

**Marina Pereira Dias**

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO METABOLISMO TUMORAL NA RESISTÊNCIA DO  
MELANOMA HUMANO AO VEMURAFENIBE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação da Fundação Pio XII – Hospital  
de Câncer de Barretos para obtenção do  
Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia  
Orientadora: Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro  
Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius de Lima Vasquez

**Barretos - SP**

**2022**

**Marina Pereira Dias**

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DO METABOLISMO TUMORAL NA RESISTÊNCIA DO  
MELANOMA HUMANO AO VEMURAFENIBE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação da Fundação Pio XII – Hospital  
de Câncer de Barretos para obtenção do  
Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia  
Orientadora: Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro  
Co-orientador: Prof. Dr. Vinícius de Lima Vasquez

**Barretos - SP**

**2022**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**(reservada versão final)**



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Marina Pereira Dias

“Caracterização do papel do metabolismo tumoral na resistência do melanoma humano ao Vemurafenibe”.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu Acadêmico da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 06/06/2022

Comissão Examinadora:

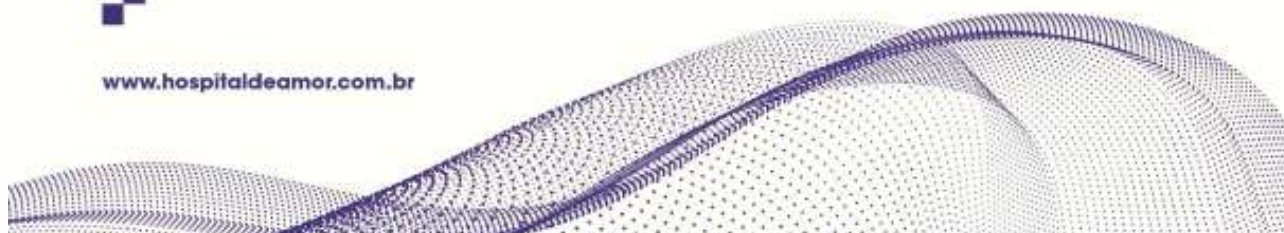
Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler  
Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Profa. Dra. Helena Isabel Martins Pópulo  
Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto

Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis  
Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Farmacologia

Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro  
Orientadora

Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez  
Coorientador e Presidente da Banca



## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Jovem Pesquisador (processo número 2015/25351-6).

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Bolsa Concedida (processo número 2017/12620-4).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

“Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos”.

“Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo”.

Dedico este trabalho a minha mãe, irmã, ao meu pai (*in memoria*), e aos meus amigos.  
Vocês foram a força, coragem, determinação, amor e confiança que precisei para chegar até  
aqui.

## AGRADECIMENTOS

**À Dra. Céline Pinheiro**, pela orientação, dedicação, apoio, confiança, compreensão ao longo deste trabalho, mesmo quando decidi não me dedicar de forma exclusiva. Seu apoio, foi fundamental para conclusão deste trabalho. Tenho uma grande admiração e respeito por você, não só pelo seu trabalho, mas também pela mulher/mãe que é. Obrigado pela amizade, carinho, pelo apoio incondicional em meio a tantos percalços ao longo do caminho. Que essa parceria firmada nestes anos permaneça e traga novas conquistas e contribuições para a ciência.

**Ao Dr. Vinicius Vazquez**, por ter aceitado a coorientação, pelo auxílio na inclusão de pacientes e por me permitir conhecer o seu trabalho como cirurgião de perto, o acompanhando nos atendimentos aos pacientes. Admiro muito seu trabalho como médico, cirurgião e pesquisador, contribuindo para entendimento e novos avanços no tratamento do melanoma.

**Ao Dr. Caio**, oncologista clínico, por todo seu apoio durante a inclusão de pacientes, pelos ensinamentos, por compartilhar parte do seu notório conhecimento no tratamento clínico dos pacientes, tenho grande admiração pelo seu trabalho.

**À Dra. Silvy Stuchi**, pela doação de todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho e principalmente pela constante colaboração, como membro da banca de acompanhamento, contribuindo de forma inestimável para melhoria constante do nosso trabalho. À equipe do laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da USP, em especial à **Dra. Larissa Anastácio**, pela execução nas análises de seahorse.

**À Dra. Luciane Sussuchi**, pelo auxílio nas análises do Nanostring.

**Aos membros da banca de acompanhamento, Dra. Silvy Stuchi e Dr. Matias Melendez**, pelo tempo dedicado na avaliação, discussão, e contribuições significativas para o trabalho.

**Aos membros da banca de defesa, Dra. Silvy Stuchi, Dra. Helena Pópulo e Dra. Miriam Jasiulionis**, pela certeza de excelentes contribuições científicas para a versão final desta tese.



**Ao Departamento de Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos e toda equipe**, por todo o auxílio com os prazos e demais questões burocráticas.

**Ao Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica (EPIT) do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial ao **Dorion Denardi**, pelo apoio nas demandas relacionadas a FAPESP e à **Maria Alice** no controle dos orçamentos e compras relacionados ao projeto.

**À Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial à **Patrícia Marconi** e **Beatriz Buzon**, por todo o auxílio dispensado aos nossos projetos de pesquisa, pela disponibilidade, simpatia e comprometimento em sempre nos atender.

**À equipe do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos**, **Dra. Carolina Laus**, **Dra. Izabela Faria**, **Me. Karina Melo**, **Dra. Marcela Rosa** e **Letícia Braga**, pela amizade, companheirismo e disponibilidade em todos os momentos. Obrigado pelo ótimo “gerenciamento de crises” e por tornarem o CPOM um ambiente de harmonia e organização, essenciais para a execução de um bom trabalho.

**Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Microambiente e Metabolismo Tumoral**, em especial ao **Dr. Murilo Bonatelli** e **Me. Patrik Vital**, por toda ajuda na execução deste trabalho, pelo apoio nos tempos que estive fora. Obrigado por todo o aprendizado e crescimento que me proporcionaram desde o início, pela troca de conhecimento. Obrigado pelos ótimos momentos na bancada e fora dela, pelos momentos de descontração, para que no dia seguinte voltasse mais forte e resiliente. Desejo que conquistem os seus sonhos, objetivos, que tenham muito sucesso profissional e pessoal.

**À FAPESP e ao Hospital de Câncer de Barretos**, pelo auxílio financeiro e pela oportunidade de divulgação internacional deste trabalho.

**A Deus**, por abençoar, iluminar os meus caminhos, me dar sabedoria e entendimento, permitindo que chegasse até aqui.

**À minha mãe Elenilda**, por ser o meu exemplo, minha força, pelo seu apoio incondicional, seu amor sem igual e por ser a maior incentivadora e apoiadora dos meus sonhos. Sem dúvidas não teria conquistado nada sem a sua ajuda. Obrigada pela educação, pelo seu esforço em ver eu a minha irmã realizando nos sonhos e principalmente por se sentir realizada com eles. Obrigada por todas as vezes que ficou 4 horas sentada na calçada esperando-me sair de uma prova. Agradeço imensamente pelo seu amor, cuidado, por ficar feliz com cada conquista minha. Amo você!

**À minha irmã Mariana**, obrigada por me apoiar, por estar comigo em todos os momentos, pela sua ajuda incondicional, por sua compreensão e por embarcar nos meus sonhos. Você é a melhor irmã do universo. Te amo incondicionalmente.

**Ao Rafael Assumpção**, seu apoio foi de extrema importância nesta reta final. Obrigada por toda compreensão, incentivo, carinho, cuidado, neste período. Te admiro muito, você é uma pessoa ímpar, com um coração gigante, sempre disposto a ajudar. Obrigada por tanto!

A grandes amigos, pessoas incríveis que tive a honra de conhecer em Barretos, que me proporcionaram momentos sem igual, e principalmente me apoiaram em outros de grande dificuldade **Fabrine Aguilar, Gislaïne Bergo, Gustavo Borges, Carla Takatu e Paula Pastrez** meu muito, muito obrigada!

**À Dra. Ana Carolina Martin**, que tive a grata surpresa de conhecer, foi um presente que ganhei tendo a hora de trabalhar como uma pessoa incrível, e que além de tudo, se tornaria uma amiga, confidente, cúmplice, parceira. Sra, obrigada!

E não menos, aos grandes amigos que Barretos me concedeu, pessoas que estive ao meu lado em tantos momentos, **Ana Laura Alves, Aline Rocha, Aline Larissa, Ariane Pereira, Ângela Neves, Cíntia Ramos, Daniele Pessoa, Izabela Faria, Karina Melo, Letícia Braga, Marcela Nunes, Mônica Leal, Ricardo e Rhafaela Causin**. Vocês fizeram parte desse capítulo e espero que de muitos mais. Obrigado por tanto!

E por fim, a todos que participaram de forma direta ou indireta na execução deste trabalho, assim como de meu crescimento pessoal e profissional.

**Meus mais sinceros agradecimentos.**

“Você nunca sabe a força que tem.  
Até que a sua única alternativa é ser forte”  
(Johnny Depp)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Melanoma	1
1.2	Aspectos moleculares do melanoma	4
1.3	Vemurafenibe	7
1.4	Metabolismo tumoral	9
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos Específicos	15
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1	Estudos com amostras humanas	16
4.1.1	Delineamento do estudo	16
4.1.2	Amostras de melanoma humano	16
4.1.3	Imunohistoquímica (IHQ)	19
4.1.4	NanoString	20
4.1.4.1	Extração de RNA	20
4.1.4.2	Detecção de genes relacionados ao metabolismo tumoral	21
4.2	Ensaio <i>in vitro</i>	22
4.2.1	Linhagens celulares	22
4.2.2	Caracterização do perfil metabólico	23
4.2.2.1	Imunocitoquímica	24
4.2.2.2	<i>Western blotting</i>	24
4.2.2.3	Quantificação de glicose e lactato extracelular	26

4.2.2.4 NanoString	26
4.2.3 <i>Knockdown</i> do gene <i>GLS</i> na linhagem SK-MEL-19 PLX R por siRNA	27
4.2.4 Caracterização <i>in vitro</i> do efeito do silenciamento de <i>GLS</i> , na ausência e presença de vemurafenibe	27
4.2.4.1 Quantificação de glicose, glutamina e lactato extracelular	28
4.2.4.2 Avaliação da viabilidade celular através do método colorimétrico com Sulforodamina B (SRB)	28
4.2.4.3 Proliferação celular	29
4.2.4.4 Migração celular	29
4.2.4.5 Invasão celular	30
4.2.4.6 Formação de colônias	31
4.3 Análise estatística	31
5 ASPECTOS ÉTICOS	33
6 RESULTADOS	34
6.1 Imunohistoquímica nas amostras humanas de melanoma tratado com vemurafenibe	34
6.2 NanoString nas amostras humanas de melanoma tratado com vemurafenibe	36
6.3 Análise da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo em linhagens de melanoma	39
6.4 NanoString na linhagem celular de melanoma SK-MEL-19	43
6.5 Quantificação de glicose e lactato extracelular	46
6.6 Caracterização do efeito do <i>knockdown</i> do gene <i>GLS</i> na linhagem SK-MEL-19 PLX R combinado com tratamento com vemurafenibe	47
6.7 Avaliação da expressão de PDK2 e PDK3	50
7 DISCUSSÃO	52

<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBILOGRÁFICAS</b>	<b>58</b>
	<b>ANEXOS</b>	<b>68</b>
	<b>Anexo 1</b> – Painel de genes <i>nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel</i> avaliados por <i>NanoString</i> .	68
	<b>Anexo 2</b> – <i>Housekeeping nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel</i> avaliados por <i>NanoString</i> .	72
	<b>Anexo 3</b> – Avaliação da média de escore na expressão de marcadores do metabolismo em amostras de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) o tratamento com vemurafenibe.	73
	<b>Anexo 4</b> – <i>Heatmaps</i> representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-Mel-19 resistente em comparação com parental. $p < 0,05$ .	74
	<b>Anexo 5</b> – <i>Heatmaps</i> representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-Mel-19 resistente em comparação com parental. $p < 0,01$ .	75
	<b>Anexo 6</b> – <i>Heatmaps</i> representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-Mel-19 resistente em comparação com parental. $p < 0,001$ .	76
	<b>Anexo 7</b> – Parecer Consubstanciado do CEP	77

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Eventos biológicos e alterações moleculares que culminam na progressão do melanoma originado de nevo. 3
- Figura 2.** Vias de sinalização no melanoma. 5
- Figura 3.** Divisão do melanoma em subtipos, com base na localização anatômica, exposição solar e perfis genéticos. 7
- Figura 4.** Principais vias metabólicas que estão alteradas nas células tumorais. 11
- Figura 5.** Fotomicrografias representativas da expressão positiva de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1 e MCT4) e da glutamina (ASCT2, GLS e GLUD1/2), avaliada por imunohistoquímica. 34
- Figura 6.** *Heatmap* representando a expressão de mRNAs em amostras tumorais de 8 pacientes diagnosticados com melanoma, antes (Pre) e após (Post) tratamento com vemurafenibe. 38
- Figura 7.** Representação gráfica da expressão de mRNAs em amostras tumorais de 8 pacientes diagnosticados com melanoma, antes (Pré-PLX) e após (Pós-PLX) tratamento com vemurafenibe. 38
- Figura 8.** Fotomicrografias representativas da expressão de diferentes proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1 e MCT4) e da glutamina (ASCT2, GLS e GLUD1/2) por imunocitoquímica. 40
- Figura 9.** Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1 e MCT4) e ao metabolismo da glutamina (ASCT2, GLUD1/2, GLS), foram determinadas por *western blotting*. 42
- Figura 10.** Densitometria dos resultados de *western blotting* para as diferentes proteínas associadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, CA9, MCT1 e MCT4) e metabolismo da glutamina (GLS e GLUD1/2) nas 8 linhagens celulares comerciais de melanoma. 43
- Figura 11.** *Heatmaps* representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-MEL-19 resistente em comparação com parental. 45
- Figura 12.** Diagrama de Venn apresentando os genes diferencialmente expressos únicos e em comum em amostras de pacientes com melanoma pós-tratamento com vemurafenibe e na linhagem celular de melanoma SK-MEL-19. 45



<b>Figura 13.</b> Consumo de glicose em 8 linhagens de melanoma parental e resistente ao vemurafenibe, ao longo do tempo (24 e 48 horas).	46
<b>Figura 14.</b> Produção de lactato em 8 linhagens de melanoma parental e resistente ao vemurafenibe, ao longo do tempo (24 e 48 horas).	47
<b>Figura 15.</b> <i>Knockdown</i> de <i>GLS</i> na linhagem SK-MEL-19 PLX R por siRNA.	48
<b>Figura 16.</b> Avaliação da viabilidade celular, proliferação e potencial de formação de colônias, em linhagens celulares de melanoma resistente a vemurafenibe após <i>knockdown</i> de <i>GLS</i> , na ausência e presença de PLX.	48
<b>Figura 17.</b> Avaliação da migração e invasão em linhagens celulares de melanoma resistentes ao vemurafenibe após <i>knockdown</i> de <i>GLS</i> , na ausência e presença de PLX.	49
<b>Figura 18.</b> Variação de glicose, lactato e glutamina em linhagens celulares de melanoma resistentes após <i>knockdown</i> de <i>GLS</i> na ausência e presença de PLX.	50
<b>Figura 19.</b> Expressão das proteínas PDK2 e PDK3 na linhagem SK-MEL-19 PLX R.	51

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Informação dos pacientes excluídos do estudo.	16
<b>Tabela 2.</b> Dados dos pacientes incluídos no estudo.	18
<b>Tabela 3.</b> Localização tumoral das 9 amostras de pacientes com melanoma incluídos no estudo.	18
<b>Tabela 4.</b> Condições e anticorpos utilizados para imunohistoquímica.	20
<b>Tabela 5.</b> Origem e perfil mutacional das linhagens celulares comerciais de melanoma utilizadas no estudo.	23
<b>Tabela 6.</b> Condições e anticorpos utilizados no <i>Western blotting</i> .	25
<b>Tabela 7.</b> Comparação da frequência de expressão de marcadores do metabolismo em amostras de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) tratamento com vemurafenibe.	36
<b>Tabela 8.</b> Genes diferencialmente expressos em amostras de pacientes pós-tratamento com vemurafenibe.	37
<b>Tabela 9.</b> Escores de expressão de marcadores do metabolismo em linhagens celulares de melanoma parentais e resistentes ao vemurafenibe.	41
<b>Tabela 10.</b> Genes diferencialmente expressos na linhagem SK-MEL-19 PLX R.	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	$\beta$ -actina
AKT	Proteína quinase B
ASCT2	Transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio
ATP	Adenosina trifosfato
<i>BRAF</i>	Homólogo B do oncogene viral de sarcoma murino V-raf
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Albumina de soro bovino
CA9	Anidrase carbônica 9
<i>CD1</i>	Ciclina D1
CEP	Comitê de ética em pesquisa
<i>CDKN2A</i>	Inibidor de quinase dependente de ciclina
CTLA4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
<i>EGFR</i>	Receptor do fator de crescimento epidermal
ERK	Proteína quinase ativada por mitógeno 1
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FH</i>	Fumarato hidratase
Globocan	<i>Global Cancer Observatory</i>
<i>GLS</i>	Glutaminase
GLI	Fatores de transcrição <i>hedgehog</i>
GLUD1/2	Glutamato desidrogenase 1 e 2
GLUT1	Transportador de glicose 1
GNAQ	Subunidade alfa da proteína G
GNA11	Subunidade alfa 11 da proteína G
HIF-1 $\alpha$	Fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$

HK2	Hexoquinase 2
ICI	Inibidores de <i>checkpoint</i> imunológico
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IGF1R	Receptor de fator de crescimento semelhante a insulina
KD	<i>Knockdown</i>
<i>KIT</i>	Proto-oncogene KIT, receptor tirosina quinase
<i>LAG-3</i>	Gene de ativação de linfócitos 3
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MCT1	Transportador de monocarboxilato 1
MCT4	Transportador de monocarboxilato 4
MCTs	Transportadores de monocarboxilatos
MEK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MIS	Melanoma <i>in situ</i>
MITF	Fator de transcrição associado à microftalmia
<i>MMP-2</i>	Metaloproteinase de matriz 2
<i>MTOR</i>	Alvo mecanístico da rapamicina quinase
<i>MYC</i>	Proto-oncogene MYC, fator de transcrição bHLH
<i>NF1</i>	Neurofibromina 1
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma homólogo de oncogene viral RAS
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
P/S	Penicilina/estreptomicina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	Morte celular programada 1
PDGFRB	Receptor B do fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK	Piruvato desidrogenase quinase
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1
PDK2	Piruvato desidrogenase quinase 2
PDK3	Piruvato desidrogenase quinase 3
PD-L1	Ligante de morte programado 1

PI3K	Subunidade catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase
PLX4032	Vemurafenibe
<i>PTEN</i>	Fosfatase Homólogo de tensina
SFB	Soro fetal bovino
<i>SDH</i>	Succinato desidrogenase
siRNA	Pequeno RNA de interferência
<i>SLC7A11</i>	Família de Transportadores de soluto 7 membro 11
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
<i>TRPM1</i>	Canal catiônico receptor de potencial transitório subfamília M1
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
UV	Ultravioleta
VDAC	Canal aniônico dependente de tensão
VHL	Von Hippel-Lindau
WS	<i>Working Solution</i>
WT	<i>Wild type</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor ou igual
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
DP	Desvio-padrão
°C	Graus celsius
μg	Microgramas
μL	Microlitro
μM	Micromolar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peróxido de hidrogênio
kDa	Kilodalton
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
O <sub>2</sub>	Oxigênio
rpm	Rotações por minuto

## RESUMO

A incidência do câncer de pele está aumentando em todo o mundo, sendo o tipo melanoma o tipo de maior letalidade devido ao seu grande potencial metastático. O *BRAF* é um dos principais oncogenes envolvidos na tumorigênese deste tipo de tumor, estimulando fenótipos altamente proliferativos, apoiados, em grande parte, pela glicólise aeróbica, também conhecida por efeito de *Warburg*, observando-se também um papel do metabolismo da glutamina. A descoberta de inibidores de *BRAF*, como o vemurafenibe, trouxe um grande avanço no tratamento deste tipo de tumor. Apesar da alta taxa de resposta, a grande maioria dos tumores desenvolvem resistência a este fármaco. Assim, a busca pelo entendimento da agressividade e resistência aos tratamentos existentes, bem como de alternativas que venham adicionar ganho na eficiência terapêutica, se faz necessária. Neste contexto, este projeto tem como objetivo avaliar o papel do metabolismo tumoral na resistência de células de melanoma ao vemurafenibe. Para isto, foram avaliados: a) a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico e da glutamina em amostras humanas de 9 pacientes portadores de melanoma, antes e após o tratamento com vemurafenibe, através da técnica de imunohistoquímica; b) o perfil de expressão de mRNAs relacionados ao metabolismo tumoral, em amostras humanas de 9 pacientes portadores de melanoma, antes e após o tratamento com vemurafenibe, assim como na linhagem celular SK-MEL-19 parental e resistente ao vemurafenibe, através da técnica de *nanoString*, utilizando o painel *nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel*; c) o perfil metabólico de linhagens parentais e resistentes ao vemurafenibe por meio de *Western blotting*, imunocitoquímica, e quantificação do consumo de glicose e produção de lactato; e d) o efeito da combinação de vemurafenibe com silenciamento do gene *GLS* por siRNA na viabilidade, proliferação, migração e invasão celular, capacidade de formação de colônia, consumo de glicose e glutamina, e produção de lactato. A avaliação do perfil de expressão de mRNAs relacionados ao metabolismo tumoral demonstrou que as amostras de pacientes pós-tratamento com vemurafenibe apresentam uma maior expressão nos genes *PDK2* e *PDK3*, assim como na linhagem tumoral SK-MEL-19 PLX R, a qual também demonstrou ter um perfil metabólico mais voltado para a via da glutaminólise, em relação à parental e as demais linhagens avaliadas no estudo. Assim, foi realizado o *knockdown* do gene *GLS* por siRNA, na presença ou ausência de vemurafenibe, o qual induziu uma diminuição significativa na proliferação celular e na capacidade de formação de colônias independente da presença de vemurafenibe, e na invasão celular na presença de

vemurafenibe. O *knockdown* do gene *GLS* também foi capaz de diminuir o consumo de glicose na ausência de vemurafenibe, bem como o efluxo de lactato, independentemente da presença de vemurafenibe. Diante dos resultados obtidos, foi verificado que amostras de pacientes com melanoma resistente ao vemurafenibe apresentam expressão diferencial em genes relacionados com o metabolismo da glicose e via mTOR. A linhagem SK-MEL-19 PLX R apresentou expressão alterada de genes envolvidos no metabolismo da glicose, do carbono, da glutamina, via mTOR e na sinalização associada à hipóxia. Destaca-se o efeito do *knockdown* de *GLS* em diminuir a proliferação celular, a formação de colônias e a invasão de células de melanoma resistentes ao vemurafenibe, demonstrando que esta proteína pode ser um alvo terapêutico promissor para o tratamento de pacientes com melanoma resistente ao vemurafenibe.

**PALAVRAS-CHAVES:**

Glutamina; Melanoma; Metabolismo; Resistência à terapia; siRNA; Vemurafenibe.



## ABSTRACT

The incidence of skin cancer is increasing worldwide, with melanoma being the most lethal type due to its great metastatic potential. *BRAF* is one of the main oncogenes involved in the tumorigenesis of this type of tumor, stimulating highly proliferative phenotypes, largely supported by aerobic glycolysis, also known as the Warburg effect. The discovery of BRAF inhibitors, such as vemurafenib, brought a great advance in the treatment of this type of tumor. Despite the high response rate, the vast majority of tumors develop resistance to this drug. Thus, the search for understanding the aggressiveness and resistance to existing treatments, as well as alternatives that may add gain in therapeutic efficiency, is necessary. In this context, this project aims to evaluate the role of tumor metabolism in the resistance of melanoma cells to vemurafenib. For this, the following were evaluated: a) the expression of proteins related to glycolytic metabolism and glutamine in human samples from 9 patients with melanoma, before and after treatment with vemurafenib, using immunohistochemistry; b) the expression profile of mRNAs related to tumor metabolism, in human samples from 9 patients with melanoma, before and after treatment with vemurafenib, as well as in the parental and vemurafenib-resistant SK-MEL-19 cell line, using nanoString, with the nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel; c) the metabolic profile of parental and vemurafenib-resistant cell lines by Western blotting, immunocytochemistry, and quantification of glucose consumption and lactate production; and d) the effect of the combination of vemurafenib with GLS gene silencing by siRNA on cell viability, proliferation, migration and invasion, colony formation capacity, glucose and glutamine consumption, and lactate production. The evaluation of the expression profile of mRNAs related to tumor metabolism showed that samples from patients after treatment with vemurafenib have a higher expression in the *PDK2* and *PDK3* genes, with the same observed in the tumor cell line SK-MEL-19 PLX R, which also showed to have a metabolic profile more focused on the glutaminolysis pathway, in relation to the parental and the other cell lines evaluated in the study. Thus, the knockdown of the *GLS* gene was performed by siRNA, in the presence or absence of vemurafenib, which induced a significant decrease in cell proliferation and in the ability to form colonies, regardless of the presence of vemurafenib, and in cell invasion in the presence of vemurafenib. *GLS* gene knockdown was also able to decrease glucose consumption in the absence of vemurafenib, as well as lactate efflux independently from vemurafenib presence. In view of the results obtained, it was found that samples from

patients with vemurafenib-resistant melanoma show differential expression in genes related to glucose metabolism and via mTOR. The SK-MEL-19 PLX R cell line showed differential expression of genes involved in glucose, carbon, glutamine metabolism, via mTOR and in hypoxia-associated signaling. The effect of the *GLS* knockdown in decreasing cell proliferation, colony formation and invasion of vemurafenib-resistant melanoma cells is highlighted, demonstrating that this protein may be a promising therapeutic target for the treatment of patients with resistant melanoma. to vemurafenib.

KEYWORDS:

Glutamine; Melanoma; Metabolism; Therapy resistance; siRNA; Vemurafenib.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Melanoma

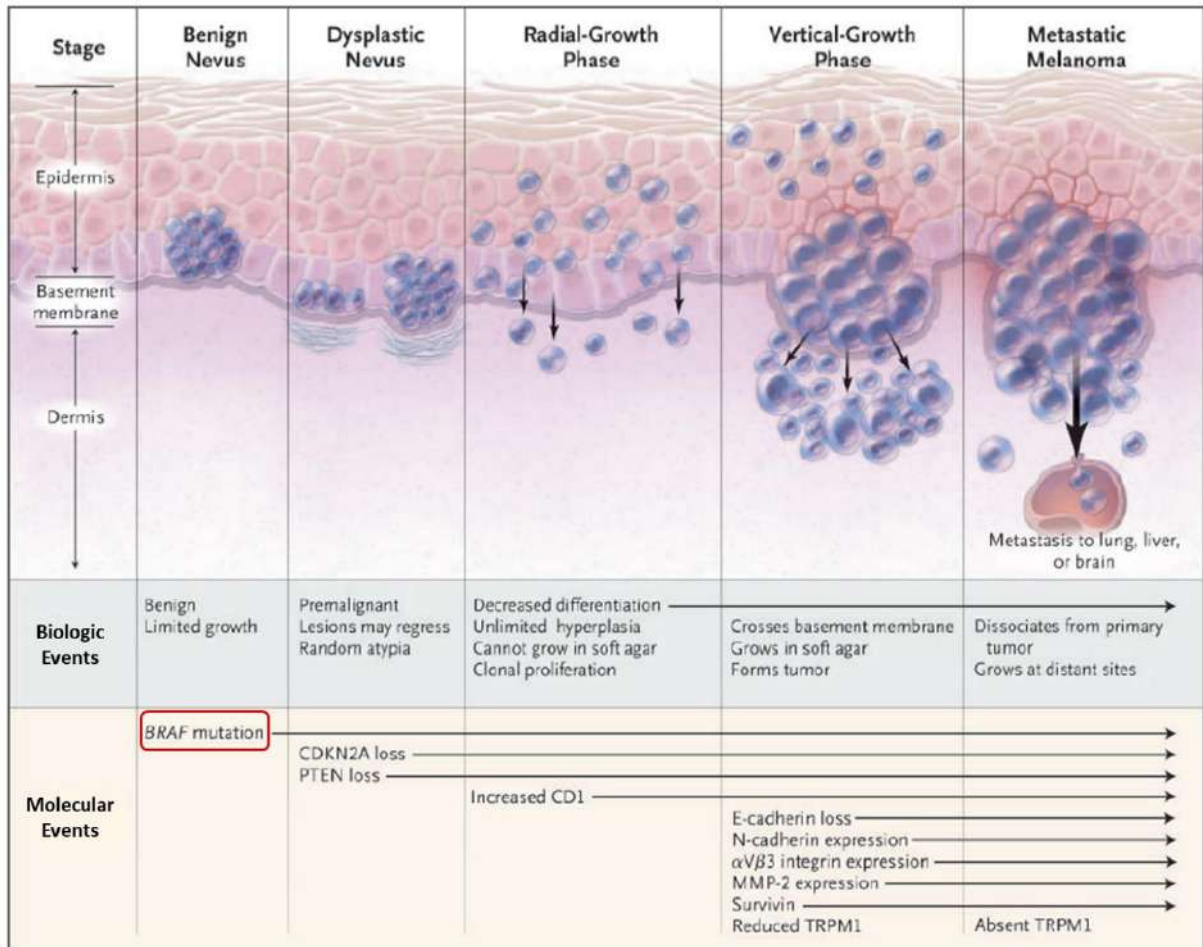
A última estimativa mundial revelou que, em 2020, aproximadamente 325 mil casos novos de melanoma foram diagnosticados, sendo que, dentre estes, 57 mil vieram a óbito em todo o mundo. As mais altas taxas de incidência de câncer de pele, melanoma e não melanoma, foram observadas em países com população caucasiana. Mais de 80% dos diagnósticos de melanomas e 65% dos óbitos por esse câncer foram verificados na Oceania, Europa e América do Norte<sup>1</sup>.

Nos Estados Unidos da América (EUA), a estimativa para o ano de 2022 é de 99.780 novos casos de melanoma, sendo 57.180 homens e 42.600 mulheres. Além disso, estimam-se 7.650 mortes por melanoma, entre homens e mulheres<sup>2</sup>. No Brasil, para o triênio 2020-2022, a estimativa de novos casos de melanoma é de 4.200 em homens e 4.250 em mulheres, podendo ser considerada uma baixa incidência, porém com alta letalidade. As maiores taxas de incidência estimadas em homens e mulheres encontram-se nas regiões Sul e Sudeste, quando comparado com as demais regiões, devido as características fenotípicas da população, pele e olhos claros, com cabelos ruivos ou loiros, um dos fatores de risco para desenvolvimento do melanoma<sup>3</sup>.

O desenvolvimento do melanoma é multifatorial, decorrente de interações entre a suscetibilidade genética e a exposição ambiental<sup>4</sup>. Estudos genéticos do melanoma sugerem que pode haver duas ou mais populações propensas ao seu desenvolvimento. A primeira inclui indivíduos com baixa propensão à proliferação de melanócitos e com exposição solar crônica. A segunda diz respeito a indivíduos com alta propensão à proliferação de melanócitos (por exemplo, predisposição genética ou fenotípica, ou alta contagem de nevos) e menos exposição ao sol no início do processo<sup>5</sup>. Os nevos são proliferações benignas seguidas de senescência, que se acredita serem derivados de melanócitos ou células-tronco de melanócitos<sup>6</sup>. Os nevos adquiridos se formam em locais cutâneos (incluindo acrais), dentro da úvea do olho e em superfícies mucosas, onde surpreendentemente, foram encontradas mais de 90% das mutações V600E do gene *BRAF*<sup>7, 8</sup>. Os nevos congênitos estão presentes no nascimento ou no início da vida, e estão predominantemente associados a mutações ativadoras em *NRAS* e lesões maiores que 20-40 cm, associados ao risco aumentado de evolução para melanoma<sup>9-12</sup>. É importante ressaltar, que estudos sugerem que apenas 25 a

30% dos melanomas estão associados ao desenvolvimento de um nevo<sup>13</sup>. Assim, a maioria dos melanomas se formam na ausência de um precursor de nevo benigno, evoluindo primeiro para lesões intermediárias, que histologicamente podem ser difíceis de se distinguir de um nevo displásico antes da progressão para melanoma *in situ* (MIS) - melanoma com uma proliferação de melanócitos de núcleos aumentados que crescem em um padrão irregular inteiramente dentro da epiderme<sup>14</sup> - ou melanoma invasivo<sup>15</sup>. O acúmulo progressivo de alterações genéticas e epigenéticas que alteram vias de homeostase transforma os melanócitos, resultando em células tumorais com proliferação descontrolada, seguido de invasão dos vasos linfáticos ou disseminação hematogênica para sítios distantes<sup>16</sup>.

O processo de tumorigênese de melanomas associados ao desenvolvimento de um nevo é o que se encontra mais bem estabelecido (Figura 1). A primeira alteração fenotípica nos melanócitos é o desenvolvimento de um nevo benigno. A rápida proliferação de melanócitos transformados leva à formação de um nevo displásico, que é assimétrico e com bordas irregulares. Segue-se uma rápida fase de crescimento radial, que é caracterizada pelo crescimento intraepidermal. A seguir, ocorre uma fase de crescimento vertical, também conhecida como fase de invasão dermal. O melanoma estimula uma rápida vascularização peritumoral, fornecendo suprimento nutricional para o tumor em desenvolvimento e servindo como rota adicional para a metástase<sup>17</sup>.



Fonte: Adaptado de Miller & Mihm Jr<sup>17</sup>.

**Figura 1.** Eventos biológicos e alterações moleculares que culminam na progressão do melanoma originado de nevo. *BRAF*: Oncogene Viral homólogo B de Sarcoma Murino; *CDKN2A*: inibidor de quinase dependente de ciclina 2A; *PTEN*: fosfatase homóloga à tensina; *CD1*: ciclina D1; *MMP-2*: metaloproteinase de matriz 2; *TRPM1*: canal catiônico receptor de potencial transitório subfamília M1.

Nas neoplasias melanocíticas cutâneas, a radiação UV por exposição da pele ao sol é a principal causa de mutações. Além disto, existe uma correlação positiva entre o desenvolvimento do melanoma e características fenotípicas como cor dos olhos, cabelo, pele clara, sardas e quantidade de nevos. Evidências apontam para dois tipos principais de melanomas que se distinguem pela exposição ao sol. Um, provocado por danos crônicos induzidos pela exposição ao sol, que tipicamente se origina na cabeça, pescoço e superfície dorsal de indivíduos mais velhos (>55 anos de idade). Estes melanomas apresentam sinais macro e microscópicos de exposição prolongada aos raios UV, destacado pela presença de elastose solar, uma mudança nas fibras elásticas da pele. Apresentam também uma alta carga de mutações e muitas vezes abrigam mutações em *NF1*, *NRAS*, *BRAF* (não-V600E) ou *KIT*. O outro tipo principal, sem danos crônicos induzidos pela exposição ao sol, tipicamente afeta

áreas expostas ao sol intermitentemente como o tronco e extremidades proximais dos indivíduos mais jovens (<55 anos de idade), e os pacientes não apresentam elastose solar acentuada. Nestes casos, as células tumorais exibem uma carga de mutação moderada e uma predominância de mutações *BRAF*<sup>V600E</sup>. Ambos os tipos estão associados a lesões precursoras distintas, com neoplasias melanocíticas atípicas e melanoma *in situ* para os melanomas provocados por danos crônicos induzidos pela exposição ao sol e nevos adquiridos que já apresentam mutações *BRAF*<sup>V600E</sup> para aqueles sem danos crônicos induzidos pela exposição ao sol<sup>16</sup>.

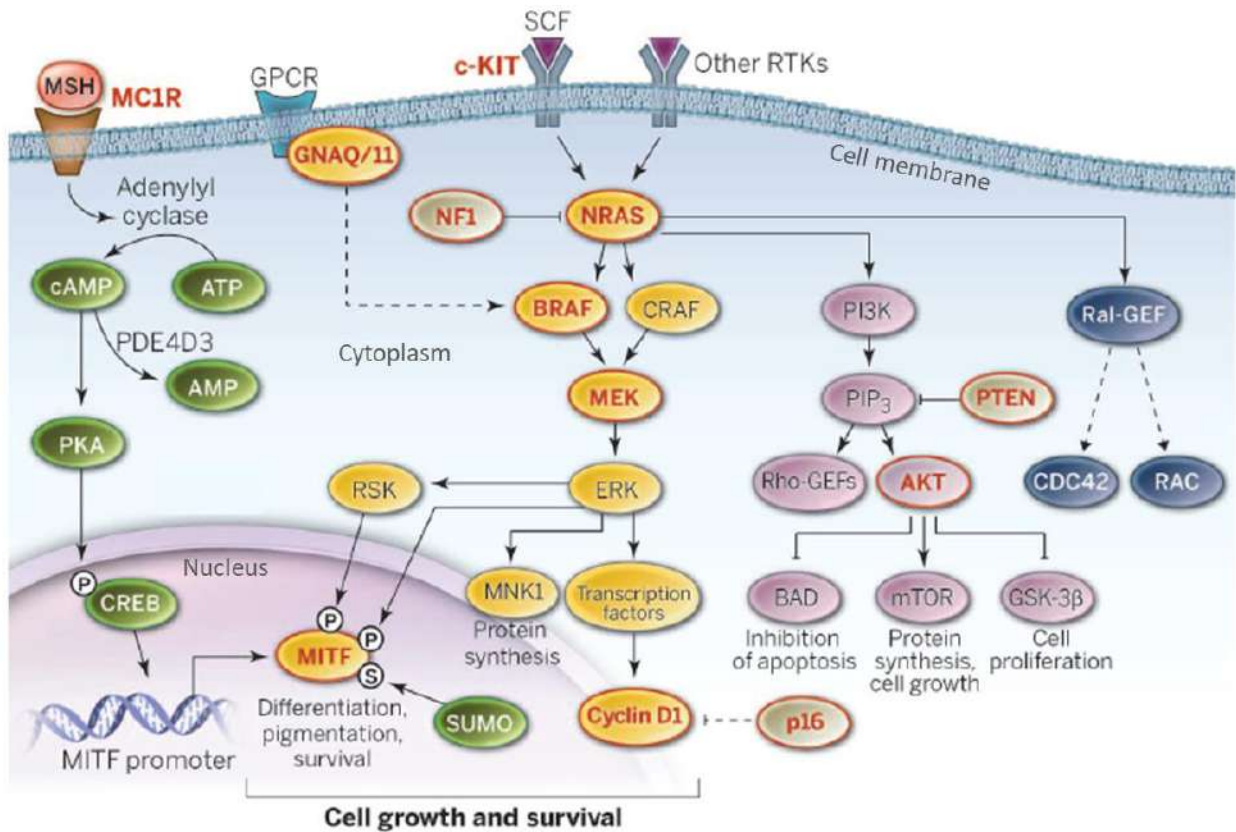
Contudo, é importante ressaltar que, entre os melanomas, a frequência de mutações específicas, padrões de alterações no número de cópias e carga mutacional variam significativamente com o tecido e local anatômico de origem, idade ao diagnóstico e exposição solar cumulativa, o que levou ao reconhecimento de que os melanomas compreendem subtipos biologicamente distintos<sup>18, 19</sup>. Melanomas com mutações *BRAF*<sup>V600E</sup> surgem de nevos benignos. Por outro lado, melanomas com mutações em *NRAS* ou mutações *BRAF*<sup>V600K</sup> estão mais associados a lesões intermediárias ou melanomas *in situ* que já haviam acumulado outras mutações patogênicas<sup>20</sup>.

## 1.2 Aspectos moleculares do melanoma

Além dos aspectos celulares descritos anteriormente, a progressão do melanoma associado ao desenvolvimento de um nevo também possui uma evolução sob o ponto de vista molecular bem estabelecida (Figura 1). Na fase do nevo benigno, ocorre mutação no gene *BRAF*, gene que codifica a proteína serina/treonina quinase BRAF. As atipias citológicas observadas no nevo displásico estão relacionadas com mutações adicionais, incluindo mutações nos genes inibidores de quinase dependente de ciclina (*CDKN2A*) e fosfatase homóloga à tensina (*PTEN*) que acarretam perda de função. A progressão do melanoma está associada com diminuição da diferenciação e da expressão de marcadores moleculares regulados pelo fator de transcrição associado à microftalmia (*MITF*). Nas fases de crescimento vertical e metástase, são notáveis disfunções de proteínas envolvidas no controle da adesão celular, tais como: perda da E-caderina e aumento da expressão da N-caderina, da integrina  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$  e da metaloproteinase de matriz 2 (*MMP-2*)<sup>17</sup>.

Apesar das alterações genéticas mais comuns no melanoma serem em mutações nos genes *BRAF* e *NRAS*, que resultam na hiperativação da via MAPK (proteínas quinases ativadas

por mitógeno) (Figura 2), vale destacar que outras alterações genéticas recorrentes também estão envolvidas no desenvolvimento do melanoma, como a amplificação de *AKT3* e perda de *PTEN* por silenciamento ou deleção epigenética<sup>21, 22</sup>, ambos os eventos levando à ativação constitutiva de PI3K (subunidade catalítica alfa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase).



Fonte: Adaptado de Lo, J.A.; Fisher, D.E.<sup>23</sup>

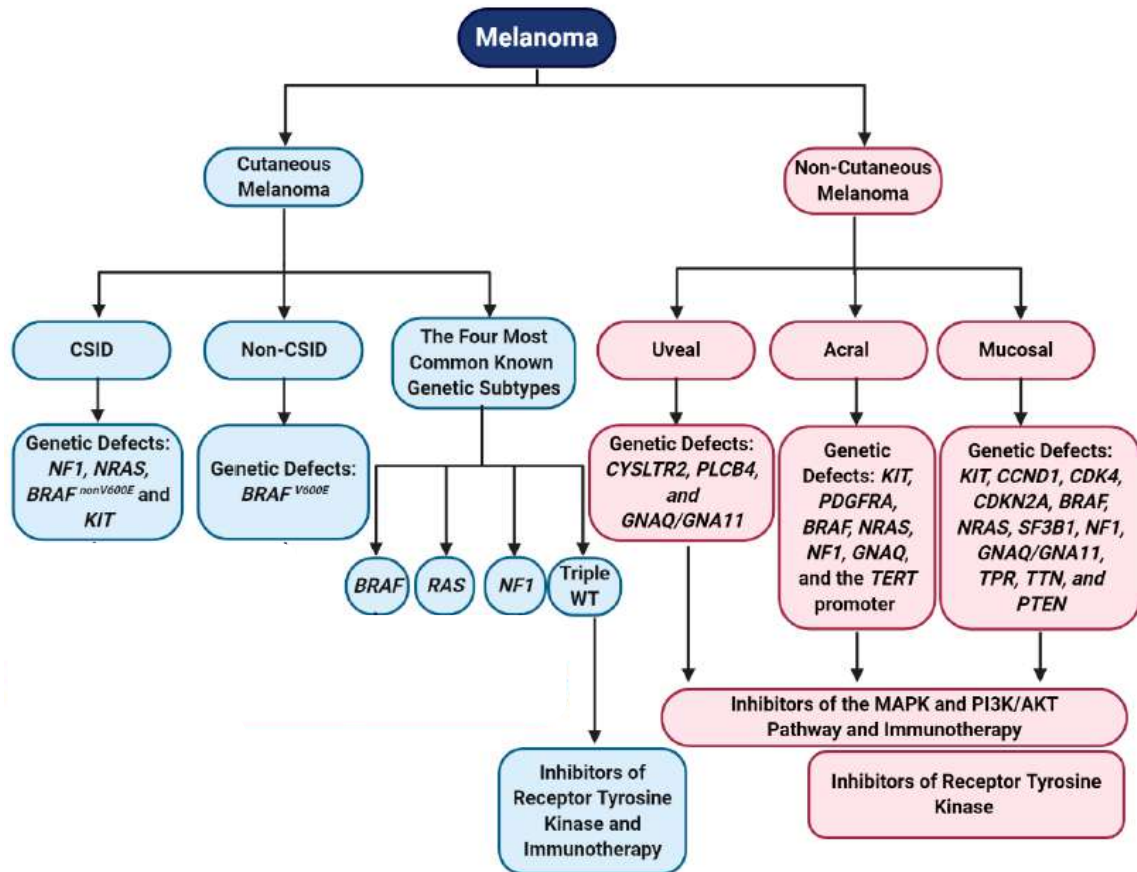
**Figura 2.** Vias de sinalização no melanoma. A sinalização MAPK promove o crescimento e a sobrevivência celular e está constitutivamente ativa na maioria dos melanomas. Oncogenes e supressores de tumor conhecidos de melanoma estão marcados em vermelho. As linhas pontilhadas representam os componentes da via omitidos.

Em alguns melanomas, os quais podem ser divididos em subtipos (Figura 3), a desregulação da via MAPK e PI3K resulta da superexpressão ou hiperativação dos receptores do fator de crescimento, como c-KIT, MET e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)<sup>24-26</sup> ou mutações inativadoras em *NF1*, um regulador negativo de Ras<sup>27</sup>. As mutações e amplificações ativadoras de *KIT*, sinalização essencial para o desenvolvimento de melanócitos, são mais comuns em melanomas do tipo acral, de mucosa e por exposição crônica ao sol<sup>26</sup>. Já as alterações genéticas dominantes em melanomas oculares (uveais) são mutações ativadoras em *GNAQ* e *GNA11*, duas subunidades da proteína G envolvidas na sinalização MAPK<sup>28</sup>. Além

disto, as variantes com perda de função de MC1R estão associadas ao fenótipo cabelo ruivo/pele clara e maior suscetibilidade ao melanoma<sup>23</sup>.

Mutações ativadoras em *BRAF* impulsionam o início e a progressão do melanoma através da via das MAPKs, por ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (ERK), que possui atividade relacionada à proliferação e à sobrevivência das células (Figura 2)<sup>29</sup>. A mutação V600E do gene *BRAF* é uma mutação *driver* (alteração genética que, quando presente, é diretamente responsável pela ativação constitutiva de cascatas de sinalização intracelular, induzindo a proliferação e invasão, necessárias para o surgimento do fenótipo maligno<sup>30</sup>), está presente em 40 a 60% de todos os melanomas cutâneos e diz respeito a mais de 80% de todas as mutações em *BRAF*<sup>31-34</sup>. O melanoma apresenta ainda mutação, em 20% dos casos, em *NRAS*, que codifica a proteína G monomérica N-RAS (neuroblastoma RAS), responsável pela ativação das vias MAPK/ERK e PI3K/AKT (fosfatidilinositol-3 quinase/Proteína quinase B)<sup>35</sup>. Além disso, mutações no gene *CDKN2A* (40% dos casos)<sup>35</sup>, no gene *PTEN* (15% dos melanomas metastáticos) e no gene *TERT* (70-80% do melanomas, com menor frequência no tipo acral lentiginoso, com aproximadamente 17% dos casos)<sup>36, 37</sup>, também são frequentes e estão fortemente associadas à progressão do melanoma<sup>38</sup>.





Fonte: Adaptado de Eddy K.; Chen S<sup>39</sup>.

**Figura 3.** Divisão do melanoma em subtipos, com base na localização anatômica, exposição solar e perfis genéticos. CSID—Melanoma Induzido pela exposição crônica ao sol; não-CSID—Melanoma induzido pela não exposição crônica ao sol.

### 1.3 Vemurafenibe

O conhecimento do perfil mutacional do melanoma, em especial as mutações em *BRAF*, permitiu o desenvolvimento de inibidores alvos, como o vemurafenibe, inibidor de BRAF mutado, utilizado e aprovado pelo FDA para o tratamento do melanoma metastático, em 2011<sup>40, 41</sup>, e o trametinibe, inibidor de MEK, em uso associado com os inibidores de BRAF, os quais demonstraram levar a aumentos significativos na sobrevida de pacientes com melanoma que possuem a mutação *driver* no gene *BRAF*<sup>42-44</sup>.

O PLX4032, ou vemurafenibe, foi o primeiro inibidor de BRAF aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) nos EUA para o tratamento do melanoma metastático com mutação no gene *BRAF*<sup>45</sup>, sendo um inibidor seletivo de BRAF que apresenta eficácia em pacientes com a mutação V600E (bem como a mutação menos comum V600K)<sup>46</sup>. Embora esta abordagem terapêutica seja efetiva, apresenta uma grande limitação, pois praticamente todos os pacientes desenvolvem resistência ao vemurafenibe em aproximadamente 6 meses

após início do tratamento<sup>47</sup>. Relatos na literatura reportam que respostas tumorais adaptativas a fármacos direcionados a BRAF conduzem, eventualmente, a resistência via mutação adquirida em *NRAS* ou aumento da expressão de vários receptores tirosina quinase, tais como receptor beta ativado por fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR $\beta$ ), receptor de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1R) e receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR)<sup>48-51</sup>. Além disto, as células tumorais têm capacidade de ativar a via de sinalização MAPK, apesar da inibição de BRAF, por meio de ativação do proto-oncogene *CRAF*<sup>52</sup>, ativação do fosfatidinositol-3 quinase (PI3K), ativação de fatores de transcrição hedghog (Gli1 e Gli2), *downregulation* do MITF e interações com o microambiente tumoral, por exemplo, através da regulação positiva da MMP-2, relatada recentemente em melanoma resistente ao vemurafenibe<sup>44, 53-57</sup>.

Considerando a carga mutacional do melanoma<sup>58</sup>, a imunoterapia surge como uma estratégia importante no tratamento do melanoma uma vez que pode ser aplicada independentemente do paciente apresentar ou não mutação no gene *BRAF*<sup>59</sup>. Os inibidores de *checkpoint* imunológico (ICIs) revolucionaram o campo da terapia tumoral. Enquanto a quimioterapia e a radioterapia continuam sendo utilizadas como tratamento base para a maioria dos tipos tumorais, os ICIs são agora terapias de primeira linha para vários tumores sólidos e líquidos. Até o momento, três ICIs diferentes foram aprovados para uso pela *Food and Drug Administration* (FDA), tendo o anticorpo contra a proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (anti-CTLA-4), ipilimumabe, sido o primeiro a receber aprovação para o tratamento do melanoma metastático, em 2011, além dos anticorpos nivolumabe e pembrolizumabe, aprovados pelo FDA em 2014, os quais atuam no bloqueio do receptor inibitório de morte celular programada 1 (anti-PD-1) nas células T, que interage com seus ligantes, anti-PD-L1 e anti-PD-L2, para impedir as respostas das células T ativas<sup>60</sup>. Mais recentemente, em março de 2022, o FDA aprovou mais um ICI, o opdualag (nivolumabe e relatlimabe), que combina um anticorpo bloqueador PD-1 e um anticorpo bloqueador do gene de ativação de linfócitos (*LAG-3*), uma molécula de superfície expressa em células imunes, incluindo linfócitos T, que regula negativamente a proliferação destas células. A associação de anti-PD-1 e anti-LAG-3 se mostrou uma combinação efetiva e com menores efeitos adversos no tratamento do melanoma metastático<sup>61</sup>. Apesar dos grandes avanços na terapia, nos últimos tempos, nem todos os pacientes se beneficiam do tratamento com ICIs, pois desenvolvem resistência, sendo que aproximadamente 50% dos pacientes não respondem à monoterapia, 40% não

respondem à imunoterapia combinada e aproximadamente 30% dos pacientes apresentam recidiva da doença após a resposta inicial<sup>62</sup>.

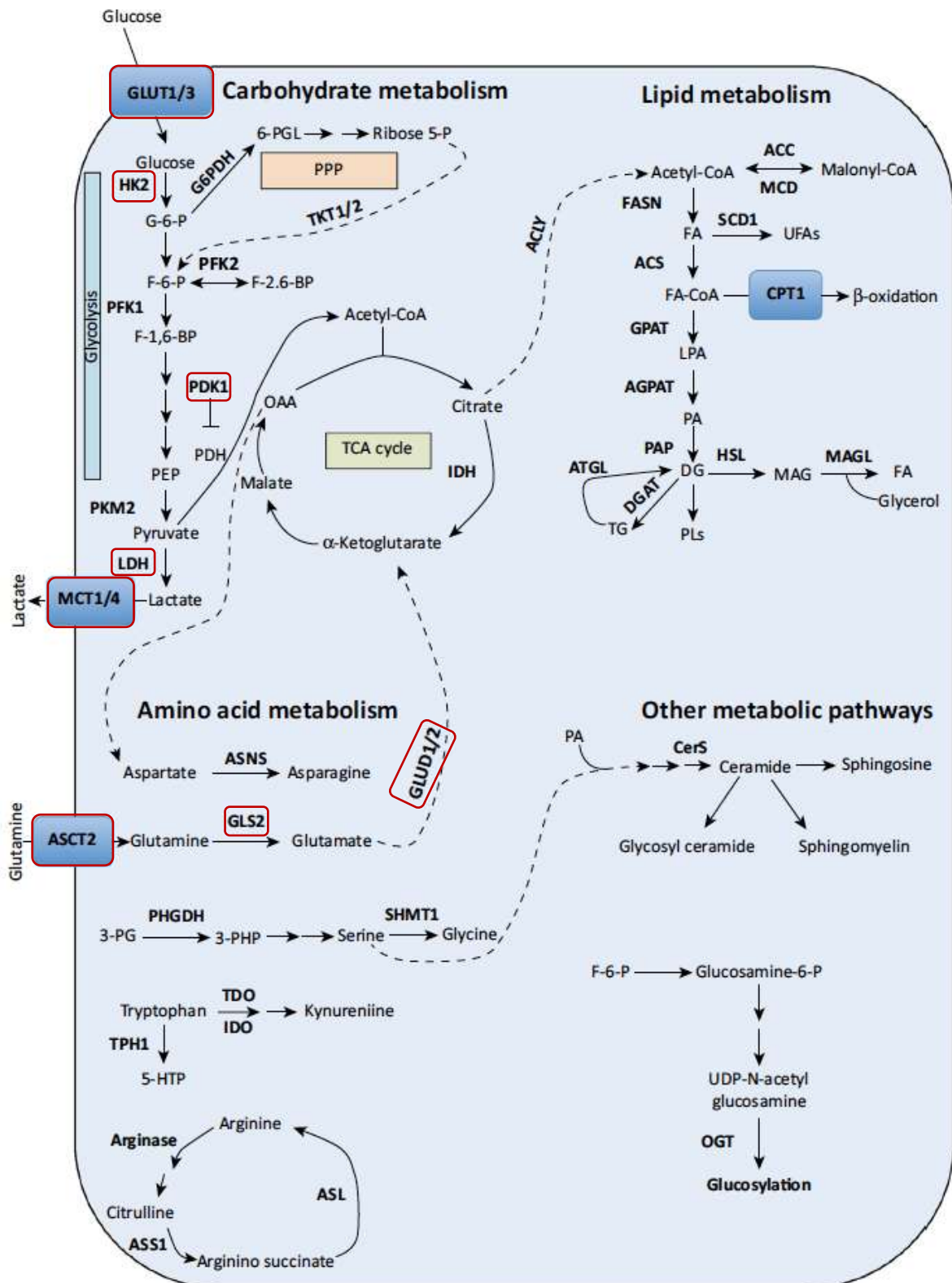
#### 1.4 Metabolismo tumoral

É cada vez mais evidente que as células tumorais apresentam preferências e dependências metabólicas heterogêneas, e os fenótipos metabólicos dos tumores são, além de heterogêneos, flexíveis, resultando em efeitos combinados de muitos fatores, alguns intrínsecos à célula (linhagem celular, estado de diferenciação e mutações adquiridas somaticamente) e outros impostos pelo microambiente (disponibilidade de nutrientes, interações com a matriz extracelular e células estromais)<sup>63</sup>.

Análises do metabolismo de células tumorais realizadas nas últimas décadas revelaram que a glicose é o principal combustível para a proliferação celular<sup>64</sup>, e a glicólise, independente da presença ou não de oxigênio, a principal via metabólica em células tumorais, fenótipo esse conhecido como glicólise aeróbica ou efeito de *Warburg*, em homenagem ao pesquisador que descreveu pela primeira vez esta alteração metabólica das células tumorais, nos anos 50<sup>65</sup>. Além do fenótipo glicolítico clássico, células tumorais apresentam uma dependência por outras fontes de carbono, como glutamina ou ácidos graxos (Figura 4). Em diversos tipos tumorais, a glutamina e os ácidos graxos são oxidados na mitocôndria para a produção de energia e/ou anabolismo, definindo um fenótipo oxidativo (ou OXPHOS), além do fenótipo glicolítico<sup>66</sup>. No contexto desta reprogramação metabólica, as células tumorais podem apresentar expressão aumentada de várias proteínas incluindo GLUT1 (transportador de glicose 1), HK2 (hexoquinase 2), PDK1 (piruvato desidrogenase quinase), LDHA (lactato desidrogenase A), CA9 (anidrase carbônica 9), transportadores de monocarboxilatos MCT1 e MCT4 (transportador de monocarboxilato 1 e 4) envolvidos na via da glutaminólise, além de, alterações na via da glutamina com aumento na expressão de ASCT2 (transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio) que possui uma ampla especificidade de substrato, incluindo a glutamina, GLS (glutaminase), e GLUD1/2 (glutamato desidrogenase 1 e 2).

Em normóxia, as células de melanoma, como outras células tumorais, apresentam frequentemente fenótipos altamente glicolíticos em que 60-80% da glicose é convertida em lactato, uma atividade aumentada para 90% ou mais em condições de hipóxia<sup>67</sup>. Sob baixos níveis de oxigênio, os fatores induzidos por hipóxia (HIFs) induzem uma adaptação da célula ao estresse hipóxico, o que tem um profundo impacto no metabolismo central do carbono<sup>68</sup>.

A resposta à hipóxia é uma das respostas mais bem descritas com relação ao estresse das células tumorais, devido aos efeitos bem conhecidos da hipóxia na radiorresistência e metástase tumoral. Conseqüentemente, a hipóxia tumoral é descrita como um fator de prognóstico negativo em uma variedade de tumores<sup>69, 70</sup>. Os complexos HIF-1 $\alpha$  e HIF-2 $\alpha$  são os principais fatores de transcrição responsáveis pelas mudanças na expressão gênica durante a resposta celular a condições de baixo teor de oxigênio<sup>71</sup>. Embora esses dois fatores de transcrição modulem um conjunto de genes sobrepostos, os efeitos no metabolismo estão melhor caracterizados para a isoforma HIF-1 $\alpha$ <sup>72</sup>. Esta isoforma ativa a transcrição de genes que codificam, entre outros, transportadores de glicose e enzimas glicolíticas, aumentando a capacidade da célula de realizar a glicólise<sup>73</sup>. Além disso, o HIF-1 é capaz de ativar a expressão de piruvato desidrogenase quinases (PDKs), que atuam na inativação do complexo mitocondrial da piruvato desidrogenase, reduzindo a conversão do piruvato, derivado da glicose, a acetil-CoA e seu fluxo no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)<sup>74-76</sup>. Esta redução no fluxo do TCA diminui a taxa de fosforilação oxidativa e consumo de oxigênio, reforçando o fenótipo glicolítico<sup>72</sup> e diminuindo a respiração mitocondrial<sup>77</sup>. É importante salientar que, apesar de ter a sua função bem estabelecida em condições de hipóxia, o HIF-1 $\alpha$  também pode acumular na célula em condições de normoxia por meio de vias de sinalização oncogênicas, entre elas a via PI3K-Akt<sup>78</sup>, ou de alterações moleculares em genes supressores tumorais, como von Hippel-Lindau (*VHL*)<sup>79, 80</sup>, succinato desidrogenase (*SDH*)<sup>81, 82</sup> e fumarato hidratase (*FH*)<sup>82</sup>.



Fonte: Adaptado de Nagarajan A. *et al.*<sup>83</sup>.

**Figura 4.** Principais vias metabólicas que estão alteradas nas células tumorais. Uma grande variedade de enzimas e vias metabólicas são alteradas que, por si só ou em conjunto, são capazes de facilitar fenótipos específicos das células tumorais, como proliferação, crescimento e metástase de tumores. O impacto das alterações metabólicas dirigidas por oncogenes pode ser generalizado, e múltiplas vias metabólicas podem ser alteradas simultaneamente, mesmo em um único tipo de tumor. Em destaque, algumas das proteínas avaliadas no presente estudo.

Adicionalmente, a via da PI3K também está relacionada com o controle do metabolismo da glicose nas células tumorais, uma vez que esta via é capaz de regular positivamente, via AKT, a captação e utilização da glicose, aumentando a expressão do transportador de glicose na membrana e a atividade da hexoquinase e da fosfofrutoquinase 2. Assim, a ativação da via PI3K torna as células dependentes de altos níveis de fluxo de glicose<sup>64</sup>.

Além do elevado fluxo glicolítico, as células tumorais utilizam outras vias metabólicas, sendo a dependência da glutamina uma marca registrada de transformações oncogênicas, incluindo o melanoma<sup>84</sup>, e a sua ausência induz apoptose em células tumorais<sup>85, 86</sup>. De fato, apesar da redução na respiração mitocondrial, as células de melanoma mantêm mitocôndrias inteiramente funcionais, que podem metabolizar carbonos derivados da glutamina e da glicose para fins anabólicos<sup>67</sup>. Neste contexto, a glutamina demonstrou ser um fornecedor essencial de nitrogênio na síntese de nucleotídeos e proteínas e afeta um regulador crítico da tradução de proteínas, o complexo mTORC 1<sup>87</sup>. Em condições de hipóxia, a biossíntese de ácidos graxos é parcialmente suportada pelo carbono da glutamina através da carboxilação do  $\alpha$ -cetogluturato devido à inversão do segmento  $\alpha$ -cetogluturato-citrato do ciclo TCA<sup>67, 84</sup>. Dados da literatura descrevem alterações oncogênicas que permitem a regulação do metabolismo da glutamina em células tumorais; por exemplo, o oncogene *C-MYC* regula a transcrição de transportadores de glutamina, levando à promoção da glutaminólise, afetando diretamente o metabolismo central de carbono<sup>86</sup>, e a expressão deste oncogene está aumentada em melanoma<sup>88, 89</sup>.

Em melanoma, estudos realizados tanto em amostras humanas como em modelos *in vitro* demonstraram que a progressão para um fenótipo invasivo ocorre mediante uma troca metabólica de fosforilação oxidativa mitocondrial para aumento do fluxo glicolítico, seguido da produção de lactato<sup>90</sup>. De notar, estudos demonstraram que a mutação V600E no gene *BRAF* induz o efeito de Warburg em células tumorais. Em melanoma e câncer de tireoide, esta mutação foi capaz de induzir um aumento na expressão do fator induzido por HIF-1 $\alpha$ <sup>91-93</sup> assim como a expressão dos transportadores de glicose e diversos genes glicolíticos<sup>94-96</sup>. Ainda, a superexpressão ectópica de *BRAF*<sup>V600E</sup> levou a um aumento na expressão de genes relacionados ao metabolismo, incluindo os que codificam a lactato desidrogenase A (LDHA), enzima chave no passo final da glicólise aeróbica<sup>97</sup>. Além disto, o transportador de glutamina ASCT2 tem a sua expressão aumentada em células de melanoma com mutação *BRAF*<sup>V600E</sup> e desempenha um papel crítico na captação de glutamina e proliferação celular<sup>98</sup>.

De notar, um estudo de 2017 mostrou que células de melanoma mutadas em *BRAF*, além de apresentarem maior taxa glicolítica, são mais sensíveis ao tratamento com o inibidor de *BRAF*, vemurafenibe, e que tornar estas células dependentes da via glicolítica para obtenção de energia, por meio da depleção do DNA mitocondrial induzida por brometo de etídio ou zalcitabina, torna as células ainda mais sensíveis ao tratamento<sup>99</sup>. Ainda, o tratamento de células *BRAF*<sup>V600E</sup> com vemurafenibe resulta no aumento da expressão de vários genes que atuam no ciclo de TCA, assim como de genes associados com a fosforilação oxidativa e síntese de ATP, efeitos não observados em células de melanoma *BRAF* do tipo selvagem<sup>100</sup>. O tratamento com o inibidor também é capaz de induzir uma dependência da glutamina que se correlaciona com a resistência ao fármaco<sup>101, 102</sup>, sendo a glutamina a principal fonte de carbono para células com resistência adquirida<sup>101</sup>. As células de melanoma resistentes a inibidores de *BRAF* são também mais sensíveis à inibição da glutaminase, o que torna a glutaminase um potencial alvo terapêutico nos tumores resistentes<sup>99, 101</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

A compreensão do microambiente tumoral e o desenvolvimento de estratégias de tratamento que visem diferentes moléculas ou moduladores em diferentes pontos das vias celulares se tornam cada vez mais relevantes para o tratamento eficaz do melanoma<sup>103</sup>. Desta forma, e considerando o fato do vemurafenibe ser uma droga utilizada atualmente na clínica para o tratamento de melanoma, a compreensão do microambiente metabólico e de como este contribui para que as células se tornem resistentes a este fármaco pode contribuir para novas perspectivas de tratamento para o tratamento de melanoma resistente ao vemurafenibe. Neste contexto, o presente projeto propõe a análise do perfil metabólico de um painel de amostras humanas e de linhagens de melanoma humano, com diferentes perfis e mecanismos de sobrevivência, para contribuir de forma determinante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência do melanoma ao tratamento com vemurafenibe.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o papel do metabolismo tumoral na resistência de células de melanoma ao vemurafenibe.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico e da glutamina em amostras de melanoma humano, antes e após tratamento com vemurafenibe;
- Caracterizar a expressão de genes relacionados ao metabolismo tumoral em amostras de melanoma humano, antes e após o tratamento com vemurafenibe, e em linhagem celular de melanoma resistente ao vemurafenibe;
- Comparar o perfil metabólico de linhagens de melanoma resistentes ao vemurafenibe com o perfil das linhagens parentais;
- Avaliar o efeito do *knockdown* do gene *GLS*, por siRNA, na ausência e presença de vemurafenibe, utilizando modelos *in vitro*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Estudos com amostras humanas

#### 4.1.1 Delineamento do estudo

O presente estudo foi baseado em um desenho longitudinal de coorte retrospectivo, realizado no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos (HCB), com a colaboração dos Departamentos de Cirurgia, Oncologia Clínica e Patologia. Este projeto contou também com a colaboração do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

#### 4.1.2 Amostra do estudo

A amostragem foi realizada por conveniência, com um total de 48 pacientes acompanhados durante o período de estudo, porém, 39 não foram incluídos (Tabela 1), por não apresentarem amostras de tecido parafinado após o tratamento com vemurafenibe.

**Tabela 1.** Informação dos pacientes excluídos do estudo.

ID	Localização Tumoral	Óbito
01	Suprailíaca Direita	05/02/2019
02	Braço Direito	NA
03	Perna Direita	NA
04	Braço Esquerdo	NA
05	Tronco	27/02/2019
06	Dorso	11/09/2018
07	Metástase Linfonodo	NA
08	Peitoral Esquerdo	29/04/2017
09	Aurícula Esquerda	02/10/2016
10	Linfonodo	17/08/2018
11	Dorso Direito	NA
12	Metástase Cerebral	NA
13	Ombro Direito	NA
14	Parede Intestinal	NA
15	Axila Esquerda	NA
16	Perna Direita	NA
17	Cólon Transverso	NA
18	-	07/08/2019
19	Mucosa Vaginal	NA
20	Região Dorsal	23/06/2019

*Continua na página seguinte*

Continuação tabela 1

21	Região Gástrica	NA
22	Cervical Esquerda	NA
23	Axila Direita	NA
24	Melanoma 1° Oculito	NA
25	-	06/08/2021
26	Metástase Cerebral	17/08/2019
27	Cervical Esquerda	18/03/2018
28	Axila Esquerda	18/10/2018
29	Região Dorsal	18/03/2018
30	Calcâneo Direito	12/03/2018
31	Melanoma de Coróide	23/09/2018
32	Tórax Anterior à Direita	15/04/2018
33	Parótida	17/09/2018
34	Couro Cabeludo	04/08/2018
35	Hipocôndrio Direito	27/09/2018
36	Peri-parotídeo	20/01/2019
37	Dorso	13/11/2018
38	Dorso	17/12/2018
39	Membro Superior Direito	06/09/2018

(-): sem informação no prontuário; NA: não se aplica.

Assim, foram incluídos 9 pacientes com diagnóstico de melanoma, com presença da mutação V600E no gene *BRAF*, de ambos os sexos, independentemente da idade, que possuíam amostras pré e pós-tratamento com vemurafenibe em bloco de parafina no serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. Os dados clínicos e patológicos foram obtidos de forma retrospectiva, por revisão de prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital de Câncer de Barretos/Fundação Pio XII (Tabela 2).

**Tabela 2.** Dados dos pacientes incluídos no estudo.

ID	Data Nascimento	Sexo	Raça	Localização Tumoral	Subtipo histológico	Espessura (mm)	T	N	M	Metástase Linfonodal	Metástase Distante	Óbito
01	25/07/1959	M	Branco	Dorso	Melanoma Lentigo	-	X	1	1	Pelve e inguinal D	Osso/partes moles/brônquios/pulmão	20/07/2014
02	02/04/1960	M	Branco	Dorso	-	-	X	1	1	Axila E	Nódulos subcutâneos/punho D	31/12/2017
03	17/12/1983	M	Branco	Tronco	-	-	X	1	1	Axila	SNC/pulmão/ fígado/ osso	14/06/2015
04	14/07/1959	M	Branco	Dorso	-	-	X	1	1	Axila E	Subcutâneo/ pulmão/ SNC/ intestino/ peritônio	27/12/2016
05	04/05/1961	F	Branco	Flanco E	Extensivo Superficial	2,0	2	0	1	Axila E	-	23/01/2018
06	14/02/1935	M	Branco	Flanco D	Nodular	4,0	3b	1	1	Inguinal D	SNC	NA
07	13/07/1952	F	Branco	Cervical	-	-	X	1	1	Cervical E	SNC	NA
08	20/10/1947	F	Branco	Perna E	-	-	X	1	1	D2	Gástrico	NA
09	18/06/1979	F	Branco	Couro Cabeludo	Cutâneo	-	X	1	1	Intrapararideo	Parótida E/ SNC/ partes moles/ osso	NA

(-): sem informação no prontuário. D: direito; E: esquerdo; F: feminino; M: masculino; M: metástase; M0: ausência de metástase; M1: metástase; N: Linfonodos; NA: não se aplica; NO: linfonodos não acometidos; N1: linfonodos acometidos; SNC: sistema nervoso central; T: Tumor primário; TX: não foi possível medir Breslow; T2, T3: tamanho do tumor.

#### 4.1.3 Amostras biológicas

Foram utilizadas amostras parafinadas, arquivadas no Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. As amostras dos 9 pacientes incluídos no estudo (Tabela 3) foram classificadas como pré e pós tratamento com vemurafenibe, sendo que as amostras pré foram obtidas de pacientes com melanoma antes do início do tratamento com vemurafenibe e as amostras pós foram obtidas de pacientes que apresentaram novas lesões após iniciar o tratamento com vemurafenibe.

**Tabela 3.** Localização tumoral das 18 amostras de pacientes com melanoma incluídos no estudo, obtidas antes (pré) e após (pós) tratamento com vemurafenibe.

ID	Localização amostra pré	Localização amostra pós
01	Metástase parótida E	Metástase parênquima cerebral
02	Metástase mama D	Nódulos subcutâneos abdominal
03	Nódulo subcutâneo em dorso à D	Lesão subcutânea panturrilha D
04	Parênquima cerebral	Tumoração de braço E/ Partes moles
05	Linfonodo axila E	Linfonodo sentinela axila D
06	Nódulo subcutâneo linha axilar média	Nódulo face medial do braço D
07	Metástase em mucosa gástrica	Estômago e omento maior
08	Pele e partes moles íliaca direita	Segmento de intestino delgado
09	Couro cabeludo	Tumor da região occipital

D: direito; E: esquerdo.

#### 4.1.4 Imunohistoquímica (IHQ)

Cortes parafinados (4 µm) das amostras humanas de melanoma foram submetidos à técnica de IHQ para avaliar a expressão de GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1, MCT4, ASCT2, GLS e GLUD1/2, utilizando anticorpos primários específicos (Tabela 4). Para as reações, cada lâmina foi desparafinada em estufa a 80°C por 10 minutos, lavada por 5 minutos em três banhos de xilol consecutivos, hidratada com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70% e 50%) e, por fim, colocada em água. Após, realizou-se a recuperação antigênica. Para tal, as lâminas foram acomodadas em recipiente contendo citrato (pH = 6,0) ou EDTA (ácido etilenodiaminotetracético, pH = 8,0), dependendo do anticorpo (Tabela 4), e colocadas em banho maria com agitação a 98°C, por 20 minutos, seguido de 20 minutos de arrefecimento. Posteriormente, cada lâmina foi lavada em tampão TBS (*tris buffered saline*), durante 5 minutos, por duas vezes, seguido de inativação de peroxidases endógenas com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol, durante 10 minutos. Para as reações de expressão de MCT1 foi utilizado o sistema polímero *LabVision UltraVision ONE Detection System: HRP Polymer (Thermo Fisher Scientific)*, enquanto as demais reações foram realizadas com o kit *LabVision UltraVision Large Volume Detection System: anti-Polyvalent, HRP (Thermo Fisher Scientific)*. Primeiramente, as lâminas foram incubadas com *Ultra V Block (LabVision)* por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido da incubação com anticorpo primário, de acordo com a Tabela 4. Após o período de incubação, as lâminas foram então lavadas em tampão TBS por 5 minutos e incubadas novamente com *Biotinylated Goat Polyvalente Secondary (LabVision)* por 10 minutos. Após nova lavagem por 5 minutos, as lâminas foram incubadas novamente com *Streptavidine Peroxidase (LabVision)* por 10 minutos, e então lavadas em tampão TBS. Para visualização das reações, utilizou-se o *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako)* como cromógeno, incubando-se as lâminas por 10 minutos, à temperatura ambiente. Por fim, cada corte histológico foi lavado em água, contra-corado com Hematoxilina de *Harris (EasyPath)* durante 1 minuto, desidratado com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%), lavado por 5 minutos em três banhos de xilol consecutivos e a lâmina montada com meio de montagem *Entellan (Merck)* e lamínula. Como controles positivos, foram utilizados os tecidos a seguir: placenta para GLUT1, carcinoma de células escamosas da cavidade oral para HK2, LDHA, MCT1 e MCT4, tumor de cólon para PDK1, estômago para CA9, próstata para ASCT2 e fígado para GLS e GLUD1/2. A expressão proteica foi avaliada por patologista, semi-quantitativamente e semi-

qualitativamente, em células de melanoma, considerando a extensão da coloração (0: sem células imunorreativas; 1: <5% de células imunorreativas; 2: 5-50% de células imunorreativas; e 3: > 50% de células imunorreativas) e a intensidade da coloração (0: negativo; 1: fraco; 2: intermediário; e 3: forte), respectivamente. O escore final foi definido como a soma de ambos os parâmetros (extensão e intensidade) e agrupados como negativos (escore 0 a 2) e positivos (escore 3 a 6)<sup>104</sup>.

**Tabela 4.** Condições e anticorpos utilizados para imunohistoquímica.

Proteína	Recuperação antigênica	Anticorpo	Diluição, tempo e temperatura de incubação
GLUT1	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	ab15309 <i>Abcam</i>	1:2000, 2 horas, temperatura ambiente
HK2	EDTA (1mM, pH=8,0), 98°C, 20 min	ab104836 <i>Abcam</i>	1:750, 2 horas, temperatura ambiente
PDK1	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	sc-28783 <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:250, 2 horas, temperatura ambiente
LDHA	EDTA (1mM, pH=8,0), 98°C, 20 min	ab101562 <i>Abcam</i>	1:1000, 2 horas, temperatura ambiente
CA9	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	ab15086 <i>Abcam</i>	1:4000, 2 horas, temperatura ambiente
MCT1	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	AB3538P <i>Chemicon International</i>	1:300, <i>overnight</i> , temperatura ambiente
MCT4	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	sc-50329 <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:2000, 2 horas, temperatura ambiente
ASCT2	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	ABN73 <i>Millipore</i>	1:1000, 2 horas, temperatura ambiente
GLS	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	A83195 <i>Sigma-Aldrich</i>	1:200, 2 horas, temperatura ambiente
GLUD1/2	Tampão citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	D9F7P <i>Cell Signaling</i>	1:1000, 2 horas, temperatura ambiente

#### 4.1.5 NanoString

##### 4.1.5.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada a partir de 16 amostras dos tumores de melanoma em blocos de parafina, seccionadas em cortes com espessura de 10 µm. Um corte adicional, com 4 µm de espessura, foi corado com hematoxilina e eosina (H & E) e avaliado por patologista para identificação da área tumoral. O RNA foi extraído com kit comercial (*Rneasy FFPE Mini Kit, Qiagen*). Resumidamente, o tecido foi retirado da lâmina, por raspagem com auxílio de

uma agulha, aumentando a precisão na raspagem da área delimitada, e submetido a desparafinização em 160  $\mu\text{L}$  de solução de desparafinização, seguido de incubação a 56°C, por 5 minutos. Após resfriamento das amostras, adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de *Buffer PKD* e as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm, por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  de *Proteinase K* à fase clara inferior das amostras, seguido de incubação a 56°C, por 15 minutos, e 80°C, por 15 minutos. A fase inferior das amostras foi transferida para um novo tubo, o qual foi incubado no gelo por 3 minutos e centrifugado a 13500 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e adicionou-se *DNase Booster Buffer*, equivalente a um décimo do volume total de amostra, e 10  $\mu\text{L}$  de *DNase I*, seguido de nova incubação à temperatura ambiente, por 15 minutos. Posteriormente, 320  $\mu\text{L}$  de *Buffer RBC* foram adicionados, os tubos vortexados e adicionados 720  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, seguido de homogeneização e transferência de 700  $\mu\text{L}$  de amostra para uma coluna de *RNeasy Min Elute*, a qual foi centrifugada a 1000 rpm, por 1 minuto. Após descartado o *flow-trough*, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer RPE* na coluna, seguido de nova centrifugação a 1000 rpm, por 1 minuto, e nova lavagem com 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer RPE*, seguido de centrifugação a 10000 rpm, por 2 minutos. Após, a coluna foi transferida para novo tubo de coleta e centrifugada a 13000 rpm, por 5 minutos, seguido de adição de 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura *RNase-free* ao centro da coluna, incubação por 1 minuto e centrifugação a 1300 rpm, por 1 minuto, para coleta das amostras. Todas as amostras foram quantificadas utilizando o kit *Qubit RNA HS (High Sensitivity)*, foram preparadas *Working Solution (WS)*, adicionando 1  $\mu\text{L}$  *Qubit RNA HS Reagent* e 199  $\mu\text{L}$  *Qubit RNA HS Buffer*, posteriormente as amostras foram quantificadas utilizando 1  $\mu\text{L}$  de amostra e 199  $\mu\text{L}$  *WS*, homogeneizadas e incubadas por 2 minutos, à temperatura ambiente, e realizada a leitura para quantificação. Posteriormente, as amostras foram diluídas para concentração final de 100 ng de RNA total em 5  $\mu\text{L}$  de amostra.

#### 4.1.5.2 Detecção de genes relacionados ao metabolismo tumoral

O painel utilizado para a análise das amostras de melanoma foi o *nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel (NanoString Technologies)*. O *nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel* é um painel que permite a análise de diferentes genes relacionados ao metabolismo do câncer (<https://www.nanostring.com/products/gene-expression-panels/gene-expression-panels-overview/ncounter-vantage-3d-rna-panels>), a partir de um input de 100 ng de RNA total. Os genes relacionados ao metabolismo assim como os genes

*housekeeping* avaliados pelo painel encontram-se listados em anexo (Anexo 1 e Anexo 2, respectivamente).

Para as reações de hibridização, utilizou-se um volume final de 15  $\mu\text{L}$  por amostra, sendo: 10  $\mu\text{L}$  de *TagSet Master Mix*, contendo 2,0  $\mu\text{L}$  de *TagSet*, 5,0  $\mu\text{L}$  de *Hybridization Buffer*, 0,5  $\mu\text{L}$  de *Probe A* (5 nM), 0,5  $\mu\text{L}$  de *Probe B* (25 nM), além de 2,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q. Após a adição de 10  $\mu\text{L}$  do *TagSet Master Mix* em tubos *strip*, adicionou-se 5  $\mu\text{L}$  de cada amostra (100 ng). Posteriormente, as amostras foram incubadas a 67°C em termociclador com tampa aquecida a 72°C. Após 24 horas de incubação, as reações de hibridização foram mantidas a 4°C até o seu processamento no *nCounter Prep Station (high sensitivity mode)*, seguido da aquisição dos dados de contagem no *nCounter Digital Analyzer (555 FOV, do inglês fields of view)*.

Para a análise dos dados de contagem, parâmetros de qualidade (imagem, densidade de ligação e linearidade dos controles positivos) foram verificados em cada amostra com o auxílio do *nSolver Analysis Software (NanoString Technologies, versão 4.0)*. Posteriormente, todas as análises foram realizadas em ambiente R (*R Studio, versão 3.6.3*). Inicialmente, avaliou-se a distribuição dos dados de contagem com o pacote *quantro, versão 1.18.0*<sup>105</sup>, definindo-se assim o melhor método de normalização. Com o auxílio do pacote *NanoStringNorm, versão 1.2.1.1*<sup>106</sup>, os dados de expressão foram então normalizados utilizando-se a média geométrica dos controles positivos e dos genes *housekeeping* presentes no ensaio, e em seguida transformados em escala logarítmica ( $\log_2$ ). Para a análise da expressão diferencial (análise não supervisionada), considerou-se um nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). A análise estatística realizada encontra-se descrita no item 4.3. Por fim, a *clusterização* hierárquica e construção dos *heatmaps* foi realizada com o pacote *ComplexHeatmap, versão 2.0.0*<sup>107</sup>.

## **4.2 Ensaio *in vitro***

### **4.2.1 Linhagens celulares**

As linhagens celulares comerciais de melanoma metastático A375, SK-MEL-19, SK-MEL-28 e WM164, descritas na Tabela 5, bem como as suas respectivas linhagens resistentes ao vemurafenibe (PLX R) utilizadas no presente estudo, foram gentilmente cedidas pela Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo. Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio de



cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, *Gibco*), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Gibco*) e 1% de solução penicilina-estreptomicina (P/S, *Sigma-Aldrich*), assim como vemurafenibe (*Selleckchem*), 3  $\mu$ M, diluído em DMSO, no caso das células resistentes. As linhagens foram mantidas em incubadora com atmosfera úmida controlada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A autenticação das linhagens celulares foi realizada através da análise de STR (*short tandem repeat*), de acordo com a padronização de referência internacional para autenticação de linhagens celulares, utilizando-se um painel de oito *primers* fluorescentes (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX e CSF1P0)<sup>108, 109</sup>, no Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

**Tabela 5.** Origem e perfil mutacional das linhagens celulares comerciais de melanoma utilizadas no estudo.

Linhagem celular	Origem	Perfil mutacional*			
		<i>BRAF</i>	<i>NRAS</i>	<i>KIT</i>	<i>TERT</i>
<b>A375</b>	Metástase	p.V600E	WT	p.L798L	C250T
<b>A375 PLX R</b>	Metástase	p.V600E	WT	p.L798L	C250T
<b>SK-MEL-19</b>	Metástase	p.V600E	WT	WT	C228T
<b>SK-MEL-19 PLX R</b>	Metástase	p.V600E	WT	WT	C228T
<b>SK-MEL-28</b>	Metástase	p.V600E	WT	WT	WT
<b>SK-MEL-28 PLX R</b>	Metástase	p.V600E	WT	WT	WT
<b>WM164</b>	Metástase	p.V600E	WT	WT	C250T
<b>WM164 PLX R</b>	Metástase	p.V600E	WT	WT	C250T

PLX R: Linhagens celulares resistentes ao vemurafenibe; WT: *wild-type* (sem mutação). \*Realizado previamente pelo grupo.

#### 4.2.2 Caracterização do perfil metabólico

As linhagens celulares de melanoma foram caracterizadas quanto à expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1, MCT4, ASCT2, GLS e GLUD1/2), através das técnicas de imunocitoquímica e *Western blotting*, quantificação dos níveis extracelulares de glicose, glutamina e lactato, além da avaliação de um painel de genes relacionados ao metabolismo celular da linhagem SK-MEL-19 parental e resistente ao vemurafenibe, utilizando NanoString.

#### 4.2.2.1 Imunocitoquímica

Para a análise imunocitoquímica, cada linhagem celular foi crescida em condições normais de cultivo até atingir cerca de 90% de confluência em duas garrafas de cultura T75. Em seguida, as células foram desagregadas com *TrypLE Express 1x* (tripsina, *Gibco*) e posteriormente fixadas com 2 mL de paraformaldeído 3,7% tamponado (pH: 7,2), *overnight*. Em seguida, cada linhagem foi centrifugada por cinco minutos a 1500 rpm e retirou-se a solução de paraformaldeído, lavando-as por duas vezes com 1 mL de DPBS. Aos *pellets* celulares fixados, foram adicionados 500 µL de agarose 2% a 60°C. Rapidamente, as células foram homogeneizadas no vortex e então centrifugadas novamente por 2 minutos, a 13000 rpm. Os *pellets* celulares, agora acondicionados em agarose, foram cortados ao meio, alocados em cassetes histológicos e mergulhados em formol tamponado 10%. Posteriormente, os cassetes foram encaminhados ao Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos para processamento, inclusão em parafina e montagem dos *cell blocks*. Cortes de 4 µm foram utilizados para a realização da imunocitoquímica, seguindo o protocolo descrito no item 4.1.3).

#### 4.2.2.2 Western blotting

As linhagens celulares de melanoma foram cultivadas em condições normais de crescimento até atingirem cerca de 70-80% de confluência, em garrafas de cultura T75, lavadas com 5 mL de DPBS e depois lisadas e homogeneizadas em tampão de lise contendo 50 mM Tris (pH= 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% NP40 e suplementado com coquetel de inibidores de protease (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche*), seguindo as recomendações do fabricante. Os lisados foram incubados em gelo por 15 minutos e centrifugados a 13000 rpm, 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações proteicas determinadas utilizando curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) e o ensaio Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, alíquotas de 20 µg de proteína total foram diluídas em tampão da amostra (*Laemmli 2x Concentrate, Sigma-Aldrich*) e desnaturadas a 95°C, por 5 minutos. Para evitar degradação proteica, e seguindo as instruções do fabricante, as amostras utilizadas para marcação de GLUT1 não passaram pelo processo de desnaturação. As proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose (*Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences*), utilizando

tampão de transferência contendo 25 mM Tris-base/Glicina, no equipamento *TransBlot Turbo Transfer (Bio-Rad)*, durante 60 minutos. Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado (Molico, diluído em TBS 1x/0,1% Tween, TBS-T, pH=7,6), durante uma hora, à temperatura ambiente, e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários. Cada anticorpo primário foi diluído em TBS-T, 5% BSA. Os anticorpos primários utilizados, assim como as condições de incubação e diluições estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6.** Condições e anticorpos utilizados no *Western blotting*.

Proteína	Anticorpo	Diluição, tempo e temperatura de incubação
GLUT1	ab15309, Abcam	1:1500, overnight, 4°C
HK2	ab104836, Abcam	1:1000, overnight, 4°C
PDK1	sc-28783, Santa Cruz Biotechnology	1:1000, overnight, 4°C
PDK2	PAS 13774, Invitrogen	1:500, overnight, 4°C
PDK3	PAS 67244, Invitrogen	1:500, overnight, 4°C
LDHA	ab101562, Abcam	1:3000, overnight, 4°C
CA9	ab15086, Abcam	1:2000, overnight, 4°C
MCT1	sc-365501, Santa Cruz Biotechnology	1:200, overnight, 4°C
MCT4	sc-50329, Santa Cruz Biotechnology	1:2000, overnight, 4°C
ASCT2	ABN73, Millipore	1:1000, overnight, 4°C
GLS	A83195, Sigma-Aldrich	1:500, overnight, 4°C
GLUD1/2	D9F7P, Cell Signaling Technology	1:1000, overnight, 4°C
ACTB	8H10D10, Cell Signaling Technology	1:2000, overnight, 4°C

Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas em TBS-T e então incubadas durante uma hora, à temperatura ambiente, com os anticorpos secundários *anti-rabbit* (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) ou *anti-mouse* (sc-2031, Santa Cruz Biotechnology), diluídos 1:5000 em TBS-T, 5% leite desnatado (Molico). Posteriormente, as membranas foram lavadas em TBS-T e então levadas para revelação da marcação no equipamento ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare Life Sciences). Os anticorpos ligados

foram visualizados por quimioluminescência através do kit *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific). A proteína  $\beta$ -actina (ACTB) foi utilizada como controle. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e experimentais.

#### 4.2.2.3 Quantificação de glicose e lactato extracelular

Para a análise do consumo de glicose e produção de lactato, foram utilizados os kits *Glucose Colorimetric Assay* (SpinReact) e *Lactate Assay* (SpinReact), conforme as instruções do fabricante. Cerca de  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM 10% SFB e 3  $\mu$ M de PLX. Posteriormente, os meios de cultura foram coletados no tempo de 24 e 48 horas e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até à quantificação. A proteína total (expressa como biomassa total) foi avaliada através do ensaio de Sulforodamina B (*TOX-6*, Sigma-Aldrich) para normalização (vide item 4.4.2). Os resultados foram expressos como consumo de glicose e efluxo de lactato. O consumo de glicose foi obtido através da subtração entre a glicose extracelular quantificada no tempo zero e a glicose extracelular quantificada após 24 horas. O efluxo de lactato foi obtido através da subtração entre o lactato extracelular quantificado em 24 horas e o lactato extracelular quantificado no tempo zero. Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

#### 4.2.2.4 NanoString

O perfil de expressão de 180 genes relacionados ao metabolismo celular foi avaliado nas linhagens de melanoma SK-MEL-19 parental e resistente, através da plataforma *NanoString* (NanoString Technologies) e tecnologia *nCounter* (NanoString Technologies), utilizando-se o painel *nCounter Vantage 3D RNA Cancer Metabolism Panel* (Nanostring Technologies).

A extração do RNA total foi realizada com o kit *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram extraídos *pellets* celulares das linhagens, coletados em triplicatas biológicas após condições normais de cultivo. Em seguida, todas as amostras foram analisadas por espectrofotômetro (*NanoDrop2000*, Thermo Fisher Scientific) para avaliação da qualidade do RNA extraído. Somente as amostras com razões 260/280 e 260/230 entre 1,8 e 2,0 foram consideradas amostras de alta qualidade e então diluídas para a concentração de 100 ng de RNA total em 7  $\mu$ L de amostra. Posteriormente, foram realizadas as reações de hibridização conforme

descrito no item 4.1.4.2, para que, então, as amostras seguissem para processamento no *nCounter Prep Station (high sensitivity mode)*, seguido da aquisição dos dados de contagem no *nCounter Digital Analyzer (555 FOV, do inglês fields of view)*.

Após a normalização, avaliou-se os genes diferencialmente expressos nas linhagens parental e resistente, com o auxílio do pacote *NanoStringNorm*, versão 1.2.1.1<sup>106</sup>. Para a análise da expressão diferencial (análise não supervisionada), considerou-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e um *fold-change*  $\geq 2,0$ . A análise estatística realizada encontra-se descrita no item 4.3. Por fim, a *clusterização* hierárquica e construção dos *heatmaps* foi realizada com o pacote *ComplexHeatmap*, versão 2.0.0<sup>107</sup>.

#### **4.2.3 Knockdown do gene *GLS* na linhagem SK-MEL-19 PLX R por siRNA**

Para os experimentos de silenciamento de *GLS*, foi utilizada a técnica de transfecção reversa na linhagem SK-MEL-19 PLX R. Em síntese,  $4 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de 6 poços, na presença de 10 nM do siRNA para *GLS* (*siRNA GLS, s5840, Ambion*) ou siRNA controle (*Silencer Select Negative Control N°.1 siRNA, 4390843, Ambion*), ambos diluídos em 500  $\mu$ L de *Opti-MEM I (Gibco)*, além de 1  $\mu$ L/mL de *Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific)* e 1500  $\mu$ L de meio *Opti-MEM*, sem antibióticos. As células permaneceram em exposição aos reagentes de transfecção por um período de 24 horas, ao fim do qual o meio de cultura foi substituído por meio DMEM 10% SFB, 1% P/S e 3  $\mu$ M de PLX, sendo o silenciamento avaliado por *western blotting* (vide item 4.2.2.2), nos tempos de 24, 48 e 72 horas. Para os ensaios descritos no item 4.4, as células foram transfectadas por um período de 24 horas, crescidas em condições normais de crescimento por mais 24 horas, tempo ao fim do qual as células foram tripsinizadas e plaqueadas de acordo com cada ensaio.

#### **4.2.4 Caracterização *in vitro* do efeito do silenciamento de *GLS*, na ausência e presença de vemurafenibe**

Os parâmetros celulares avaliados após silenciamento de *GLS* por siRNA, na ausência e presença de vemurafenibe, nas linhagens de melanoma resistentes ao vemurafenibe e respectivas linhagens parentais, encontram-se brevemente descritos a seguir e otimizados pelo grupo<sup>110, 111</sup>.

#### 4.2.4.1 Quantificação de glicose, glutamina e lactato extracelular

As quantidades extracelulares de glicose, glutamina e lactato foram quantificadas em amostras de meio de cultura colhidas após o silenciamento de *GLS*. A quantificação foi realizada utilizando kits comerciais (*Cayman Chemical* para glicose e lactato e *Biovision* para glutamina), seguindo as instruções dos fabricantes. Cerca de  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM 10% SFB e  $3 \mu\text{M}$  de PLX. Posteriormente, os meios de cultura foram coletados no tempo de 24 horas e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até à quantificação (vide item 4.2.3.3). A proteína total (expressa como biomassa total) foi avaliada através do ensaio de Sulforodamina B (*TOX-6, Sigma-Aldrich*) para normalização (vide item 4.2.4.2). Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

#### 4.2.4.2 Avaliação da viabilidade celular através do método colorimétrico com Sulforodamina B (SRB)

A viabilidade celular foi avaliada utilizando a técnica colorimétrica de sulforodamina B (SRB). Após o silenciamento de *GLS*,  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços, em meio de cultura DMEM 10% SFB e  $3 \mu\text{M}$  de PLX, e incubadas *overnight*. Após, o meio de plaqueamento foi substituído por meio de cultura DMEM 0% SFB e  $3 \mu\text{M}$  PLX. Após 24 horas de tratamento, a biomassa celular foi mensurada utilizando-se o ensaio de SRB (*TOX-6, Sigma-Aldrich*), conforme as recomendações do fabricante. Em síntese, os poços foram lavados com  $100 \mu\text{L}$  de DPBS, seguido da adição de  $100 \mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 10% (*Sigma Aldrich*) gelado, com posterior período de incubação de uma hora, a  $4^\circ\text{C}$ . A placa foi lavada cinco vezes em água corrente e exposta ao ar para secagem por pelo menos 24 horas. Com a placa seca, adicionou-se  $50 \mu\text{L}$  de SRB por 30 minutos, lavando-se a placa em seguida com ácido acético 1% por quatro vezes. Posteriormente, a placa foi exposta ao ar para secagem por pelo menos 30 minutos. Após secagem, adicionou-se  $100 \mu\text{L}$  de Tris 10 mM em cada poço, seguido de incubação por cinco minutos, sob agitação. Após incubação, a absorbância correspondente a cada poço foi mensurada em leitor de placa (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*), sendo o comprimento de onda de 565 nm utilizado para a condição teste e 690 nm para a condição referência. Previamente às análises, todas as absorbâncias lidas em 690 nm foram subtraídas das leituras realizadas em 565 nm. O experimento foi realizado em triplicatas experimentais e biológicas.

#### 4.2.4.3 Proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada utilizando a técnica colorimétrica de incorporação de BrdU, kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric (Roche)*, de acordo com as instruções do fabricante. Após o silenciamento de *GLS*,  $5 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços, em meio de cultura DMEM 10% SFB, e incubadas *overnight*. Após, o meio de plaqueamento foi substituído por meio de cultura DMEM 0% SFB e 3  $\mu\text{M}$  PLX. Após, adicionou-se 1,0  $\mu\text{L}$  da solução de marcação BrdU, numa concentração final de 10  $\mu\text{M}$ /poço. Após 24 horas, o meio foi aspirado, seguido da adição de 200  $\mu\text{L}$  da solução fixadora e desnaturante de DNA, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após, aspirou-se a solução dos poços, adicionando-se em seguida 100  $\mu\text{L}$  do anticorpo anti-BrdU, com incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem, seguido da adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução substrato (30 minutos de incubação, à temperatura ambiente e protegido da luz) para revelação. Após incubação, a absorbância correspondente a cada poço foi mensurada em leitor de placa (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*), sendo o comprimento de onda de 370 nm para a condição teste e 492 nm para a condição referência. Previamente às análises, todas as absorbâncias lidas em 492 nm foram subtraídas das leituras realizadas em 370 nm. O experimento foi realizado em triplicatas experimentais e biológicas.

#### 4.2.4.4 Migração celular

O processo de migração celular foi avaliado utilizando o ensaio de migração *transwell*, com os insertos *Falcon Permeable Support for 24-well Plate with 8.0  $\mu\text{m}$  Transparent PET Membrane (Corning)*, de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese,  $4 \times 10^5$  células silenciadas e respectivos controles foram cultivados no compartimento superior dos insertos, em 500  $\mu\text{L}$  de meio de cultura DMEM 0% SFB contendo PLX 3 $\mu\text{M}$ , permitindo a migração das células até o compartimento inferior, contendo 750  $\mu\text{L}$  de meio de cultura DMEM 10% SFB (utilizado como quimio-atrativo para indução da migração celular). Posteriormente, as células foram deixadas a migrar por 24 horas, sendo então os insertos lavados com DPBS, por cinco minutos, e fixados com metanol gelado, durante cinco minutos, à temperatura ambiente. Após fixação, foi realizada nova lavagem em DPBS, seguido da remoção de todas as células remanescentes presentes no compartimento superior com o auxílio de haste de algodão. Após, todos os insertos foram corados com hematoxilina de Harris (*Easypath*), por 10 minutos,

e lavados em água corrente, seguido da coloração em eosina amarelada (*Easypath*), por 10 minutos, e nova lavagem em água corrente, com posterior exposição ao ar para secagem, por pelo menos 24 horas. Posteriormente, os insertos foram fotografados em sua totalidade no microscópio Olympus SZX7 (magnificação de 100x), e as células capazes de migrar foram quantificadas com o software ImageJ 1.41 (*National Institute of Health*). O experimento foi realizado em duplicatas experimentais e triplicatas biológicas.

#### 4.2.4.5 Invasão celular

A invasão celular foi avaliada utilizando a técnica da câmara de invasão. Para esta técnica, foram utilizadas as placas de invasão *Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber with BD Matrigel Matrix (Corning)*, seguindo as recomendações do fabricante. Primeiramente, o matrigel, presente no compartimento superior dos insertos, foi hidratado com 500 µL de meio de cultura DMEM 0% SFB no compartimento superior e inferior dos mesmos, durante uma hora em incubadora com atmosfera úmida controlada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio utilizado para a hidratação do matrigel foi retirado e semeadas 4x10<sup>5</sup> células no compartimento superior dos insertos em 500 µL de meio de cultura DMEM 0% SFB contendo PLX 3µM, permitindo a invasão das células até o compartimento inferior, contendo 750 µL de meio de cultura DMEM 10% SFB (utilizado como quimio-atrativo para indução da invasão celular). Posteriormente, as células foram deixadas a invadir por 24 horas, os insertos foram lavados com DPBS, por cinco minutos, e fixados com metanol gelado, durante cinco minutos, à temperatura ambiente. Após fixação, foi realizada nova lavagem em DPBS, seguido da remoção de todas as células remanescentes presentes no compartimento superior com o auxílio de haste de algodão. Após, os insertos foram corados em hematoxilina de Harris (*Easypath*), por 10 minutos, e lavados em água corrente, seguido da coloração em eosina amarelada (*Easypath*), por 10 minutos, e nova lavagem em água corrente, com posterior exposição ao ar para secagem, por pelo menos 24 horas. Posteriormente, os insertos foram fotografados em sua totalidade, no microscópio Olympus SZX7 (magnificação de 100x), e as células capazes de invadir a membrana foram quantificadas com o software ImageJ 1.41 (*National Institute of Health*)<sup>112</sup>. O experimento foi realizado em duplicatas experimentais e triplicatas biológicas.



#### 4.2.4.6 Formação de colônias

O potencial de formação de colônias foi avaliado utilizando o ensaio clonogênico, dependente de ancoragem. Em síntese,  $1 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de seis poços com meio de cultura DMEM 10% SFB. Após 24 horas, o meio de plaqueamento foi retirado e, em seguida, o PLX 3  $\mu$ M, diluído em meio de cultura DMEM 10% SFB, adicionado aos poços. Após dezoito dias de exposição, os poços foram lavados com 2,0 mL de DPBS, seguido da adição de 2,0 mL de metanol (*Merck*) gelado, durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, adicionou-se 2,0 mL de cristal violeta 0,5% (diluído em DPBS), com período de incubação de 15 minutos, à temperatura ambiente. Após, todos os poços foram lavados duas vezes com H<sub>2</sub>O destilada e, então, as placas foram colocadas abertas à temperatura ambiente por 24 horas para secagem completa. Para avaliação do número de colônias formadas, os poços foram fotodocumentados com o auxílio do microscópio Olympus SZX7 (magnificação de 100x) e a capacidade de formação de colônias avaliada solubilizando as colônias coradas em ácido acético 10% e analisando a solução resultante em espectrofotômetro a 570 nm. O experimento foi realizado em duplicatas experimentais.

#### 4.3 Análise estatística

Os resultados obtidos na avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico nas amostras humanas de melanomas foram analisados utilizando o software estatístico IBM-SPSS (versão 21.0). A descrição da amostra foi feita através de medidas de frequência, tendência e dispersão. Os grupos para análise foram definidos mediante a graduação final obtida na avaliação das reações de IHQ (negativa e positiva). A comparação entre a frequência de expressão de proteínas nas amostras pareadas (obtidas antes e após tratamento com vemurafenibe) foi avaliada para significância estatística utilizando o teste de McNemar. A análise estatística do perfil de expressão diferencial das linhagens SK-MEL-19 parental e resistente (*NanoString*) foi realizada em ambiente R, e a significância estatística foi avaliada utilizando o teste pareado de *Wilcoxon*. Os dados quantitativos relacionados aos ensaios funcionais (*in vitro*) foram armazenados e analisados no software *GraphPad Prism 9.0.0.*, e são apresentados como a média e o erro padrão de no mínimo três experimentos independentes realizados em duplicata (formação de colônias, migração e invasão celular) ou triplicata técnica (demais experimentos). Para variáveis quantitativas que seguem distribuição normal, a análise estatística foi realizada utilizando o

teste *t-Student* ou *ANOVA* seguida de análise *post hoc*. Para variáveis quantitativas que não seguem distribuição normal, a análise estatística foi realizada utilizando teste de *Mann-Whitney* e *Kruskall Wallis*. Para todos os testes foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

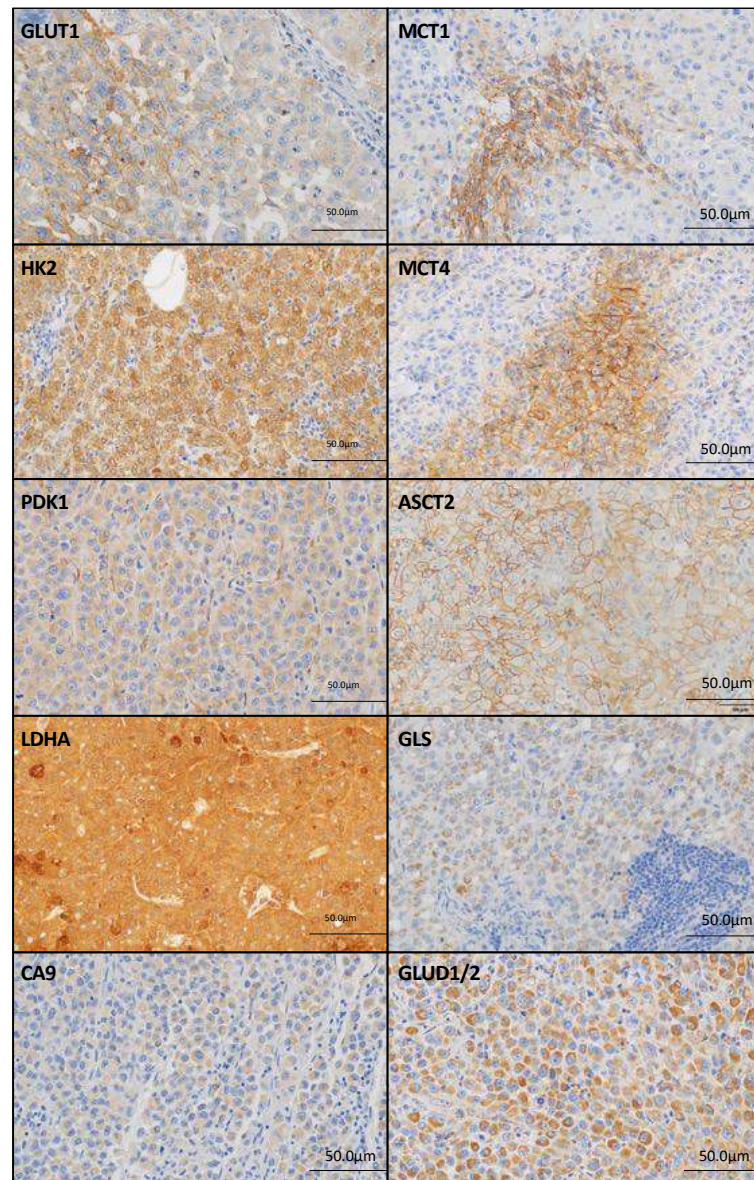
## **5 ASPECTOS ÉTICOS**

O estudo encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos com parecer 2.290.161 e registro na Plataforma Brasil com número de CAAE 74071317.0.0000.5437. Os dados dos pacientes foram obtidos exclusivamente de forma retrospectiva em prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) e através de análises do material biológico humano (blocos de parafina). Todas as informações referentes aos participantes foram e serão mantidas em sigilo, sob a responsabilidade do investigador principal (orientador), não havendo divulgação pública do nome ou de qualquer informação que possa identificar o participante. Devido à necessidade de garantir material estocado no Departamento de Patologia para possíveis testes de diagnósticos futuros, os blocos de parafina não foram esgotados ou prejudicados. Assim, trata-se de um estudo com risco mínimo ao participante da pesquisa, caracterizado apenas pela eventual quebra de sigilo. Houve a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido aprovada pelo CEP. O participante da pesquisa não terá benefício direto, no entanto, futuros pacientes diagnosticados com melanoma poderão se beneficiar do conhecimento gerado.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Imunohistoquímica nas amostras humanas de melanoma tratado com vemurafenibe

Amostras de tecido parafinado de 9 pacientes diagnosticados com melanoma, com presença da mutação V600E no gene *BRAF*, que realizaram tratamento com vemurafenibe, foram avaliadas quanto à expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo, antes e após o tratamento, por imunohistoquímica (Figura 5). Quanto à localização predominante de expressão para cada marcador, as proteínas GLUT1, MCT1, MCT4 e ASCT2 apresentam localização primordial na membrana plasmática, enquanto HK2, PDK1, LDHA, CA9, GLS e GLUD1/2 foram observados no citoplasma.



**Figura 5.** Fotomicrografias representativas da expressão positiva de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1 e MCT4) e da glutamina (ASCT2, GLS e GLUD1/2), avaliada por imunohistoquímica. Ampliação 400x.

Quanto à comparação da expressão entre amostras pré-tratamento e pós-tratamento com vemurafenibe (Tabela 7), observa-se que as proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico, PDK1, LDHA e MCT4, e GLUD1/2 envolvido no metabolismo da glutamina, não apresentaram alteração na frequência de expressão. Contudo, para o transportador de glicose GLUT1 ocorreu perda de expressão em um paciente, após o tratamento, e, para enzima HK2, ganho de expressão em um paciente, após o tratamento com vemurafenibe. Para o regulador de pH CA9, observou-se perda de expressão em três pacientes, após o tratamento com vemurafenibe. De maneira semelhante, dois pacientes apresentaram perda expressão do transportador de lactato MCT1 após o tratamento com o inibidor de BRAF. Por fim, três pacientes apresentaram ganho de expressão da enzima GLS após o tratamento com o inibidor de BRAF. As médias dos valores de escore encontram-se descritas no Anexo 3.

**Tabela 7.** Comparação da frequência de expressão de marcadores do metabolismo em amostras de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) tratamento com vemurafenibe.

Expressão	Amostra		p
	Pré-PLX n (%)	Pós-PLX n (%)	
<b>GLUT1</b>			1,000
Negativo	1 (11,1)	2 (22,2)	
Positivo	8 (88,9)	7 (77,8)	
<b>HK2</b>			..
Negativo	1 (11,1)	0 (0,0)	
Positivo	8 (88,9)	9 (100,0)	
<b>PDK1</b>			1,000
Negativo	1 (11,1)	1 (11,1)	
Positivo	8 (88,9)	8 (88,9)	
<b>LDHA</b>			..
Negativo	0 (0,0)	0 (0,0)	
Positivo	9 (100,0)	9 (100,0)	
<b>CA9</b>			0,250
Negativo	2 (22,2)	5 (55,6)	
Positivo	7 (77,8)	4 (44,4)	
<b>MCT1</b>			0,500
Negativo	2 (22,2)	4 (44,4)	
Positivo	7 (77,8)	5 (55,6)	
<b>MCT4</b>			1,000
Negativo	2 (22,2)	2 (22,2)	
Positivo	7 (77,8)	7 (77,8)	
<b>ASCT2</b>			1,000
Negativo	1 (11,1)	0 (0,0)	
Positivo	8 (88,9)	9 (100,0)	
<b>GLUD1/2</b>			1,000
Negativo	2 (22,2)	2 (22,2)	
Positivo	7 (77,8)	7 (77,8)	
<b>GLS</b>			0,250
Negativo	3 (33,3)	6 (66,7)	
Positivo	6 (66,7)	3 (33,3)	

.. Valor numérico não pode ser estimado.

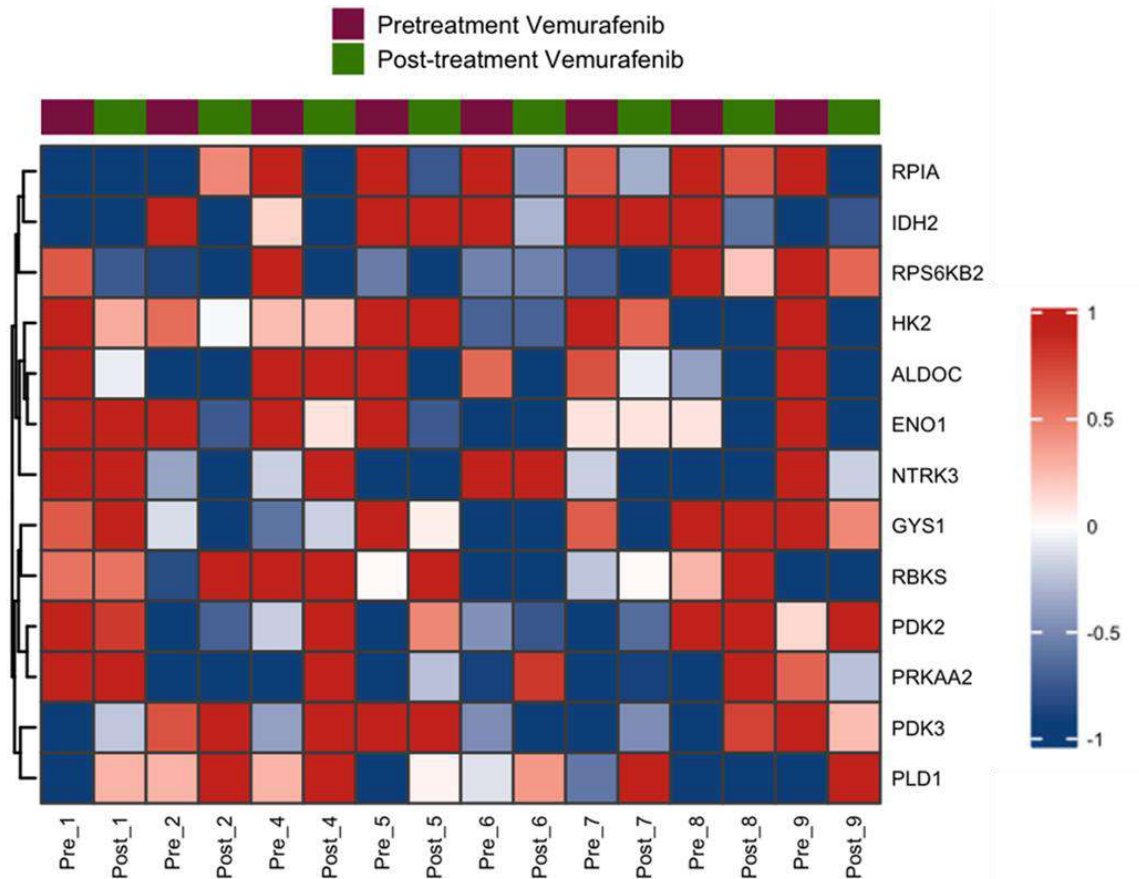
## 6.2 NanoString nas amostras humanas de melanoma tratado com vemurafenibe

A análise dos resultados de expressão gênica obtidos em amostras humanas de melanoma, antes e após tratamento com vemurafenibe, revelou expressão diferencial em 13 genes dos 180 genes avaliados, com maior expressão dos genes *PDK2*, *PDK3*, *PLD1*, *PRKAA2* e *RBKS* e menor expressão de *ALDOC*, *ENO1*, *GYS1*, *HK2*, *IDH2*, *NTRK3*, *RPIA* e *RPS6KB2* em amostras obtidas após o tratamento, quando comparadas com a amostras do mesmo paciente antes do uso da terapia alvo (Tabela 8,  $p \leq 0,05$ ).

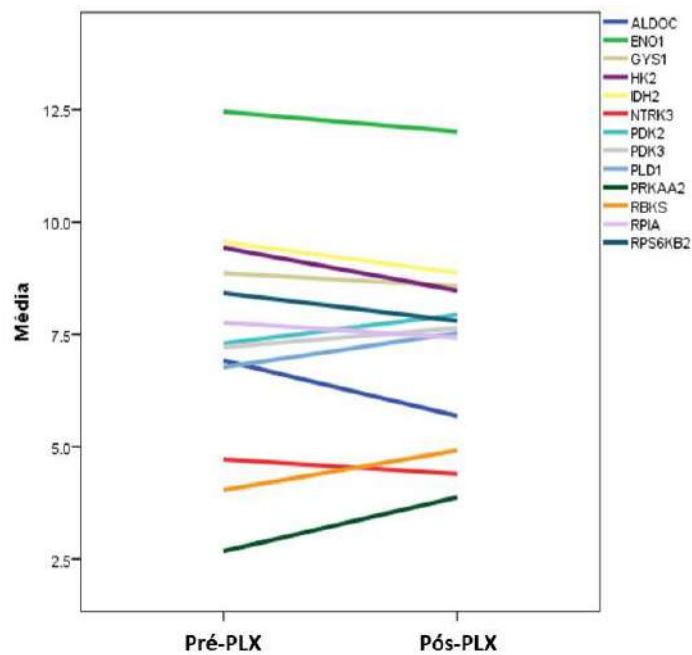
**Tabela 8.** Genes diferencialmente expressos em amostras de pacientes pós-tratamento com vemurafenibe.

<b>Genes</b>	<b>Proteína</b>	<b>Fold-change</b>	<b>p</b>
<i>ALDOC</i>	Aldolase C bifosfato de frutose	-2,3	0,025
<i>ENO1</i>	Enolase 1	-1,3	0,043
<i>GYS1</i>	Glicogênio sintase 1	-1,2	0,036
<i>HK2</i>	Hexoquinase 2	-2,0	0,028
<i>IDH2</i>	Isocitrato desidrogenase 2	-1,6	0,050
<i>NTRK3</i>	Receptor Tipo 3 de tirosina quinase neurotrófica	-1,2	0,050
<i>PDK2</i>	Piruvato desidrogenase quinase 2	1,5	0,050
<i>PDK3</i>	Piruvato desidrogenase quinase 3	1,3	0,036
<i>PLD1</i>	Fosfolipase D	1,7	0,018
<i>PRKAA2</i>	Proteína quinase subunidade catalítica 2	2,3	0,036
<i>RBKS</i>	Riboquinase	1,9	0,018
<i>RPIA</i>	Ribose 5-fosfato isomerase A	-1,2	0,043
<i>RPS6KB2</i>	Proteína ribossomal S6 quinase B2	-1,5	0,018

Os genes diferencialmente expressos foram selecionados para construção de *heatmap* (Figura 6) e de representação gráfica (Figura 7). Ressalta-se a diminuição significativa da expressão gênica de *ALDOC* (*fold-change*=-2,3; *p*=0,025) e *HK2* (*fold-change*=-2,0; *p*=0,028), envolvidos no metabolismo da glicose. Ainda, dentre os genes superexpressos, destaca-se os genes *PDK2* (*fold-change*=1,5; *p*=0,050), *PDK3* (*fold-change*=1,3; *p*=0,036) e *RBKS* (*fold-change*=1,9; *p*=0,018), envolvidos no metabolismo da glicose, e *PRKAA2* (*fold-change*=2,3; *p*=0,036), relacionado com a via mTOR.



**Figura 6.** Heatmap representando a expressão de mRNAs em amostras tumorais de 8 pacientes diagnosticados com melanoma, antes (*Pre*) e após (*Post*) tratamento com vemurafenibe. Foram incluídos os genes que apresentaram valor de  $p$  significativo ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 7.** Representação gráfica da expressão de mRNAs em amostras tumorais de 8 pacientes diagnosticados com melanoma, antes (Pré-PLX) e após (Pós-PLX) tratamento com vemurafenibe. Foram incluídos os genes que apresentaram valor de  $p$  significativo ( $p \leq 0,05$ ). Os dados brutos foram normalizados usando os genes *housekeeping*.

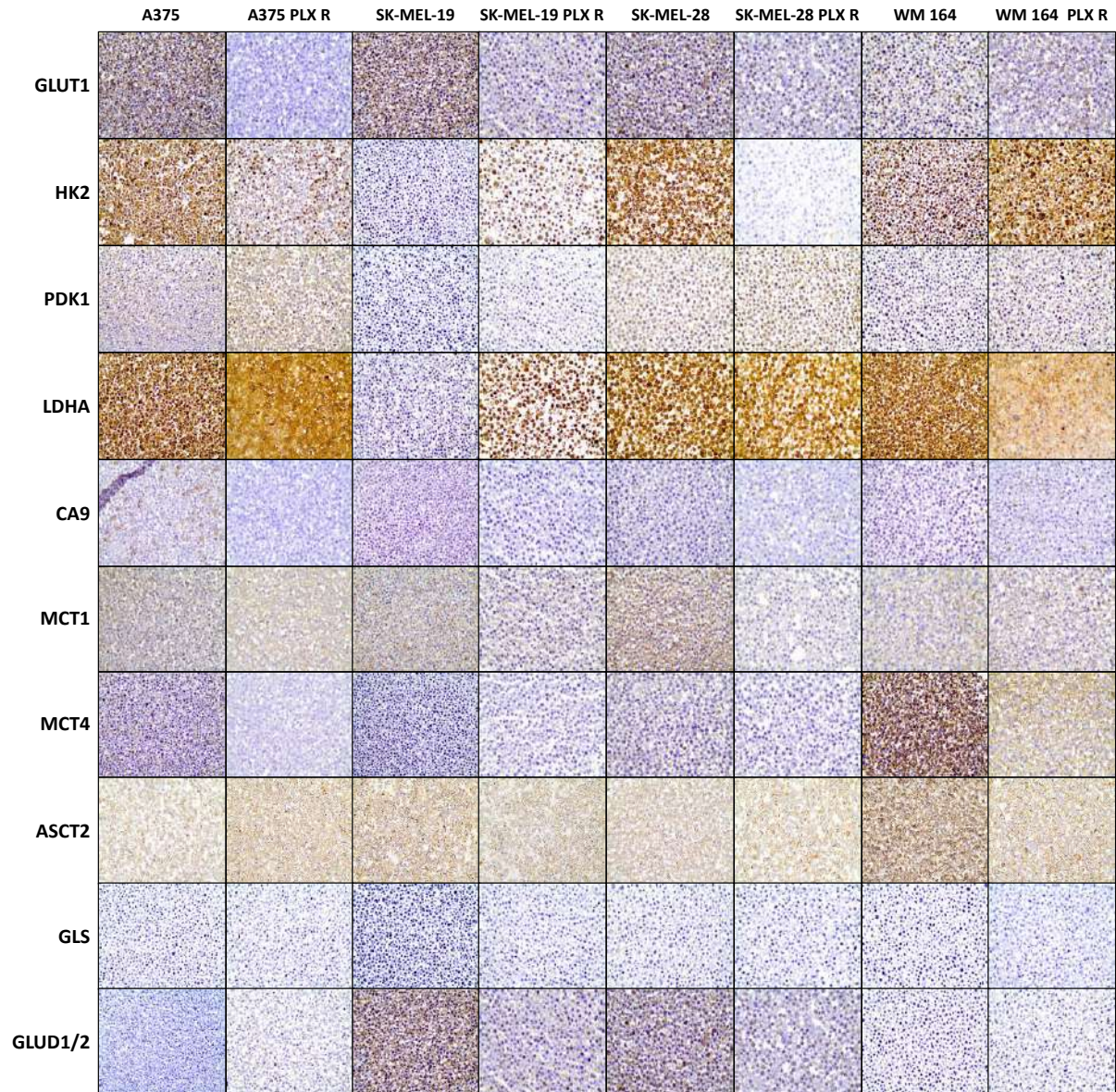


### **6.3 Análise da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo em linhagens de melanoma**

As linhagens de melanoma parentais e resistentes ao vemurafenibe (PLX R) foram avaliadas quanto ao perfil metabólico através da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1 e MCT4) e da glutamina (ASCT2, GLS e GLUD1/2), por imunocitoquímica (Figura 8 e Tabela 9). É possível observar que a maioria das linhagens de melanoma parentais apresentaram um perfil metabólico preferencialmente glicolítico, com expressão elevada de GLUT1, HK2 e LDHA, como observado para as linhagens A375, SK-MEL-28 e WM164. Já a linhagem SK-MEL-19 demonstrou ter um perfil mais oxidativo, com menor expressão de HK2, PDK1 e LDHA. Com relação à CA9, observou-se expressão desta proteína apenas na linhagem A375. Quanto ao MCT1 e MCT4, observou-se uma expressão mais forte de MCT1 na linhagem SK-MEL-28, sendo também fracamente expresso nas demais linhagens parentais, enquanto foi observada uma expressão forte de MCT4 para a linhagem WM164. Ao avaliar proteínas relacionadas com a via da glutamina, pode-se observar que a linhagem SK-MEL-19 apresenta uma possível ativação da via da glutaminólise, com expressão de ASCT2 e de GLUD1/2, sendo também observada expressão de ASCT2 nas demais linhagens parentais (com maior intensidade na linhagem WM164), e de GLUD1/2 na linhagem SK-MEL-28. Para o GLS, não se observa expressão nas linhagens quando analisada por imunocitoquímica.

Quando comparadas as linhagens resistentes ao vemurafenibe com as respectivas linhagens parentais, observou-se uma diminuição na expressão de GLUT1 nas linhagens resistentes ao vemurafenibe. A HK2 teve a sua expressão reduzida nas linhagens A375 PLX R e SK-MEL-28 PLX R e aumento de expressão nas linhagens SK-MEL-19 PLX R e WM164 PLX R, em relação às respectivas parentais. Para a PDK1, foi observado um aumento de expressão na linhagem A375 PLX R. A LDHA apresentou expressão em todas as linhagens resistentes, com aumento na linhagem SK-MEL-19 PLX R e diminuição na linhagem WM164 PLX R, em comparação às respectivas parentais, enquanto o MCT1 e o MCT4 tiveram a sua expressão reduzida nas linhagens resistentes em relação à parental. Com relação ao transportador de glutamina ASCT2, foi observada uma expressão mais acentuada para a linhagem A375 PLX R, sendo que o mesmo não foi observado na expressão de GLS e GLUD1/2 na resistência ao vemurafenibe; enquanto para a GLS não foi observada expressão nas linhagens resistentes,

foi observada uma diminuição na expressão de GLUT1/2 nas linhagens SK-MEL-19 PLX R e SK-MEL-28 PLX R.



**Figura 8.** Fotomicrografias representativas da expressão de diferentes proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1 e MCT4) e da glutamina (ASCT2, GLS e GLUT1/2) por imunocitoquímica. Ampliação 400x.

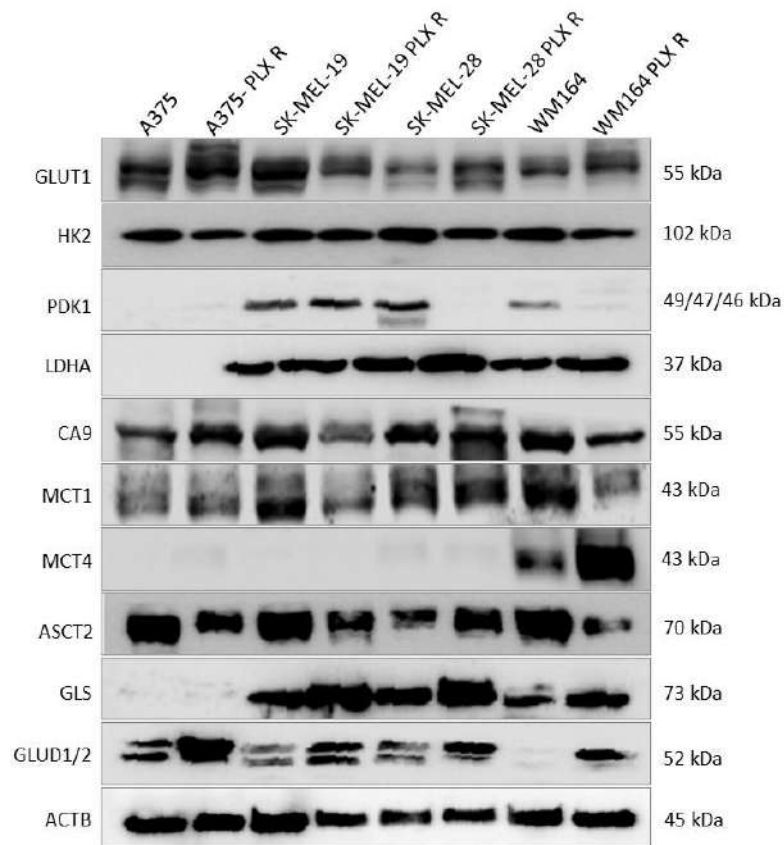
**Tabela 9.** Escores de expressão de marcadores do metabolismo em linhagens celulares de melanoma parentais e resistentes ao vemurafenibe.

Proteína	Linhagens Melanoma							
	A375		SK-MEL-19		SK-MEL-28		WM 164	
	P	PLX R	P	PLX R	P	PLX R	P	PLX R
<b>GLUT1</b>	4	0	4	2	4	2	2	2
<b>HK2</b>	6	5	0	5	6	0	5	6
<b>PKD1</b>	3	4	0	0	2	2	0	0
<b>LDHA</b>	6	6	0	5	6	6	6	5
<b>CA9</b>	1	0	0	0	0	0	0	0
<b>MCT1</b>	3	2	3	2	4	0	2	2
<b>MCT4</b>	0	0	0	0	2	0	6	4
<b>ASCT2</b>	2	2	2	2	2	2	5	2
<b>GLS</b>	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>GLUD1/2</b>	0	0	5	2	4	2	0	0

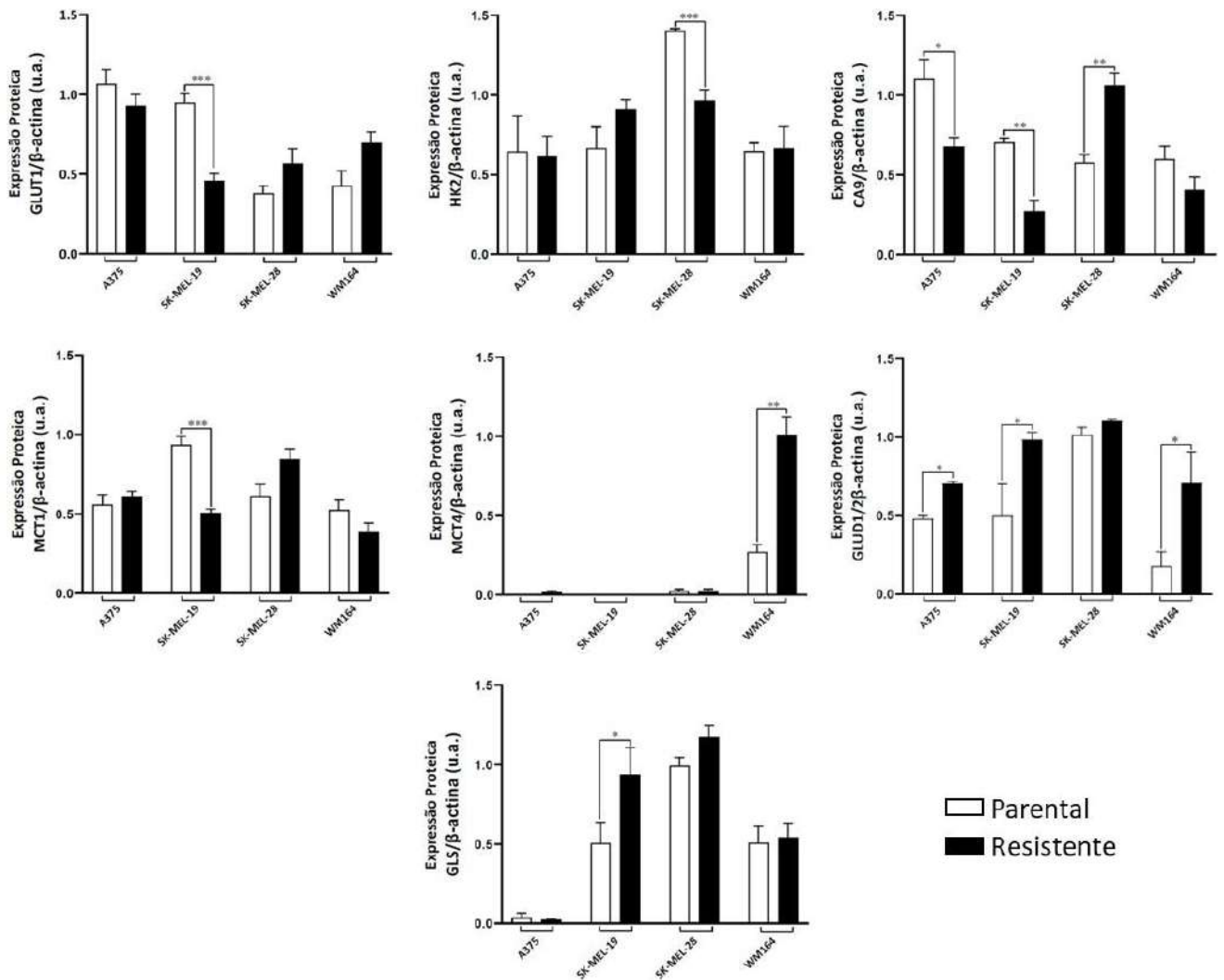
Escore: soma dos valores de extensão e intensidade. Extensão da coloração (0: sem células imunorreativas; 1: <5% de células imunorreativas; 2: 5-50% de células imunorreativas; e 3: > 50% de células imunorreativas). Intensidade da coloração (0: negativo; 1: fraco; 2: intermediário; e 3: forte).

A expressão das proteínas também foi avaliada por meio da técnica de *Western blotting*. De acordo com as Figuras 9 e 10, em relação às linhagens de melanoma parentais, é possível observar que a linhagem A375 apresentou expressão de GLUT1 e CA9, não apresentou expressão de LDHA, PDK1, MCT4 e GLS. Porém, observa-se expressão de ASCT2 e GLUD1/2, sendo assim possível inferir que, nesta linhagem, está ocorrendo atividade da via da glutaminólise. As demais linhagens parentais apresentaram expressão de GLUT1, PDK1, LDHA e CA9, bem como GLS e GLUD1/2, com exceção da linhagem WM164, com ausência de expressão de GLUD1/2. Com relação aos transportadores de monocarboxilatos, observa-se ausência de expressão de MCT4 nas linhagens celulares, com exceção da linhagem WM164, e expressão de MCT1 em todas as linhagens celulares. Quando comparadas as linhagens resistentes ao vemurafenibe com as parentais, observa-se que existe uma tendência geral para perda do fenótipo glicolítico e ativação da via da glutaminólise, com destaque para a linhagem SK-MEL-19 PLX R, a qual apresentou uma redução na expressão de GLUT1, CA9 e

MCT1, e, por outro lado, um aumento na expressão de GLS e GLUD1/2, em comparação com a linhagem parental. Com relação às demais linhagens de melanoma avaliadas, observa-se a mesma tendência, com perda na expressão de HK2 na linhagem SK-MEL-28 PLX R, perda de CA9 na A375 PLX R bem como aumento na expressão de GLUD1/2 nas linhagens A375 PLX R e WM164 PLX R. Em sentido contrário a esta tendência, observou-se aumento de CA9 na linhagem SK-MEL-28 PLX R e aumento de MCT4 na linhagem WM164, rem relação às respectivas linhagens parentais.



**Figura 9.** Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, PDK1, LDHA, CA9, MCT1 e MCT4) e ao metabolismo da glutamina (ASCT2, GLUD1/2, GLS), foram determinadas por *western blotting*. A proteína  $\beta$ -actina foi utilizada como controle interno.



**Figura 10.** Densitometria dos resultados de *western blotting* para as diferentes proteínas associadas ao metabolismo glicolítico (GLUT1, HK2, CA9, MCT1 e MCT4) e metabolismo da glutamina (GLS e GLUD1/2) nas 8 linhagens celulares comerciais de melanoma. São apresentados apenas os gráficos para as proteínas com resultados estatisticamente significativos. Todos os resultados foram normalizados pela  $\beta$ -Actina. Os valores estão expressos pela média e erro padrão de dois experimentos independentes. U.a., unidade arbitrária. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 6.4 NanoString na linhagem celular de melanoma SK-MEL-19

A análise do perfil metabólico, através da expressão de genes, foi realizada para a linhagem celular SK-MEL-19 resistente e sua parental, utilizando um painel de genes relacionados ao metabolismo. A linhagem celular SK-MEL-19 PLX R, apresentou expressão diferencial em 23 genes, de um total de 180 genes avaliados (Tabela 10,  $p < 0,05$ ;  $fold-change \geq 2,0$ ), relacionados com o metabolismo da glicose, de carbono, via da mTOR e sinalização de hipóxia, dentre estes, 10 genes apresentaram uma diminuição em sua expressão e 13 estão superexpressos na linhagem resistente. Ressalta-se o aumento na expressão da isoforma 2 do

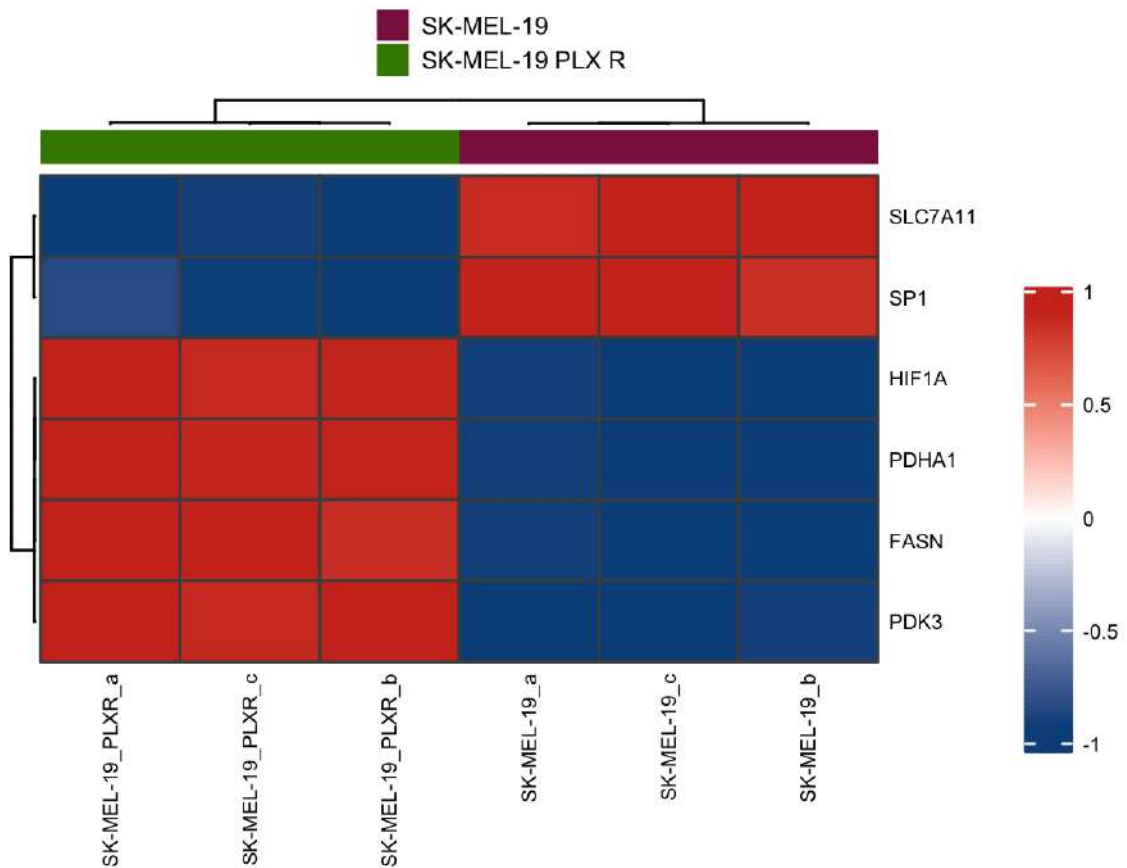
gene *GLS* (*fold-change*=2; *p*=0,018), estando de acordo com o observado para a expressão da proteína.

**Tabela 10.** Genes diferencialmente expressos na linhagem SK-MEL-19 PLX R.

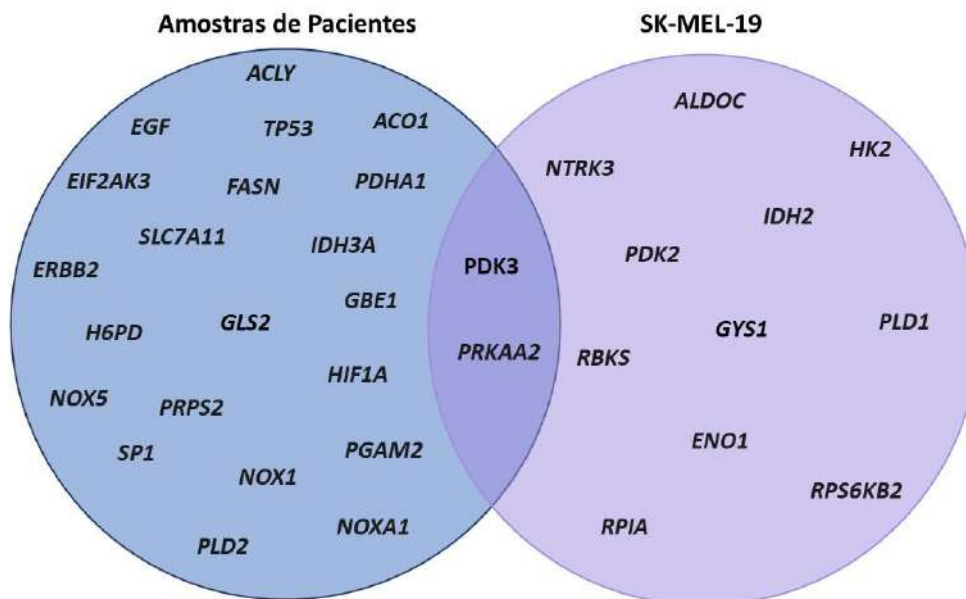
Genes	Proteína	FC	<i>p</i> valor
<i>ACLY</i>	ATP citrato liase	2,0	0,00057
<i>ACO1</i>	Aconitase 1 solúvel	2,0	0,00081
<i>EGF</i>	Fator de crescimento epidérmico	-2,8	0,00038
<i>EIF2AK3</i>	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2- $\alpha$ quinase 3	2,3	0,00069
<i>ERBB2</i>	erb-b2 receptor tirosina quinase 2	-4,6	0,0017
<i>FASN</i>	Ácido graxo sintase	2,8	0,000028
<i>GBE1</i>	Enzima de ramificação de 1,4- $\alpha$ -glucano 1	2,1	0,012
<i>GLS2</i>	Glutaminase 2	2,0	0,018
<i>H6PD</i>	Hexose-6-fosfato desidrogenase	-2,0	0,00068
<i>HIF1A</i>	Fator induzido por hipóxia 1 $\alpha$	2,3	0,000031
<i>IDH3A</i>	Isocitrato Desidrogenase 3	2,0	0,00013
<i>NOX1</i>	NADPH oxidase 1	2,0	0,03
<i>NOX5</i>	NADPH oxidase 5	-3,7	0,0064
<i>NOXA1</i>	Ativador de NADPH oxidase 1	-2,0	0,00028
<i>PDHA1</i>	Piruvato desidrogenase 1 $\alpha$	2,6	0,000011
<i>PDK3</i>	Piruvato desidrogenase quinase 3	2,6	0,00000045
<i>PGAM2</i>	Fosfoglicerato mutase 2	-2,1	0,023
<i>PLD2</i>	Fosfolipase D2	-2,0	0,0026
<i>PRKAA2</i>	Proteína quinase ativada por AMP, subunidade catalítica 2 $\alpha$	2,0	0,0002
<i>PRPS2</i>	Fosforribosil pirofosfato sintetase 2	2,8	0,00033
<i>SLC7A11</i>	Família de transportadores de soluto 7 membro 11	-2,0	0,0000064
<i>SP1</i>	Fator de transcrição Sp1	-2,1	0,000048
<i>TP53</i>	Proteína tumoral p53	-2,0	0,00072

FC: *fold-change*.

Considerando os resultados mais significativos ( $p < 0,0001$ , Figura 11), os dados mostram alteração nos níveis de expressão de uma variedade de genes, em especial um aumento na expressão de *HIF1A*, *PDHA1*, *FASN* e *PDK3* e uma diminuição em *SLC7A11* e *SP1*, em comparação com a linhagem celular parental. Em anexo, encontram-se *heatmaps* representando a expressão de mRNAs com  $p < 0,05$  (Anexo 4),  $p < 0,01$  (Anexo 5) e  $p < 0,001$  (Anexo 6). Adicionalmente, foi realizada a comparação entre os genes diferencialmente expressos nas amostras de pacientes e na linhagem SK-MEL-19 resistentes ao vemurafenibe, sendo observado um aumento na expressão dos genes *PDK3* e *PRKAA2* para ambos os tipos de amostras, genes relacionados com a via glicolítica e a ativação da via da mTOR, respectivamente (Figura 12).



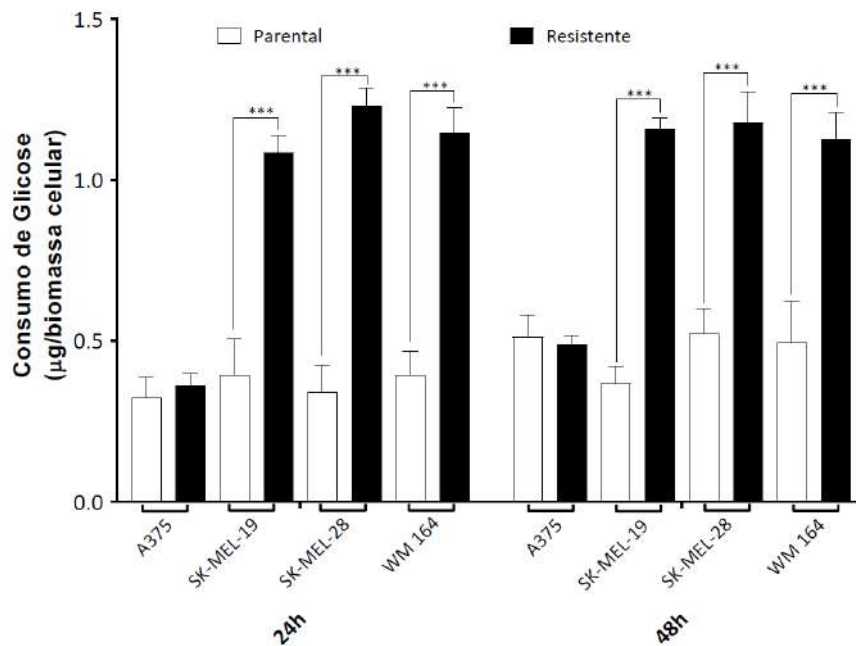
**Figura 11.** Heatmaps representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-MEL-19 resistente em comparação com parental. Dados extraídos e normalizados pelo programa Galaxy.  $p < 0,0001$ . Os dados brutos foram normalizados usando os genes *housekeeping*.



**Figura 12.** Diagrama de Venn apresentando os genes diferencialmente expressos únicos e em comum em amostras de pacientes com melanoma pós-tratamento com vemurafenibe e na linhagem celular de melanoma SK-MEL-19 resistente ao vemurafenibe.

### 6.5 Quantificação de glicose e lactato extracelular

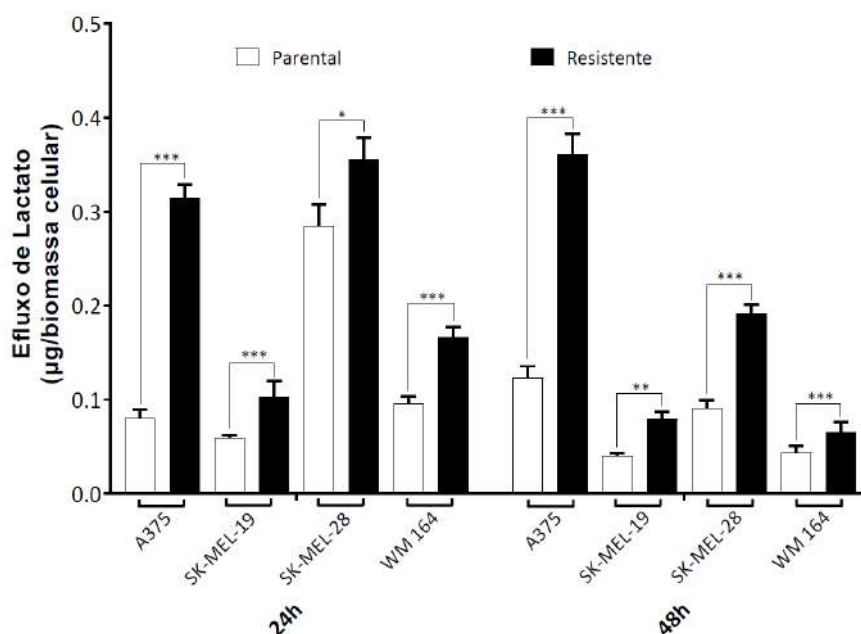
A quantidade de glicose e lactato no meio extracelular, após 24 e 48 horas de cultura em condições normais de crescimento, foi avaliada para as 8 linhagens de melanoma, parentais e resistentes ao vemurafenibe. Em relação ao consumo de glicose, as linhagens SK-MEL-19, SK-MEL-28 e WM164 resistentes ao vemurafenibe apresentaram maior consumo de glicose, quando comparada com as parentais, em 24 e 48 horas (Figura 13).



**Figura 13.** Consumo de glicose em 8 linhagens de melanoma parental e resistente ao vemurafenibe, ao longo do tempo (24 e 48 horas). Os resultados foram normalizados pela biomassa celular total (SRB) e expressam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. Teste T não-pareado. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Para o efluxo de lactato, todas as linhagens resistentes apresentaram um maior efluxo em relação as suas respectivas parentais, em 24 e 48 horas, com valores estatisticamente significativos (Figura 14).

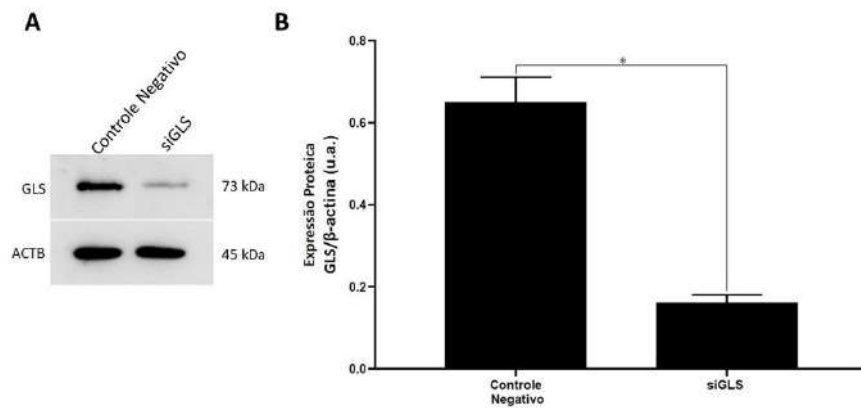




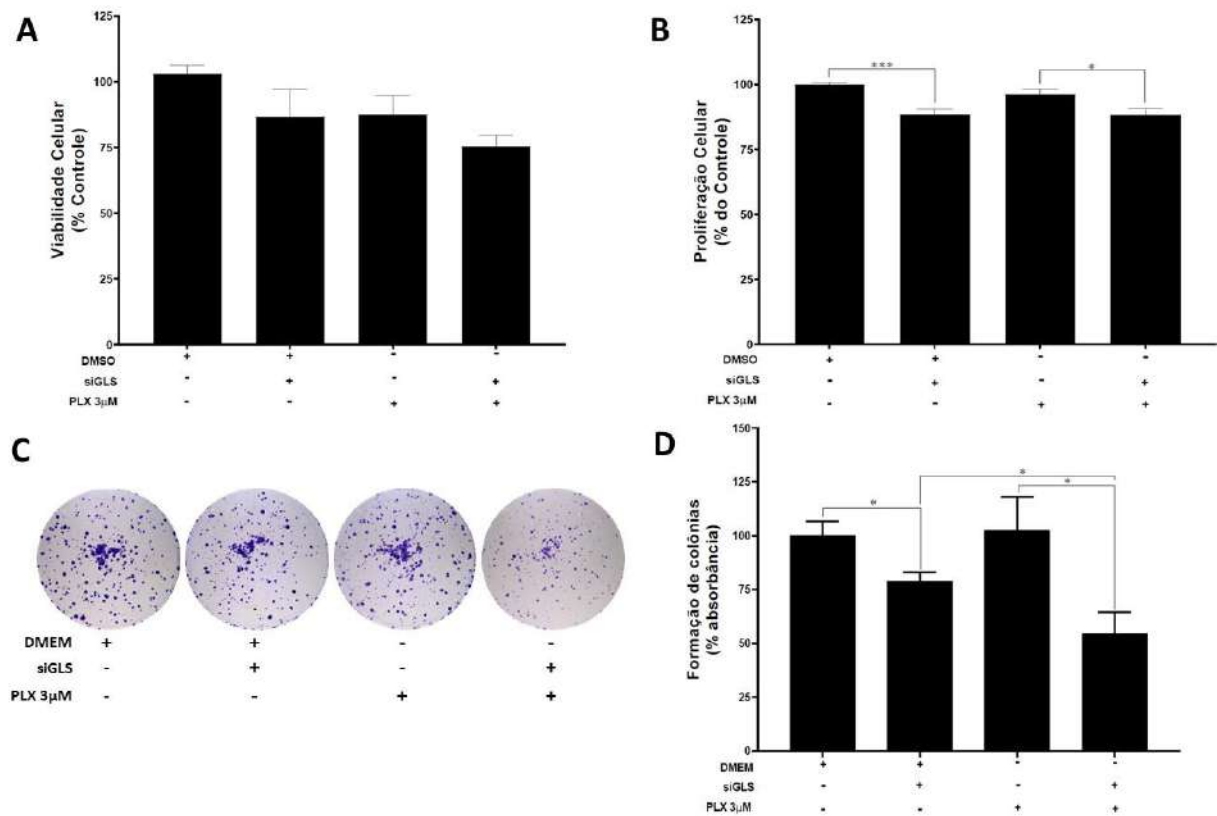
**Figura 14.** Produção de lactato em 8 linhagens de melanoma parental e resistente ao vemurafenibe, ao longo do tempo (24 e 48 horas). Os resultados foram normalizados pela biomassa celular total (SRB) e expressam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. Teste T não-pareado. \* $p=0,0298$ ; \*\* $p=0,001$ ; \*\*\* $p<0,0001$ .

### 6.6 Caracterização do efeito do *knockdown* do gene *GLS* na linhagem SK-MEL-19 PLX R combinado com tratamento com vemurafenibe

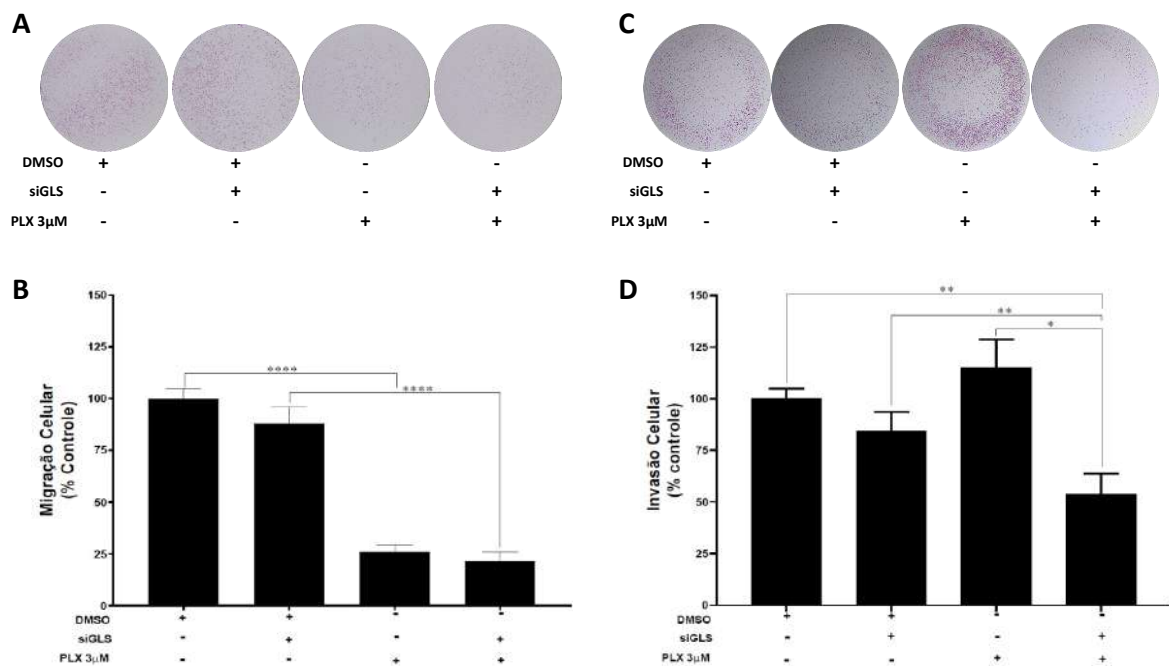
O efeito do *knockdown* do gene *GLS*, na presença ou ausência de vemurafenibe, foi avaliado na linhagem de melanoma resistente ao vemurafenibe SK-MEL-19, no que diz respeito à viabilidade celular, capacidade de proliferação, migração e invasão das células assim como consumo de glicose e glutamina e efluxo de lactato. O *knockdown* de *GLS* usando siRNA levou a uma diminuição de cerca de 80% na expressão de *GLS* (Figura 15). Essa redução na expressão de *GLS* não influenciou a viabilidade celular (Figura 16A), mas levou a uma redução significativa na proliferação (Figura 16B) e na formação de colônias (Figura 16C), independentemente da presença de vemurafenibe. Ainda, a migração celular não foi afetada pelo *knockdown* de *GLS* (Figura 17A) enquanto a invasão diminuiu, apenas na presença de vemurafenibe (Figura 17C).



**Figura 15.** *Knockdown* de *GLS* na linhagem SK-MEL-19 PLX R por siRNA. **(A)** Expressão proteica de *GLS* avaliada por *Western blotting*. **(B)** Análise da expressão proteica de *GLS* por densitometria. Média e erro padrão estão representados no gráfico. \* $p \leq 0,05$ .

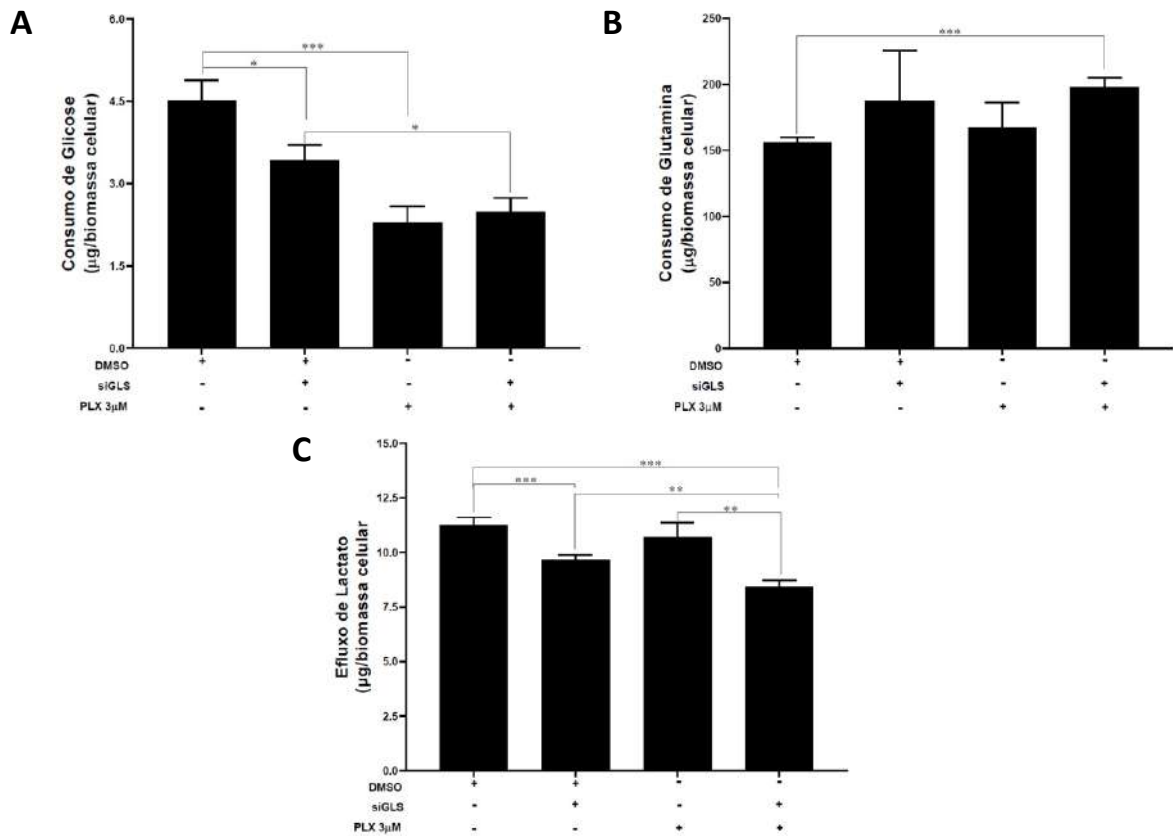


**Figura 16.** Avaliação da viabilidade celular, proliferação e potencial de formação de colônias, em linhagens celulares de melanoma resistente a vemurafenibe após *knockdown* de *GLS*, na ausência e presença de PLX. **(A)** Viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de sulforrodamina B após 24 horas. Dados normalizados para o grupo DMSO. **(B)** A proliferação celular foi avaliada pelo ensaio BrdU após 24 horas. Dados normalizados para o grupo DMSO. **(C)** Colônias coradas por cristal violeta. **(D)** Representação gráfica de absorvância após solubilização das colônias das células coradas em ácido acético 10%. Dados normalizados para o grupo DMEM. Dados apresentados como a média  $\pm$  SEM de triplicatas de pelo menos três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .



**Figura 17.** Avaliação da migração e invasão em linhagens celulares de melanoma resistentes ao vemurafenibe após *knockdown* de *GLS*, na ausência e presença de PLX, usando o ensaio *transwell*. **(A)** Células migratórias coradas por hematoxilina e eosina, após 24 horas. **(B)** Representação gráfica da contagem de células migratórias. Dados normalizados para o grupo DMSO. **(C)** Células invasivas coradas por hematoxilina e eosina, após 24 horas. **(D)** Representação gráfica da contagem de células invasivas. Dados normalizados para o grupo DMSO. Dados apresentados como a média  $\pm$  SEM de triplicados de pelo menos dois experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

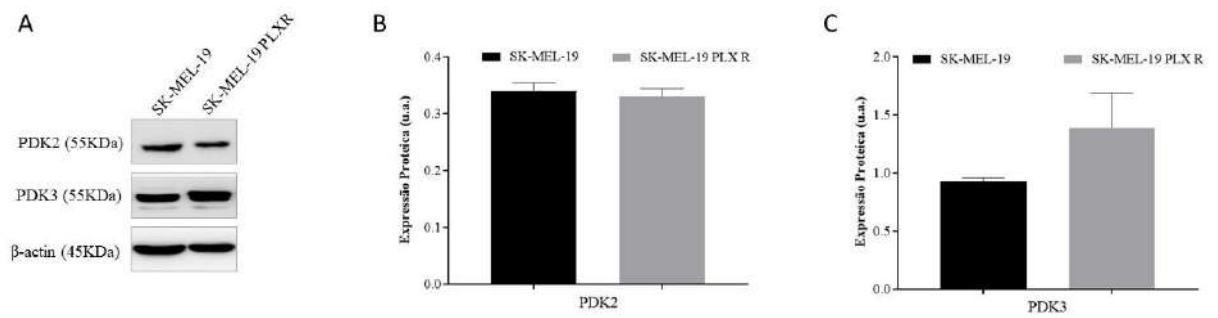
Além disso, o *knockdown* de *GLS* induziu uma diminuição no consumo de glicose na ausência de vemurafenibe (Figura 18A), não influenciou o consumo de glutamina (Figura 18B), enquanto foi capaz de reduzir o efluxo de lactato, independentemente na presença de vemurafenibe (Figura 18C).



**Figura 18.** Variação de glicose, lactato e glutamina em linhagens celulares de melanoma resistentes após *knockdown* de *GLS* na ausência e presença de PLX. **(A)** A variação de glicose (influxo) foi calculada pela diferença entre a quantidade inicial e final (após 24 horas) de glicose no meio de cultura. Dados normalizados para o grupo DMSO. **(B)** A variação de glutamina (influxo) foi calculada pela diferença entre a quantidade inicial e final (após 24 horas) de glutamina no meio de cultura. Dados normalizados para o grupo DMSO. **(C)** A variação de lactato (efluxo) foi calculada pela diferença entre a quantidade final (após 24 horas) e inicial de lactato em meio de cultura. Dados normalizados para o grupo DMSO. Dados apresentados como a média  $\pm$  SEM de triplicados de pelo menos três experimentos independentes. \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

### 6.7 Avaliação da expressão de PDK2 e PDK3

De acordo com as análises de nanoString nas amostras humanas e na linhagem SK-MEL-19, foi possível observar um aumento no perfil de expressão dos genes *PDK2* e *PDK3* na resistência ao vemurafenibe. Diante disto, a expressão destas proteínas foi avaliada na linhagem SK-MEL-19 parental e resistente, de acordo com a Figura 19, observando-se um aumento na expressão de PDK3 na linhagem PLX R, em comparação com a sua parental, apesar de não ser estatisticamente significativo.



**Figura 19.** Expressão das proteínas PDK2 e PDK3 na linhagem SK-MEL-19 PLX R. **(A)** Expressão proteica de PDK2 e PDK3 foi avaliada por *western blotting*. **(B)** Análise da expressão proteica de PDK2 por densitometria. **(C)** Análise da expressão proteica de PDK3 por densitometria. Média e erro padrão estão representados no gráfico. Os valores estão expressos pela média e erro padrão de dois experimentos independentes. u.a., unidade arbitrária.

## 7 DISCUSSÃO

A compreensão do papel do metabolismo tumoral na resistência ao vemurafenibe por meio amostras de pacientes com melanoma e resistência adquirida ao vemurafenibe demonstrou que, em alguns pacientes, ocorre uma diminuição do perfil glicolítico com perda de GLUT1, CA9 e MCT1. As análises de um amplo painel de genes relacionados a diferentes vias metabólicas, em amostras de pacientes e na linhagem SK-MEL-19, parental e resistente, permitiu a identificação de genes alterados tanto para as amostras de pacientes, quanto para a linhagem celular estabelecida. Com o *screening* do perfil metabólico de um painel de linhagens comerciais de melanoma, observamos que algumas não alteram o seu perfil metabólico com a resistência ao vemurafenibe, enquanto a linhagem SK-MEL-19 resistente ao vemurafenibe demonstrou ter um perfil mais oxidativo, com ativação da via da glutaminólise, utilizando a glutamina como fonte energética na resistência. Além disto, o *knockdown* do gene *GLS*, que codifica uma importante enzima da via da glutamina, demonstrou ser capaz de inibir a agressividade das células.

A avaliação do perfil metabólico por imunohistoquímica de amostras de pacientes com melanoma, pré e pós-tratamento com vemurafenibe, não demonstrou diferenças estatisticamente significativas, dado o reduzido número de casos obtidos. Contudo, foi observada perda de expressão de GLUT1, CA9 e MCT1 em alguns pacientes, caracterizando uma diminuição do metabolismo glicolítico. O GLUT1 é responsável pelo transporte de glicose para o interior das células<sup>113</sup>, enquanto a CA9, enzima localizada na membrana celular, está envolvida na regulação do pH em microambiente hipóxico de tumores sólidos<sup>114</sup>. Os transportadores de monocarboxilato (MCTs), especificamente o MCT1, desempenha um papel essencial na reprogramação metabólica das células tumorais, contribuindo tanto para o fenótipo hiperglicolítico, quanto para a resistência ao microambiente ácido das células tumorais, por mediar o efluxo de lactato e próton para o meio extracelular<sup>115</sup>. Assim, o resultado de diminuição da expressão destas proteínas em amostras obtidas após tratamento com vemurafenibe está de acordo com a literatura, que descreve que em células de melanoma resistente ao vemurafenibe ocorre um aumento no metabolismo da glutamina, estando, em alguns casos, associado a uma diminuição no metabolismo glicolítico<sup>99, 101</sup>. Porém, foi também observado neste estudo um ganho de expressão de HK2 (apenas um paciente) e não se observaram diferenças na expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo da glutamina, ao contrário do que seria esperado. Já na avaliação da expressão de um painel de genes

relacionados ao perfil metabólico nas amostras humanas, foi observado um aumento na expressão dos genes *PDK2*, *PDK3*, *PLD1*, *PRKAA2* e *RBKS* e menor expressão de *ALDOC*, *ENO1*, *GYS1*, *HK2*, *IDH2*, *NTRK3*, *RPIA* e *RPS6KB2* nas amostras de melanoma resistentes ao vemurafenibe. A linhagem SK-MEL-19 PLX R demonstrou aumento na expressão de *HIF1A*, *PDHA1*, *FASN* e *PDK3* com diminuição em *SLC7A11* e *SP1* em comparação a parental. De forma geral, estes genes alterados relacionam-se ao metabolismo da glicose, ao metabolismo de carbono, à via da mTOR e à sinalização associada à hipóxia. Interessantemente, o aumento na expressão do gene *PDK3* na resistência ao vemurafenibe foi observado tanto nas amostras dos pacientes quanto na linhagem estabelecida. As piruvato desidrogenase quinases (PDK) são enzimas que, por fosforilação, inibem a piruvato desidrogenase (PDH), enzima responsável pela conversão de piruvato em acetil-CoA na mitocôndria. Assim, a atividade de PDK desvia o metabolismo para a produção de lactato, estando envolvida nas alterações metabólicas das células tumorais<sup>116, 117</sup>. A *PDK2*, em condições de hipóxia, é um regulador chave da glicólise e da oxidação fosforilação, e a sua expressão está aumentada em diversos tumores, incluindo glioma, câncer de cólon e câncer de pulmão<sup>118-120</sup>, bem como melanoma, no qual a expressão está associada à via de mTOR e é independente da mutação em *BRAF*<sup>121</sup>. A *PDK3* está envolvida na reprogramação metabólica induzida por hipóxia e na sobrevivência das células tumorais<sup>74-76</sup>, sendo que a sua inibição, em condições de hipóxia, é capaz de reduzir a sobrevivência celular, diminuir a produção de lactato induzida pela hipóxia e diminuir a resistência aos quimioterápicos<sup>76</sup>. Assim, a *PDK3* está superexpressa em vários tumores, sendo correlacionada com a progressão tumoral e apontada como um potencial alvo de inibição por drogas, incluindo em melanoma metastático<sup>120-122</sup>, no entanto, não existem estudos que sugerem uma contribuição desta proteína no contexto da resistência ao vemurafenibe. Estudos adicionais, avaliando o efeito da inibição desta proteína em linhagens celulares e modelos *in vivo* de resistência ao vemurafenibe, auxiliarão no entendimento do possível papel da *PDK3* na resistência do melanoma ao vemurafenibe. Sendo assim, mediante os resultados obtidos neste trabalho, apesar de a expressão de *PDK3* na linhagem SK-MEL-19 resistente não ser estatisticamente significativa, porém sugerindo um aumento na sua expressão em comparação com a linhagem parental, estudos adicionais com o objetivo de esclarecer o papel desta proteína na resistência ao vemurafenibe serão desenvolvidos, passando por análise da expressão proteica por imunocitoquímica, que permite avaliar a

localização e expressão de PDK3, além de avaliação do impacto do silenciamento por siRNA do gene *PDK3* nos parâmetros de agressividade da linhagem resistente.

A análise do perfil metabólico de linhagens celulares comerciais de melanoma permitiu observar que a linhagem de melanoma SK-MEL-19 PLX R apresenta um perfil metabólico preferencialmente oxidativo, em relação às demais linhagens e sua respectiva parental, com redução na expressão de GLUT1, HK2 (que participa na fosforilação da glicose para produzir glicose-6-fosfato, primeira etapa da via glicolítica<sup>113</sup>), CA9 e MCT1, assim como aumento na expressão de GLS, uma amidohidrolase ativada por fosfato que catalisa a hidrólise da glutamina em glutamato e amônia, e de GLUD1/2, responsáveis pela conversão do glutamato em  $\alpha$ -cetoglutarato, que reflete um aumento na glutaminólise<sup>123</sup>.

Considerando esta mudança metabólica da glicólise para a glutaminólise na resistência ao vemurafenibe, era esperada uma diminuição no consumo de glicose das linhagens resistentes. De fato, células de melanoma resistentes a inibidores de BRAF apresentam aumento da massa mitocondrial e aumento da respiração oxidativa, acompanhados por uma diminuição no consumo de glicose<sup>101</sup>. No entanto, no presente estudo, as linhagens celulares resistentes ao vemurafenibe, com exceção da A375R, mostraram um aumento importante no consumo de glicose, o que merece mais estudos para elucidar os mecanismos por trás dessa adaptação metabólica. Em todas as linhagens celulares estudadas, a produção de lactato foi aumentada no contexto da resistência ao vemurafenibe, o que está de acordo com o lactato sendo, além do produto final da glicólise aeróbica, o produto final do metabolismo da glutamina. Curiosamente, o metabolismo da glutamina também é capaz de fornecer às células uma fonte robusta de NADPH, resultando na maior parte do carbono derivado da glutamina sendo secretado como lactato, além da secreção de nitrogênio como amônia e alanina. Já os intermediários derivados de glicose podem ser desviados para precursores de macromoléculas, como acetil-CoA, ácidos graxos, aminoácidos não essenciais e ribose para a síntese de nucleotídeos, como demonstrado em medições de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C em células de glioblastoma, que foram capazes de converter até 90% da glicose e 60% da glutamina que adquirem em lactato ou alanina<sup>124</sup>.

Para a síntese de ácidos graxos, a maior parte do carbono utilizado vem da glicose. Como as células de melanoma possuem mitocôndrias totalmente funcionais, que podem metabolizar carbonos derivados de glutamina e glicose para fins anabólicos<sup>125</sup>, a glicose é convertida em acetil-CoA no citoplasma e utilizada para a síntese de citrato no ciclo do TCA.



Sob condições de alta disponibilidade de ATP/ADP e NADH/NAD<sup>+</sup>, exibidas na maioria das células em proliferação, esse citrato é excretado no citosol, onde ocorre a síntese de lipídios. No citoplasma, o acetil-CoA é produzido a partir do citrato e utilizado como fonte de carbono para formar cadeias acil<sup>126</sup>. A captação de glutamina também parece ser crítica para a síntese de lipídios, pois fornece carbono na forma de oxaloacetato mitocondrial para manter a produção de citrato na primeira etapa do ciclo do TCA<sup>124</sup>. Assim, o metabolismo da glutamina e da glicose são orquestrados para apoiar a produção de acetil-CoA e NADPH necessários para a síntese de ácidos graxos, e o fluxo de intermediários metabólicos para síntese de ácidos nucleicos e aminoácidos deve ser igualmente equilibrado<sup>127</sup>, a fim de sustentar a proliferação celular, como vimos em nas linhagens resistentes um maior consumo de glicose e produção de lactato, bem como expressão de marcadores relacionados à glutaminólise.

A glutamina tem sido um dos nutrientes amplamente estudados no campo do metabolismo das células tumorais, pois tem um papel central na proliferação celular devido ao seu papel em inúmeros processos biológicos, incluindo biossíntese e bioenergética, defesa antioxidante, modificação da cromatina/transcrição de genes, facilitando o transporte de outros aminoácidos através da membrana plasmática e regulando a sinalização celular<sup>128</sup>. Além disso, células de melanoma resistentes a vemurafenibe, bem como modelos de dupla resistência, vemurafenibe/selumetinibe (inibidor de MEK) apresentam dependência da glutamina e inibição do seu metabolismo, têm se mostrado promissores para o tratamento de tumores com resistência simples ou dupla<sup>102</sup>. Assim, no presente estudo, o silenciamento do gene *GLS* na linhagem SK-MEL-19 PLX R, que foi a linhagem celular com expressão mais significativa de proteínas relacionadas às alterações no perfil metabólico da glicólise para a glutaminólise na resistência ao vemurafenibe, induziu diminuição na proliferação e invasão celular. O aumento da via da glutamina pode conferir maior capacidade de invasão às células tumorais, como relatado para câncer de ovário, com células de maior capacidade invasiva sendo dependentes da glutamina para sua sobrevivência<sup>129</sup>. De acordo, células de melanoma resistentes têm se mostrado mais invasivas do que aquelas sensíveis ao inibidor de BRAF<sup>130</sup>, sugerindo que estas células utilizam a glutamina não apenas para sustentar a proliferação, mas também para outras características do câncer, como invasão e metástase. O aumento do metabolismo oxidativo nas células resistentes, o que as torna mais dependentes da glutamina sobre a glicose para proliferação celular, faz com que estas células se tornem também mais sensíveis aos inibidores mitocondriais e inibidores da glutaminólise, como o BPTES (BPTES-Bis-

2-(5-fenilacetamido-1,2,4-tiadiazol-2-il) sulfeto de etila)<sup>101</sup>. De fato, estudos com o BPTES, uma pequena molécula inibidora de GLS, mostram que este inibidor diminui significativamente o crescimento de xenoinxertos em camundongos e a proliferação de células tumorais *in vitro* em vários tipos de neoplasias, incluindo linfomas, câncer de mama e gliomas<sup>131-135</sup>. No melanoma, o BPTES suprimiu o surgimento de resistência ao vemurafenibe e foi capaz de melhorar a atividade antitumoral do vemurafenibe em xenoinxertos utilizando a linhagem celular A375, induzindo regressão tumoral<sup>101</sup>.

Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que o GLS pode ser um alvo promissor a ser explorado em melanomas resistentes ao vemurafenibe, no entanto, algumas limitações devem ser consideradas. Em primeiro lugar, estudos adicionais precisam ser realizados para elucidar a contribuição do vemurafenibe no efeito do *knockdown* de *GLS*, pois diferentes respostas foram observadas na presença e ausência de vemurafenibe, com um efeito aparentemente mais pronunciado na presença de vemurafenibe, sugerindo um possível benefício do tratamento combinado. Além disso, o presente estudo se concentrou em vias metabólicas específicas, sendo o metabolismo do câncer muito complexo. De fato, o impacto do *knockdown* de *GLS* nas células de melanoma resistentes ao vemurafenibe não foi drástico, indicando que outras vias estão sendo usadas pelas células para manter sua sobrevivência. Assim, uma abordagem mais ampla contribuirá para o entendimento das necessidades metabólicas das células de melanoma na resistência ao vemurafenibe. Por fim, o presente estudo utilizou de uma abordagem *in vitro*, enquanto explorar o impacto do *knockdown* do gene *GLS* em modelos *in vivo* seria de grande importância para validar estes achados.

## 8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo e de acordo com os objetivos propostos, foi verificado que amostras de pacientes com melanoma resistente ao vemurafenibe apresentam expressão diferencial em 13 genes, relacionados com o metabolismo da glicose e via mTOR. Demonstrou-se ainda que a linhagem de melanoma SK-MEL-19 PLX R apresentou um painel de 23 genes diferencialmente expressos, quando comparada à linhagem parental, entre eles genes envolvidos no metabolismo da glicose, de carbono, metabolismo da glutamina, via mTOR e sinalização associada à hipóxia. Já a triagem de um painel de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico e da glutamina em linhagens celulares de melanoma, parentais e resistentes ao vemurafenibe, mostrou uma mudança do metabolismo da glicose para a glutamina na resistência ao vemurafenibe, de acordo com relatos anteriores da literatura. De notar, o *knockdown* de *GLS* induzido por siRNA levou a uma diminuição da proliferação celular, da formação de colônias e da invasão de células de melanoma resistentes ao vemurafenibe, sugerindo que esta proteína contribui para o fenótipo agressivo e pode ser um alvo terapêutico promissor para o tratamento de pacientes com melanoma resistente ao vemurafenibe.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. **CA Cancer J Clin**. 2021;71(3):209-49.
2. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. *Cancer statistics, 2022*. **CA Cancer J Clin**. 2022;72(1):7-33.
3. INCA. *Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil /Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva*. **Rio de Janeiro**.2019.
4. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. **In Vivo**. 2014;28(6):1005-11.
5. Demierre MF. *Epidemiology and prevention of cutaneous melanoma*. **Curr Treat Options Oncol**. 2006;7(3):181-6.
6. Michaloglou C, Vredeveld LC, Soengas MS, Denoyelle C, Kuilman T, van der Horst CM, et al. *BRAF600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi*. **Nature**. 2005;436(7051):720-4.
7. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. *High frequency of BRAF mutations in nevi*. **Nat Genet**. 2003;33(1):19-20.
8. Jansen P, Cosgarea I, Murali R, Möller I, Sucker A, Franklin C, et al. *Frequent Occurrence of NRAS and BRAF Mutations in Human Acral Naevi*. **Cancers (Basel)**. 2019;11(4).
9. Krengel S, Scope A, Dusza SW, Vonthein R, Marghoob AA. *New recommendations for the categorization of cutaneous features of congenital melanocytic nevi*. **J Am Acad Dermatol**. 2013;68(3):441-51.
10. Martins da Silva V, Martinez-Barrios E, Tell-Martí G, Dabad M, Carrera C, Aguilera P, et al. *Genetic Abnormalities in Large to Giant Congenital Nevi: Beyond NRAS Mutations*. **J Invest Dermatol**. 2019;139(4):900-8.
11. Polubothu S, McGuire N, Al-Olabi L, Baird W, Bulstrode N, Chalker J, et al. *Does the gene matter? Genotype-phenotype and genotype-outcome associations in congenital melanocytic naevi*. **Br J Dermatol**. 2020;182(2):434-43.
12. Kinsler VA, O'Hare P, Bulstrode N, Calonje JE, Chong WK, Hargrave D, et al. *Melanoma in congenital melanocytic naevi*. **Br J Dermatol**. 2017;176(5):1131-43.
13. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H. *Cutaneous melanomas associated with nevi*. **Arch Dermatol**. 2003;139(12):1620-4; discussion 4.
14. /z-wcorg/. James WDBTGEDMORB. *Andrews' diseases of the skin : clinical dermatology*. **Philadelphia: Saunders Elsevier**; 2006.
15. Shain AH, Bastian BC. *From melanocytes to melanomas*. **Nat Rev Cancer**. 2016;16(6):345-58.

16. Merlino G, Herlyn M, Fisher DE, Bastian BC, Flaherty KT, Davies MA, et al. *The state of melanoma: challenges and opportunities*. **Pigment Cell & Melanoma Research**. 2016;29(4):404-16.
17. Miller AJ, Mihm MC. *Melanoma*. **New England Journal of Medicine**. 2006;355(1):51-65.
18. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. *Distinct sets of genetic alterations in melanoma*. **N Engl J Med**. 2005;353(20):2135-47.
19. Bastian BC. *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia*. **Annu Rev Pathol**. 2014;9:239-71.
20. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. *The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions*. **N Engl J Med**. 2015;373(20):1926-36.
21. Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, et al. *Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma*. **Cancer Research**. 2004;64(19):7002-10.
22. Stark M, Hayward N. *Genome-wide loss of heterozygosity and copy number analysis in melanoma using high-density single-nucleotide polymorphism arrays*. **Cancer Res**. 2007;67(6):2632-42.
23. Lo JA, Fisher DE. *The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics*. **Science**. 2014;346(6212):945-9.
24. Furge KA, Kiewlich D, Le P, Vo MN, Faure M, Howlett AR, et al. *Suppression of Ras-mediated tumorigenicity and metastasis through inhibition of the Met receptor tyrosine kinase*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001;98(19):10722-7.
25. Bardeesy N, Kim M, Xu J, Kim R-S, Shen Q, Bosenberg MW, et al. *Role of Epidermal Growth Factor Receptor Signaling in RAS-Driven Melanoma*. 2005;25(10):4176-88.
26. Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC. *Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma*. **J Clin Oncol**. 2006;24(26):4340-6.
27. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. *Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis*. **Cancer Discov**. 2013;3(3):338-49.
28. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, et al. *Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi*. **Nature**. 2009;457(7229):599-602.
29. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. **Nature**. 2002;417(6892):949-54.
30. Barlesi F, Blons H, Beau-Faller M, Rouquette I, Ouafik Lh, Mosser J, et al. *Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (pts)*. **Journal of Clinical Oncology**. 2013;31(15\_suppl):8000-.
31. Goydos JS, Mann B, Kim HJ, Gabriel EM, Alsina J, Germino FJ, et al. *Detection of *BRAF* and *N-RAS* mutations in human melanoma*. **Journal of the American College of Surgeons**. 2005;200(3):362-70.

32. Anderson S, Bloom KJ, Valleria DU, Rueschoff J, Meldrum C, Schilling R, et al. *Multisite Analytic Performance Studies of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of BRAF V600E Mutations in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Specimens of Malignant Melanoma*. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. 2012;136(11):1385-91.
33. Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, Gast A, Sucker A, Mueller-Berghaus J, et al. *B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis*. **PLoS One**. 2007;2(2):e236.
34. Goydos JS, Mann B, Kim HJ, Gabriel EM, Alsina J, Germino FJ, et al. *Detection of B-RAF and N-RAS mutations in human melanoma*. **J Am Coll Surg**. 2005;200(3):362-70.
35. PMC. Shtivelman E, Davies MA, Hwu P, Yang J, Lotem M, Oren M, et al. *Pathways and therapeutic targets in melanoma*. **Oncotarget**. 2014;5(7):1701-52.
36. Hugdahl E, Kalvenes MB, Mannelqvist M, Ladstein RG, Akslen LA. *Prognostic impact and concordance of TERT promoter mutation and protein expression in matched primary and metastatic cutaneous melanoma*. **Br J Cancer**. 2018;118(1):98-105.
37. Thomas NE, Edmiston SN, Tsai YS, Parker JS, Googe PB, Busam KJ, et al. *Utility of TERT Promoter Mutations for Cutaneous Primary Melanoma Diagnosis*. **Am J Dermatopathol**. 2019;41(4):264-72.
38. Aguisa-Touré A-H, Li G. *Genetic alterations of PTEN in human melanoma*. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 2012;69(9):1475-91.
39. Eddy K, Chen S. *Overcoming Immune Evasion in Melanoma*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(23).
40. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, et al. *Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008;105(8):3041-6.
41. Bollag G, Tsai J, Zhang J, Zhang C, Ibrahim P, Nolop K, et al. *Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer*. **Nat Rev Drug Discov**. 2012;11(11):873-86.
42. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J. *Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations*. **N Engl J Med**. 2012;367.
43. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, et al. *Survival in BRAF V600-Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib*. **New England Journal of Medicine**. 2012;366(8):707-14.
44. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. *Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma*. **New England Journal of Medicine**. 2014;371(20):1877-88.
45. Chowdhary M, Patel KR, Danish HH, Lawson DH, Khan MK. *BRAF inhibitors and radiotherapy for melanoma brain metastases: potential advantages and disadvantages of combination therapy*. **Onco Targets Ther**. 2016;9:7149-59.

46. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, et al. *Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2008;105(8):3041-6.
47. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. *Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma*. **New England Journal of Medicine**. 2010;363(9):809-19.
48. PMC. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. *Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by co-targeting MEK and IGF-1R/PI3K*. **Cancer cell**. 2010;18(6):683-95.
49. PMC. Shi H, Kong X, Ribas A, Lo Rs. *Combinatorial treatments that overcome PDGFR $\beta$ -driven resistance of melanoma cells to (V600E)B-RAF inhibition*. **Cancer research**. 2011;71(15):5067-74.
50. PMC. Ng Y-K, Lee J-Y, Supko KM, Khan A, Torres SM, Berwick M, et al. *Pan-erbB inhibition potentiates BRAF inhibitors for melanoma treatment*. **Melanoma research**. 2014;24(3):207-18.
51. Wang J, Sinnberg T, Niessner H, Dölker R, Sauer B, Kempf WE, et al. *PTEN regulates IGF-1R-mediated therapy resistance in melanoma*. **Pigment Cell & Melanoma Research**. 2015;28(5):572-89.
52. Kidger AM, Siphthorp J, Cook SJ. *ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway*. **Pharmacology & Therapeutics**. 2018;187:45-60.
53. Müller J, Krijgsman O, Tsoi J, Robert L, Hugo W, Song C, et al. *Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma*. **Nature Communications**. 2014;5:5712.
54. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. *Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib*. **New England Journal of Medicine**. 2014;372(1):30-9.
55. Faiao-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, Sandri S, Vicente ALSA, Scapulatempo-Neto C, et al. *Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells*. **Oncogene**. 2016;36(13):1849-61.
56. Sandri S, Faião-Flores F, Tiago M, Pennacchi PC, Massaro RR, Alves-Fernandes DK, et al. *Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation*. **Pharmacological Research**. 2016;111:523-33.
57. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. *MAPK pathway in melanoma part II- secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition*. **European Journal of Cancer**. 2017;73:93-101.
58. Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. *Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes*. **Nature**. 2013;499(7457):214-8.
59. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B, Schadendorf D. *Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions*. **Eur J Surg Oncol**. 2017;43(3):604-11.

60. Bagchi S, Yuan R, Engleman EG. *Immune Checkpoint Inhibitors for the Treatment of Cancer: Clinical Impact and Mechanisms of Response and Resistance*. **Annu Rev Pathol**. 2021;16:223-49.
61. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, Ascierto PA, Matamala L, Castillo Gutiérrez E, et al. *Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma*. **N Engl J Med**. 2022;386(1):24-34.
62. Olbryt M, Rajczykowski M, Widłak W. *Biological Factors behind Melanoma Response to Immune Checkpoint Inhibitors*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(11).
63. Kim J, DeBerardinis RJ. *Mechanisms and Implications of Metabolic Heterogeneity in Cancer*. **Cell Metab**. 2019;30(3):434-46.
64. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation*. 2009;324(5930):1029-33.
65. Warburg O. *On the Origin of Cancer Cells*. **Science**. 1956;123(3191):309-14.
66. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. *The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation*. **Cell Metabolism**. 2008;7(1):11-20.
67. PMC. Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZeA, et al. *Comparative Metabolic Flux Profiling of Melanoma Cell Lines: BEYOND THE WARBURG EFFECT*. **The Journal of Biological Chemistry**. 2011;286(49):42626-34.
68. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. *Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress*. **Molecular Cell**. 2010;40(2):294-309.
69. Tatum JL, Kelloff GJ, Gillies RJ, Arbeit JM, Brown JM, Chao KS, et al. *Hypoxia: importance in tumor biology, noninvasive measurement by imaging, and value of its measurement in the management of cancer therapy*. **Int J Radiat Biol**. 2006;82(10):699-757.
70. Lunt SJ, Chaudary N, Hill RP. *The tumor microenvironment and metastatic disease*. **Clin Exp Metastasis**. 2009;26(1):19-34.
71. Bertout JA, Patel SA, Simon MC. *The impact of O<sub>2</sub> availability on human cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2008;8(12):967-75.
72. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. *Regulation of cancer cell metabolism*. **Nat Rev Cancer**. 2011;11(2):85-95.
73. Semenza GL. *HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism*. **Curr Opin Genet Dev**. 2010;20(1):51-6.
74. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption*. **Cell Metab**. 2006;3(3):187-97.
75. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. **Cell Metab**. 2006;3(3):177-85.



76. Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ. *Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance.* **J Biol Chem.** 2008;283(42):28106-14.
77. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. *HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption.* **Cell Metabolism.** 2006;3(3):187-97.
78. Plas DR, Thompson CB. *Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving.* **Oncogene.** 2005;24(50):7435-42.
79. Kapitsinou PP, Haase VH. *The VHL tumor suppressor and HIF: insights from genetic studies in mice.* **Cell Death Differ.** 2008;15(4):650-9.
80. Kaelin WG, Jr. *The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O<sub>2</sub> sensing and cancer.* **Nat Rev Cancer.** 2008;8(11):865-73.
81. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, et al. *Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase.* **Cancer Cell.** 2005;7(1):77-85.
82. King A, Selak MA, Gottlieb E. *Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer.* **Oncogene.** 2006;25(34):4675-82.
83. Nagarajan A, Malvi P, Wajapeyee N. *Oncogene-directed alterations in cancer cell metabolism.* **Trends Cancer.** 2016;2(7):365-77.
84. Filipp FV, Scott DA, Ronai ZeA, Osterman AL, Smith JW. *Reverse TCA cycle flux through isocitrate dehydrogenases 1 and 2 is required for lipogenesis in hypoxic melanoma cells.* **Pigment Cell & Melanoma Research.** 2012;25(3):375-83.
85. PubMed. Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, et al. *Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases.* **British journal of cancer.** 2001;84(1):72-9.
86. Dang Chi V. *MYC on the Path to Cancer.* **Cell.** 2012;149(1):22-35.
87. Wang Q, Beaumont KA, Otte NJ, Font J, Bailey CG, van Geldermalsen M, et al. *Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth.* **International Journal of Cancer.** 2014;135(5):1060-71.
88. PubMed. Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang X-Y, Pfeiffer HK, et al. *Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction.* **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 2008;105(48):18782-7.
89. Kraehn GM, Utikal J, Udart M, Greulich KM, Bezold G, Kaskel P, et al. *Extra c-myc oncogene copies in high risk cutaneous malignant melanoma and melanoma metastases.* **Br J Cancer.** 2001;84(1):72-9.

90. Bettum IJ, Gorad SS, Barkovskaya A, Pettersen S, Moestue SA, Vasiliauskaite K, et al. *Metabolic reprogramming supports the invasive phenotype in malignant melanoma*. **Cancer Letters**. 2015;366(1):71-83.
91. Kumar SM, Yu H, Edwards R, Chen L, Kazianis S, Brafford P, et al. *Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma*. **Cancer Res**. 2007;67(7):3177-84.
92. Zerilli M, Zito G, Martorana A, Pitrone M, Cabibi D, Cappello F, et al. *BRAFV600E mutation influences hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression levels in papillary thyroid cancer*. **Modern Pathology**. 2010;23:1052.
93. Hall A, Meyle KD, Lange MK, Klima M, Sanderhoff M, Dahl C, et al. *Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600EBRAF oncogene*. 2013;4(4).
94. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S. *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. **Nature**. 2002;417.
95. Philippe M, Pierre G, Jerome K, Laurent M. *Metabolic Features of Melanoma: A Gold Mine of New Therapeutic Targets?* **Current Cancer Drug Targets**. 2014;14(4):357-70.
96. Hosseini M, Kasraian Z, Rezvani HR. *Energy metabolism in skin cancers: A therapeutic perspective*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**. 2017;1858(8):712-22.
97. Hall A, Meyle KD, Lange MK, Klima M, Sanderhoff M, Dahl C, et al. *Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the (V600E)BRAF oncogene*. **Oncotarget**. 2013;4(4):584-99.
98. Wang Q, Beaumont KA, Otte NJ, Font J, Bailey CG, Geldermalsen M. *Targeting glutamine transport to suppress melanoma cell growth*. **Int J Cancer J Int du Cancer**. 2014;135.
99. Hardeman KN, Peng C, Paudel BB, Meyer CT, Luong T, Tyson DR, et al. *Dependence On Glycolysis Sensitizes BRAF-mutated Melanomas For Increased Response To Targeted BRAF Inhibition*. **Sci Rep**. 2017;7:42604.
100. Ratnikov BI, Scott DA, Osterman AL, Smith JW, Ronai ZA. *Metabolic rewiring in melanoma*. **Oncogene**. 2017;36(2):147-57.
101. Baenke F, Chaneton B, Smith M, Van Den Broek N, Hogan K, Tang H, et al. *Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells*. **Mol Oncol**. 2016;10(1):73-84.
102. Hernandez-Davies JE, Tran TQ, Reid MA, Rosales KR, Lowman XH, Pan M, et al. *Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence*. **J Transl Med**. 2015;13:210.
103. Tang T, Eldabaje R, Yang L. *Current Status of Biological Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma*. **Anticancer Res**. 2016;36(7):3229-41.
104. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Scapulatempo C, Ferreira L, Martins S, Pellerin L, et al. *Increased expression of monocarboxylate transporters 1, 2, and 4 in colorectal carcinomas*. **Virchows Archiv**. 2008;452(2):139-46.

105. Hicks SC, Irizarry RA. *quantro: a data-driven approach to guide the choice of an appropriate normalization method*. **Genome Biol.** 2015;16(1):117.
106. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. *NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data*. **Bioinformatics.** 2012;28(11):1546-8.
107. Gu Z, Eils R, Schlesner M. *Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data*. **Bioinformatics.** 2016;32(18):2847-9.
108. Dirks WG, Faehnrich S, Estella IA, Drexler HG. *Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines*. **ALTEX.** 2005;22(2):103-9.
109. Silva-Oliveira RJ, Silva VA, Martinho O, Cruvinel-Carloni A, Melendez ME, Rosa MN, et al. *Cytotoxicity of allitinib, an irreversible anti-EGFR agent, in a large panel of human cancer-derived cell lines: KRAS mutation status as a predictive biomarker*. **Cell Oncol (Dordr).** 2016;39(3):253-63.
110. Miranda-Gonçalves V, Honavar M, Pinheiro C, Martinho O, Pires MM, Pinheiro C, et al. *Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets*. **Neuro Oncol.** 2013;15(2):172-88.
111. Morais-Santos F, Miranda-Gonçalves V, Pinheiro S, Vieira AF, Paredes J, Schmitt FC, et al. *Differential sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines*. **Endocr Relat Cancer.** 2014;21(1):27-38.
112. Geissmann Q. *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects*. **PLoS One.** 2013;8(2):e54072.
113. Zhu J, Thompson CB. *Metabolic regulation of cell growth and proliferation*. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 2019;20(7):436-50.
114. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. *Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy*. **Nat Rev Cancer.** 2013;13(9):611-23.
115. Chiche J, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. *Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer*. **J Cell Mol Med.** 2010;14(4):771-94.
116. Gudi R, Bowker-Kinley MM, Kedishvili NY, Zhao Y, Popov KM. *Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans*. **J Biol Chem.** 1995;270(48):28989-94.
117. Korotchikina LG, Patel MS. *Site specificity of four pyruvate dehydrogenase kinase isoenzymes toward the three phosphorylation sites of human pyruvate dehydrogenase*. **J Biol Chem.** 2001;276(40):37223-9.
118. Sutendra G, Dromparis P, Kinnaird A, Stenson TH, Haromy A, Parker JM, et al. *Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer*. **Oncogene.** 2013;32(13):1638-50.

119. Jha MK, Suk K. *Pyruvate dehydrogenase kinase as a potential therapeutic target for malignant gliomas*. **Brain Tumor Res Treat**. 2013;1(2):57-63.
120. Lu CW, Lin SC, Chien CW, Lin SC, Lee CT, Lin BW, et al. *Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 3 increases drug resistance and early recurrence in colon cancer*. **Am J Pathol**. 2011;179(3):1405-14.
121. Pópulo H, Caldas R, Lopes JM, Pardal J, Máximo V, Soares P. *Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase supports dichloroacetate as a candidate for cutaneous melanoma therapy*. **Expert Opin Ther Targets**. 2015;19(6):733-45.
122. Kluza J, Corazao-Rozas P, Touil Y, Jendoubi M, Maire C, Guerreschi P, et al. *Inactivation of the HIF-1 $\alpha$ /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants*. **Cancer Res**. 2012;72(19):5035-47.
123. Jin L, Alesi GN, Kang S. *Glutaminolysis as a target for cancer therapy*. **Oncogene**. 2016;35(28):3619-25.
124. DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, et al. *Beyond aerobic glycolysis: Transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis*. 2007;104(49):19345-50.
125. Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, et al. *Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect*. **J Biol Chem**. 2011;286(49):42626-34.
126. Hatzivassiliou G, Zhao F, Bauer DE, Andreadis C, Shaw AN, Dhanak D, et al. *ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth*. **Cancer Cell**. 2005;8(4):311-21.
127. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. **Science**. 2009;324(5930):1029-33.
128. González A, Hall MN. *Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals*. **Embo j**. 2017;36(4):397-408.
129. Yang L, Moss T, Mangala LS, Marini J, Zhao H, Wahlig S, et al. *Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer*. **Mol Syst Biol**. 2014;10(5):728.
130. Sanchez-Laorden B, Viros A, Girotti MR, Pedersen M, Saturno G, Zambon A, et al. *BRAF Inhibitors Induce Metastasis in RAS Mutant or Inhibitor-Resistant Melanoma Cells by Reactivating MEK and ERK Signaling*. 2014;7(318):ra30-ra.
131. Robinson Mary M, Mcbryant Steven J, Tsukamoto T, Rojas C, Ferraris Dana V, Hamilton Sean K, et al. *Novel mechanism of inhibition of rat kidney-type glutaminase by bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide (BPTES)*. **Biochemical Journal**. 2007;406(3):407-14.
132. Seltzer MJ, Bennett BD, Joshi AD, Gao P, Thomas AG, Ferraris DV, et al. *Inhibition of Glutaminase Preferentially Slows Growth of Glioma Cells with Mutant IDH1*. **Cancer Research**. 2010;70(22):8981-7.

133. Le A, Lane AN, Hamaker M, Bose S, Gouw A, Barbi J, et al. *Glucose-independent glutamine metabolism via TCA cycling for proliferation and survival in B cells*. **Cell Metab**. 2012;15(1):110-21.
134. Thangavelu K, Pan CQ, Karlberg T, Balaji G, Uttamchandani M, Suresh V, et al. *Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism*. 2012;109(20):7705-10.
135. Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, et al. *Design, Synthesis, and Pharmacological Evaluation of Bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl Sulfide 3 (BPTES) Analogs as Glutaminase Inhibitors*. **Journal of Medicinal Chemistry**. 2012;55(23):10551-63.

## ANEXOS

## ANEXO 1

Tabela S1: Pannel de genes *nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel* avaliados por *NanoString*.

Gene	Nome
<i>ACO1</i>	aconitase 1, soluble
<i>ACO1</i>	aconitase 1, soluble
<i>ACO2</i>	aconitase 2, mitochondrial
<i>AKT1</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<i>AKT2</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2
<i>AKT3</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 3
<i>ALDOA</i>	aldolase A, fructose-bisphosphate
<i>ALDOB</i>	aldolase B, fructose-bisphosphate
<i>ALDOC</i>	aldolase C, fructose-bisphosphate
<i>ARNT</i>	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
<i>BECN1</i>	beclin 1, autophagy related
<i>BPGM</i>	2,3-bisphosphoglycerate mutase
<i>CAD</i>	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase
<i>CS</i>	citrate synthase
<i>DLAT</i>	dihydrolipoamide S-acetyltransferase
<i>DLD</i>	dihydrolipoamide dehydrogenase
<i>DLST</i>	dihydrolipoamide S-succinyltransferase (E2 component of 2-oxo-glutarate complex)
<i>EGF</i>	epidermal growth factor
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor
<i>EGLN1</i>	egl-9 family hypoxia-inducible factor 1
<i>EGLN2</i>	egl-9 family hypoxia-inducible factor 2
<i>EGLN3</i>	egl-9 family hypoxia-inducible factor 3
<i>EIF2AK3</i>	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3
<i>EIF2B4</i>	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta, 67kDa
<i>EIF4E2</i>	eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2
<i>EIF4EBP1</i>	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
<i>ENO1</i>	enolase 1, (alpha)
<i>ENO2</i>	enolase 2 (gamma, neuronal)
<i>ENO3</i>	enolase 3 (beta, muscle)
<i>EPAS1</i>	endothelial PAS domain protein 1
<i>ERBB2</i>	v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
<i>FASN</i>	fatty acid synthase
<i>FBP1</i>	fructose-1,6-bisphosphatase 1
<i>FGFR1</i>	fibroblast growth factor receptor 1
<i>FGFR2</i>	fibroblast growth factor receptor 2
<i>FGFR3</i>	fibroblast growth factor receptor 3
<i>FH</i>	fumarate hydratase
<i>FLT3</i>	fms-related tyrosine kinase 3
<i>FOXO3</i>	forkhead box O3
<i>G6PC</i>	glucose-6-phosphatase, catalytic subunit
<i>G6PC3</i>	glucose 6 phosphatase, catalytic, 3
<i>G6PD</i>	glucose-6-phosphate dehydrogenase

<b>GALM</b>	galactose mutarotase (aldose 1-epimerase)
<b>GBE1</b>	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1
<b>GCK</b>	glucokinase (hexokinase 4)
<b>GLS</b>	glutaminase
<b>GLS2</b>	glutaminase 2 (liver, mitochondrial)
<b>GPI</b>	glucose-6-phosphate isomerase
<b>GSK3A</b>	glycogen synthase kinase 3 alpha
<b>GYS1</b>	glycogen synthase 1 (muscle)
<b>H6PD</b>	hexose-6-phosphate dehydrogenase (glucose 1-dehydrogenase)
<b>HIF1A</b>	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)
<b>HK1</b>	hexokinase 1
<b>HK2</b>	hexokinase 2
<b>HK3</b>	hexokinase 3 (white cell)
<b>HKDC1</b>	hexokinase domain containing 1
<b>HRAS</b>	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>IDH1</b>	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble
<b>IDH2</b>	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
<b>IDH3A</b>	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) alpha
<b>IDH3B</b>	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) beta
<b>IDH3G</b>	isocitrate dehydrogenase 3 (NAD+) gamma
<b>IKBKB</b>	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase beta
<b>JUN</b>	jun proto-oncogene
<b>KIT</b>	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
<b>KRAS</b>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<b>LDHA</b>	lactate dehydrogenase A
<b>LDHB</b>	lactate dehydrogenase B
<b>MAP2K1</b>	mitogen-activated protein kinase kinase 1
<b>MAP2K2</b>	mitogen-activated protein kinase kinase 2
<b>MAPK1</b>	mitogen-activated protein kinase 1
<b>MAPK3</b>	mitogen-activated protein kinase 3
<b>MAPKAP1</b>	mitogen-activated protein kinase associated protein 1
<b>MDH1</b>	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)
<b>MDH1B</b>	malate dehydrogenase 1B, NAD (soluble)
<b>MDH2</b>	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)
<b>MET</b>	met proto-oncogene
<b>MLST8</b>	MTOR associated protein, LST8 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
<b>MTOR</b>	mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
<b>MYC</b>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<b>NOX1</b>	NADPH oxidase 1
<b>NOX3</b>	NADPH oxidase 3
<b>NOX4</b>	NADPH oxidase 4
<b>NOX5</b>	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5
<b>NOXA1</b>	NADPH oxidase activator 1
<b>NOXO1</b>	NADPH oxidase organizer 1
<b>NRAS</b>	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
<b>NTRK1</b>	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
<b>NTRK3</b>	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
<b>OAZ2</b>	ornithine decarboxylase antizyme 2

<b>OAZ3</b>	ornithine decarboxylase antizyme 3
<b>ODC1</b>	ornithine decarboxylase 1
<b>OGDH</b>	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide)
<b>PDGFA</b>	platelet-derived growth factor alpha polypeptide
<b>PDGFC</b>	platelet derived growth factor C
<b>PDGFRA</b>	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
<b>PDGFRB</b>	platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
<b>PDHA1</b>	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1
<b>PDHA2</b>	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 2
<b>PDHB</b>	pyruvate dehydrogenase (lipoamide) beta
<b>PDK1</b>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1
<b>PDK2</b>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2
<b>PDK3</b>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3
<b>PDK4</b>	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4
<b>PDP1</b>	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 1
<b>PDP2</b>	pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2
<b>PDPR</b>	pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit
<b>PFKL</b>	phosphofructokinase, liver
<b>PFKM</b>	phosphofructokinase, muscle
<b>PFKP</b>	phosphofructokinase, platelet
<b>PGAM1</b>	phosphoglycerate mutase 1 (brain)
<b>PGAM2</b>	phosphoglycerate mutase 2 (muscle)
<b>PGK1</b>	phosphoglycerate kinase 1
<b>PGLS</b>	6-phosphogluconolactonase
<b>PIK3CA</b>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
<b>PIK3CB</b>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit beta
<b>PIK3CD</b>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit delta
<b>PKLR</b>	pyruvate kinase, liver and RBC
<b>PKM</b>	pyruvate kinase, muscle
<b>PLCG1</b>	phospholipase C, gamma 1
<b>PLD1</b>	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific
<b>PLD2</b>	phospholipase D2
<b>PPARGC1A</b>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha
<b>PRKAA1</b>	protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
<b>PRKAA2</b>	protein kinase, AMP-activated, alpha 2 catalytic subunit
<b>PRKAB1</b>	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit
<b>PRKAB2</b>	protein kinase, AMP-activated, beta 2 non-catalytic subunit
<b>PRKCB</b>	protein kinase C, beta
<b>PRKCG</b>	protein kinase C, gamma
<b>PRPS1</b>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1
<b>PRPS2</b>	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 2
<b>PTEN</b>	phosphatase and tensin homolog
<b>RAC1</b>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)
<b>RAC2</b>	ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)
<b>RAF1</b>	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
<b>RBKS</b>	ribokinase
<b>RET</b>	ret proto-oncogene
<b>RICTOR</b>	RPTOR independent companion of MTOR, complex 2



<b>ROS1</b>	c-ros oncogene 1 , receptor tyrosine kinase
<b>RPE</b>	ribulose-5-phosphate-3-epimerase
<b>RPIA</b>	ribose 5-phosphate isomerase A
<b>RPS6KB1</b>	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
<b>RPS6KB2</b>	ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 2
<b>RPTOR</b>	regulatory associated protein of MTOR, complex 1
<b>SCO2</b>	SCO2 cytochrome c oxidase assembly protein
<b>SDHA</b>	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)
<b>SDHB</b>	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (Ip)
<b>SDHC</b>	succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa
<b>SDHD</b>	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein
<b>SHMT1</b>	serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)
<b>SIRT3</b>	sirtuin 3
<b>SIRT6</b>	sirtuin 6
<b>SLC16A1</b>	solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 1
<b>SLC16A3</b>	solute carrier family 16 (monocarboxylate transporter), member 3
<b>SLC1A5</b>	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5
<b>SLC25A1</b>	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; citrate transporter), member 1
<b>SLC2A1</b>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1
<b>SLC2A2</b>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2
<b>SLC2A3</b>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3
<b>SLC2A4</b>	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 4
<b>SLC38A2</b>	solute carrier family 38, member 2
<b>SLC44A4</b>	solute carrier family 44, member 4
<b>SLC5A1</b>	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1
<b>SLC5A2</b>	solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 2
<b>SLC7A11</b>	solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11
<b>SLC7A5</b>	solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5
<b>SP1</b>	Sp1 transcription factor
<b>SUCLA2</b>	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit
<b>SUCLG1</b>	succinate-CoA ligase, alpha subunit
<b>SUCLG2</b>	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit
<b>TALDO1</b>	transaldolase 1
<b>TIGAR</b>	TP53 induced glycolysis regulatory phosphatase
<b>TKT</b>	transketolase
<b>TKTL2</b>	transketolase-like 2
<b>TP53</b>	tumor protein p53
<b>TPI1</b>	triosephosphate isomerase 1
<b>TSC1</b>	tuberous sclerosis 1
<b>TSC2</b>	tuberous sclerosis 2
<b>VEGFA</b>	vascular endothelial growth factor A
<b>VHL</b>	von Hippel-Lindau tumor suppressor, E3 ubiquitin protein ligase

## ANEXO 2

Tabela S2. Housekeeping nCounter Vantage™ RNA Cancer Metabolism Panel avaliados por NanoString.

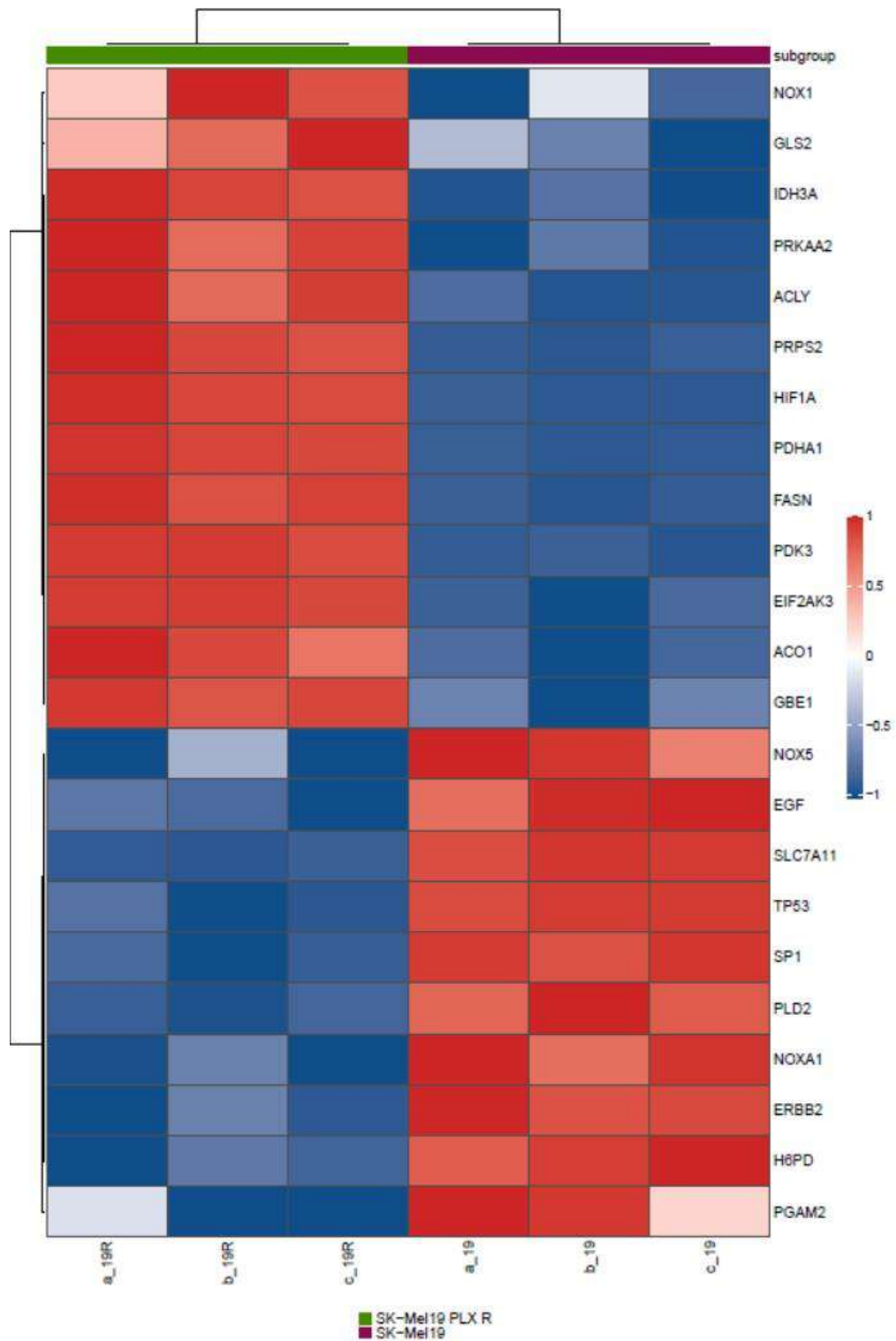
Gene	Nome
<b>CC2D1B</b>	coiled-coil and C2 domain containing 1B
<b>COG7</b>	component of oligomeric golgi complex 7
<b>EDC3</b>	enhancer of mRNA decapping 3
<b>GPATCH3</b>	G patch domain containing 3
<b>HDAC3</b>	histone deacetylase 3
<b>MTMR14</b>	myotubularin related protein 14
<b>NUBP1</b>	nucleotide binding protein 1
<b>PRPF38A</b>	pre-mRNA processing factor 38A
<b>SAP130</b>	Sin3A-associated protein, 130kDa
<b>SF3A3</b>	splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa
<b>TLK2</b>	tousled-like kinase 2
<b>ZC3H14</b>	zinc finger CCCH-type containing 14

## ANEXO 3

**Tabela S3:** Avaliação da média de escore na expressão de marcadores do metabolismo em amostras de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) o tratamento com vemurafenibe. O escore final foi definido como a soma de ambos os parâmetros (extensão e intensidade) e agrupados como negativos (escore 0 a 2) e positivos (escore 3 a 6).

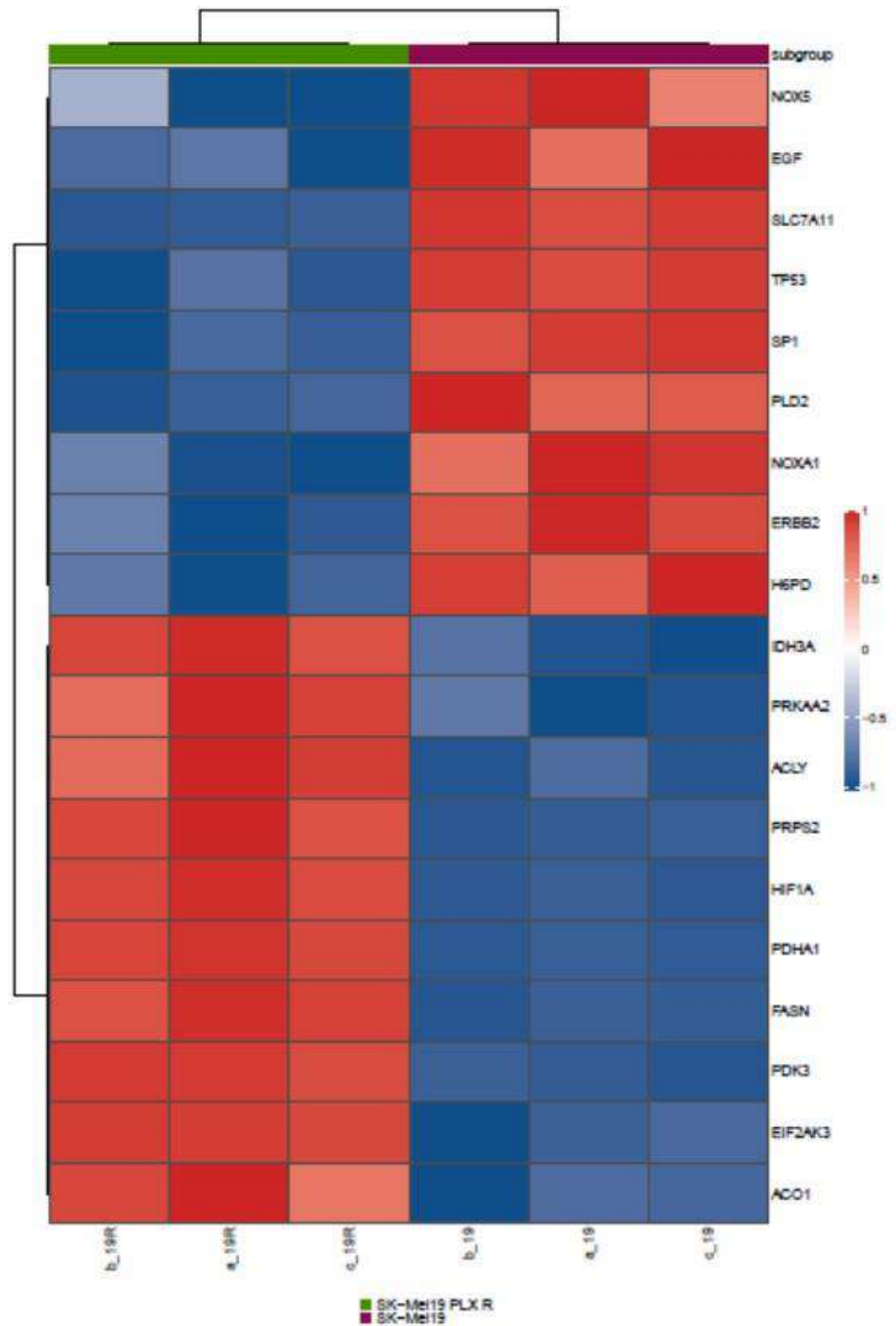
Proteína	Amostras		
	Pré-PLX	Pós-PLX	
<b>Média Escore</b>			
<b>GLUT1</b>			
	Pré-PLX	4,33	Positivo
	Pós-PLX	3,78	Positivo
<b>HK2</b>			
	Pré-PLX	4,67	Positivo
	Pós-PLX	5,00	Positivo
<b>PDK1</b>			
	Pré-PLX	4,22	Positivo
	Pós-PLX	3,78	Positivo
<b>LDHA</b>			
	Pré-PLX	5,89	Positivo
	Pós-PLX	6,00	Positivo
<b>CA9</b>			
	Pré-PLX	2,89	Positivo
	Pós-PLX	1,67	Negativo
<b>MCT1</b>			
	Pré-PLX	3,22	Positivo
	Pós-PLX	2,22	Negativo
<b>MCT4</b>			
	Pré-PLX	3,78	Positivo
	Pós-PLX	3,33	Positivo
<b>ASCT2</b>			
	Pré-PLX	4,11	Positivo
	Pós-PLX	4,56	Positivo
<b>GLUD1/2</b>			
	Pré-PLX	3,78	Positivo
	Pós-PLX	3,78	Positivo
<b>GLS</b>			
	Pré-PLX	3,56	Positivo
	Pós-PLX	2,00	Negativo

## ANEXO 4



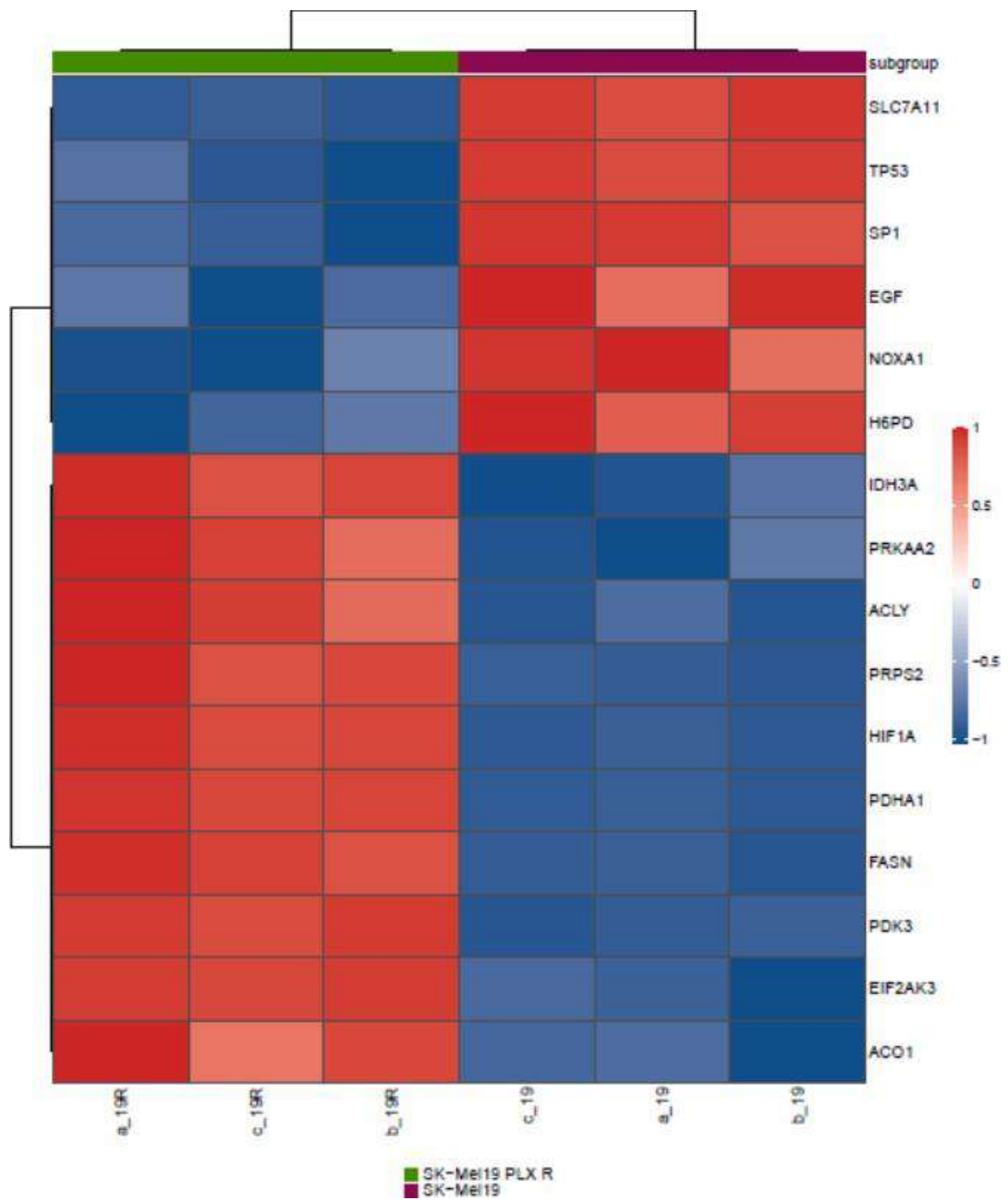
**Figura S1.** Heatmaps representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-Mel-19 resistente em comparação com parental. Dados extraídos e normalizados pelo programa Galaxy.  $p < 0,05$ . Os dados brutos foram normalizados usando os genes *housekeeping*.

## ANEXO 5



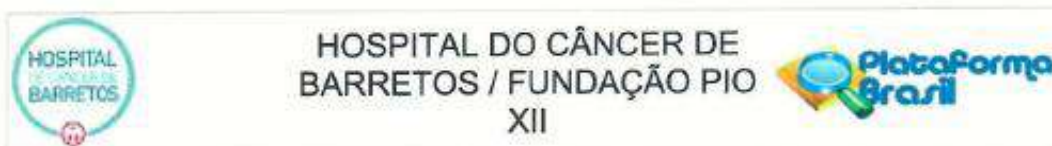
**Figura S2.** Heatmaps representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-Mel-19 resistente em comparação com parental. Dados extraídos e normalizados pelo programa Galaxy.  $p < 0,01$ . Os dados brutos foram normalizados usando os genes *housekeeping*.

## ANEXO 6



**Figura S3.** *Heatmaps* representando a expressão de mRNAs da linhagem SK-Mel-19 resistente em comparação com parental. Dados extraídos e normalizados pelo programa Galaxy.  $p < 0,001$ . Os dados brutos foram normalizados usando os genes *housekeeping*.

## ANEXO 7 – Parecer Consubstanciado do CEP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Caracterização do papel do metabolismo tumoral na resistência do melanoma humano ao vemurafenibe

**Pesquisador:** Celine Marques Pinheiro

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 74071317.0.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO  
Financiamento Próprio  
Fundação Pio XII

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.290.161

**Apresentação do Projeto:****RESUMO:**

A incidência do câncer de pele está aumentando em todo o mundo, sendo o tipo melanoma o de maior letalidade devido ao seu grande potencial metastático, com pior prognóstico. O B-RAF é um dos principais oncogenes envolvidos na tumorigênese deste tipo de tumor, estimulando fenótipos altamente proliferativos, apoiados, em grande parte, pela glicólise aeróbica, também conhecida por efeito de Warburg, além de se observar um papel importante do metabolismo da glutamina. A descoberta de inibidores de B-RAF, como o vemurafenibe, trouxe um grande avanço no tratamento deste tipo de tumor. Apesar de alta taxa de resposta, a grande maioria dos tumores desenvolvem resistência a este fármaco, aproximadamente 6 meses após o início do tratamento. Assim, a busca pelo entendimento de tamanha agressividade e resistência aos tratamentos existentes, bem como de alternativas que venham adicionar ganho na eficiência terapêutica, se fazem necessárias. Neste contexto, este projeto tem como principal objetivo a avaliação do papel do metabolismo tumoral na resistência de células de melanoma ao vemurafenibe. Para isto, serão avaliados: a) a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico e da glutamina através da técnica de imunohistoquímica, antes e após o tratamento com vemurafenibe; b) o perfil

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

**Bairro:** Dr. Paulo Prata

**CEP:** 14.784-400

**UF:** SP

**Município:** BARRETOS

**Telefone:** (17)3321-0347

**Fax:** (17)3321-6600

**E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.290.161

metabólico de linhagens parentais e resistentes ao vemurafenibe por meio de Western blotting, imunocitoquímica, bem como da quantificação do consumo de glicose e glutamina e produção de lactato; c) o efeito do tratamento combinado de vemurafenibe com inibidores de metabolismo na viabilidade, proliferação, migração e invasão celular, e capacidade de formação de colônia; d) o efeito do tratamento combinado na formação e crescimento tumoral e indução de angiogênese em modelos in vivo (membrana corioalantoide). Com a obtenção de todos estes dados, esperamos contribuir para elucidar os mecanismos utilizados pelas linhagens celulares de melanoma humano que as tornam resistentes aos atuais protocolos de tratamentos, com enfoque nas alterações metabólicas, e propor alternativas que visam ultrapassar tais mecanismos de resistência.

### INTRODUÇÃO:

O câncer de pele configura-se como um dos mais frequentes em todas as populações e se apresenta principalmente sob duas formas: o melanoma e o não melanoma. A última estimativa mundial revelou que, em 2012, 232 mil casos novos de melanoma seriam diagnosticados, dentre estes 55 mil viriam a óbito em todo o mundo. As mais altas taxas de incidência de câncer de pele, melanoma e não melanoma foram observadas em países com população caucasiana. Mais de 80% dos diagnósticos de melanomas e 65% dos óbitos por esse câncer foram verificados na Oceania, Europa e América do Norte (1). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 2 a 3 milhões de casos de câncer de pele não-melanoma e 132.000 casos de câncer de pele melanoma ocorrem globalmente a cada ano (World Health Organization). Nos Estados Unidos da América, a estimativa para o ano de 2017 é de 87.110 novos casos de melanoma diagnosticados, sendo 52.170 homens e 34.940 mulheres. Além disso, estima-se 9.730 mortes por melanoma, entre homens e mulheres (2). No Brasil, em 2016, a estimativa foi de 80.850 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 94.910 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 81,66 casos novos de câncer de pele a cada 100 mil homens e 91,98 para cada 100 mil mulheres. Quanto ao melanoma, a sua letalidade é elevada, porém, a sua incidência é baixa (3 mil casos novos em homens e 2.670 casos novos em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (1). O melanoma se origina a partir de células chamadas melanócitos, responsáveis pela produção do pigmento melanina. Geralmente, começa com o surgimento de uma pinta (nevo benigno) e está fortemente associado à exposição à radiação solar UVA e UVB. A transformação de células de melanócitos é uma das várias etapas do processo, que se inicia com a fase de crescimento horizontal ou radial, progredindo então para o fenótipo invasivo (3). De fato, o desenvolvimento do melanoma a partir de melanócitos ocorre por meio de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-8600 E-mail: [cap@hccancerbarretos.com.br](mailto:cap@hccancerbarretos.com.br)





## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.280.181

um mecanismo gradual que envolve a sucessão clonal e aquisição de alterações genéticas deletérias (4). Após a fase de crescimento vertical, as células do tumor podem invadir profundamente a derme/hipoderme e, eventualmente, penetrar o endotélio de capilares e entrar na corrente sanguínea, o que lhes permite formar metástases em órgãos distantes (3). A progressão para melanoma metastático depende de uma série complexa de acontecimentos moleculares que incluem mutações que resultam num fenótipo invasivo (5). A forte agressividade deste câncer deve-se principalmente à rápida disseminação sistêmica, à alta capacidade metastática e ao seu potencial refratário aos tratamentos antineoplásicos convencionais, que são provocados por alterações genéticas que envolvem mutações associadas ao ganho-de-função, amplificação e/ou superexpressão de oncogenes, juntamente com mutações associadas à perda-de-função, deleção e/ou silenciamento epigenético de genes supressores de tumor. Entre as alterações genéticas mais frequentes em melanoma encontram-se mutações em B-RAF (50-70% dos casos, sendo a mutação V600E a mais frequente), que codifica a proteína Serina/Treonina quinase B-RAF envolvida na transdução de sinais mitogênicos da membrana celular para o núcleo por meio da via de sinalização MAPK/ERK (Proteína quinase ativada por mitógeno/Quinases extracelular-reguladas por sinais) (6) e mutações em N-RAS (20% dos casos), que codifica a proteína G monomérica N-RAS (neuroblastoma RAS), responsável pela ativação das vias MAPK/ERK e PI3K/AKT (Fosfatidilinositol-3 quinase/Proteína quinase B) (7). Além disso, mutações no gene CDKN2A (40% dos casos) (8) e no gene PTEN (15% dos melanomas metastáticos) também são frequentes e estão fortemente associadas à progressão do melanoma (9). Em diversos tipos de tumores cancerígenos, o microambiente tumoral é pouco vascularizado, o que submete as células cancerígenas à privação de oxigênio e nutrientes, provocando alterações metabólicas para promover a sua sobrevivência e crescimento sob tais condições. A rápida proliferação aumenta a procura por energia necessária para a biossíntese de macromoléculas, bem como para os precursores de aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos. Como resultado, o metabolismo central de carbono é frequentemente alterado em células tumorais (10-13). Assim, a reprogramação metabólica surge como uma das características fundamentais das células tumorais (14-17). No caso do melanoma, além das alterações genéticas associadas com a agressividade e capacidade invasiva, o microambiente em que o tumor está inserido também contribui para o fenótipo invasivo. O melanoma é o tipo de tumor no qual a estratificação do microambiente tumoral tem sido melhor caracterizada (18-19). Os fenótipos altamente proliferativos exibidos pelas células tumorais são apoiados, em parte, pela glicólise aeróbica, ou efeito Warburg (13), que fornece energia e intermediários para a biossíntese de macromoléculas (20-21). Em normoxia, as células

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: [cep@hcancerbarretos.com.br](mailto:cep@hcancerbarretos.com.br)



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.290.161

de melanoma, como outras células tumorais, apresentam frequentemente fenótipos altamente glicolíticos em que 60-80% da glicose é convertida em lactato, uma atividade aumentada para 90% ou mais em condições de hipóxia (22). Sob baixos níveis de oxigênio, os fatores induzíveis por hipóxia (HIFs) induzem uma adaptação da célula ao estresse hipóxico, o que tem um profundo impacto no metabolismo central do carbono (23). O acúmulo de HIF-1, induzido por hipóxia, leva a um aumento das taxas glicolíticas, acompanhado pela perda da utilização do carbono da glicose no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) devido à expressão mediada por HIF de piruvato quinase desidrogenase 1 (PDK1) (24), diminuindo assim a respiração mitocondrial (25). As células de melanoma mantêm mitocôndrias inteiramente funcionais que podem metabolizar carbonos derivados de glutamina e da glicose para fins anabólicos (22). Notavelmente, sob hipóxia, a biossíntese de ácidos graxos é parcialmente suportada pelo carbono da glutamina através da carboxilação do -cetoglutarato devido à inversão do segmento -cetoglutarato-citrato do ciclo TCA (26-27). O aumento da geração de ROS (espécies reativas de oxigênio), devido à atividade metabólica alta ou desregulada, é um fator de estresse que desempenha um papel significativo na tumorigênese (27). Dependendo do contexto, a geração de ROS pode aumentar (28) ou bloquear a progressão do tumor (29-30), promovendo a instabilidade genômica e estimulando a proliferação celular ou induzindo toxicidade celular, respectivamente. O PGC1 (co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma) atua no controle da geração de ROS mitocondrial (31) e a sua expressão aumenta em resposta à atividade metabólica aumentada, à indução da biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa. As células de melanoma que exibem altos níveis de PGC1 provavelmente dependem da sua expressão para sobrevivência e tumorigênese (32) e a inibição de PGC1 nestas células ativa a via apoptótica intrínseca, além de promover a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, acompanhada de aumento em ROS e baixos níveis de glutatona (32). A dependência de glutamina é uma marca registrada de transformações oncogênicas, incluindo o melanoma (26), e a sua ausência induz apoptose em células tumorais (33-34). A glutamina demonstrou ser um fornecedor essencial de nitrogênio na síntese de nucleotídeos e proteínas e afeta um regulador crítico da tradução de proteínas, o complexo mTORC 1 (35). Estudos também apontaram para alterações oncogênicas que permitem a regulação do metabolismo da glutamina em células tumorais. Por exemplo, o oncogene C-MYC está relacionado com a regulação da transcrição de transportadores de glutamina com alta afinidade na promoção da glutaminólise e a sua expressão está aumentada em melanoma (36-35). O MYC é um oncogene que contribui para muitas malignidades humanas, afetando diretamente o metabolismo central de carbono (37). A reprogramação metabólica no melanoma ocorre em resposta aos estímulos oncogênicos e como

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Praia

CEP: 14.794-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancelbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.290.161

uma adaptação ao estresse dependente do microambiente tumoral. Compartimentos citosólicos e mitocondriais muitas vezes mostram padrões de adaptação recíproca para acomodar mudanças em ambos. A inibição do metabolismo do carbono já é uma estratégia terapêutica em câncer (38) e combinada com outros agentes pode ser útil no combate ao melanoma (39). Estudos mostram que o oncogene B-RAF regula a reprogramação metabólica em melanoma (40-41), e foi demonstrado que células de melanoma com a mutação B-RAFV600E se tornam energeticamente dependentes do efeito de Warburg (42). Ainda, foi demonstrado que o transportador de glutamina ASCT2 tem sua expressão aumentada em células de melanoma com mutação B-RAFV600E e desempenha um papel crítico na captação de glutamina e proliferação celular (43). O vemurafenibe é um inibidor seletivo de B-RAF (44), apresentando eficácia em pacientes com melanoma com a mutação V600E (bem como a mutação menos comum V600K). Em pacientes sem estas mutações, o vemurafenibe pode ativar B-RAF normal e promover o crescimento tumoral (45). Em um ensaio de fase III que definiu aleatoriamente 675 pacientes com melanoma metastático previamente não tratados e com a mutação BRAFV600E para receber tratamento com vemurafenibe ou dacarbazina (agente alquilante), a sobrevida global, em 6 meses, foi de 84% (Intervalo de Confiança (IC) 95% = 78-89%) em pacientes tratados com vemurafenibe e de 64% (95% IC = 56-73%) em pacientes tratados com dacarbazina. A taxa de resposta para o vemurafenibe foi de 48% e de 5% para a dacarbazina. Contudo, é importante notar que 18% dos pacientes tratados com vemurafenibe desenvolveram um carcinoma cutâneo de células escamosas ou um queratoacantoma ou ambos, todos os quais foram tratados por simples excisão (46). Dados da literatura reportam ainda a capacidade do vemurafenibe em reduzir a expressão de MMPs (metaloproteinases), o que poderia levar a uma inibição parcial do processo de invasão celular. Por outro lado, durante e após a aquisição de resistência ao vemurafenibe, as células passam a apresentar um ciclo celular lento, maior expressão de MMP-2, altos níveis de proteína RECK, apresentando capacidade invasiva (47). Um fator limitante para a utilização de inibidores de B-RAF como o vemurafenibe é o desenvolvimento de resistência, ocorrendo, frequentemente, 6 meses após o início do tratamento. A resistência celular aos inibidores de B-RAF está relacionada a um padrão molecular distinto para as diferentes células de melanoma. Relatos na literatura reportam que respostas tumorais adaptativas a fármacos direcionados a B-RAF conduzem, eventualmente, ao início da resistência, incluindo aumento da expressão de vários receptores tirosina quinases, tais como receptor beta ativado por fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), receptor de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1R), receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), MET e fatores derivados de tumores tais como neuregulina-1 (NRG) (48-51). O desenvolvimento de resistência, também se dá

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.290.161

pela capacidade das células tumorais em ativar a via de sinalização MAPK/ERK, apesar da inibição de B-RAF, através da regulação positiva e da expressão aumentada da isoforma C-RAF (52). Em células resistentes aos inibidores de B-RAF, também tem se observado uma ativação na sinalização de PI3K/AKT, indicando um papel na resistência tumoral, (50). A caracterização da resistência ao vemurafenibe tem sido essencial para a eficácia das estratégias terapêuticas da próxima geração (47). De notar, um estudo de 2017 mostrou que células de melanoma mutadas em B-RAF que apresentam maior taxa glicolítica são mais sensíveis ao tratamento com o inibidor de B-RAF PL4720 e que tornar estas células dependentes da via glicolítica para obtenção de energia torna as células ainda mais sensíveis ao tratamento (53). Ainda, o tratamento de células B-RAFV600E com vemurafenibe resulta no aumento da expressão de vários genes que atuam no ciclo de TCA, assim como dos genes associados com a fosforilação oxidativa e síntese de ATP, efeitos não observado em células de melanoma B-RAF de tipo selvagem (39). O tratamento com inibidor também é capaz de induzir uma dependência da glutamina que se correlaciona com a resistência ao fármaco (54-55), sendo a glutamina a principal fonte de carbono para células com resistência adquirida (54). As células de melanoma resistentes a inibidores de B-RAF são também mais sensíveis à inibição da glutaminase, o que torna a glutaminase um potencial alvo terapêutico nos tumores resistentes (54-53).

### HIPÓTESE:

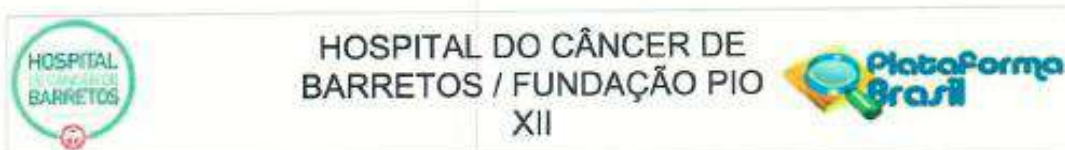
A compreensão do microambiente tumoral e o desenvolvimento de estratégias de tratamento que visem diferentes moléculas ou moduladores em diferentes pontos das vias celulares, se tornam cada vez mais relevantes para o tratamento eficaz do melanoma e outros tipos de câncer (30). Desta forma, aliado ao fato do vemurafenibe já ser uma droga aprovada e utilizada atualmente na clínica, torna-se crucial a compreensão do microambiente metabólico e como este contribui para que as células se tornem resistentes ao fármaco. Assim, acreditamos que a análise do perfil metabólico de um painel de amostras humanas e de linhagens de melanoma humano, com diferentes perfis e mecanismos de sobrevivência, possa ser um passo crucial para contribuir para a compreensão dos mecanismos de resistência desenvolvidos pelos tumores e avançar no tratamento do melanoma.

### Objetivo da Pesquisa:

#### OBJETIVO PRIMÁRIO:

Avaliar o papel do metabolismo tumoral na resistência de células de melanoma ao vemurafenibe.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.290.161

**OBJETIVO SEVUNDÁRIO:**

- a) Caracterizar a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico, oxidativo e da glutamina em amostras de melanoma humano, antes e após tratamento com vemurafenibe;
- b) Comparar o perfil metabólico de linhagens de melanoma resistentes ao vemurafenibe com o perfil das linhagens parentais, em condições de normoxia e hipóxia;
- c) Avaliar o efeito do tratamento combinado de inibidores de metabolismo e vemurafenibe, utilizando modelos in vitro e in vivo.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**RISCOS:**

Todas as informações referentes aos participantes serão mantidas em sigilo, sob a responsabilidade do investigador principal (orientador), não havendo divulgação pública do nome ou de qualquer informação que possa identificar o participante. Devido à necessidade de garantir material estocado no Departamento de Patologia, para possíveis testes de diagnósticos futuros, os blocos de parafina não serão esgotados ou prejudicados. Assim, trata-se de um projeto com risco mínimo ao participante da pesquisa, caracterizado apenas pela eventual quebra de sigilo, sendo que será solicitada dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido.

**BENEFÍCIOS:**

O participante da pesquisa não terá benefício direto, no entanto, futuros pacientes diagnosticados com melanoma poderão se beneficiar do conhecimento gerado durante este projeto.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

- Desenho longitudinal de coorte retrospectivo, com amostragem por conveniência.
- A amostra incluirá todos os pacientes diagnosticados com melanoma e tratados com vemurafenibe no Hospital de Câncer de Barretos, com um número previsto de 20 pacientes.
- Serão incluídos todos os pacientes com diagnóstico de melanoma, de ambos os sexos, independente da idade, que possuam amostras pré e pós-tratamento com vemurafenibe em bloco de parafina no serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos.
- Serão excluídos do estudo casos que não apresentem material (bloco de parafina) suficiente para a análise de imunohistoquímica.
- Dados clínicos e patológicos serão obtidos de forma retrospectiva, por revisão de prontuários

Endereço: Rua Arnanor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.290.161

arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital de Câncer de Barretos / Fundação Pio XII.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

**Recomendações:**

1. Recomenda-se adequar a data do início do projeto, pois a mesma está anterior a aprovação por este Comitê de Ética.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, manifesta -se pela **APROVAÇÃO** do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 21/03/2018.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1435/2017.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0342 Fax: (17)3321-6800 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.250.161

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_964783.pdf	21/08/2017 09:26:26		Aceito
Outros	Cadastro_do_Projeto_de_Pesquisa.pdf	21/08/2017 09:25:06	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	15/08/2017 11:56:53	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Corresponsabilidade_de_Estudo.pdf	08/08/2017 18:38:50	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	31/07/2017 18:47:22	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	MABIN.pdf	31/07/2017 18:41:40	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_Autorizacao.pdf	31/07/2017 18:35:34	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Orçamento	Declaracao_Fonte_de_Financiamento.pdf	19/07/2017 18:39:32	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Responsabilidade_do_pesquisador.pdf	19/07/2017 18:38:33	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BARRETOS, 21 de Setembro de 2017

Assinado por:  
Thiago Buosi Silva  
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
UF: SP Município: BARRETOS  
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br