



MARIA CAROLINA SANTOS MENDES

**“CARACTERIZAÇÃO DA VIA IRS1/Akt/mTOR EM
XENOENXERTOS TUMORAIS DE ANIMAIS
SUBMETIDOS À SUPLEMENTAÇÃO COM
LEUCINA”**

Campinas

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

MARIA CAROLINA SANTOS MENDES

**“CARACTERIZAÇÃO DA VIA IRS1/Akt/mTOR EM
XENOENXERTOS TUMORAIS DE ANIMAIS SUBMETIDOS
À SUPLEMENTAÇÃO COM LEUCINA”**

Orientador: Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia
Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de Doutora em Ciências.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MARIA CAROLINA
SANTOS MENDES E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ
BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA.**

Assinatura do Orientador

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "José Barreto Campello Carvalheira".

Campinas,

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M522c Mendes, Maria Carolina Santos, 1983-
Caracterização da via IRS1/Akt/mTOR em
xenoenxertos tumorais de animais submetidos à
suplementação com leucina / Maria Carolina Santos
Mendes. -- Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador : Jose Barreto Campello Carvalheira.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Serina-treonina quinases TOR. 2. Aminoácidos
de cadeia ramificada. 3. Neoplasias. 4. Morte celular. I.
Carvalheira, Jose Barreto Campello, 1971-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of IRS1/AKT/mTOR pathway in tumor
xenografts of animals supplemented with leucine

Palavras-chave em inglês:

TOR serine-threonine kinases

Amino acids, Branched-chain

Neoplasms

Cell death

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Mario Jose Abdalla Saad [Presidente]

Willian Tadeu Lara Festuccia

Roger Chammas

Dennys Esper Correa Cintra

Andre Almeida Schenka

Data de defesa: 23-04-2014

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

MARIA CAROLINA SANTOS MENDES

Orientador (a) PROF(A). DR(A). JOSE BARRETO CAMPELLO CARVALHEIRA

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). MARIO JOSE ABDALLA SAAD

2. PROF(A). DR(A). WILLIAN TADEU LARA FESTUCCIA

3. PROF(A). DR(A). ROGER CHAMMAS

4. PROF(A). DR(A). DENNYS ESPER CORREA CINTRA

5. PROF(A). DR(A). ANDRE ALMEIDA SCHENKA

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 23 de abril de 2014

*Dedico este trabalho
aos meus pais, Domingos e Maria Celina,
à minha Irmã Mila,
e ao meu amor João Paulo.*

AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo -FAPESP, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico -CNPQ e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – INCT de Obesidade e Diabetes; pela bolsa de estudo concedida e financiamento das pesquisas que permitiram o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP pelas oportunidades a mim oferecidas, pelo apoio concedido e pelo exemplo de excelência em ensino e pesquisa.

Ao meu orientador, Professor. José Barreto, pelo exemplo de profissional, competente, comprometido e dedicado. Agradeço por ter confiado em mim e no meu trabalho e por ter me oferecido a oportunidade de vivenciar todo esse aprendizado.

Ao Prof. Mario Saad, você é com certeza fonte de inspiração para todos aqueles que tiveram a sorte de poder conviver ao seu lado. Exemplo de liderança e amor ao trabalho.

À vocês, grandes mestres, dedico: “Eu não tenho ídolos. Tenho admiração por trabalho, dedicação e competência.” Ayrton Senna.

Aos professores Prof. Gabriel Anhe, Prof. Hernandes Carvalho, Prof. Everardo Coelho pela colaboração na realização deste trabalho. Ao Danilo, agradeço a atenção e calma em ensinar as técnicas de imunohistoquímica. À Carol Solon, agradeço a grande disposição em colaborar sempre que necessitei.

À Sandra, Sr. Lú, Jósimo, Dioze e Andrey agradeço pelo apoio técnico oferecido.

Aos colegas do Labsincel, pela convivência, especialmente à Erika, Gerson e Jose pelos vários “socorros” atendidos.

Aos colegas de trabalho do LICRI e Laboratório de Oncologia Molecular, não vou citar todos os nomes, porque extenderia demais, a todos muito obrigada pela amizade, almoços, discussões, risadas, desabafos, colaborações, viagens, festas... continuaremos juntos.

À equipe do biotério (Sr. Zé, Sr. Antônio, Marino), do CEMIB (Érica e Regina), da limpeza (Magnólia e Claudiane), obrigada por cuidarem com tanta dedicação dos nossos animais experimentais e do nosso laboratório.

À Lígia e Amanda do Laboratório Multiusuário, obrigada pelo modo gentil que me acolheram durante a reforma do laboratório.

À Ana Leda, obrigada por toda ajuda com as milhares de dúvidas em citometria.

À Salete e Regina, secretárias da pós-graduação, sempre dispostas a esclarecer nossas dúvidas.

Às Profas. Patrícia Prada, Rosângela Bezerra e Marciane Milanski, meu muito obrigada pela oportunidade de vivenciar uma das melhores experiências da minha vida. Obrigada pela confiança, amizade e troca de experiências. I Turma de Nutrição da UNICAMP vocês foram incríveis e serão inesquecíveis.

Aos Profs. Dennys e Eduardo agradeço por terem me auxiliado no primeiro passo, me apresentarem a UNICAMP e todo esse labirinto de portas abertas. Obrigado por acreditarem em mim, sem nem me conhecer. À vocês serei eternamente grata!

A todos os professores do Departamento de Nutrição Clínica e Social da UFOP, obrigada por terem apoiado e aprovado a minha vinda para a UNICAMP, pelas concessões nas disciplinas, ajustes de horários, sem a compreensão de vocês, nada disso teria se concretizado.

Às minhas companheiras e ex-companheiras de apartamento Maíra, Amandinha, Laís, Gí e Lá obrigada pela convivência harmoniosa do dia a dia, pelo problemas compartilhados, pelas sessões de terapia em grupo, rs, enfim, pela amizade construída ao longo desses anos. À Mandinha, agradeço em especial pela grande amizade, pelas batalhas enfrentadas e vencidas, por fazer do dia uma grande poesia.

À todos os meus familiares, em especial minha Tia Zezé, que está sempre em orações por mim. Obrigada por toda força!

À família Felix, Claudia e Sr. Paulinho, Mic, Gá e Tici, não existem palavras para expressar toda gratidão que sinto por vocês. Obrigada pela torcida, rezas, apoio, conforto, acolhimento, enfim, por serem família. Vocês são peças fundamentais na construção desse sonho. Muito Obrigada!

Ao meu amor, João Paulo, certamente não suportaria tudo isso sem você ao meu lado. Obrigada pela paciência, pela presença e apoio fundamental em todos os momentos.

À minha essência familiar, meus pais, Domingos e Celina, e minha irmã, Mila, vocês são a razão de tudo isso. Aqueles que sempre foram suporte para todas as minhas conquistas. Obrigada pelo amor, pela torcida, pela força, pelas orações e orientações. Obrigada por guardar o meu paraíso sempre intacto. Amo vocês!

À Deus, obrigada pelo dom da vida!

*“Mas na profissão, além de amar tem de saber.
E o saber leva tempo para crescer.”*

Rubem Alves

LISTA DE ABREVIATURAS

4E-BP1	<i>Eukaryotic initiation factor 4E</i> <i>(eif4E)-binding proteins</i>	Proteína associada ao eif4E
ABN		Associação Brasileira de Nutrologia
ASPEN	<i>American Society for Parenteral and Enteral Nutrition</i>	Sociedade Americana de Nutrição Enteral e Parenteral
DEPTOR	<i>DEP domain-containing mTOR-interacting protein</i>	Proteína contendo domínio DEP que interage com a mTOR
ESPEN	<i>The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism</i>	Sociedade Européia de Nutrição Enteral e Parenteral
eif4E	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4E</i>	Fator 4E de iniciação de tradução em eucaritos
GAP	<i>GTPase activating protein</i>	Proteína ativadora de GTPase
GDP	<i>Guanosine diphosphate</i>	Difosfato de guanosina
Grb10	<i>Growth factor receptor-bound protein 10</i>	Fator de crescimento ligado à proteína 10
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i>	Trifosfato de guanosina
hVPS34	<i>Mammalian vacuolar protein sorting 34 homolog</i>	
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>	Fator de crescimento semelhante à insulina
INCA		Instituto Nacional do Câncer
IPMK	<i>inositol polyphosphate monokinase</i>	
IRS1	<i>Insulin receptor substrate 1</i>	Substrato do receptor de insulina
		1
Lkb1	<i>serine threonine kinase 1</i>	Serina treonina quinase 1
MAP4k3	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 3</i>	

mLST8	<i>Mammalian lethal with SEC13 protein 8</i>	
mSIN1	<i>Mammalian stress-activated map kinase-interacting protein 1</i>	
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>	Alvo mecanístico da rapamicina
mTORC1	<i>mTOR complex 1</i>	complexo 1 da mTOR
mTORC2	<i>mTOR complex 2</i>	complexo 2 da mTOR
Nf1		Neurofibromatose tipo 1
p70S6K1	<i>70kDa S6 Kinase 1</i>	Quinase 1 da S6 de 70 kDa
PDGFR	<i>Platelet-derived growth fator receptor</i>	Receptor do fator derivado de plaquetas
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>	Proteína quinase 1 dependente de fosfoinosítideo
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>	Fosfoinosítideo-3-quinase
PRAS40	<i>40kDa Pro-rich Akt substrate</i>	Substrato da AKT rico em prolina de 40 kDa
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>	Proteína homóloga à fosfatase e à tensina
PROTOR	<i>Protein observed with RICTOR 1</i>	Proteína observada com RICTOR 1
RAPTOR	<i>Regulatory-associated protein of mTOR</i>	Proteína da mTOR associada ao domínio regulatório
RICTOR	<i>Rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>	Companhia da mTOR insensível à rapamicina
RHEB	<i>Ras homolog enriched in brain</i>	GTPase homóloga de Ras enriquecida em cérebro
SBNEP		Sociedade Brasileira de Nutrição Enteral e Parenteral

TSC1	<i>Tuberous sclerosis 1- harmatin</i>	Complexo esclerosa tuberosa 1
TSC2	<i>tuberous sclerosis – tuberin</i>	Complexo esclerosa tuberosa 2
v-ATPase	<i>vacuolar H+-adenoside triphosphate ATPase</i>	
VPS34	<i>PI3K catalytic subunit type 3</i>	Subunidade catalítica tipo 3 da PI3K

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes da dieta padrão e dieta suplementada com leucina para roedores.

43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial do câncer	22
Figura 2. Via de sinalização IRS1/AKT/mTOR.	26
Figura 3. A via das proteínas mTORC1 e mTORC2.	28
Figura 4. Alças de contra regulação negativa da via IRS1/AKT/mTOR	33

RESUMO

A proteína mTOR é um proteína reguladora chave de vários processos celulares, dentre eles proliferação, crescimento e sobrevivência celular. Fatores de crescimento, oxigênio, *status* energético e a presença de aminoácidos são fundamentais para que todos esses processos ocorram normalmente. Descobertas realizadas nas últimas décadas mostraram que a via da mTOR encontra-se ativada em vários processos celulares, incluindo formação tumoral e angiogênese. A leucina é um aminoácido de cadeia ramificada que tem o maior potencial em ativar a via da mTOR. Devido sua capacidade de promover a síntese proteica e ganho de massa muscular, seu uso é constantemente estimulado em pacientes com câncer. No entanto, seus efeitos no crescimento tumoral não está claro. Dessa forma, realizamos um estudo cujo objetivo principal foi investigar os efeitos da dieta suplementada com leucina na modulação do crescimento tumoral em diferentes linhagens de células tumorais que se diferenciem em relação à ativação constitutiva da via IRS1/Akt/mTOR. Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados demonstraram que as células que se diferenciam em relação à ativação da via IRS1/AKT/mTOR respondem de maneira distinta à suplementação com leucina. Linhagens de células tumorais que possuem a via da mTOR constitutivamente ativada, PC-3 e MCF-7, quando suplementadas com doses elevadas de leucina *in vitro* reduziram a proliferação celular e causaram retenção das células na fase G1 do ciclo celular. Já o xenoenxerto tumoral da PC-3 reduziu sua proliferação e aumentou a morte celular quando os animais foram suplementados com leucina na dieta. Nós também observamos aumento da atividade da mTOR e da p70S6K em todas as linhagens celulares quando suplementadas com leucina. O aumento da atividade da proteína mTOR foi acompanhado de redução na fosforilação de AKTser473 nas células que possuíam a via da PI3K hiperativada (PC-3 e MCF-7). Esse fato

pode estar ocorrendo devido a ativação das alças de contraregulação ocasionadas pela estimulação excessiva provocada pela suplementação com leucina, naquelas linhagens celulares que já possuem a via hiperativada. Fato este comprovado pelo aumento da fosforilação em serina 307 da proteína IRS1. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a ativação da via da mTOR é central para determinar a sensibilidade de tumores à dieta suplementada com leucina, podendo modular o desenvolvimento tumoral naquelas células que já possuem a via IRS1/AKT/mTOR constitutivamente ativada. O mecanismo pelo qual a leucina pode retardar o desenvolvimento tumoral em células que possuem a via da mTOR hiperativada parece estar relacionado com o eixo de regulação negativa p70S6K-PI3K, com consequente redução da fosforilação de AKT e liberação das vias apoptóticas nos tecidos tumorais.

ABSTRACT

mTOR is a key regulatory protein in various cellular processes including proliferation, cell growth and survival. Growth factors, oxygen, energy status and amino acids are all essential to these processes. New findings in the last few decades have shown that the mTOR pathway is activated in many cellular processes, including tumorigenesis and angiogenesis. The branched chain amino acid leucine has the greatest potential to activate the mTOR pathway. Due to its ability to promote protein synthesis and muscle mass gain, use of leucine is frequently utilized in patients with cancer. However, the effect of leucine on tumor growth is not clear. The aim of this study is therefore to investigate the effect of diet-supplemented leucine on the modulation of tumor growth in several tumor cell lines that differ in the constitutive activation status of the insulin receptor substrate 1 (IRS1)/AKT/mTOR pathway. Both *in vitro* and *in vivo* experiments demonstrated different cell proliferation responses when cells were exposed to high doses of leucine. Tumor cell lines PC-3 and MCF-7, which have a constitutively activated mTOR signaling, displayed reduced cell proliferation and G1 phase cell cycle arrest when supplemented with high doses of leucine *in vitro*. Likewise, leucine-supplemented PC-3 cell tumor xenografts displayed reduced proliferation and increased cell death. We also observed increased activity of mTOR and its downstream substrate p70S6K in all cell lines supplemented with leucine. Increased mTOR activity was accompanied by a reduction in AKT serine 473 (ser473) phosphorylation in cell lines with a hyperactivated PI3K pathway (PC-3 and MCF-7). This most likely occurred because leucine supplementation further increased mTOR and p70S6K activity, triggering the inhibitory p70S6K/IRS1 axis. In fact, we found increased IRS1 ser307 phosphorylation in hyperactivated cell lines (PC-3 and MCF-7) supplemented with high doses of leucine.

Therefore, our results suggest that mTOR pathway activation is central to determining the sensitivity of tumors to leucine supplementation. Furthermore, this could affect the response to leucine-supplemented therapies of those tumors in which the PI3K pathway is constitutively activated. The mechanism for this appears to be related to the negative p70S6K/IRS1 regulation axis, with consequent reduction of AKT phosphorylation and the release of apoptotic pathways in tumor tissues.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
Introdução	21
Epidemiologia do Câncer	22
A via IRS1/AKT/mTOR	25
Objetivos	35
Objetivo geral	36
Objetivos específicos	36
Materiais e Métodos	37
Capítulo 1	51
mTOR activation in cancer cells determines selective sensitivity to leucine-mediated cell proliferation	52
Conclusões	86
Referências Bibliográficas	88
Anexo	96
Anexo 1	97

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Epidemiologia do Câncer

As estatísticas globais do câncer estimam que em menos de 20 anos devam ocorrer cerca de 27 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por câncer (Ferlay *et al.*, 2010). A mais recente publicação da Globocan estimou que em 2012 em todo o mundo havia 14,1 milhões de novos casos de câncer, 8,2 milhões de mortes por câncer e 32,6 milhões de pessoas vivendo com a doença (dentro de 5 anos após o diagnóstico). Destes, 57% dos novos casos de câncer e 65% da mortalidade foram registradas em regiões menos desenvolvidas (figura 1).

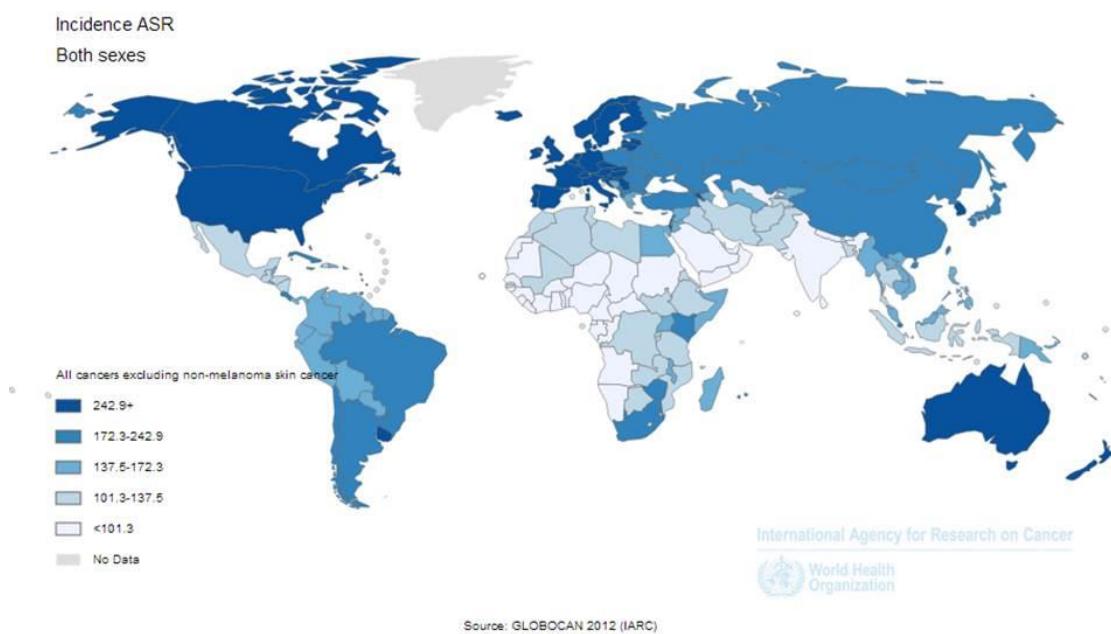


Figura 1. Incidência mundial do câncer

Fonte: GLOBOCAN 2012

No Brasil, a estimativa para o ano de 2014 é de 576 mil casos novos, ou seja, mais de meio milhão de pessoas possuirão algum tipo de neoplasia (INCA, 2013). Fato este que implica no crescimento progressivo dos gastos do governo com a assistência oncológica de alta complexidade. No último levantamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) o aumento encontrado foi de 103% no período de 2000 a 2005. Dados do Tribunal de Contas da União estimam que o Brasil gastou no ano de 2010 cerca de R\$ 1,92 bilhão com o tratamento do câncer. Considerando que esses recursos representam somente aqueles gastos com assistência direta ao tratamento oncológico pelo Sistema Único de Saúde, como quimioterapia, radioterapia e cirurgias oncológicas. O último relatório do Fundo Internacional de Pesquisa em Câncer (World Cancer Research Fund Report, 2014) declarou que em 2010 o custo anual total do câncer foi estimado em aproximadamente US\$ 1,16 trilhões.

Um importante indicador na assistência ao paciente com câncer é a necessidade de tratamento hospitalar. Este apresenta impacto individual com piora na qualidade de vida do paciente como também coletivo, com aumento dos custos do tratamento ao cofre público. Complicações clínicas relacionadas à desnutrição do paciente com câncer são importantes causas de indicação de tratamento hospitalar, além de implicarem em tempo de internação prolongado (Waitzberg *et al.*, 2001). Dessa forma, a implementação de terapia nutricional apropriada durante o tratamento da neoplasia é primordial em vários aspectos do cuidado com o paciente seja no incremento da sua reabilitação, melhora da qualidade de vida, diminuição do tempo de internação hospitalar e, consequentemente, dos custos deste atendimento (Arends *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, inúmeros estudos foram publicados a respeito da dietoterapia para pacientes com câncer. No entanto, os mecanismos pelos quais as proteínas da dieta interferem no metabolismo tumoral ainda são pouco conhecidos. As últimas orientações lançadas pela Sociedade Européia de Nutrição Clínica e Metabolismo (ESPEN – The European Society for Clinical Nutrition and Metabolism) e pela Sociedade Americana de Nutrição Enteral e Parenteral (ASPEN- American Society for Parenteral and Enteral Nutrition) e afirmadas pelas Diretrizes da Sociedade Brasileira de Nutrição Enteral e Parenteral (SBNEP) e Associação Brasileira de Nutrologia (ABN) recomendam o uso de quantidade mínima de proteínas de 1 g/Kg/dia e meta de 1,2 a 2,0 g/Kg/dia (Arends *et al.*, 2006; August and Huhmann, 2009; Pinho *et al.*, 2011).

Apesar disso ainda permanecem dúvidas sobre quais os possíveis efeitos da dieta hiperprotéica no metabolismo tumoral (Bozzetti and Mori, 2009). Um estudo que questionou o conhecimento de pacientes terminais de câncer em relação à nutrição artificial e hidratação encontrou que, aproximadamente 15% dos pacientes acreditavam que a nutrição artificial poderia aumentar a proliferação de células cancerosas e cerca de 50% dos pacientes ainda tinham dúvidas sobre essa possibilidade (Chiu *et al.*, 2004).

Especula-se que uma dieta rica em proteínas poderia favorecer o desenvolvimento tumoral e consequentemente agravar o estado do paciente. Estudos experimentais mostraram que a administração intravenosa de nutrientes, especialmente de aminoácidos, pode levar a um aumento do volume e peso do tumor. Da mesma maneira, foi demonstrado que a terapia nutricional aumenta o número de metástases e de atividade mitótica (Bozzetti and Mori, 2009). Entretanto, até o momento, a ASPEN, ESPEN, SBNEP e ABN afirmam que não

existem dados confiáveis que mostrem qualquer efeito da terapia nutricional no crescimento tumoral (Arends *et al.*, 2006; August and Huhmann, 2009; Pinho *et al.*, 2011).

A via IRS1/AKT/mTOR, Leucina e Câncer

A proteína quinase *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) (previamente chamada de *mammalian target of rapamycin*) é um proteína reguladora chave do metabolismo, crescimento, proliferação e sobrevivência celular. Aminoácidos, glicose e outras fontes de carbono são fundamentais para que todos esses processos ocorram normalmente. Para isso as células desenvolveram mecanismos que garantem que o crescimento celular só ocorra quando os nutrientes básicos forem abundantes. No entanto, quando os estímulos proliferativos deixam de ser regulados adequadamente pelos sinais de *status* energético, vários processos patológicos podem ocorrer incluindo neoplasias, diabetes tipo 2 e neurodegeneração (Zoncu, Efeyan, *et al.*, 2011). Neste contexto, a mTOR desempenha papel fundamental em acoplar o crescimento celular com o *status* nutricional da célula (Efeyan *et al.*, 2012).

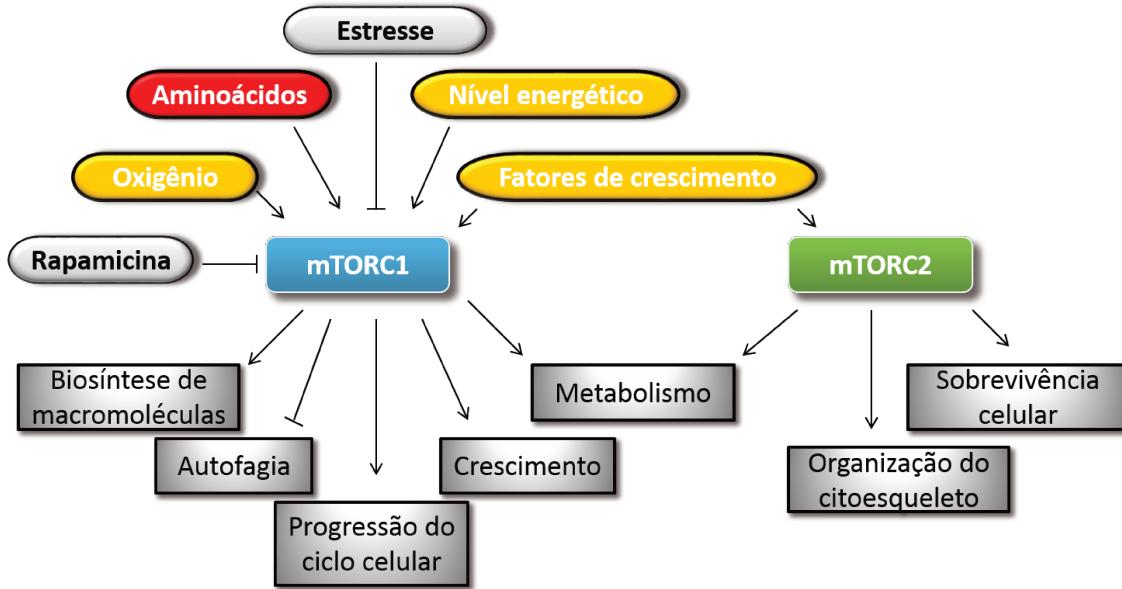


Figura 2. A via das proteínas mTORC1 e mTORC2.

O câncer é caracterizado por crescimento e proliferação celular, sustentado mesmo em condições sub ótimas de nutrientes e condições ambientais. Descobertas realizadas nas últimas décadas mostraram que a via da mTOR encontra-se ativada em vários processos celulares, incluindo formação tumoral e angiogênese. Além disso, sua atividade apresenta-se desregulada em doenças humanas como o câncer. Esse conhecimento tornou o estudo da ativação da mTOR ainda mais intrigante e estimulante no meio científico (Laplante and Sabatini, 2009).

A proteína mTOR caracteriza-se por ser uma serina/treonina quinase que pertence à família de quinases relacionadas ao fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K) e interage com várias proteínas para formar dois complexos distintos chamados complexo 1 da mTOR (mTORC1) e complexo 2 da mTOR (mTORC2) (Laplante and Sabatini, 2012).

O complexo 1 da mTOR (mTORC1) é definido pela presença de Raptor, mLST8/G β L, Deptor e Pras40 (Kim *et al.*, 2002; Loewith *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Sancak *et al.*, 2007), enquanto que Rictor, G β L, Protor, Deptor e mSin formam o complexo 2 da mTOR (mTORC2) (Loewith *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004; Frias *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006). As proteínas mTORC1 e mTORC2 são ativadas de maneiras diferentes e possuem substratos específicos distintos.

O complexo mTORC1 é melhor caracterizado que o mTORC2, sendo característica marcante deste eixo da via o grande número e diversidade de sinais *upstreams* que sensibilizam essa proteína. A via da mTORC1 integra sinais de pelo menos 5 importantes condicionantes da regulação celular, interna ou externa: fatores de crescimento, estresse, *status* energético, oxigênio, e aminoácidos. Sendo assim, determinante no controle de cruciais processos de vida e morte celular, incluindo síntese de lipídios, proteínas e autofagia (Efeyan *et al.*, 2012) (figura 3).

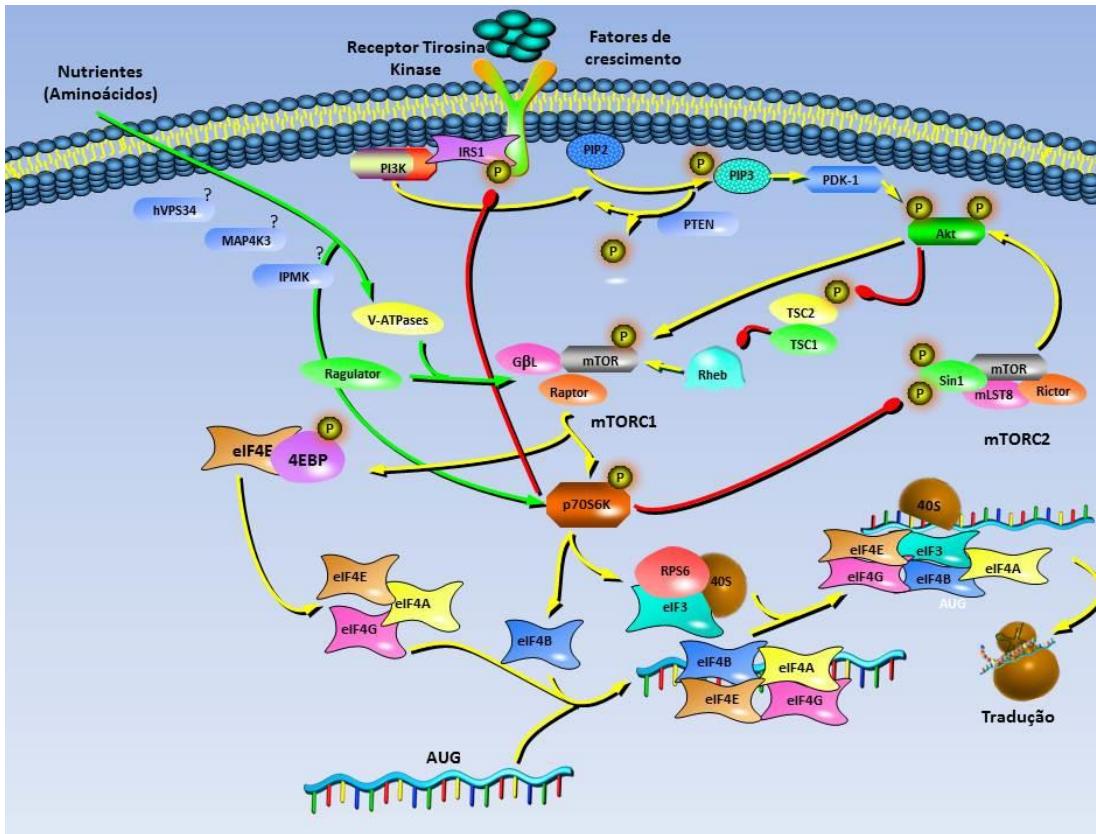


Figura 3. Via de sinalização IRS1/AKT/mTOR. Linhas e setas em amarelo indicam efeito positivo de ativação ou inibição. Linhas e setas em vermelho indicam contra regulação negativa. Linhas e setas em verde indicam ação dos aminoácidos.

O heterodímero constituído pelo *tuberous sclerosis 1* (TSC1, também conhecido como harmatin) e TSC2 (também chamado de tuberin) apresenta-se como regulador chave upstream da mTORC1 e age como proteína ativadora de GTPase (GAP) da proteína *Ras homolog enriched in brain* (Rheb). Rheb quando ligada à GTP interage diretamente com a mTORC1, estimulando fortemente sua atividade quinase. Por outro lado, a regulação negativa da mTORC1 se dá através da conversão de Rheb para a sua forma inativa ligada à GDP (Inoki *et al.*, 2003; Tee *et al.*, 2003).

Dessa forma, TSC1/2 é responsável por transmitir vários dos sinais *upstream* que incidem sobre a mTORC1, incluindo fatores de crescimento, como a insulina e fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1), estimulando a PI3K e a via da RAS (Inoki *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002). No entanto, a ativação da mTORC1 também pode acontecer por vias independentes de TSC1/2. Destacam-se entre elas a fosforilação de PRAS40 pela proteína AKT gerando dissociação de Raptor, um inibidor da mTORC1 (Sancak *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007).

Bastante importante também é a ação reguladora positiva da mTORC1 exercida pelos aminoácidos (Guertin and Sabatini, 2007). Neste contexto, a leucina é conhecida como o aminoácido de maior potência na ativação da proteína mTOR quando comparada a outros aminoácidos (Lynch *et al.*, 2002; Nishitani *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2003; Avruch *et al.*, 2009). Sabe-se que a ativação da mTORC1 pelos aminoácidos ocorre de maneira independente do eixo de sinalização AKT-TSC (Smith *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a inibição da mTOR pela rapamicina é parcialmente efetiva no bloqueio dos efeitos da leucina ou demais aminoácidos, sugerindo que vias sensíveis e insensíveis à rapamicina podem estar envolvidas (Lynch *et al.*, 2003). Muito importante para sua ação é o seu acesso ao meio intracelular, que acontece de maneira dependente de glutamina através do transportador bidirecional SLC7A5 (Nicklin *et al.*, 2009).

Sabe-se que a ativação da mTORC1 dependente de aminoácidos necessita de RagGTPases (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). Mamíferos têm quatro proteínas Rag, que formam heterodímeros obrigatoriamente constituídos por Rag A ou Rag B com Rag C ou Rag D. Os dois membros do heterodímero parecem ter estados opostos, assim, quando RagA/B está ligado a GTP, Rag C/D está ligado a GDP e *vice e versa*. Por um mecanismo desconhecido,

os aminoácidos promovem a ligação de RagA/B com GTP, que permite que o heterodímero interaja com o componente Raptor da mTORC1. Essa interação resulta na translocação da mTORC1 de uma localização citoplasmática para a superfície lisossomal que contém seu ativador Rheb. As razões pelas quais a translocação da mTORC1 para a superfície lisossomal culminam na sua ativação ainda não estão totalmente esclarecidas (Sekiguchi *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). Contudo, evidências atuais sugerem que, na superfície lisossomal, mTORC1 pode se ligar a Rheb e ser ativada por ele (Buerger *et al.*, 2006). Assim Rheb ligada a GTP somente interage com mTORC1 quando o mecanismo sensível a aminoácidos de Rag-Ragulator arrasta a mTORC1 até a superfície lisossomal. Isso assegura, portanto, que a ativação da mTORC1 ocorra somente quando houver disponibilidade de aminoácidos, independente da presença de outros sinais positivos (Long *et al.*, 2005).

É possível ainda que existam outros mediadores que comuniquem às proteínas Rag a disponibilidade de aminoácidos. Recentemente foi proposto que o acúmulo de aminoácidos no lúmen lisossomal inicia a sinalização através de um mecanismo que necessita da *vacuolar H⁺-adenoside triphosphate ATPase* (v-ATPase) (Zoncu, Bar-Peled, *et al.*, 2011). A v-ATPase interage diretamente com *Ragulator*, promovendo *link* físico entre v-ATPase e Rag GTPase, na superfície dos lisossomos. Foi demonstrado ainda que a via da mTORC1 regula a expressão de v-ATPase, sugerindo que exista uma alça de controle entre mTORC1 e a função lisossomal (Pena-Llopis *et al.*, 2011).

Outras proteínas também foram sugeridas de estarem envolvidas na sensibilidade de aminoácidos pela mTORC1, incluindo *mitogen-activated protein kinase kinase kinase* (MAP4k3) (Findlay *et al.*, 2007), *mammalian vacuolar protein sorting 34 homolog* (hVPS34) (Nobukuni *et al.*, 2005), e *inositol polyphosphate monokinase* (IPMK) (Kim and

Snyder, 2011). No entanto, os mecanismos pelos quais essas moléculas se conectam ao sistema Rag-Ragulator ainda são desconhecidos (Efeyan *et al.*, 2012).

A mTORC1 ativada fosforila, entre outros alvos, as proteínas p70S6K1 e 4EBP1. Sabe-se que os aminoácidos, especialmente a leucina, regulam positivamente a sinalização da mTOR, por meio da liberação da inibição da tradução pela 4E-BP (*eukaryotic initiation factor 4E-binding proteins*) e ativando S6Kinases, que também podem regular a tradução (Proud, 2002). Dessa forma, exercem importantes ações na regulação do início da tradução, síntese protéica e ganho de massa celular (Sarbassov *et al.*, 2005).

Todas essas observações suportam a importância da via da IRS1/AKT/mTOR na patogênese do câncer (Luo *et al.*, 2003). Muitos componentes de sinalização desta via sofrem mutações nas neoplasias humanas, como PI3K, TSC1/2, *serine threonine kinase 11* (Lkb1), PTEN, e neurofibromatose tipo 1 (Nfl) (Samuels and Ericson, 2006; Song *et al.*, 2012). Estas alterações geram ativação oncogênica da sinalização da AKT e mTOR induzindo vários dos processos requeridos no câncer como o crescimento, sobrevivência, e proliferação celular (Laplante and Sabatini, 2012).

Neshat *et al.* (2011) avaliou o desenvolvimento tumoral em camundongos heterozigotos para PTEN^{+/−} e mostrou incidência aumentada para tumor uterino e da medula adrenal. Nas lesões neoplásicas a expressão de PTEN estava reduzida ou ausente e a atividade de S6K estava aumentada. Nesses animais o tratamento com um análogo da rapamicina diminuiu a atividade da S6K, mas manteve os altos níveis de fosforilação da AKT (Podsypanina *et al.*, 2001). Da mesma maneira, trabalho desenvolvido com linhagens celulares deficientes em PTEN por

Neshat *et al.* mostrou aumento de fosforilação de S6, sensível ao tratamento com análogo da rapamicina, mas não interferiu na fosforilação em AKT (Neshat *et al.*, 2001).

Dada a importância deste eixo para a regulação de diversos processos celulares, que existem numerosas alças de regulação negativa para exercer seu fino controle (figura 4). Uma delas ocorre através da fosforilação e degradação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1), desencadeada pela ativação da mTORC1 e consequentemente da S6K1, reduzindo sua capacidade de sinalização *downstream* ao receptor tirosina quinase (Harrington *et al.*, 2004; Um *et al.*, 2004). Assim mTORC1 regula negativamente a sinalização de fatores de crescimento pela direta fosforilação de IRS1 (Tzatsos and Kandror, 2006) e do receptor tirosina quinase inibidor do fator de crescimento ligado a proteína 10 (Grb10) (Hsu *et al.*, 2011). Além disso, a redução da expressão do receptor do fator derivado de plaquetas (PDGFRs), através de mecanismos ainda desconhecidos, é outra forma pela qual a mTORC1 influencia na contraregulação proliferativa (Zhang *et al.*, 2007). Além disso, recentemente foi demonstrado por Liu *et al.* outro importante eixo de regulação negativa, em que p70S6K fosforila o componente essencial da mTORC2 Sin1, nos sítios de treonina 86 e 398, levando à inativação da mTORC2. Assim, S6K interfere com a função da mTORC2, e consequentemente com a ativação da AKT, através da fosforilação de Sin1. Isto formaria mais um eixo inibitório entre mTORC1 e mTORC2, que ocorreria provavelmente em resposta a múltiplos estímulos de fatores de crescimento (Xie and Proud, 2013).

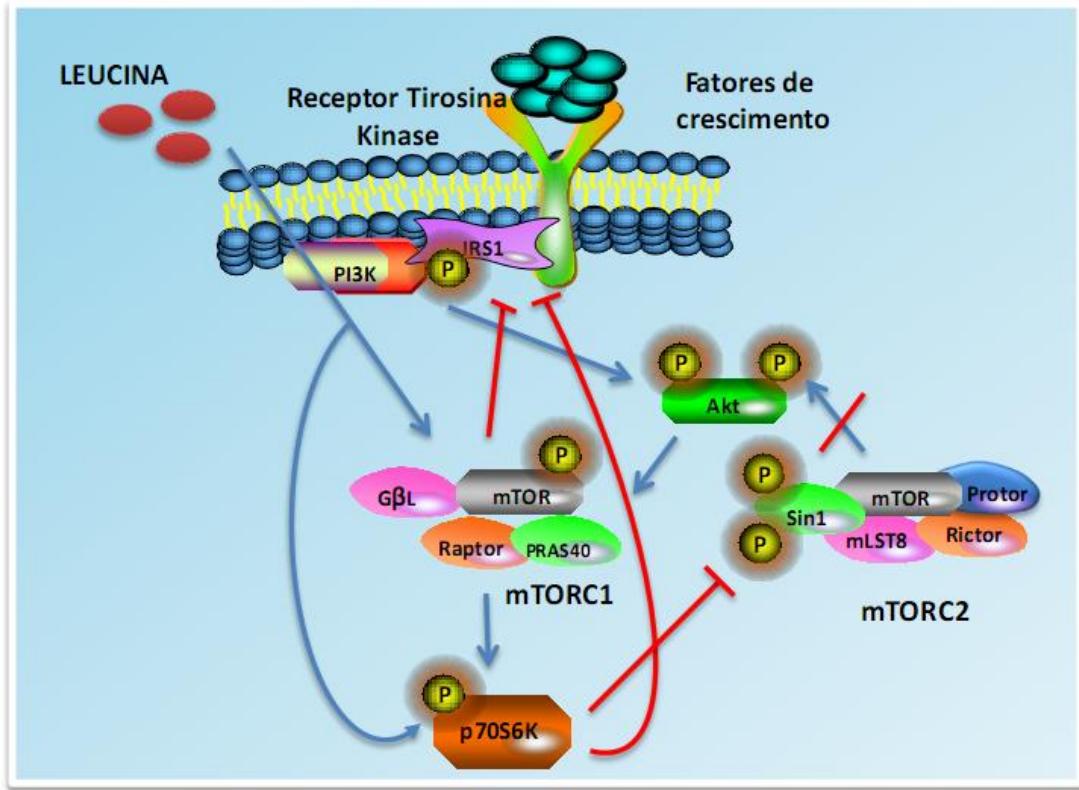


Figura 4. Alças de contra regulação negativa da via IRS1/AKT/mTOR

Elegante estudo de Kalaany e Sabatini recentemente demonstrou que mutações na via da IRS1/AKT/mTOR geram sensibilidades diferentes à disponibilidade de nutrientes. Nesse estudo observou-se que certas linhagens de tumores humanos, quando crescem em xenoenxertos em camundongos, são altamente sensíveis aos sinais anti-crescimento da restrição dietética, enquanto que outras são resistentes. As células cancerosas que formam os tumores resistentes à restrição dietética carregam uma mutação que causa ativação constitutiva da via da PI3K. A restrição dietética não afeta o modelo de câncer de próstata que possui células deficientes em PTEN, mas essa diminui significativamente o crescimento de tumores num modelo de câncer de pulmão que não possui essa deficiência na sinalização

da via da PI3K. Assim, os autores do estudo concluem que a via da PI3K é um determinante importante da sensibilidade de tumores à restrição dietética, e mutações que causem ativação dessa via podem influenciar na resposta dos tumores às terapias que mimetizem a restrição dietética (Kalaany and Sabatini, 2009).

Conhecendo-se então a indiscutível importância da via IRS1/AKT/mTOR na fisiopatologia do câncer além das influências diretas e indiretas da disponibilidade de nutrientes sobre ela, com importante destaque para a leucina, nosso trabalho tem como objetivo investigar os efeitos de uma dieta rica em leucina na modulação do crescimento tumoral em diferentes linhagens de células tumorais que se diferenciem em relação à ativação constitutiva da via IRS1/Akt/mTOR.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar os efeitos da dieta suplementada com leucina na modulação do crescimento tumoral em diferentes linhagens de células tumorais que se diferenciem em relação à ativação constitutiva da via IRS1/Akt/mTOR.

Objetivos específicos

Analizar a atividade das proteínas da via IRS1/Akt/mTOR após a exposição à diferentes concentrações de leucina, em diferentes linhagens de células tumorais, sem ativação constitutiva da via IRS1/Akt/mTOR (DU-145, HT-29, A-549), e que apresenta ativação constitutiva da via IRS1/Akt/mTOR (PC-3, MCF-7).

Analizar os efeitos da leucina na proliferação de diferentes linhagens de células tumorais sem ativação constitutiva da via IRS1/Akt/mTOR (DU-145, HT-29, A-549) e que apresenta ativação constitutiva da via IRS1/Akt/mTOR (PC-3, MCF-7).

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os reagentes e os aparelhos para o gel de sódio dodecil sulfato de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram da *Bio-Rad* (Richmond, CA). Tampão TRIS-HCl, fluoreto de fenilmetanossulfonila (PMSF), aprotinina, ditiotreitol (DTT) foram da *Sigma Chemical Co.* (St. Louis, MO). A membrana de nitrocelulose (0,25 mm) foi da *Bio-Rad*. Os anticorpos anti-mTOR, anti-phospho-mTOR Ser 2448, anti-p70S6K, anti-phospho-p70S6K Thr 389, anti-phospho-4E-BP1 Thr70, anti-4E-BP1, anti-Akt, anti-phospho-Akt Ser 473, anti-Bax, anti-Bcl2 (SC 492) foram da *Cell Signaling technology* (Beverly, MA, USA). Os meios de cultura celular foram adquiridos da Cultilab e o soro fetal bovino (FBS) da Gibco® (*Life Technologies – Invitrogen*). A L-leucine foi adquirida da Sigma-Aldrich®. FITC Anexina V e Iodeto de propídeo (PI) foram comprados da BD Biosciences Pharmigen (Franklin Lakes, NJ). O conjunto para análise de proliferação celular (*Cell Trace CFSE Cell Proliferation Kit* (C34554)) foi adquirido da *Invitrogen*. Optimen e Lipofectamina®2000 foram adquiridos da *Life Technologies – Invitrogen*, assim como o siRNA da PTEN (Silencer® Select pre-designed - S 325 Cat 4392420) e o controle negativo (Silencer® Select Negativo Control – Cat 4390843).

Linhagens celulares

As células de linhagem de tumor de cólon (HT-29), tumor prostático (PC-3), tumor de pulmão (A-549) e tumor de mama (MCF-7) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). E a de tumor prostático (DU-145) foi obtida da *American Type Culture*

Collection (ATCC), Filadelfia, PA, USA. As células foram cultivadas em meio apropriado de acordo com recomendações da ATCC (células HT-29 em meio Maccoy, células PC-3 em meio RPMI, células A-549, MCF-7 e DU-145 em meio DMEM) todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino, e adicionados de antibactericida e antifúngico. A incubação foi realizada a uma temperatura de 37 °C e em atmosfera gasosa úmida a 5% de CO₂.

A linhagem de adenocarcinoma de cólon HT-29 foi isolada em 1964 por J. Fogh a partir de tumor primário do epitélio do cólon de uma mulher caucasiana de 44 anos de idade. A linhagem de carcinoma prostático DU-145 foi isolada de um homem caucasiano de 69 anos. A linhagem de adenocarcinoma de pulmão humano A-549, foi extraída em 1972 de um tecido carcinomatoso de pulmão de um homem de 58 anos, cor branca (PubMed 4.357.758). Já a linhagem de adenocarcinoma prostático PC-3 foi estabelecida a partir de tecido tumoral metastático presente na vértebra lombar de um homem caucasóide de 62 anos. A linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 foi isolada de uma mulher caucasiana, de 69 anos de idade.

As mutações nos genes *PI3KCA*, *PTEN*, *KRAS* e *BRAF* estão entre as mais frequentes alterações em células tumorais. A presença dessas alterações levam à hiperativação da via IRS1/AKT/mTOR. Dentre as linhagens tumorais estudadas as células HT-29 e MCF-7 possuem mutações em *PI3KCA*. A linhagem HT-29 apresenta ainda mutação em *BRAF* (Het C.1799T>A). A linhagem PC-3 possui deleção da proteína *PTEN* (Hom C.165-1026 del 862). E a linhagem A-549 apresenta mutação em *KRAS* (Hom C.34G>A). Já a linhagem DU-145 não apresenta mutações nessas vias de interesse.

Transfecção Celular

Um total de 3.10^5 células de cada linhagem celular (HT-29, DU-145, A-549, PC-3 e MCF-7) foram plaqueadas em meio de cultura específico para cada linhagem celular e incubada *overnight*. Foi realizada transfecção com o RNA de interferência (siRNA) com alvo para a proteína PTEN (si-PTEN, Silencer® Select Pre-designed s325) ou o controle negativo *scrambled control siRNA* (Silencer® Select Pre-designed 4309843). As linhagens celulares foram lavadas com meio de cultura sem soro e sem glucose (Opti-MEM, Life Technologies) e incubadas com 2 mL do mesmo meio de cultura contendo siRNA (concentração final de 10 nM) previamente adicionado de 5 μ L de Lipofectamina 2000 (Life Technologies). Após 7 horas, 1 mL de Opti-MEM contend 30% de FBS foi adicionado ao meio de cultura contendo o siRNA e a Lipofectamina. Após 17 horas, o meio de cultura foi trocado para o meio de cultivo completo específico de cada linhagem celular. Após 12 horas, células foram colocadas em carenciamento *overnight* e em sequência foram realizados os tratamentos com diferentes doses de leucina, em acordo com cada procedimento realizado.

Animais

Os camundongos utilizados para o estudo foram da linhagem NOD.CB17-Prkdc^{scid}/JUnib, com idade de 8-10 semanas (20-25 g), fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp (CEMIB), Campinas-SP. Os animais eram mantidos em gaiolas com no máximo 5 animais por caixa, em cama de maravalha, em sala climatizada, em ciclo claro-escuro de 12 horas. Estes animais foram randomicamente divididos em 2 grupos experimentais e receberam dieta controle ou suplementada com leucina e água filtrada *ad libitum*. Cada grupo continha no

mínimo 5 animais, sendo que estes eram identificados e acompanhados individualmente durante todo o experimento. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia da UNICAMP (protocolo nº 2323-1).

Implante tumoral

Camundongos NOD.CB17-Prkdc^{scid}/JUnib foram inoculados com 1×10^6 (em 0,1 mL) células de linhagem tumoral específica (HT-29, PC-3 ou A-549) na região subcutânea dorsal.

O peso e o crescimento tumoral foram avaliados periodicamente, começando a partir da data da inoculação do tumor. A medida do tumor foi convertida em volume do tumor (V) a partir da fórmula ($V = W \times L [(W + L)/2] \times 0,52$), em que W e L são o menor e o maior diâmetro.

Os animais foram acompanhados durante 15 dias após o tumor atingir volume igual a 50 mm³. Ao final, os camundongos foram pesados e sacrificados, e os tumores extraídos.

Avaliação da Ingestão Alimentar

Os animais foram alimentados com suas respectivas dietas (padrão ou suplementada com leucina) e receberam água filtrada *ad libitum*. Durante 10 dias antes da inoculação tumoral, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais (Tecniplast®). Os três primeiros dias representou a fase de adaptação, em que não houve medida de ingestão. Nos demais dias a ingestão alimentar foi determinada pela aferição da diferença de peso entre o alimento oferecido e o alimento restante na gaiola diariamente às 18:00h.

Dieta

Os animais controles foram alimentados com dieta padrão (CTL) (baseada na AIN93-M) (Reeves, Nielsen et al. 1993), oferecida livremente. Os grupos de tratamento receberam suplementada com leucina (LEU). Estas dietas foram elaboradas com o intuito de manter ofertas calóricas similares.

O cálculo da composição centesimal das dietas foi realizado da seguinte forma: a caseína comercial contém 11,99% de leucina (Roman JA; Sgarbieri VC, 2005). Dessa maneira, a dieta padrão (CTL) fornecida aos camundongos contém 140 g de caseína (16,8 g de leucina). Com o objetivo de confeccionar dieta com mesma quantidade de leucina de uma dieta hiperprotéica (50% de proteína e 60 g de leucina) a dieta padrão foi suplementada com leucina (L-leucine Sigma-Aldrich®). Assim, a dieta suplementada com leucina (LEU) contém 16,8 g de leucina advinda da caseína da dieta padrão, e as demais 43,2 g foram suplementadas. As dietas foram adquiridas da empresa Rhoster®.

Tabela 1. Componentes da dieta padrão para roedores e dieta suplementada com leucina.

	Dieta Padrão (CTL) (g/Kg de dieta)	Dieta suplementada com leucina (LEU) (g/Kg de dieta)
Caseína	140	140
L-Leucine*	0	43,2
Sacarose	100	100
Amido de milho	465,6	422,4
Amido dextrinizado	155	155
Óleo de soja	40	40
Celulose	50	50
Mix mineral AIN-93	35	35
Mix de Vitaminas AIN-93	10	10
L-cistina	1,8	1,8
Colina	2,5	2,5
Total	1000	1000
Energia (Kj/g)	15,9	15,9
% Energia		
% Proteína	14	20
% Lipídio	10	10
% Carboidrato	76	70

*L-leucine Sigma-Aldrich® adicionada somente à dieta suplementada com leucina.

Nota: A dieta CTL fornece 16,8 g de leucina, enquanto que as dietas HPD e LEU fornecem 60 g de leucina cada.

Extração do Tumor

Os animais foram anestesiados com Ketamina/Xilazina (200/5 mg/kg), e foram utilizados após 15 minutos, assegurando-se de que a anestesia fez efeito através da avaliação da perda dos reflexos pés-pedal e córnea. Foi coletado cerca de 1 mL de sangue de cada animal para obtenção de soro para análises séricas. Os tumores foram extraídos e separados para extração proteica ou imunohistoquímica.

Western Blotting

Extração de Proteínas

O material extraído do tumor ou das placas de cultivo celular foi imediatamente colocado em tampão de extração (1% Triton X-100, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 100 mM pirofosfato de sódio, 100 mM fluoreto de sódio, 10 mM EDTA, 10 Mm ortovanadato de sódio, 2 mM fluoreto de fenilmetanossulfonila e 0.1 mg/mL aprotinina) a 4 °C e homogeneizado com Politron PTA 20S Generator (Brinkmann Instruments model PT 10/35, Westbury, NY, EUA), ajustado à velocidade máxima por 30 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 11000 rpm a 4 °C em um rotor “Beckman 70,1”, por 40 minutos para remoção de material insolúvel. O sobrenadante foi utilizado para a análise por extrato total e imunoprecipitação com anticorpos específicos. A determinação de proteína foi realizada pelo método de BIURETO (Henry and Berkman 1957). O volume das amostras foi normalizado por concentração protéica.

Análise Protéica por *Immunoblotting*

As proteínas foram ressuspensas em tampão de Laemmli (Laemmli 1970), contendo 100 mM de DTT. Após aquecimento em água fervente por 5 minutos, foram aplicadas em gel de poliacrilamida para separação por eletroforese (SDS-PAGE). O gel foi balizado por marcador de peso molecular da Bio Rad. A eletroforese foi realizada em cuba de minigel da Bio Rad, com solução tampão para eletroforese previamente diluída. O SDS-PAGE foi submetido a 70 volts inicialmente até a passagem pela fase de empilhamento (*stacking*) e 120 volts até o final do gel de resolução (*resolving*). As proteínas separadas em SDS-PAGE foram

transferidas para membrana de nitrocelulose em aparelho de transferência da BIO-RAD banhadas com tampão de transferência durante 60 minutos a 120 Volts em gelo, como descrito por Towbin et al (Towbin, Staehelin et al. 1979).

As membranas com as proteínas transferidas foram incubadas em solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) por duas horas a temperatura ambiente a fim de diminuir a ligação inespecífica dos anticorpos à membrana de nitrocelulose. Após lavadas em solução basal, estas membranas foram então incubadas com anticorpos específicos, mantidas a 4 °C, *overnight*, sob agitação contínua. Em seguida as membranas foram novamente lavadas com solução basal e a detecção das bandas foi realizada utilizando anticorpo secundário ligado a uma molécula de peroxidase, que reagiu à solução de quimioluminescência (SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific) seguindo as instruções do fabricante. As membranas sofreram exposições a filmes de RX e posteriormente reveladas e as bandas identificadas na autoradiografia quantificadas através de densitometria óptica e análise por software específico para análise de bandas UN-SCAN-IT™ 6.0.

Imunoprecipitação

Após a extração, o material insolúvel foi removido por centrifugação durante 45 minutos a 11.000 rpm a 4 °C. A determinação protéica foi realizada através do método de Biureto. O volume das amostras foi normalizado por concentração protéica e as referidas amostras foram incubadas com anticorpo específico e permaneceram sob agitação contínua, a 4 °C durante 12 horas. A seguir, foram acrescentados 60 µL de proteína A-Sepharose 6MB para precipitação do complexo proteína A anticorpo, mantida sob agitação contínua por duas

horas. As amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 11.000 rpm a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado três vezes com solução tampão específica para lavagem (2 mmol/L Ortovanadato de Sódio; 100 mmol/L Trisma; 1 mmol/L EDTA e 0,5% Triton X-100). A seguir, as proteínas precipitadas foram acrescidas de tampão de Laemmli contendo 100 mM de DTT e aquecidas a 100 °C por 5 minutos. As proteínas foram então analisadas pela técnica de *immunoblotting*.

Imunohistoquímica

Preparação da Histologia

Fragmentos do tumor foram retirados para procedimento histológico. Os materiais foram imediatamente colocados em um recipiente contendo paraformaldeído tamponado a 4%, ficaram por pelo menos 6 horas e máximo de 24 horas em banho para adequada fixação. Posteriormente os tecidos foram processados com álcool em crescentes concentrações (70%, 80%, 95% e 100%), xilol e parafina, incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 mm com o auxílio de um micrótomo e fixados em lâminas de microscopia. Para a visualização das estruturas em microscópio óptico, os cortes foram corados com hematoxilina e eosina.

Ki-67

Para detecção do Ki-67, após desparafinização, a permeabilização foi realizada em um forno de microondas doméstico a 700W, com as lâminas imersas em um tampão de citrato a

0,01 mol/L e pH igual a 6, estas foram aquecidas por duas vezes, durante 5 minutos, com um intervalo de 2 minutos entre as imersões, o que permitia a reposição do tampão. As lâminas foram mantidas em temperatura ambiente para resfriarem, após serem retiradas do forno. Em seguida, foi realizado o bloqueio com peroxidase endógena (1% H₂O₂ em metanol) por 15 minutos, seguido de tratamento com proteinase K (20 µg/mL) por 30 minutos. Após o bloqueio com BSA 3%, as lâminas foram incubadas *overnight*, em temperatura ambiente, com anticorpo monoclonal de origem murina para Ki-67 clone MIB-1 anti-humano (*Dako Cytomation*) (diluído 1:150). As lâminas foram incubadas com o kit LSAB+ e complexadas com avidina-biotina (*Dako Cytomation*), por 30 minutos, seguido da adição de tetrahidrocloreto diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Aldrich*) como uma solução de substrato cromógeno. Após coloração com hematoxilina e desidratação, as lâminas foram montadas em Entellan (*Merck, Darmstadt*, Alemanha).

TUNEL

A coloração do *Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin -d UTP Nick End Labeling* (TUNEL) foi realizada utilizando um kit comercial para detecção de apoptose (Upstate- 17 141), de acordo com as recomendações do fabricante.

ELISA

A análise sérica de insulina foi determinada através de kits comerciais disponíveis ELISA (Millipore, St. Charles, MO, USA).

Quantificação da leucina sérica

Os aminoácidos livres foram extraídos do soro em etanol 80% e 0,1 M HCl, e a metioninassulfona adicionada como padrão interno. A mistura foi sonicada por 10 minutos e em seguida homogeneizada por 1 hora, seguida de centrifugação a 1000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado em uma membrana de 0.22 mm e 40 µL derivatizados. Os aminoácidos livres no soro foram extraídos com metanol e derivatizados com fenilisotiocianato. Foram injetados 20 µL dos derivados em cromatografia líquida equipado com coluna Luna-C-18, 250x4.6mm (00G-4252-EQ) a 50 °C. A quantificação foi realizada pela comparação com o padrão e a metioninassulfona.

Análise por Citometria de Fluxo

Os experimentos para a análise de proliferação, morte e ciclo celular foram realizados em citômetro de fluxo FACS Calibur® equipado com laser de argônio e software *CellQuest*® (*Becton Dickinson*). Para cada amostra foram coletados 10000 eventos e as populações de cada linhagem de células (HT-29, DU-145, A-549, PC-3 e MCF-7) foram identificadas por suas características de tamanho e granulosidade e analisadas através da intensidade de fluorescência dos marcadores utilizados para cada tipo de experimento.

Para os ensaios de proliferação celular (CFSE), morte celular (Anexina V/Iodeto de propídeo) e ciclo celular foram plaqueadas 10^4 células/poço das linhagens celulares, em uma placa com 6 poços. As células foram cultivadas por 24 horas, após esse período foi realizado procedimento para sincronização celular, tratando as células com meio sem FBS por 24h. A

partir deste ponto as células eram tratadas de maneira diferente para cada análise, conforme descrição abaixo.

Análise da viabilidade celular por Anexina V e iodeto de propídeo A

A análise de anexina-V marcada com FITC avalia os níveis de fosfatidilserina expostas na membrana celular externa que se ligaram à anexina V, detectando a fase inicial da apoptose (também denominada de apoptose precoce). Quando se associa o iodeto de propídio na análise, é possível avaliar células com permeabilidade de membrana, o que indica, por sua vez, a fase tardia de apoptose ou necrose. Ainda, a presença de dupla marcação referente à anexina V e ao iodeto de propídio sugere apoptose tardia (PEC et al., 2003).

Cada linhagem celular (HT-29, DU-145, A-549, PC-3 e MCF-7), após tratamento com diferentes doses de leucina, foi tripsinizada e centrifugada a 300 x g por 5 min. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 200 µL de tampão de ligação (10 mM HEPES, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂ e 1,8 mM CaCl₂), em seguida foram adicionados 2 µL de anexina V conjugada com FITC e 4 µL de iodeto de propídeo. A reação foi incubada por 20 minutos, a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. As intensidades de fluorescência FITC e iodeto de propídeo foram avaliadas em canais FL-1H e FL-2H do citômetro de fluxo FACS Calibur, respectivamente.

Antes da aquisição, foi realizada a compensação de cada linhagem celular. Para cada ensaio, foram incluídas células tratadas e não tratadas, utilizadas como controle negativo interno ao experimento. Foi considerada morte celular aquelas células que apresentaram qualquer marcação positiva para Anexina V, iodeto de propídeo ou ambos.

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm Erro Padrão da média (E.P) acompanhado pela indicação do número de camundongos usados no experimento. A comparação entre os grupos foi feita através de teste paramétrico ANOVA (*one-way*) e teste *post hoc* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística.

CAPÍTULO 1

**mTOR activation in cancer cells determines selective sensitivity to leucine-mediated
cell proliferation**

**Maria Carolina Santos Mendes¹, Daiane S. M. Paulino¹, Guilherme Z. Rocha¹, Carolina
Sollon¹, Danilo M. Damas-Souza², Hernandes F. Carvalho², Gabriel Anhê¹, Eduardo R.
Ropelle³, Mario J. A. Saad¹, José Barreto C. Carvalheira¹.**

¹Medical Science Faculty, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

²Cell Biology, Physiology and Biophysics Institute, State University of Campinas, Campinas,
São Paulo, Brazil.

³Applied Science Faculty, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

Keywords: branched-chain amino acids, mTOR pathway, cancer

Financial support: FAPESP, CNPQ, CAPES, INCT

Corresponding author: José Barreto C. Carvalheira, Department of Internal Medicine,
FCM–UNICAMP, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Campinas, SP, Brazil, 13083-970.

Phone: 55-19-35218950

Fax: 55-19-35218950

E-mail: carvalheirajbc@uol.com.br

Branched chain amino acid supplementation is widely used by cancer patients to prevent muscle mass loss and cachexia. Leucine activates the mTORC1 complex and is essential for proper signaling of growth factors. However, its effects on tumor growth are controversial and unclear. Here we show that xenografts of a specific cancer cell line (PC-3) display decreased tumor growth rate in response to leucine supplementation in immunosuppressed mice, in an mTOR-dependent manner. We observed decreased proliferation and G1 phase cell cycle arrest upon leucine supplementation of mTOR-hyperactivated PC-3 and MCF-7 cell lines *in vitro*. Our results demonstrate that leucine supplementation impairs tumor growth in mTOR-hyperactivated cancer cell lines through p70S6K/IRS1 (insulin receptor substrate 1) feedback loop activation. This results in IRS1 ser307 phosphorylation, reduction of AKT ser473 phosphorylation and release of apoptotic pathways in tumor tissue. This study reveals that mTOR pathway activation is central to determining the sensitivity of tumors to leucine supplementation, and could affect the response of cancers to leucine-supplemented therapies.

Introduction

Cancer-induced malnutrition and weight loss are associated with increased morbidity and mortality (Klidjian *et al.*, 1982; Waitzberg *et al.*, 2001). Thus, the maintenance or gain of muscle mass is a major challenge for the preservation of cancer patients quality of life (Arends *et al.*, 2006; August and Huhmann, 2009). Leucine, a branched chain amino acid, has been extensively studied for its ability to stimulate protein synthesis and decrease degradation of muscle mass (Rieu *et al.*, 2006; Peters *et al.*, 2011). Due to these properties the use leucine as nutritional support for cancer patients is commonly recommended (Morley *et al.*, 2010; Deutz *et al.*, 2011). Although, this nutritional strategy is protective to the muscle, its effects on carcinogenesis is largely unknown.

Leucine primarily promotes protein synthesis through activation of mTORC1 complex (Blommaart *et al.*, 1995; Hara *et al.*, 1998). In addition, leucine is essential for growth factors adequately transduce their signal through mTOR (Sancak *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2010; Zoncu *et al.*, 2011). Importantly, signaling by mTOR controls cellular programs associated with carcinogenesis; including cell cycle control, cell proliferation, metabolism, motility and genomic instability (Luo *et al.*, 2003). Moreover, cancer genomic studies suggest that IRS1/AKT/mTOR pathway is the most frequent target of mutations in cancer (Samuels and Ericson, 2006; Song *et al.*, 2012). Specifically, *PI3KCA* gene is frequently mutated in human cancers and its two most frequent mutations in *PI3KCA*, E545K and H1047R, induces cell transformation (Liu *et al.*, 2009). Additionally, deletions or mutations that inactivate PTEN

generate pro-tumorigenic hyperactivation IRS1/AKT/mTOR pathway (Cantley and Neel, 1999).

Since, sustained activation of this pathway is associated with uncontrolled proliferation, negative feedback mechanisms at various levels of IRS1/AKT/mTOR pathway have evolved. First, p70S6K1/IRS1 loop, which inhibits insulin receptor substrate 1 (IRS1) by serine phosphorylation inducing its degradation, thereby suppressing the activation of PI3K – AKT pathway (Haruta *et al.*, 2000; Takano *et al.*, 2001; Findlay *et al.*, 2007). Second, p70S6K induces mTORC2 phosphorylation in two sites that negatively interfere on the ability of mTORC2 to phosphorylate AKT in serine 473 (Liu *et al.*, 2013). Finally, mTORC1 negatively regulates the signaling of growth factors by direct phosphorylation of IRS1 (Tzatsos and Kandror, 2006).

Because activation of mTOR or its negative feedback are associated with opposite effects on cancer growth, we hypothesized that leucine could promote or inhibit cancer growth depending on the steady state activation of mTOR. Thus, herein we explored the effects of leucine supplementation in the modulation of tumor growth in different tumor cell lines that differ in relation to the constitutive activation of the IRS1/Akt/mTOR.

Materials and Methods

Materials

Anti-mTOR, anti-phospho-mTOR ser2448, anti-p70S6K, anti-phospho-p70S6K thr389, anti-AKT, anti-phospho-AKT ser473, anti-phospho-AKT thr308, anti-caspase 3, anti-phospho IRS1 ser307, anti-SIN-1, anti-CDK4, anti-phospho-RB ser807/811, anti-p27, and anti-PTEN were purchased from Cell Signaling Technologies. Anti-IRS1, anti-BAX and anti-cyclin D1 were purchased from Santa Cruz Biotechnology. L-Leucine was obtained from Sigma-Aldrich.

Cell culture

The human cancer cell lines DU-145, HT-29, A-549, PC-3 and MCF-7 were obtained from ATCC. DU-145, A-549 and MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium, HT-29 cells were cultured in McCoy's medium and PC-3 cells were cultured in RPMI-1640 medium, all with 10% FBS (Gibco, Life Technologies, Invitrogen), with the addition of antibiotics and fungicides. L-leucine was obtained from Sigma-Aldrich. All cell lines were maintained at 37 °C with humidity and 5% CO₂.

Transfection

A total of 3 x 10⁵ cells (DU-145, HT-29, A-549, PC-3 and MCF-7) were seeded in a tissue culture plate in complete growth medium and incubated overnight. RNA interference was performed by transfection of either a short interfering RNA (siRNA) targeted to PTEN (si-

PTEN, pre-designed Silencer Select s325) or a scrambled negative control siRNA (pre-designed Silencer Select 4309843). Cells were washed with Opti-MEM culture medium (Life Technologies[®]) and incubated with 2 mL of Opti-MEM containing siRNA (final concentration 10 nM) prior to addition of 5 µL Lipofectamine-2000 (Life Technologies[®]). After 7 hours, 1 mL of Opti-MEM medium containing 30% FBS was added to the culture medium containing siRNA and Lipofectamine-2000. After 17 hours, the culture medium was changed to the complete culture medium specific to each cell line. After 12 hours, cells were placed in starvation medium overnight, and subsequent treatment of cells with varying doses of leucine was performed.

Cell death assay

After treatment with leucine, cells were washed with PBS, trypsinized and centrifuged at 300 g for 5 minutes. The supernatant was removed and the pellet resuspended in 200 µL ligation buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂) with 2 µL of annexin V-FITC and 4 µL of propidium iodide (BD Biosciences, Pharmigen). The reaction was incubated for 20 minutes at room temperature in the dark. The fluorescence intensities of FITC and propidium iodide were analyzed in the FL-1H and FL-2H channels of the FACSCalibur flow cytometer respectively. Each assay was performed in triplicate.

Human tumor xenograft models

All experimental procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Research of the Institute of Biology, UNICAMP (protocol no. 2323-1). Eight-to-ten-week-old (20–25 g) NOD.CB17-Prkdc^{scid}/JUnib animals were provided by the State University of Campinas Central Breeding Center. Animals were injected subcutaneously in the dorsal region with 1×10^6 HT-29, A-549 or PC-3 cells. Mice were randomly divided into two experimental groups and received either control or leucine-supplemented diet (manufactured by Rhoster®, Supplementary table 1). Mice had access to food and water *ad libitum*. The experimental diet started 7 days before tumor injection. Once tumors became palpable, tumor volume (V) was calculated daily by measuring the length (L) and width (W) of the tumor with calipers using the formula ($V = W \times L [(W + L)/2] \times 0.52$). After tumors reached 60 mm^3 , animal weight and tumor volume were assessed daily.

Food Intake

Mice were kept in individual metabolic cages (Tecniplast®) for 10 days prior to tumor injection, and food intake was measured daily.

Tissue extracts

Whole tissue extract and cell pellets were homogenized in extraction buffer treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM DTT and heated at 100 °C. For total extracts, similarly sized aliquots (50 µg protein) were subjected to SDS-PAGE. Proteins were resolved on a 6.5–15% gel and blotted onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Band intensities

were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs using Un-Scan-It gel 6.1 software.

Western blotting

Whole tissue extract and cell pellets were homogenized in extraction buffer, treated with Laemmli sample buffer containing 100 mM DTT and heated at 100 °C. For total extracts, similar-sized aliquots (50 µg protein) were subjected to SDS-PAGE. Proteins were resolved by 6.5-15% and blotted onto nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs by using Un-Scan-It gel 6.1 (Silk Scientific, Inc).

Immunohistochemistry

To detect Ki-67 protein, post-fixation was carried out using a domestic microwave oven to heat slides immersed in 0.01 M citrate buffer (pH 6.0) in two 7-minute doses separated by a 2-minute break. Endogenous peroxidase blocking was then performed (1% H₂O₂ in methanol) for 15 minutes, followed by treatment with proteinase K (20 mg/mL) for 30 minutes. Sections were then incubated at 4 °C overnight with primary monoclonal mouse anti-human Ki-67 clone MIB-1 (Dako, diluted 1:1000). The slides were then incubated with avidin-biotin complex (LSAB+ Kit, Dako Cytomation) for 30 minutes followed by the addition of diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) in a substrate-chromogen solution (Sigma Aldrich). After hematoxylin counterstaining and dehydration, slides were mounted in

Entellan (Merck, Darmstadt, Germany). Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) was performed using a commercial apoptosis detection kit (Roche) according to the recommendations of the manufacturer. Analysis and documentation of results were carried out using a Leica FW4500 B microscope.

Serum analysis

Serum insulin was measured using a commercial ELISA kit (Millipore, St. Charles, MO, USA). Free amino acids were extracted from serum in 80% ethanol and 0.1 M HCl and methionine sulfone was added as internal standard. The mixture was sonicated for 10 minutes and then homogenized for 1 hour, followed by centrifugation at 1000 rpm for 15 minutes. The supernatant was filtered through a 0.22 mm membrane and 40 µL was derivatized. Serum-free amino acids were extracted with methanol and derivatized with phenylisothiocyanate. Twenty microliters was injected into a HPLC, equipped with a Luna-C-18 250 mm x 4.6 mm (00G-4252-EQ) column at 50 °C. Quantification was performed by comparison of the standard and methionine sulfone samples.

Statistical analyses

Data are presented as mean \pm SEM from at least three independent experiments. Differences between groups were analyzed by ANOVA and, as appropriate, a Bonferroni post-hoc test for multiple unpaired comparisons of means. A *t*-test was performed when comparing two groups. The level of significance adopted was p<0.05.

Results

Selective sensitivity of tumor xenografts to leucine supplementation

We first analyze the sensitivity of different types of tumors to leucine supplementation. Leucine supplementation analyses of growth rate curves revealed that although HT-29 and A-549 xenografts presented similar growth and volume in control or leucine supplemented group (HT-29, CTL= $1002 \pm 187,6$ mm³; LEU= $1032 \pm 218,1$ mm³; p=0,17), (A-549, CTL= $359,8 \pm 364,1$ mm³, LEU= $215,6 \pm 86,18$ mm³; p=0,1) (Fig. 1A-D), PC-3 xenografts of mice fed with leucine diet grew in a lower rate and presented reduced tumor volume (CTL= $815,1 \pm 450,7$ mm³; LEU= $432,7 \pm 179$ mm³; p=0,03) (Fig. 1E-F). In consonance with the hypothesis that intrinsic characteristics of tumor determine the differential sensitivity to leucine, control and leucine diet fed mice presented similar weight and food intake (Supplementary table 2). As previous demonstrated, animals receiving the leucine-supplemented diet displayed higher serum insulin levels than the control group (Supplementary table 2).

To gain further insight in the factors that mediate the selective inhibition of tumor growth in PC3 xenografts, we assayed for proliferation with Ki-67 immunohistochemistry, and for cell death with TUNEL. Leucine supplementation to mice bearing HT-29 and A-549 tumors exhibited similar levels of proliferation and apoptosis compared with the matched controls. In striking contrast, leucine-supplemented mice bearing PC-3 tumors contained fewer Ki-67-positive proliferating cells and higher levels of TUNEL staining than the control group (Figure 1 G-H).

Constitutive IRS1/AKT/mTOR activation signaling in cancer cell lines

The divergent sensitivity to leucine led us to evaluate the effect of leucine in an extended panel of cancer cell lines that differs on IRS1/AKT/mTOR pathway activation. In order to determine if there is constitutive activation of IRS1/AKT/mTOR, cells were extracted from their respective complete growth media without the presence of any additional stimulation. Increased biological activity of this pathway was detected in PC-3 and MCF-7 cell lines as noticed by increased phosphorylation of AKT and mTOR, whereas we don't detect increased IRS1/AKT/mTOR pathway activity in DU-145, HT-29 and A-549 cancer cell lines. All cell lines examined have an intact IRS1/AKT/mTOR pathway as indicated by the increased phosphorylation of AKT with fetal calf serum medium supplementation (figure 2).

Leucine-induced mTOR activation inhibits Akt signaling

We hypothesize that tumor cell lines in which the PI3K pathway is constitutively activated, when further stimulated by leucine, could trigger inhibitory mechanisms that cause cell cycle arrest. As shown in figure 3, all cell lines studied showed higher mTORC1 activity, the higher the concentration of leucine in the medium, as evidenced by increased expression of pmTOR (Ser2448), as well as pp70S6 (Thr389). However, the kinetics of negative feedback showed a dramatic reduction of Akt phosphorylation with the highest dosage of leucine in cell lines with constitutive PI3K pathway activation (PC-3 and MCF-7). Indeed, these cells display decreased ser473 AKT phosphorylation to all leucine concentrations studied (figure 3 A-B, bottom panels). Whereas, Akt phosphorylation did not change or even increased in cells

without constitutive activation of IRS1/AKT/mTOR pathway (figure 3C-D, bottom panels). In accordance with the hypothesis that increased p70S6K phosphorylation activates the inhibitory p70S6K/IRS1 axis and consequently decreases AKT phosphorylation, we observed increased phosphorylation at the serine site of the IRS1 protein in both PC-3 and MCF-7 (Fig. 3A-B, bottom panels), but not in DU-145, HT-29 and A549 cell lines (Fig. 3C-E, bottom panels).

Leucine treatment increases G1 phase cell cycle arrest in mTOR hyperactivated cell lines

Because the observed increased activity of the negative feedback loop that controls AKT activity, we next examined the expression of proteins involved in G1 to S phase cell cycle progression, that are under the control of Akt (Liang and Slingerland, 2003). Cyclin D1 and p27 accumulation in PC-3 and MCF-7 cells with increasing doses of leucine confirmed that leucine treatment induced a failure of cyclin degradation, which might be due to inhibition of cyclin-dependent kinases (CDKs) by the p27 protein (figure. 4 A-B). In contrast, we did not detect statistically significant difference in the percentage of cell death in all cell lines studied (Supplementary figure 1 A-E). Moreover there was no difference in the expression of proteins related to cell death (Supplementary figure 1 F-J).

In support of the selective effects of leucine on tumor growth, in DU-145 silenced for PTEN leucine supplementation promotes mTORC1 activation (figure 4C-E), and also increased IRS1serine 307 phosphorylation and decreased phosphorylation of AKT (figure 4F). Furthermore, the expressions of proteins related to the control of G1 to S phase displayed

accumulation of cyclin D1, in the higher doses of leucine, after silencing of PTEN (figure 4G) and there was no difference in cell death with the increasing doses of leucine tested (Supplementary figure 2).

Leucine supplementation increases cell death in tumor xenografts cell lines with mTOR constitutive activation

Consistent with *in vitro* results, we detected increased activity of mTOR in all tumor xenografts. Moreover, we could not detect increased levels of IRS-1 serine phosphorylation in HT-29 and A-549 tumors in the leucine treated compared to the control group, which was associated with increased AKT phosphorylation. While in PC-3 tumors there was an increase in IRS-1 serine phosphorylation and no difference in AKT phosphorylation between groups (figure 5, bottom panels). In aggregate these *in vivo* results suggest that dietary supplementation with leucine lead to decreased cell proliferation in PC3 xenografts, by increasing the activity of mTOR negative feedback loop and, therefore inhibiting the increase in AKT activity.

Discussion

BCAA-enriched nutritional supplementation to maintain nutritional status of cancer-induced catabolism is commonly indicated in cancer patients (Choudry *et al.*, 2006; Bozzetti and Bozzetti, 2013). Although, the molecular mechanisms are only partially known, much less unclear, however, are the effects of BCAA supplementation on cancer growth. The results presented herein show that leucine selectively impairs tumor growth in cancer cells that differ on constitutive activation of mTOR pathway by activation of p70S6K/IRS1 feedback loop, with consequent reduction of AKT phosphorylation and cell cycle arrest. Therefore, these results suggest that some of the beneficial effects observed with BCAA supplementation in cancer-un nourished patients are directly mediated by leucine anti-proliferative on cancer cells.

Among the cell lines studied, PC-3 and MCF-7 have the IRS1/AKT/mTOR pathway constitutively activated. Insofar, PC-3 is null for PTEN, MCF-7 has a mutation in the catalytic subunit p110 α . Interestingly, as reported here, these cells presented increased susceptibility to the anti-proliferative effects of leucine. Whereas, HT-29, DU-145 and A-549 cells lines, which do not present constitutive activation of IRS1/AKT/mTOR pathway were resistant to leucine anti-proliferative effects. It is interesting to note that although HT-29 and MCF-7 cell lines have mutations in *PI3KCA*, they exhibit distinct levels of activation of the PI3K pathway. This is explained by the different site of mutation, although both cases represent PIK3 gain of function, mutation P449T (present in HT-29) represents a two times greater catalytic activity of p110 α than the wild type protein, whereas the E545K mutation (present in MCF-7) increases by 10 times the catalytic activity of p110 α (Dan *et al.*, 2010). Altogether these results suggest that differential levels of PI3K activity is sufficient to

promote strikingly changes in the steady state status of mTOR activation and, therefore, sensitivity of cell lines to the anti-proliferative effects of leucine.

Importantly, our data revealed that p70S6K1/IRS1 loop is an important negative feedback loop, by which leucine inhibits IRS1 signaling and induces its degradation in cells that present constitutive activation of mTOR. Interestingly, previous to our work, this feedback mechanism has been implicated as the cause of the failure of drugs designed to target this pathway and have even promoted the activation of compensatory pathways that maintain cell survival and tumor growth (Engelman, 2009). For example, AKT and mTOR inhibitors can increase both the expression and activity of growth factor receptors, increasing PI3K and RAS signaling and leading to cancer cell survival (Chandarlapaty *et al.*, 2011; Rodrik-Outmezguine *et al.*, 2011). Conversely, in our study instead of inhibits hyperactivated proteins of the PI3K pathway, we generate greater activation of mTOR and p70S6K protein, through leucine supplementation, which was able to trigger feedback mechanisms and impairs tumor growth. In agreement with our data studies in metabolism field showed that chronic activation of mTOR by glucose (and/or IGF-1) led to increased phosphorylation of ser/thr IRS2, decreased activation of AKT and a consequent increase in β -cell apoptosis leading to diabetes (Briaud *et al.*, 2005). Our results, however, do not exclude the possibility that other mTOR negative feedback mechanisms, such as p70S6K-induced inhibition of mTORC2 (Liu *et al.*, 2013) could also play a role in the inhibition of AKT activity. Thus, further studies to elucidate the role of leucine in these potential feedback mechanisms are deserved.

Previous studies have demonstrated that AKT promotes the phosphorylation of cyclin-dependent kinase p27 (Liang *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2002), which blocks its inhibitory

effects on cell cycle (Viglietto *et al.*, 2002; Sekimoto *et al.*, 2004). Notably, the direct administration of leucine only to cells with constitutive mTOR activation was sufficient to inhibit AKT activation, and increase cyclin D1 and cyclin-dependent kinase p27 protein levels indicating that there was a G1 phase cell cycle arrest. Furthermore, the inhibition of PTEN in cells without constitutive activation of mTOR, convert the cells susceptible to the anti-proliferative effects of leucine. AKT activation also modulates proteins involved in cell survival and cell death pathways. For example, AKT phosphorylates the BAD protein, preventing its interaction with the survival protein BCL-XL and, therefore, releasing its anti-apoptotic function (Datta *et al.*, 1997). However, leucine did not change the levels of anti-apoptotic or pro-apoptotic proteins in any of the cells lines studied. In aggregate, this data suggest that leucine anti-proliferative effects are mostly mediated through AKT inhibition and ultimately by inducing G1 cell cycle arrest.

A recent study demonstrated that mutations affecting the IRS1/AKT/mTOR pathway are causative for different sensitivities to nutrient availability. In this study, dietary restriction does not affect PTEN-deficient cells, but does significantly decrease tumor growth in cancer cells lacking this deficiency (Kalaany and Sabatini, 2009). In striking contrast, our study shows that the cells that are sensitivity to anti-proliferative effects of leucine display constitutive IRS1/AKT/mTOR pathway activation. Altogether, these studies indicate that fine-tuning regulation between the signaling pathways activated in cancer and both the kind and availability of nutrients has salient effects on tumor growth rate.

The strategy that one nutritional intervention fits all patients with cancer is in check and the question of whether nutritional therapy regulates tumor growth remains open among health professionals (Chiu *et al.*, 2004; Bozzetti and Mori, 2009; Pinho *et al.*, 2011). Furthermore,

recent studies showing that intravenous administration of nutrients, especially amino acids, has been reported to even increase tumor growth (Bozzetti and Mori, 2009; Xie *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2013). Because our findings show that the effects of nutritional supplementation on cancer growth is dependent on intrinsic characteristics of cancer cell signaling pathways, we believe that the design of better nutritional supplementations for cancer should be based on the sort of cancer mutation. In conclusion, our study demonstrated that the nature of cancer mutation and the corresponding activated signaling pathway is critical for the determination of tumor sensitivity to nutrients.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT) - Obesidade e Diabetes. The authors thank S. Brambrilla, D. Guadagnini, L. Janeri and J. Pinheiro (Department of Internal Medicine, UNICAMP, Campinas, São Paulo) for technical assistance.

Author contributions

M.C.S.M researched data and wrote the article, D.S.M.P., G.Z.R., C.S and D.M.D. researched data, H.F.C., G.A., E.R.R. and M.J.A.S. contributed to discussion, J.B.C contributed to discussion, edited and reviewed the article.

Disclosure of potential conflicts of interest

The authors declare that there is no potential conflict of interest.

References

- ARENDS, J. et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Non-surgical oncology. **Clin Nutr**, v. 25, n. 2, p. 245-59, Apr 2006. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697500> >.
- AUGUST, D. A.; HUHMANN, M. B. A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support therapy during adult anticancer treatment and in hematopoietic cell transplantation. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 33, n. 5, p. 472-500, Sep-Oct 2009. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19713551 >.
- BLOMMAART, E. F. et al. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. **J Biol Chem**, v. 270, n. 5, p. 2320-6, Feb 1995. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836465> >.
- BOZZETTI, F.; BOZZETTI, V. Is the intravenous supplementation of amino acid to cancer patients adequate? A critical appraisal of literature. **Clin Nutr**, v. 32, n. 1, p. 142-6, Feb 2013. ISSN 1532-1983. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23218120> >.
- BOZZETTI, F.; MORI, V. Nutritional support and tumour growth in humans: a narrative review of the literature. **Clin Nutr**, v. 28, n. 3, p. 226-30, Jun 2009. ISSN 1532-1983 (Electronic) 0261-5614 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19285762 >.
- BRIAUD, I. et al. Insulin receptor substrate-2 proteasomal degradation mediated by a mammalian target of rapamycin (mTOR)-induced negative feedback down-regulates protein kinase B-mediated signaling pathway in beta-cells. **J Biol Chem**, v. 280, n. 3, p. 2282-93, Jan 21 2005. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15537654> >.
- CANTLEY, L. C.; NEEL, B. G. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 8, p. 4240-5, Apr 13 1999. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10200246> >.

CHANDRALAPATY, S. et al. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. **Cancer Cell**, v. 19, n. 1, p. 58-71, Jan 2011. ISSN 1878-3686. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21215704> >.

CHIU, T. Y. et al. Terminal cancer patients' wishes and influencing factors toward the provision of artificial nutrition and hydration in Taiwan. **J Pain Symptom Manage**, v. 27, n. 3, p. 206-14, Mar 2004. ISSN 0885-3924 (Print) 0885-3924 (Linking). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15010099 >.

CHOUDRY, H. A. et al. Branched-chain amino acid-enriched nutritional support in surgical and cancer patients. **J Nutr**, v. 136, n. 1 Suppl, p. 314S-8S, Jan 2006. ISSN 0022-3166. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365105> >.

DAN, S. et al. Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. **Cancer Res**, v. 70, n. 12, p. 4982-94, Jun 15 2010. ISSN 1538-7445 (Electronic) 0008-5472 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20530683> >.

DATTA, S. R. et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. **Cell**, v. 91, n. 2, p. 231-41, Oct 1997. ISSN 0092-8674. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9346240> >.

DEUTZ, N. E. et al. Muscle protein synthesis in cancer patients can be stimulated with a specially formulated medical food. **Clin Nutr**, v. 30, n. 6, p. 759-68, Dec 2011. ISSN 1532-1983 (Electronic) 0261-5614 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21683485> >.

ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 8, p. 550-62, Aug 2009. ISSN 1474-1768. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19629070> >.

FINDLAY, G. M. et al. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. **Biochem J**, v. 403, n. 1, p. 13-20, Apr 2007. ISSN 1470-8728. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17253963> >.

HARA, K. et al. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. **J Biol Chem**, v. 273, n. 23, p. 14484-94, Jun 1998. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603962> >.

HARUTA, T. et al. A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. **Mol Endocrinol**, v. 14, n. 6, p. 783-94, Jun 2000. ISSN 0888-8809 (Print) 0888-8809 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10847581> >.

KALAANY, N. Y.; SABATINI, D. M. Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 725-31, Apr 9 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279572> >.

KLIDJIAN, A. M. et al. Detection of dangerous malnutrition. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 6, n. 2, p. 119-21, Mar-Apr 1982. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7201531> >.

LIANG, J.; SLINGERLAND, J. M. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. **Cell Cycle**, v. 2, n. 4, p. 339-45, 2003 Jul-Aug 2003. ISSN 1538-4101. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12851486> >.

LIANG, J. et al. PKB/Akt phosphorylates p27, impairs nuclear import of p27 and opposes p27-mediated G1 arrest. **Nat Med**, v. 8, n. 10, p. 1153-60, Oct 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244302> >.

LIU, P. et al. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, n. 8, p. 627-44, Aug 2009. ISSN 1474-1784 (Electronic) 1474-1776 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19644473> >.

LIU, P. et al. Sin1 phosphorylation impairs mTORC2 complex integrity and inhibits downstream Akt signalling to suppress tumorigenesis. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 1340-50, Nov 2013. ISSN 1476-4679 (Electronic) 1465-7392 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24161930> >.

LUO, J.; MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. **Cancer Cell**, v. 4, n. 4, p. 257-62, Oct 2003. ISSN 1535-6108. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585353> >.

MORLEY, J. E. et al. Nutritional recommendations for the management of sarcopenia. **J Am Med Dir Assoc**, v. 11, n. 6, p. 391-6, Jul 2010. ISSN 1538-9375. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20627179> >.

PETERS, S. J. et al. Dose-dependent effects of leucine supplementation on preservation of muscle mass in cancer cachectic mice. **Oncol Rep**, v. 26, n. 1, p. 247-54, Jul 2011. ISSN

1791-2431 (Electronic) 1021-335X (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21503587>>.

PINHO, N. et al. **Terapia Nutricional na Oncologia**. Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral Associação Brasileira de Nutrologia. 2011

RIEU, I. et al. Leucine supplementation improves muscle protein synthesis in elderly men independently of hyperaminoacidaemia. **J Physiol**, v. 575, n. Pt 1, p. 305-15, Aug 2006. ISSN 0022-3751. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777941>>.

RODRIK-OUTMEZGUINE, V. S. et al. mTOR kinase inhibition causes feedback-dependent biphasic regulation of AKT signaling. **Cancer Discov**, v. 1, n. 3, p. 248-59, Aug 2011. ISSN 2159-8290. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140653>>.

SAMUELS, Y.; ERICSON, K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. **Curr Opin Oncol**, v. 18, n. 1, p. 77-82, Jan 2006. ISSN 1040-8746. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357568>>.

SANCAK, Y. et al. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 290-303, Apr 2010. ISSN 1097-4172. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20381137>>.

SANCAK, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496-501, Jun 13 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497260>>.

SEKIMOTO, T.; FUKUMOTO, M.; YONEDA, Y. 14-3-3 suppresses the nuclear localization of threonine 157-phosphorylated p27(Kip1). **EMBO J**, v. 23, n. 9, p. 1934-42, May 5 2004. ISSN 0261-4189 (Print) 0261-4189 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057270>>.

SHIN, I. et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. **Nat Med**, v. 8, n. 10, p. 1145-52, Oct 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244301>>.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 283-96, May 2012. ISSN 1471-0800. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473468>>.

TAKANO, A. et al. Mammalian target of rapamycin pathway regulates insulin signaling via subcellular redistribution of insulin receptor substrate 1 and integrates nutritional signals and metabolic signals of insulin. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 15, p. 5050-62, Aug 2001. ISSN 0270-7306 (Print) 0270-7306 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438661> >.

TZATSOS, A.; KANDROR, K. V. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 1, p. 63-76, Jan 2006. ISSN 0270-7306. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354680> >.

VIGLIETTO, G. et al. Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. **Nat Med**, v. 8, n. 10, p. 1136-44, Oct 2002. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12244303> >.

WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W. T.; CORREIA, M. I. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRAMUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v. 17, n. 7-8, p. 573-80, Jul-Aug 2001. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448575> >.

XIE, X. L. et al. L-leucine and L-isoleucine enhance growth of BBN-induced urothelial tumors in the rat bladder by modulating expression of amino acid transporters and tumorigenesis-associated genes. **Food Chem Toxicol**, v. 59, p. 137-44, Sep 2013. ISSN 1873-6351 (Electronic) 0278-6915 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23747718> >.

XIE, X.L. et al. Long-term treatment with L-isoleucine or L-leucine in AIN-93G diet has promoting effects on rat bladder carcinogenesis. **Food Chem Toxicol**, v. 50, n. 11, p. 3934-40, Nov 2012. ISSN 1873-6351 (Electronic) 0278-6915 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22889894> >.

ZONCU, R. et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 678-83, Nov 2011. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053050> >.

Figure legends

Figure 1. Leucine treatment induces variable tumor growth in tumor cell xenografts from different tumor cell lines. HT-29, A-549 and PC-3 cells (1×10^6) were injected subcutaneously into the flank of NOD/SCID mice. The animals started the diet 7 days before the tumor injection. Tumor growth was assessed for 15 days of follow-up after reaching a tumor volume of approximately 60 mm^3 . (A) HT-29 tumor growth curve; control ($n = 13$) and leucine ($n = 15$). (B) HT-29 tumor volume after 15 days of follow-up; control ($n = 12$) and leucine ($n = 14$). (C) A-549 tumor growth; control ($n = 13$) and leucine ($n = 13$). (D) A-549 tumor volume after 15 days of follow-up; control ($n = 12$) and leucine ($n = 10$) (E) PC-3 tumor growth; control ($n = 18$) and leucine ($n = 20$). (F) PC-3 tumor volume after 15 days of follow-up; control ($n = 16$) and leucine ($n = 11$). (G) Representative microphotograph (magnification x40) of HT-29, A-549 and PC-3 tumor sections stained for proliferation with Ki-67. (H) Representative microphotograph (magnification x40) of HT-29, A-549 and PC-3 tumor sections stained for apoptosis with TUNEL. Data are presented as mean \pm SEM ($p < 0.05$, *t*-test).

Figure 2. Constitutive IRS1/AKT/mTOR activation signaling in DU-145, HT-29, A-549, PC-3 and MCF-7 cell lines. (A) Cells (5×10^5) were extracted from complete growth medium and expression of the following proteins was assayed by western blot: PTEN, phospho-ser473 AKT, AKT, phospho-ser2448 mTOR and mTOR. (B) Cells (5×10^5) were treated with or without FBS for 1 or 24 hours, and phospho-ser473 AKT and AKT proteins were assayed by western blot.

Figure 3. Leucine-induced mTOR activation inhibits AKT signaling in mTOR hyperactivated cell lines. (A) PC-3, (B) MCF-7, (C), DU-145 (D) HT-29 and (E) A-549 cells (5×10^5) were treated with leucine in the indicated concentrations over 3 hours. Protein expression in each cell line was assessed by western blot for phospho-ser2448 mTOR, mTOR, phospho-thr389 p70S6K and p70S6K, phospho-ser473 AKT, AKT, IRS1 immunoprecipitated and blotted with antibodies against phospho-ser307 IRS and alpha-tubulin.

Figure 4. Leucine treatment increases G1 phase cell cycle arrest in mTOR hyperactivated cell lines. (A) PC-3 and (B) MCF-7 cells (5×10^5) were treated with leucine in the indicated concentrations for 3 hours as indicated in the Materials and Methods. Expression of cyclin D1, CDK4, phospho-RB, p27 and alpha-tubulin was assessed by western blot. (C-E) PTEN silencing in DU-145 cells mimics the response of IRS1/AKT/mTOR-hyperactivated cell lines to leucine supplementation. (Scr; scrambled, siPTEN; silenced PTEN). DU-145 cells were transfected with siRNA specific to PTEN. (C) Expression of PTEN and alpha-tubulin was assessed by western blot. (D) Stoichiometry for PTEN silencing. Cells (5×10^5) were treated with leucine in the indicated concentrations for 3 hours. (E) Expression of phospho-ser2448 mTOR, mTOR, phospho-thr389 p70S6K and p70S6K was assessed by western blot. (F) Expression of phospho-ser473 AKT, AKT, immunoprecipitated IRS1 blotted with phospho-ser307 IRS1 was assessed by western blot. (G) Expression of cyclin D1, CDK4, phospho-RB, p27 and alpha-tubulin was assessed by western blot.

Figure 5. Leucine supplementation increases mTOR signaling in xenografted tumors and increases cell death in tumor xenografts with mTOR constitutive activation. Mice with (A) HT-29, (B) A-549 and (C) PC-3 cell xenografts were treated with standard (CTL) or leucine-supplemented (LEU) diets as described in the Materials and Methods. Tumors were extracted and expression of phospho-ser2448 mTOR, mTOR, phospho-thr389 p70S6K, p70S6K, phospho-ser473 AKT, AKT, IRS1 immunoprecipitated and blotted with antibodies against phospho-ser307 IRS and alpha-tubulin.

Supplementary figures.

Supplementary figure 1. Leucine supplementation does not promote cell death in human tumor cell lines. (A) DU-145, (B) HT-29, (C) A-549, (D) PC-3 and (E) MCF-7 cells (1×10^4) were treated with indicated concentrations of leucine for 120 hours as indicated in the Materials and Methods. Cell death was measured by annexin V and propidium iodide staining ($n = 1$ experiment in triplicate). (F) DU-145, (G) HT-29, (H) A-549, (I) PC-3 and (J) MCF-7 cells (5×10^5) were treated with the indicated concentrations of leucine for 3 hours. BAX, caspase 3 and alpha-tubulin expression was assessed in each cell line.

Supplementary figure 2. Leucine supplementation does not promote cell death in PTEN silencing in DU-145. A) Cells (5×10^5) were treated with 300 μ M, 500 μ M, 700 μ M and 1000 μ M leucine for 3 hours, as indicated in the Materials and Methods. BAX, caspase 3 and alpha-tubulin expression was assessed in each cell line. B) Cells (1×10^4) were treated with 300 μ M, 500 μ M, 700 μ M and 1000 μ M leucine for 120 hours as indicated in the

Materials and Methods. Cell death was measured by annexin V and propidium iodide staining ($n = 1$ experiment for scrambled and $n = 2$ experiments for siPTEN). ANOVA and post-hoc Bonferroni tests were performed ($p < 0.05$).

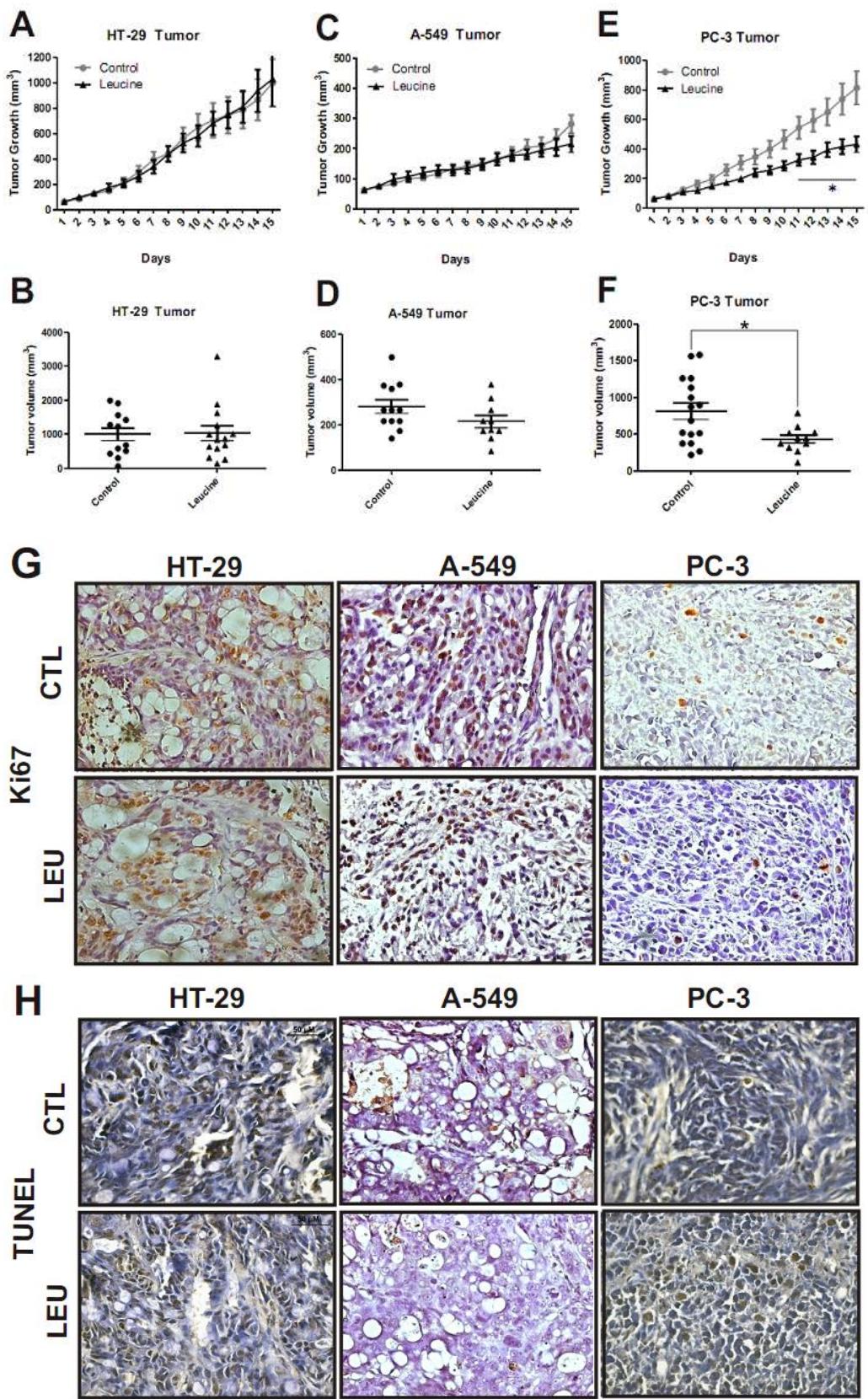


Figure 2

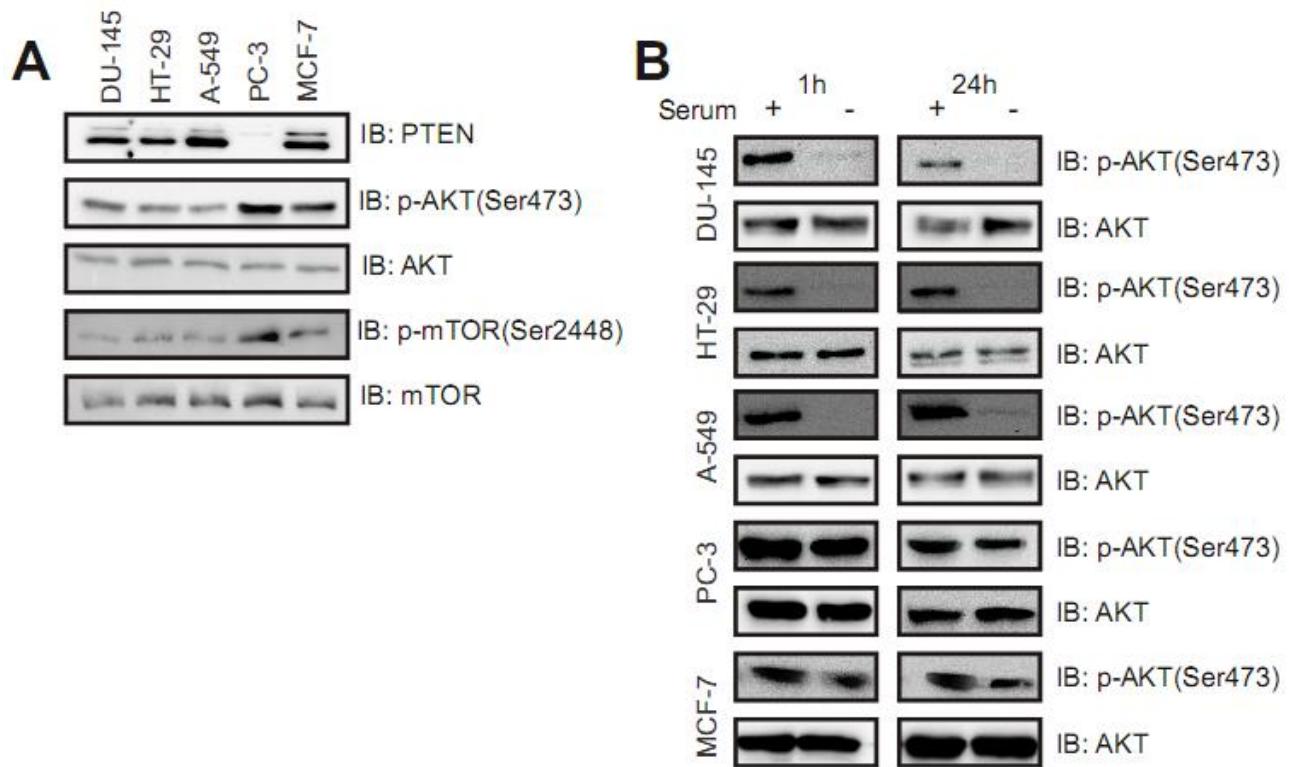


Figure 3

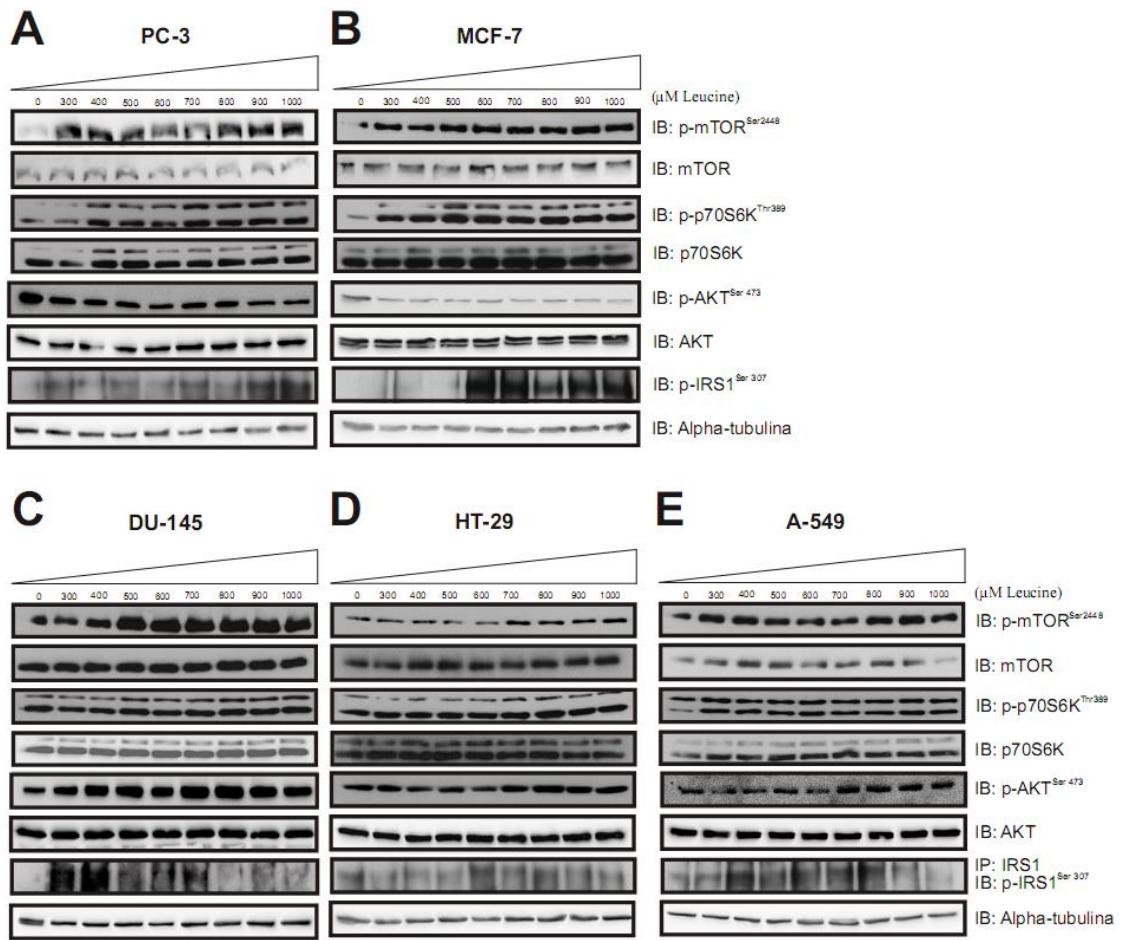


Figure 4

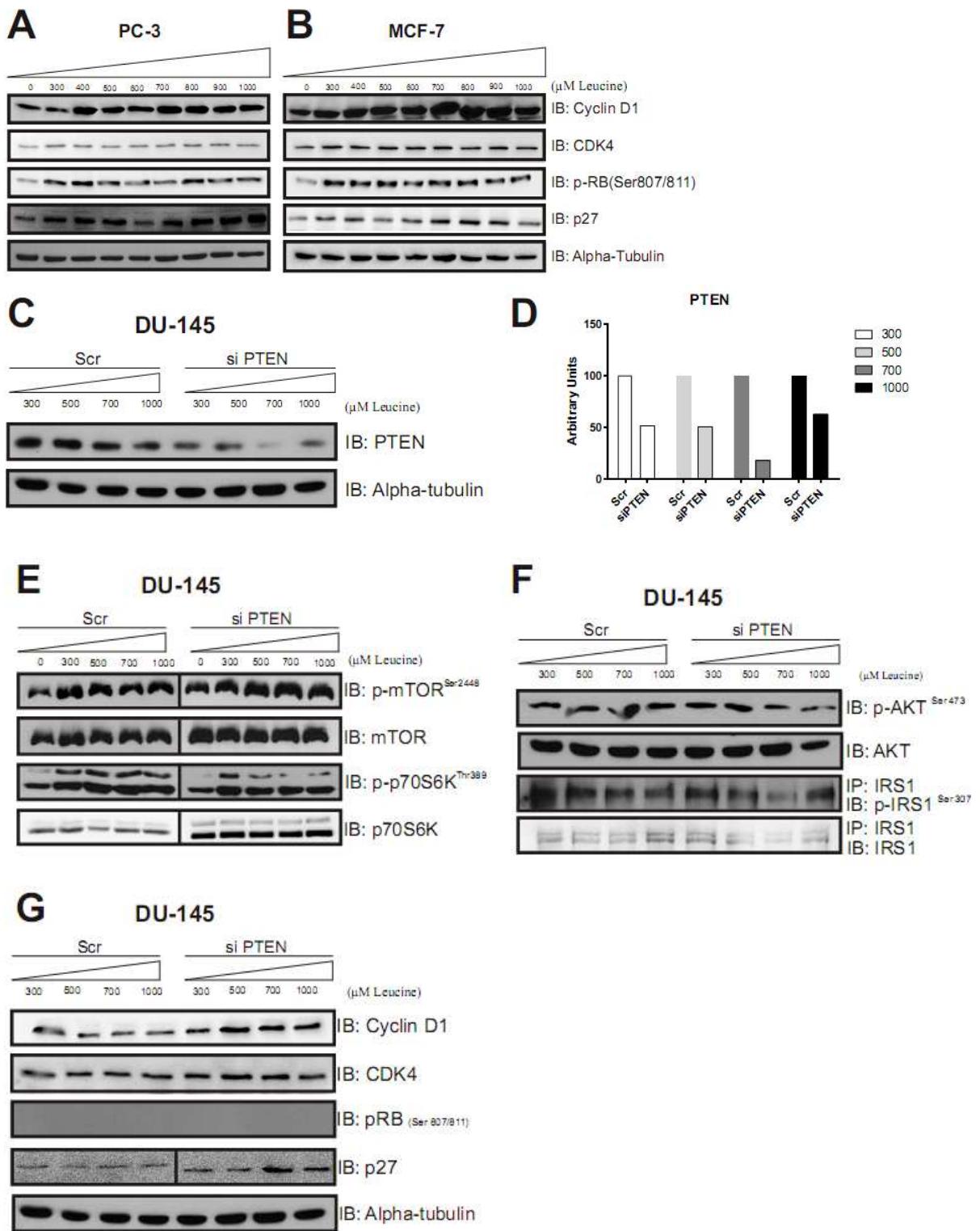
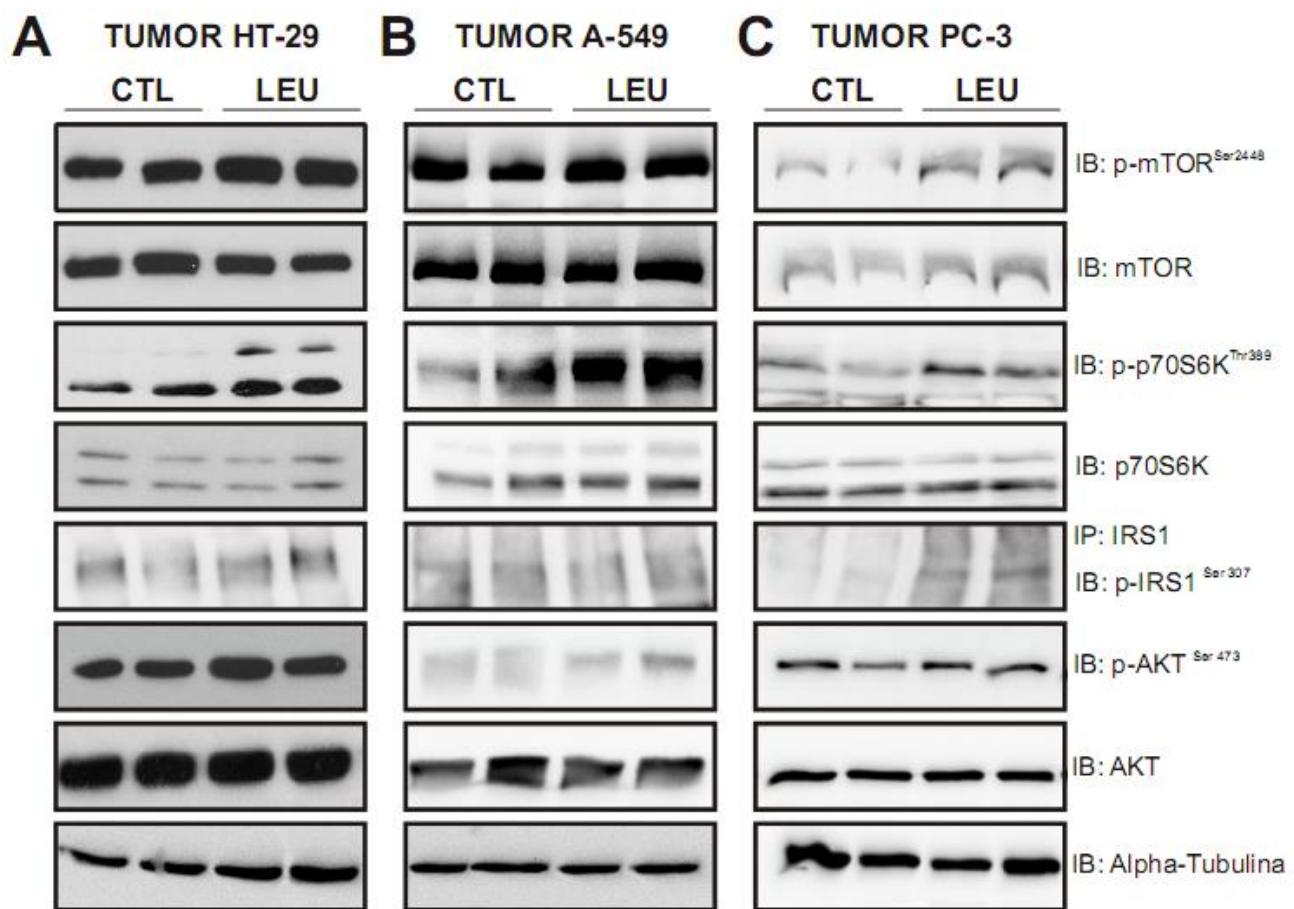


Figure 5



Supplementary tables

Table 1. Diet characteristics

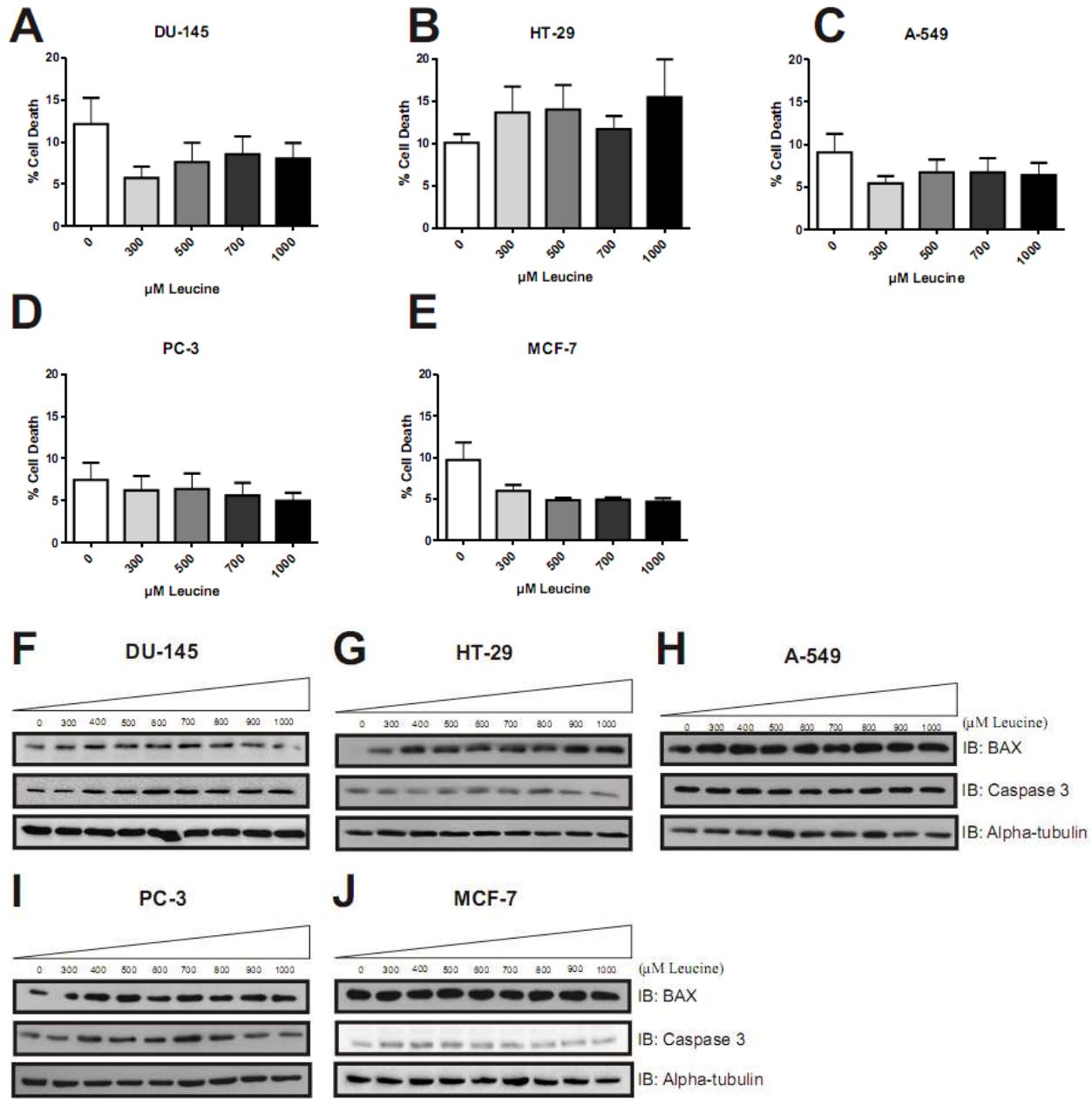
	Standard diet (CTL) (g/kg diet)	Leucine-supplemented diet (LEU) (g/kg diet)
Casein	140	140
L-Leucine*	0	43.2
Saccharose	100	100
Corn Starch	465.6	422.4
Dextrin Starch	155	155
Soybean Oil	40	40
Cellulose	50	50
Mineral Mix AIN-93	35	35
Vitamin Mix AIN-93	10	10
L-cystine	1.8	1.8
Choline	2.5	2.5
Total	1000	1000
Energy(kJ/g)	15.9	15.9
% Energy		
% Protein	14	20
% Fat	10	10
% Carbohydrate	76	70

Note: standard diet provides 16.8g of leucine, leucine-supplemented diet provides 60g of leucine.

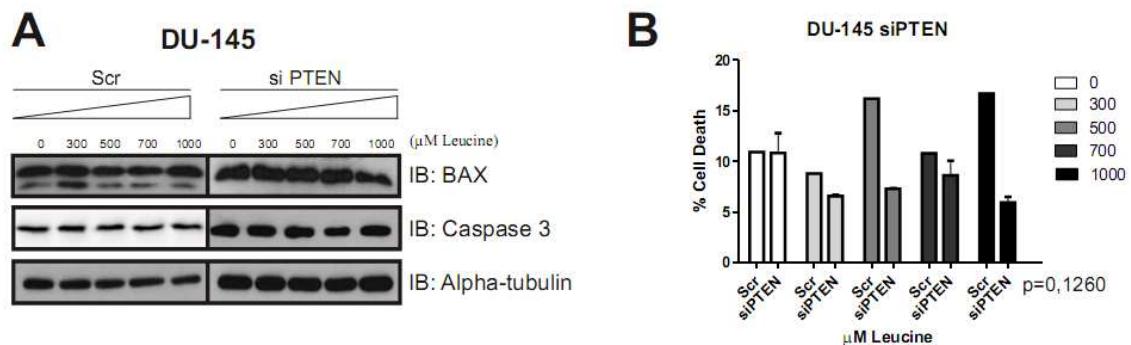
Table 2. Metabolic characteristics of the animals

	<i>Control</i>		<i>Leucine</i>		
	Media \pm SE	N	Media \pm SE	N	p*
Weight (g)					
HT-29	24,06 \pm 2,33	12	22,05 \pm 2,36	11	0,10
A-549	27,13 \pm 5,04	8	27,28 \pm 2,30	9	0,97
PC-3	23,11 \pm 2,67	14	22,53 \pm 1,93	9	0,82
Food intake before tumor inoculation (g)	3,96 \pm 0,90	6	4,02 \pm 0,61	6	0,43
Serum Leucine (ng/mL)	1529 \pm 237	4	2878 \pm 367,1	4	0,04
Serum Insuline (ng/mL)	0,28 \pm 0,02	13	0,43 \pm 0,05	21	0,03

Sup. Figure 1



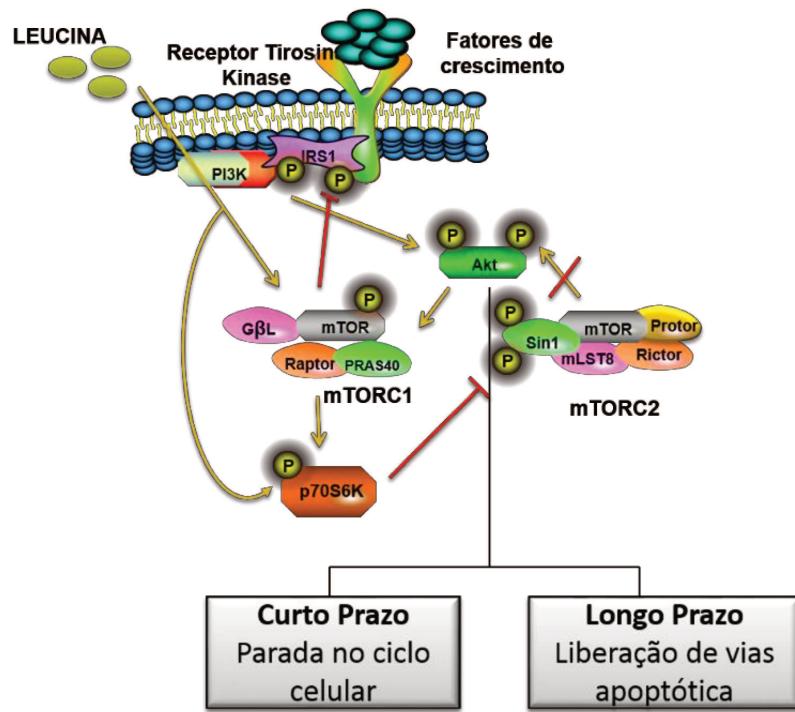
Sup. Figure 2



CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que a ativação da via da mTOR é central para determinar a sensibilidade de tumores à dieta suplementada com leucina, podendo modular o desenvolvimento tumoral. O mecanismo pelo qual a leucina pode retardar o desenvolvimento tumoral em células que possuem a via da mTOR hiperativada parece estar relacionado com o eixo de regulação negativa p70S6K-IRS1, com consequente redução da fosforilação de AKT e liberação das vias apoptóticas nos tecidos tumorais. Desta maneira, nós acreditamos que a formulação da terapia nutricional deve ser realizada considerando as mutações do câncer e as consequentes vias de sinalização ativada.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARENDS, J. et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Non-surgical oncology. **Clin Nutr**, v. 25, n. 2, p. 245-59, Apr 2006. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16697500> >.

AUGUST, D. A.; HUHMANN, M. B. A.S.P.E.N. clinical guidelines: nutrition support therapy during adult anticancer treatment and in hematopoietic cell transplantation. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, v. 33, n. 5, p. 472-500, Sep-Oct 2009. ISSN 0148-6071 (Print)0148-6071 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19713551 >.

AVRUCH, J. et al. Amino acid regulation of TOR complex 1. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 296, n. 4, p. E592-602, Apr 2009. ISSN 0193-1849 (Print). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18765678 >.

BOZZETTI, F.; MORI, V. Nutritional support and tumour growth in humans: a narrative review of the literature. **Clin Nutr**, v. 28, n. 3, p. 226-30, Jun 2009. ISSN 1532-1983 (Electronic)0261-5614 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19285762 >.

BUERGER, C.; DEVRIES, B.; STAMBOLIC, V. Localization of Rheb to the endomembrane is critical for its signaling function. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 344, n. 3, p. 869-80, Jun 2006. ISSN 0006-291X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16631613> >.

CHIU, T. Y. et al. Terminal cancer patients' wishes and influencing factors toward the provision of artificial nutrition and hydration in Taiwan. **J Pain Symptom Manage**, v. 27, n. 3, p. 206-14, Mar 2004. ISSN 0885-3924 (Print)0885-3924 (Linking). Available at: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15010099 >.

EFEYAN, A.; ZONCU, R.; SABATINI, D. M. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. **Trends Mol Med**, v. 18, n. 9, p. 524-33, Sep 2012. ISSN 1471-499X. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749019> >.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, Dec 15 2010. ISSN 1097-0215 (Electronic)0020-7136 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269> >.

FINDLAY, G. M. et al. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. **Biochem J**, v. 403, n. 1, p. 13-20, Apr 2007. ISSN 1470-8728. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17253963> >.

FRIAS, M. A. et al. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. **Curr Biol**, v. 16, n. 18, p. 1865-70, Sep 19 2006. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16919458> >.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer Cell**, v. 12, n. 1, p. 9-22, Jul 2007. ISSN 1535-6108 (Print) 1535-6108 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613433> >.

HARRINGTON, L. S. et al. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. **J Cell Biol**, v. 166, n. 2, p. 213-23, Jul 19 2004. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249583> >.

HSU, P. P. et al. The mTOR-regulated phosphoproteome reveals a mechanism of mTORC1-mediated inhibition of growth factor signaling. **Science**, v. 332, n. 6035, p. 1317-22, Jun 2011. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21659604> >.

INOKI, K. et al. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. **Genes Dev**, v. 17, n. 15, p. 1829-34, Aug 2003. ISSN 0890-9369. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12869586> >.

INOKI, K. et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. **Nat Cell Biol**, v. 4, n. 9, p. 648-57, Sep 2002. ISSN 1465-7392. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12172553> >.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2014. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2013.

JACINTO, E. et al. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. **Cell**, v. 127, n. 1, p. 125-37, Oct 6 2006. ISSN

0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16962653> >.

JACINTO, E. et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nat Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 1122-8, Nov 2004. ISSN 1465-7392 (Print) 1465-7392 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15467718> >.

KALAANY, N. Y.; SABATINI, D. M. Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 725-31, Apr 9 2009. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19279572> >.

KIM, D. H. et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. **Cell**, v. 110, n. 2, p. 163-75, Jul 26 2002. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150925> >.

KIM, D.H. et al. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. **Mol Cell**, v. 11, n. 4, p. 895-904, Apr 2003. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12718876> >.

KIM, E. et al. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. **Nat Cell Biol**, v. 10, n. 8, p. 935-45, Aug 2008. ISSN 1476-4679. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18604198> >.

KIM, S.; SNYDER, S. H. Nutrient amino acids signal to mTOR via inositol polyphosphate multikinase. **Cell Cycle**, v. 10, n. 11, p. 1708-10, Jun 2011. ISSN 1551-4005. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633199> >.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling at a glance. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 20, p. 3589-94, Oct 15 2009. ISSN 1477-9137 (Electronic) 0021-9533 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19812304> >.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274-93, Apr 2012. ISSN 1097-4172. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22500797> >.

LOEWITH, R. et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. **Mol Cell**, v. 10, n. 3, p. 457-68, Sep 2002. ISSN 1097-

2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12408816> >.

LONG, X. et al. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. **J Biol Chem**, v. 280, n. 25, p. 23433-6, Jun 2005. ISSN 0021-9258. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878852>>.

LUO, J.; MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. **Cancer Cell**, v. 4, n. 4, p. 257-62, Oct 2003. ISSN 1535-6108. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585353>>.

LYNCH, C. J. et al. Potential role of leucine metabolism in the leucine-signaling pathway involving mTOR. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 285, n. 4, p. E854-63, Oct 2003. ISSN 0193-1849 (Print). Available at: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12812918>.

LYNCH, C. J. et al. Leucine is a direct-acting nutrient signal that regulates protein synthesis in adipose tissue. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 283, n. 3, p. E503-13, Sep 2002. ISSN 0193-1849 (Print). Available at: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12169444>.

MANNING, B. D. et al. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. **Mol Cell**, v. 10, n. 1, p. 151-62, Jul 2002. ISSN 1097-2765. Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150915>>.

NESHAT, M. S. et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10314-9, Aug 28 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Available at: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504908>>.

NICKLIN, P. et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 521-34, Feb 6 2009. ISSN 1097-4172 (Electronic) 0092-8674 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19203585>>.

NISHITANI, S. et al. Leucine promotes glucose uptake in skeletal muscles of rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 299, n. 5, p. 693-6, Dec 20 2002. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291X (Linking). Available at: <

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12470633.

NOBUKUNI, T. et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 40, p. 14238-43, Oct 2005. ISSN 0027-8424. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16176982>>.

PENA-LLOPIS, S. et al. Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. **EMBO J**, v. 30, n. 16, p. 3242-58, Aug 17 2011. ISSN 1460-2075 (Electronic) 0261-4189 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21804531>>.

PINHO, N. et al. **Terapia Nutricional na Oncologia**. Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral e Enteral Associação Brasileira de Nutrologia. 2011

PODSY PANINA, K. et al. An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten+/- mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 18, p. 10320-5, Aug 28 2001. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11504907>>.

PROUD, C. G. Regulation of mammalian translation factors by nutrients. **Eur J Biochem**, v. 269, n. 22, p. 5338-49, Nov 2002. ISSN 0014-2956 (Print) 0014-2956 (Linking). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12423332>.

SAMUELS, Y.; ERICSON, K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. **Curr Opin Oncol**, v. 18, n. 1, p. 77-82, Jan 2006. ISSN 1040-8746. Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357568>>.

SANCAK, Y. et al. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. **Science**, v. 320, n. 5882, p. 1496-501, Jun 13 2008. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497260>>.

SANCAK, Y. et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. **Mol Cell**, v. 25, n. 6, p. 903-15, Mar 23 2007. ISSN 1097-2765 (Print) 1097-2765 (Linking). Available at: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386266>>.

SARBASSOV, D. D. et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol**, v. 14,

n. 14, p. 1296-302, Jul 27 2004. ISSN 0960-9822 (Print) 0960-9822 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15268862> >.

SARBASSOV, D. D.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Growing roles for the mTOR pathway. **Curr Opin Cell Biol**, v. 17, n. 6, p. 596-603, Dec 2005. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226444> >.

SEKIGUCHI, T. et al. Novel G proteins, Rag C and Rag D, interact with GTP-binding proteins, Rag A and Rag B. **J Biol Chem**, v. 276, n. 10, p. 7246-57, Mar 2001. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11073942> >.

SMITH, E. M. et al. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. **J Biol Chem**, v. 280, n. 19, p. 18717-27, May 2005. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15772076> >.

SONG, M. S.; SALMENA, L.; PANDOLFI, P. P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 5, p. 283-96, May 2012. ISSN 1471-0080. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22473468> >.

TEE, A. R. et al. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. **Curr Biol**, v. 13, n. 15, p. 1259-68, Aug 2003. ISSN 0960-9822. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12906785> >.

TZATSOS, A.; KANDROR, K. V. Nutrients suppress phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling via raptor-dependent mTOR-mediated insulin receptor substrate 1 phosphorylation. **Mol Cell Biol**, v. 26, n. 1, p. 63-76, Jan 2006. ISSN 0270-7306. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354680> >.

UM, S. H. et al. Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. **Nature**, v. 431, n. 7005, p. 200-5, Sep 2004. ISSN 1476-4687. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306821> >.

WAITZBERG, D. L.; CAIAFFA, W. T.; CORREIA, M. I. Hospital malnutrition: the Brazilian national survey (IBRAMUTRI): a study of 4000 patients. **Nutrition**, v. 17, n. 7-8, p. 573-80, Jul-Aug 2001. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11448575> >.

WANG, L. et al. PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. **J Biol Chem**, v. 282, n. 27, p. 20036-44, Jul 2007. ISSN 0021-9258. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510057> >.

World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Continuous Update Project report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of ovarian cancer. Washington DC: WCRF; 2014 Mar

XIE, J.; PROUD, C. G. Crosstalk between mTOR complexes. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 11, p. 1263-5, Nov 2013. ISSN 1476-4679 (Electronic) 1465-7392 (Linking). Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24189516> >.

ZHANG, H. et al. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 730-8, Mar 2007. ISSN 0021-9738. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17290308> >.

ZONCU, R. et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 678-83, Nov 2011. ISSN 1095-9203. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22053050> >.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, n. 1, p. 21-35, Jan 2011. ISSN 1471-0080. Available at: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21157483> >.

ANEXO

ANEXO 1



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto "Caracterização da via IRS1/Akt/mTOR em exsertos tumorais de animais submetidos à dieta hiperprotéica" (protocolo nº 2323-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira / Maria Carolina Santos Mendes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 21 de fevereiro de 2011.

Campinas, 21 de fevereiro de 2011.

Handwritten signature of Ana Maria A. Guaraldo.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Handwritten signature of Fátima Alonso.

Fátima Alonso
Secretária Executiva