, Hendrix MJ. Influence of the microenvironment on melanoma cell fate determination and phenotype. Cancer Res. 2006;66(16):7833-6.
13. Francis SO, Mahlberg MJ, Johnson KR, Ming ME, Dellavalle RP. Melanoma chemoprevention. J Am Acad Dermatol. 2006;55(5):849-61.
14. Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. Nature. 2007;445(7130):851-7.

15. Kawakami A, Fisher DE. Key discoveries in melanocyte development. *J Invest Dermatol.* 2011;131(E1):E2-4.
16. Bedogni B, Welford SM, Cassarino DS, Nickoloff BJ, Giaccia AJ, Powell MB. The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell.* 2005;8(6):443-54.
17. Seftor EA, Brown KM, Chin L, Kirschmann DA, Wheaton WW, Protopopov A, et al. Epigenetic transdifferentiation of normal melanocytes by a metastatic melanoma microenvironment. *Cancer Res.* 2005;65(22):10164-9.
18. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin.* 2000;50(4):215-36; quiz 37-40.
19. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
20. Kosary CL, Altekruse SF, Ruhl J, Lee R, Dickie L. Clinical and prognostic factors for melanoma of the skin using SEER registries: collaborative stage data collection system, version 1 and version 2. *Cancer.* 2014;120 Suppl 23:3807-14.
21. Guy GP, Jr., Thomas CC, Thompson T, Watson M, Massetti GM, Richardson LC. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2015;64(21):591-6.
22. Portal - Instituto Nacional de Câncer - INCA 2014 [Available from: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>].
23. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo.* 2014;28(6):1005-11.
24. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med.* 1999;340(17):1341-8.
25. Archier E, Devaux S, Castela E, Gallini A, Aubin F, Le Maitre M, et al. Efficacy of psoralen UV-A therapy vs. narrowband UV-B therapy in chronic plaque psoriasis: a systematic literature review. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2012;26 Suppl 3:11-21.
26. Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochem Photobiol.* 2011;87(5):978-87.
27. Payandeh Z, Yarahmadi M, Nariman-Saleh-Fam Z, Tarhriz V, Islami M, Aghdam AM, et al. Immune therapy of melanoma: Overview of therapeutic vaccines. *J Cell Physiol.* 2019.
28. Mohammadpour A, Derakhshan M, Darabi H, Hedayat P, Momeni M. Melanoma: Where we are and where we go. *J Cell Physiol.* 2019;234(4):3307-20.

29. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
30. Tsao H, Goel V, Wu H, Yang G, Haluska FG. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):337-41.
31. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(9):809-19.
32. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-16.
33. Yang G, Rajadurai A, Tsao H. Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2005;125(6):1242-51.
34. Davies MA. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J*. 2012;18(2):142-7.
35. Liu Y, Sheikh MS. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol*. 2014;6(3):228.
36. Mehdizadeh A, Somi MH, Darabi M, Farajnia S, Akbarzadeh A, Montazersaheb S, et al. Liposome-mediated RNA interference delivery against Erk1 and Erk2 does not equally promote chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017;45(8):1612-9.
37. Lee C, Collichio F, Ollila D, Moschos S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. *Clin Dermatol*. 2013;31(2):141-7.
38. Houghton AN, Polsky D. Focus on melanoma. *Cancer Cell*. 2002;2(4):275-8.
39. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*. 2009;27(36):6199-206.
40. Crowson AN, Magro CM, Mihm MC. Prognosticators of melanoma, the melanoma report, and the sentinel lymph node. *Mod Pathol*. 2006;19 Suppl 2:S71-87.
41. Cheng Y, Zhang G, Li G. Targeting MAPK pathway in melanoma therapy. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32(3-4):567-84.
42. Postow MA, Callahan MK, Wolchok JD. Immune Checkpoint Blockade in Cancer Therapy. *J Clin Oncol*. 2015;33(17):1974-82.

43. Wang E, Panelli MC, Monsurro V, Marincola FM. A global approach to tumor immunology. *Cell Mol Immunol*. 2004;1(4):256-65.
44. Houghton AN, Gold JS, Blachere NE. Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr Opin Immunol*. 2001;13(2):134-40.
45. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology*. 2006;119(2):254-64.
46. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(4):299-308.
47. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004;21(2):137-48.
48. Raval RR, Sharabi AB, Walker AJ, Drake CG, Sharma P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother Cancer*. 2014;2:14.
49. MATIAS BF. Avaliação da resposta imune mediada por macrófagos, células nk e linfócitos t citotóxicos em pacientes oncológicos submetidos à imunoterapia com células dendríticas. Uberaba-MG: UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO; 2010.
50. Ece H, Cigdem E, Yuksel K, Ahmet D, Hakan E, Oktay TM. Use of oral antidiabetic drugs (metformin and pioglitazone) in diabetic patients with breast cancer: how does it effect serum Hif-1 alpha and 8Ohdg levels? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):5143-8.
51. Terme M, Ullrich E, Delahaye NF, Chaput N, Zitvogel L. Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol*. 2008;9(5):486-94.
52. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*. 1989;47:187-376.
53. Chiossone L, Dumas PY, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(11):671-88.
54. Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol*. 2001;13(4):459-63.
55. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med*. 2000;191(4):661-8.

56. Glasner A, Ghadially H, Gur C, Stanietsky N, Tsukerman P, Enk J, et al. Recognition and prevention of tumor metastasis by the NK receptor NKp46/NCR1. *J Immunol.* 2012;188(6):2509-15.
57. Halftack GG, Elboim M, Gur C, Achdout H, Ghadially H, Mandelboim O. Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *J Immunol.* 2009;182(4):2221-30.
58. Glasner A, Levi A, Enk J, Isaacson B, Viukov S, Orlanski S, et al. NKp46 Receptor-Mediated Interferon-gamma Production by Natural Killer Cells Increases Fibronectin 1 to Alter Tumor Architecture and Control Metastasis. *Immunity.* 2018;48(1):107-19.e4.
59. Ebbo M, Gerard L, Carpentier S, Vely F, Cypowyj S, Farnarier C, et al. Low Circulating Natural Killer Cell Counts are Associated With Severe Disease in Patients With Common Variable Immunodeficiency. *EBioMedicine.* 2016;6:222-30.
60. Klimp AH, de Vries EG, Scherphof GL, Daemen T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002;44(2):143-61.
61. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 2003;425(6957):516-21.
62. Lin EY, Li J-F, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, et al. Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer. 2006.
63. Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today.* 1992;13(7):265-70.
64. Shurin MR, Institute UoPMCaUoPC, shurinmr@upmc.edu, Lotze MT. *Dendritic Cells in Cancer: Emergence of the Discipline.* Springer US; 2009. p. 11-30.
65. Shurin MR, Institute UoPMCaUoPC, shurinmr@upmc.edu, Lotze MT. *Dendritic Cells in Cancer: Emergence of the Discipline.* 2014:11-30.
66. DeNardo DG, Department of Pathology UoC, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA, Barreto JB, Department of Pathology UoC, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA, Andreu P, Department of Pathology UoC, San Francisco, San Francisco, CA 94143, USA, et al. CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell.* 2009;16(2):91-102.
67. Guermonprez P, Saveanu L, Kleijmeer M, Davoust J, Van Endert P, Amigorena S. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature.* 2003;425(6956):397-402.

68. Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004;199:9-26.
69. Hanson HL, Kang SS, Norian LA, Matsui K, O'Mara LA, Allen PM. CD4-directed peptide vaccination augments an antitumor response, but efficacy is limited by the number of CD8+ T cell precursors. *J Immunol.* 2004;172(7):4215-24.
70. Greenberg PD, Cheever MA, Fefer A. Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1+2- lymphocytes. *J Exp Med.* 1981;154(3):952-63.
71. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, et al. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med.* 1999;190(5):617-27.
72. Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P, et al. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med.* 2003;197(3):387-93.
73. Lorvik KB, Hammarstrom C, Fauskanger M, Haabeth OA, Zangani M, Haraldsen G, et al. Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer Res.* 2016;76(23):6864-76.
74. Knutson KL, Disis ML. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(8):721-8.
75. LaCasse CJ, Janikashvili N, Larmonier CB, Alizadeh D, Hanke N, Kartchner J, et al. Th-1 lymphocytes induce dendritic cell tumor killing activity by an IFN-gamma-dependent mechanism. *J Immunol.* 2011;187(12):6310-7.
76. Van Waes C, Urban JL, Rothstein JL, Ward PL, Schreiber H. Highly malignant tumor variants retain tumor-specific antigens recognized by T helper cells. *J Exp Med.* 1986;164(5):1547-65.
77. Ossendorp F, Mengede E, Camps M, Filius R, Melief CJ. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med.* 1998;187(5):693-702.
78. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998;188(12):2357-68.
79. Corthay A, Skovseth DK, Lundin KU, Rosjo E, Omholt H, Hofgaard PO, et al. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity.* 2005;22(3):371-83.

80. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res.* 2011;71(4):1263-71.
81. Chen Y, Haines CJ, Gutmacher I, Hochweller K, Blumenschein WM, McClanahan T, et al. Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2. *Immunity.* 2011;34(3):409-21.
82. Yamada Y, Saito H, Ikeguchi M. Prevalence and clinical relevance of Th17 cells in patients with gastric cancer. *J Surg Res.* 2012;178(2):685-91.
83. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, et al. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. *J Hepatol.* 2009;50(5):980-9.
84. Voo KS, Wang YH, Santori FR, Boggiano C, Arima K, Bover L, et al. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4793-8.
85. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood.* 2009;114(6):1141-9.
86. Blatner NR, Mulcahy MF, Dennis KL, Scholtens D, Bentrem DJ, Phillips JD, et al. Expression of RORgammat marks a pathogenic regulatory T cell subset in human colon cancer. *Sci Transl Med.* 2012;4(164):164ra59.
87. Phillips JD, Knab LM, Blatner NR, Haghi L, DeCamp MM, Meyerson SL, et al. Preferential expansion of pro-inflammatory Tregs in human non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2015;64(9):1185-91.
88. Human tumor-infiltrating Th17 cells have the capacity to differentiate into IFN- γ and FOXP3+ T cells with potent suppressive function - Ye - 2011 - *European Journal of Immunology* - Wiley Online Library. 2019.
89. Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kuhnel F, Woller N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(4):689-713.
90. Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res.* 2005;32(1-3):155-68.
91. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155(3):1151-64.

92. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014;27:1-7.
93. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*. 2001;2(4):301-6.
94. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
95. Francois V, Ottaviani S, Renkvist N, Stockis J, Schuler G, Thielemans K, et al. The CD4(+) T-cell response of melanoma patients to a MAGE-A3 peptide vaccine involves potential regulatory T cells. *Cancer Res*. 2009;69(10):4335-45.
96. Attia P, Maker AV, Haworth LR, Rogers-Freezer L, Rosenberg SA. Inability of a fusion protein of IL-2 and diphtheria toxin (Denileukin Diftitox, DAB389IL-2, ONTAK) to eliminate regulatory T lymphocytes in patients with melanoma. *J Immunother*. 2005;28(6):582-92.
97. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*. 2005;115(12):3623-33.
98. Jacobs JF, Punt CJ, Lesterhuis WJ, Suttmuller RP, Brouwer HM, Scharenborg NM, et al. Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2010;16(20):5067-78.
99. Rech AJ, Mick R, Martin S, Recio A, Aqui NA, Powell DJ, Jr., et al. CD25 blockade depletes and selectively reprograms regulatory T cells in concert with immunotherapy in cancer patients. *Sci Transl Med*. 2012;4(134):134ra62.
100. Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(5):325-37.
101. Galluzzi L, Kepp O, Vander Heiden MG, Kroemer G. Metabolic targets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(11):829-46.
102. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029-33.
103. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(6):401-10.
104. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.

105. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
106. Khandekar MJ, Cohen P, Spiegelman BM. Molecular mechanisms of cancer development in obesity. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(12):886-95.
107. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(3):159-69.
108. Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *Bmj*. 2005;330(7503):1304-5.
109. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;352(21):2184-92.
110. Vander Heiden MG. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(9):671-84.
111. Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E. Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(4):267-77.
112. Bailey CJ, Day C. Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*. 1989;12(8):553-64.
113. Miller RA, Chu Q, Xie J, Foretz M, Viollet B, Birnbaum MJ. Biguanides suppress hepatic glucagon signalling by decreasing production of cyclic AMP. *Nature*. 2013;494(7436):256-60.
114. Garber AJ. Metformin: mechanisms of antihyperglycemic action, other pharmacodynamic properties, and safety perspectives. *Endocr Pract*. 1997;3(6):359-70.
115. Cicero AF, Tartagni E, Ertek S. Metformin and its clinical use: new insights for an old drug in clinical practice. *Arch Med Sci*. 2012;8(5):907-17.
116. Salpeter SR, Buckley NS, Kahn JA, Salpeter EE. Meta-analysis: metformin treatment in persons at risk for diabetes mellitus. *Am J Med*. 2008;121(2):149-57.e2.
117. Glueck CJ, Fontaine RN, Wang P, Subbiah MT, Weber K, Illig E, et al. Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30. *Metabolism*. 2001;50(7):856-61.
118. Gokcel A, Gumurdulu Y, Karakose H, Melek Ertorer E, Tanaci N, BascilTutuncu N, et al. Evaluation of the safety and efficacy of sibutramine, orlistat and metformin in the treatment of obesity. *Diabetes Obes Metab*. 2002;4(1):49-55.

119. Andrews M, Soto N, Arredondo M. [Effect of metformin on the expression of tumor necrosis factor- α , Toll like receptors 2/4 and C reactive protein in obese type-2 diabetic patients]. *Rev Med Chil.* 2012;140(11):1377-82.
120. Nath N, Khan M, Paintlia MK, Singh I, Hoda MN, Giri S. Metformin attenuated the autoimmune disease of the central nervous system in animal models of multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009;182(12):8005-14.
121. Giovannucci E, Harlan DM, Archer MC, Bergenstal RM, Gapstur SM, Habel LA, et al. Diabetes and cancer: a consensus report. *Diabetes Care.* 2010;33(7):1674-85.
122. Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, Depinho RA, et al. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Science.* 2005;310(5754):1642-6.
123. McIntyre HD, Ma A, Bird DM, Paterson CA, Ravenscroft PJ, Cameron DP. Metformin increases insulin sensitivity and basal glucose clearance in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Aust N Z J Med.* 1991;21(5):714-9.
124. Czyzyk A, Tawecki J, Sadowski J, Ponikowska I, Szczepanik Z. Effect of biguanides on intestinal absorption of glucose. *Diabetes.* 1968;17(8):492-8.
125. Hermann LS. Metformin: a review of its pharmacological properties and therapeutic use. *Diabete Metab.* 1979;5(3):233-45.
126. Demaille D, Guigas B, Leverve X, Wiernsperger N, Devos P. Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function. *Biochem Pharmacol.* 2002;63(7):1259-72.
127. Miller RA, Birnbaum MJ. An energetic tale of AMPK-independent effects of metformin. *J Clin Invest.* 2010;120(7):2267-70.
128. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001;108(8):1167-74.
129. Hardie DG, Carling D, Gamblin SJ. AMP-activated protein kinase: also regulated by ADP? *Trends Biochem Sci.* 2011;36(9):470-7.
130. Xiao B, Sanders MJ, Underwood E, Heath R, Mayer FV, Carmena D, et al. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature.* 2011;472(7342):230-3.
131. Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, Scott JW, Ling N, Tam S, et al. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science.* 2011;332(6036):1433-5.
132. Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(3):143-56.

133. Samuel VT, Beddow SA, Iwasaki T, Zhang XM, Chu X, Still CD, et al. Fasting hyperglycemia is not associated with increased expression of PEPCK or G6Pc in patients with Type 2 Diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29):12121-6.
134. Burgess SC, He T, Yan Z, Lindner J, Sherry AD, Malloy CR, et al. Cytosolic phosphoenolpyruvate carboxykinase does not solely control the rate of hepatic gluconeogenesis in the intact mouse liver. *Cell Metab*. 2007;5(4):313-20.
135. Foretz M, Hebrard S, Leclerc J, Zarrinpashneh E, Soty M, Mithieux G, et al. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2355-69.
136. Gunton JE, Delhanty PJ, Takahashi S, Baxter RC. Metformin rapidly increases insulin receptor activation in human liver and signals preferentially through insulin-receptor substrate-2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(3):1323-32.
137. Hadad S, Iwamoto T, Jordan L, Purdie C, Bray S, Baker L, et al. Evidence for biological effects of metformin in operable breast cancer: a pre-operative, window-of-opportunity, randomized trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;128(3):783-94.
138. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. *Cancer Discov*. 2012;2(9):778-90.
139. Tomimoto A, Endo H, Sugiyama M, Fujisawa T, Hosono K, Takahashi H, et al. Metformin suppresses intestinal polyp growth in ApcMin/+ mice. *Cancer Sci*. 2008;99(11):2136-41.
140. Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, et al. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. *Oncogene*. 2013;32(12):1475-87.
141. Bar-Peled L, Schweitzer LD, Zoncu R, Sabatini DM. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell*. 2012;150(6):1196-208.
142. Wang Y, Zhang MX, Duan XY, Zhou SN, Ermek T, Wang YN, et al. [Effects of antidiabetic drug metformin on human breast carcinoma cells with different estrogen receptor expressing in vitro]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*. 2011;27(3):253-6.
143. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol*. 2002;4(9):648-57.
144. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214-26.

145. Ning J, Clemmons DR. AMP-activated protein kinase inhibits IGF-I signaling and protein synthesis in vascular smooth muscle cells via stimulation of insulin receptor substrate 1 S794 and tuberous sclerosis 2 S1345 phosphorylation. *Mol Endocrinol.* 2010;24(6):1218-29.
146. Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Del Barco S, Martin-Castillo B, Menendez JA. If mammalian target of metformin indirectly is mammalian target of rapamycin, then the insulin-like growth factor-1 receptor axis will audit the efficacy of metformin in cancer clinical trials. *J Clin Oncol.* 27. United States 2009. p. e207-9; author reply e10.
147. Blandino G, Valerio M, Cioce M, Mori F, Casadei L, Pulito C, et al. Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Nat Commun.* 2012;3:865.
148. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brule S, Viollet B, et al. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab.* 2010;11(5):390-401.
149. Efeyan A, Zoncu R, Chang S, Gumper I, Snitkin H, Wolfson RL, et al. Regulation of mTORC1 by the Rag GTPases is necessary for neonatal autophagy and survival. *Nature.* 2013;493(7434):679-83.
150. Zhu Z, Jiang W, Thompson MD, McGinley JN, Thompson HJ. Metformin as an energy restriction mimetic agent for breast cancer prevention. *J Carcinog.* 2011;10:17.
151. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:259-83.
152. Wang R, Green DR. Metabolic checkpoints in activated T cells. *Nat Immunol.* 2012;13(10):907-15.
153. Pearce EL, Poffenberger MC, Chang CH, Jones RG. Fueling immunity: insights into metabolism and lymphocyte function. *Science.* 2013;342(6155):1242-454.
154. Finlay DK, Rosenzweig E, Sinclair LV, Feijoo-Carnero C, Hukelmann JL, Rolf J, et al. PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2012;209(13):2441-53.
155. Macintyre AN, Finlay D, Preston G, Sinclair LV, Waugh CM, Tamas P, et al. Protein kinase B controls transcriptional programs that direct cytotoxic T cell fate but is dispensable for T cell metabolism. *Immunity.* 2011;34(2):224-36.
156. Powell JD, Delgoffe GM. The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. *Immunity.* 2010;33(3):301-11.

157. Rolf J, Zarrouk M, Finlay DK, Foretz M, Viollet B, Cantrell DA. AMPK α 1: a glucose sensor that controls CD8 T-cell memory. *Eur J Immunol.* 2013;43(4):889-96.
158. Rao E, Zhang Y, Zhu G, Hao J, Persson XMT, Egilmez NK, et al. Deficiency of AMPK in CD8⁺ T cells suppresses their anti-tumor function by inducing protein phosphatase-mediated cell death. *Oncotarget.* 2015;6(10):7944-58.
159. Kang KY, Kim YK, Yi H, Kim J, Jung HR, Kim IJ, et al. Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2013;16(1):85-92.
160. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, Wang LS, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature.* 2009;460(7251):103-7.
161. Michalek RD, Gerriets VA, Jacobs SR, Macintyre AN, MacIver NJ, Mason EF, et al. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol.* 2011;186(6):3299-303.
162. Ben Sahra I, Regazzetti C, Robert G, Laurent K, Le Marchand-Brustel Y, Auberger P, et al. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.* 2011;71(13):4366-72.
163. Zarrouk M, Finlay DK, Foretz M, Viollet B, Cantrell DA. Adenosine-mono-phosphate-activated protein kinase-independent effects of metformin in T cells. *PLoS One.* 2014;9(9):e106710.
164. Blagih J, Coulombe F, Vincent EE, Dupuy F, Galicia-Vazquez G, Yurchenko E, et al. The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. *Immunity.* 2015;42(1):41-54.
165. Eikawa S, Nishida M, Mizukami S, Yamazaki C, Nakayama E, Udono H. Immune-mediated antitumor effect by type 2 diabetes drug, metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112. United States 2015. p. 1809-14.
166. Scharping NE, Menk AV, Whetstone RD, Zeng X, Delgoffe GM. Efficacy of PD-1 Blockade Is Potentiated by Metformin-Induced Reduction of Tumor Hypoxia. *Cancer Immunol Res.* 2017;5(1):9-16.
167. Pereira FV, Melo ACL, Low JS, de Castro IA, Braga TT, Almeida DC, et al. Metformin exerts antitumor activity via induction of multiple death pathways in tumor cells and activation of a protective immune response. *Oncotarget.* 2018;9(40):25808-25.
168. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 3302005. p. 1304-5.

169. Tsutsumi Y, Nomiya T, Kawanami T, Hamaguchi Y, Terawaki Y, Tanaka T, et al. Combined Treatment with Exendin-4 and Metformin Attenuates Prostate Cancer Growth. *PLoS One*. 2015;10(10):e0139709.
170. Lee MS, Hsu CC, Wahlqvist ML, Tsai HN, Chang YH, Huang YC. Type 2 diabetes increases and metformin reduces total, colorectal, liver and pancreatic cancer incidences in Taiwanese: a representative population prospective cohort study of 800,000 individuals. *BMC Cancer*. 2011;11:20.
171. Skinner HD, Crane CH, Garrett CR, Eng C, Chang GJ, Skibber JM, et al. Metformin use and improved response to therapy in rectal cancer. *Cancer Med*. 2013;2(1):99-107.
172. Zhao D, Long XD, Lu TF, Wang T, Zhang WW, Liu YX, et al. Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2015;136(11):2556-65.
173. Saisho Y. Metformin and Inflammation: Its Potential Beyond Glucose-lowering Effect. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2015;15(3):196-205.
174. Volarevic V, Misirkic M, Vucicevic L, Paunovic V, Simovic Markovic B, Stojanovic M, et al. Metformin aggravates immune-mediated liver injury in mice. *Arch Toxicol*. 2015;89(3):437-50.
175. Bastos LFCS. OPAS/OMS Brasil - Câncer. 2018.
176. Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev*. 2011;25(18):1895-908.
177. Ma EH, Poffenberger MC, Wong AH, Jones RG. The role of AMPK in T cell metabolism and function. *Curr Opin Immunol*. 2017;46:45-52.
178. Shackelford DB, Abt E, Gerken L, Vasquez DS, Seki A, Leblanc M, et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. *Cancer Cell*. 2013;23(2):143-58.
179. Adamovich Y, Adler J, Meltser V, Reuven N, Shaul Y. AMPK couples p73 with p53 in cell fate decision. *Cell Death Differ*. 2014;21(9):1451-9.
180. Short JD, Dere R, Houston KD, Cai SL, Kim J, Bergeron JM, et al. AMPK-mediated phosphorylation of murine p27 at T197 promotes binding of 14-3-3 proteins and increases p27 stability. *Mol Carcinog*. 2010;49(5):429-39.
181. Nam M, Lee WH, Bae EJ, Kim SG. Compound C inhibits clonal expansion of preadipocytes by increasing p21 level irrespectively of AMPK inhibition. *Arch Biochem Biophys*. 2008;479(1):74-81.

182. Sag D, Carling D, Stout RD, Suttles J. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. 2008.
183. Wang Z, Wang N, Liu P, Xie X. AMPK and Cancer. *Exp Suppl.* 2016;107:203-26.
184. Aggarwal BB, Gupta SC, Kim JH. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood.* 1192012. p. 651-65.
185. Katerinaki E, Evans GS, Lorigan PC, MacNeil S. TNF-alpha increases human melanoma cell invasion and migration in vitro: the role of proteolytic enzymes. *Br J Cancer.* 2003;89(6):1123-9.
186. Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, et al. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature.* 2014;507(7490):109-13.
187. Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, et al. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature.* 2012;490(7420):412-6.
188. Anderson M, Marayati R, Moffitt R, Yeh JJ. Hexokinase 2 promotes tumor growth and metastasis by regulating lactate production in pancreatic cancer. *Oncotarget.* 2016.
189. Wu CA, Chao Y, Shiah SG, Lin WW. Nutrient deprivation induces the Warburg effect through ROS/AMPK-dependent activation of pyruvate dehydrogenase kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(5):1147-56.
190. Houten SM, Chegary M, Te Brinke H, Wijnen WJ, Glatz JF, Luiken JJ, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 expression is synergistically induced by AMP-activated protein kinase and fatty acids. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(7):1283-94.
191. Roche TE, Hiromasa Y. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(7-8):830-49.
192. Sutendra G, Michelakis ED. Pyruvate dehydrogenase kinase as a novel therapeutic target in oncology. *Front Oncol.* 2013;3:38.
193. Delgoffe GM, Kole TP, Zheng Y, Zarek PE, Matthews KL, Xiao B, et al. The mTOR kinase differentially regulates effector and regulatory T cell lineage commitment. *Immunity.* 2009;30(6):832-44.
194. Haxhinasto S, Mathis D, Benoist C. The AKT-mTOR axis regulates de novo differentiation of CD4⁺Foxp3⁺ cells. *J Exp Med.* 2008;205(3):565-74.

195. Chang X, Lazorchak AS, Liu D, Su B. Sin1 regulates Treg-cell development but is not required for T-cell growth and proliferation. *Eur J Immunol*. 2012;42(6):1639-47.
196. Sun IH, Oh MH, Zhao L, Patel CH, Arwood ML, Xu W, et al. mTOR Complex 1 Signaling Regulates the Generation and Function of Central and Effector Foxp3(+) Regulatory T Cells. *J Immunol*. 2018;201(2):481-92.
197. MacIver NJ, Blagih J, Saucillo DC, Tonelli L, Griss T, Rathmell JC, et al. The liver kinase B1 is a central regulator of T cell development, activation, and metabolism. *J Immunol*. 2011;187(8):4187-98.
198. He N, Fan W, Henriquez B, Yu RT, Atkins AR, Liddle C, et al. Metabolic control of regulatory T cell (Treg) survival and function by Lkb1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(47):12542-7.
199. Mockler MB, Department of Surgery TCfHS, St. James's Hospital, Trinity College Dublin, Ireland, Conroy MJ, Department of Surgery TCfHS, St. James's Hospital, Trinity College Dublin, Ireland, Lysaght J, Department of Surgery TCfHS, St. James's Hospital, Trinity College Dublin, Ireland, et al. Targeting T Cell Immunometabolism for Cancer Immunotherapy; Understanding the Impact of the Tumor Microenvironment. *Frontiers in Oncology*. 2014;4.
200. Griss T, Vincent EE, Egnatchik R, Chen J, Ma EH, Faubert B, et al. Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis. *PLoS Biol*. 132015.
201. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018;19(2):121-35.
202. Bergeron R, Ren JM, Cadman KS, Moore IK, Perret P, Pypaert M, et al. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(6):E1340-6.
203. Narkar VA, Downes M, Yu RT, Emblar E, Wang YX, Banayo E, et al. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*. 2008;134(3):405-15.
204. Garcia-Roves PM, Osler ME, Holmstrom MH, Zierath JR. Gain-of-function R225Q mutation in AMP-activated protein kinase gamma3 subunit increases mitochondrial biogenesis in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem*. 2008;283(51):35724-34.
205. Mottillo EP, Desjardins EM, Crane JD, Smith BK, Green AE, Ducommun S, et al. Lack of Adipocyte AMPK Exacerbates Insulin Resistance and Hepatic Steatosis through Brown and Beige Adipose Tissue Function. *Cell Metab*. 2016;24(1):118-29.
206. Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, et al. Hematopoietic AMPK beta1 reduces mouse adipose tissue macrophage

inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest.* 2011;121(12):4903-15.

207. Hasenour CM, Ridley DE, Hughey CC, James FD, Donahue EP, Shearer J, et al. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) effect on glucose production, but not energy metabolism, is independent of hepatic AMPK in vivo. *J Biol Chem.* 2014;289(9):5950-9.