

**Murilo Queiroz de Almeida Bonatelli**

**O MCT1 COMO ALVO TERAPÊUTICO E MEDIADOR DE RESPOSTA NO TRATAMENTO  
DE MELANOMAS**

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez

Barretos, SP  
2021

**Murilo Queiroz de Almeida Bonatelli**

**O MCT1 COMO ALVO TERAPÊUTICO E MEDIADOR DE RESPOSTA NO TRATAMENTO  
DE MELANOMAS**

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez

Barretos, SP  
2021

B697m Bonatelli, Murilo Queiroz de Almeida.

O MCT1 como alvo terapêutico e mediador de resposta no tratamento de melanomas. / Murilo Queiroz de Almeida Bonatelli. - Barretos, SP 2021.  
118 f. : il.

Orientadora: Céline Marques Pinheiro.  
Coorientador: Vinicius de Lima Vazquez.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

1. 3-bromopiruvato. 2. Efeito Warburg. 3. MCT1. 4. Melanoma. 5. Reprogramação metabólica. 6. Transportadores de monocarboxilatos. I. Autor. II. Título.

CDD 616.994

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570  
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Murilo Queiroz de Almeida Bonatelli**

**O MCT1 como alvo terapêutico e mediador de resposta no tratamento de melanomas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde – Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 09/08/2021

### **Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Instituição: Universidade de São Paulo (USP) - Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Profa. Dra. Sara Granja

Instituição: Universidade do Minho - Braga, Portugal

Profa. Dra. Patrícia Zancan

Instituição: Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) - Rio de Janeiro, Brasil

Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro

Orientadora

Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez

Co-orientador

Profa. Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

Presidente da Banca Examinadora

## **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 como Item Orçamentário em Auxílio (processo número 2016/10821-0).

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 à minha mãe, meus irmãos e amigos.  
Vocês foram força, amor e compreensão em meio a tanta ausência.*

## AGRADECIMENTOS

À **Dra. Céline Pinheiro**, pela orientação, dedicação, apoio e confiança ao longo deste trabalho, proporcionando oportunidades únicas de crescimento profissional e aprendizado acadêmico. Foi uma grata surpresa tê-la como minha orientadora, alguém que já admirava ao longe. Hoje reafirmo toda a minha admiração e respeito ao seu trabalho e à sua primorosa orientação. Obrigado pela amizade e principalmente pela independência que me permitiu desenvolver no laboratório e dentro de nosso grupo de pesquisa. Que essa parceria permaneça e traga novas conquistas e contribuições para a ciência.

**Ao Dr. Vinicius Vazquez**, por ter aceitado a coorientação deste trabalho e por toda a contribuição oferecida ao grupo com a sua expertise em melanomas.

À **Dra. Silvy Stuchi**, pela doação de todas as linhagens celulares utilizadas neste trabalho e principalmente pela constante colaboração. À **equipe do laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da USP**, em especial à **Dra. Érica Oliveira**, pelo auxílio científico e **Dra. Larissa Anastácio**, pelo árduo trabalho na construção das peles artificiais.

**Ao Dr. Adhemar Longatto, Dr. Flávio Cárcano e Dra. Fátima Baltazar**, por todas as parcerias estabelecidas e pela oportunidade de participar em vossas pesquisas.

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

**Aos membros da banca de acompanhamento, Dr. Carlos Scrideli e Dra. Márcia Chiquitelli**, pelo tempo dedicado na avaliação e discussão de todos os resultados obtidos neste trabalho desde o início de sua execução.

**Aos membros da banca de defesa, Dr. Carlos Scrideli, Dra. Patrícia Zancan e Dra. Sara Granja**, pela certeza de excelentes contribuições científicas para a versão final desta tese.

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

**Ao Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica (EPIT) e toda equipe**, em especial à **Dorion Denardi, Joyce Silva e Maria Alice**, pelo excelente trabalho realizado, em especial no controle de todos os orçamentos e compras relacionados ao projeto.

À **Patologia**, em especial à **Patrícia Marconi e Beatriz Buzon**, por todo o auxílio dispensado aos nossos projetos de pesquisa, pelos sorrisos e por toda a gentileza.



À equipe do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), Me. André Lengert, Dra. Carolina Laus, Karina Melo 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, Eduardo Caetano, Maurício Zaia, Isabella Fornari, Lara Pinheiro, Priscila Bernécule, Wilson Alves, Marina Dias, Patrik Vital e Ayra Quinelato. Obrigado por todo o aprendizado e crescimento que me proporcionaram desde o início. Obrigado pelos ótimos momentos na bancada e fora dela, assim como pelos não tão ótimos assim, quando dividíamos as frustrações de um experimento que insistia em não dar certo. Vocês me ensinaram a ser mais resiliente e a não desanimar frente às adversidades da vida de um pós-graduando. Torço para que conquistem cada vez mais os seus sonhos e objetivos.

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

À Deus, por abençoar e guiar todos os meus caminhos, permitindo que chegasse até aqui.

À minha mãe Adriana, por ser o meu maior exemplo e por todo o seu amor e carinho. Por nunca medir esforços em me ver bem, realizado e feliz. Obrigado pela educação, pelo incentivo, pela esperança em tempos difíceis, “pelo colo de mãe” quando precisei desabafar. Por todos os dias em que acordávamos às 4:00 da manhã para realizar o sonho da iniciação científica na UNICAMP. E não menos importante, obrigado por toda a liberdade e respeito. Você é minha luz!

Aos meus irmãos Davi e Priscila e aos meus avós Francisco (*in memoriam*) e Carmem, por todo amor, auxílio e incentivo.

À minha prima Milena, obrigado por me receber tão bem em Barretos e por todo o incentivo ao longo destes oito anos de Hospital de Câncer.

Ao grande amigo e mentor, Dr. Renato Oliveira. Você foi meu alicerce em tantos momentos, profissionais e pessoais. Obrigado pela amizade e por nunca me negar uma boa conversa, seja para solução de dúvidas, discussões científicas ou mesmo para momentos de descontração, sempre acompanhados de um bom café. Tenho-o em alta estima e como um exemplo de profissional e ser-humano.

**Aos amigos de Sorocaba de nossa saudosa sétima série H, Ariani Colli, Bárbara Campesi, Carolina Cavalheiro, Luiz Perino, Renan Wagner e Sthefany Souza**, que compreenderam a minha ausência por inúmeras vezes e já não aguentavam mais ouvir: “preciso cuidar das células”. Obrigado por estarem ao meu lado nesses 20 anos de amizade e, principalmente, pelos ótimos momentos que passamos juntos. aguardo ansiosamente pelo nosso encontro anual.

**Aos queridos amigos, Guy Ruegg, Silvano Lopez e Vinícius Corrá**, obrigado pelos conselhos, pelos puxões de orelha e por me ensinarem tanto com a sua vivência.

**À Cintia Ramos**, minha irmã por escolha. Gratidão ainda é pouco por tudo o que você representa em minha vida. Obrigado por dividir o aluguel e os problemas da vida adulta. Obrigado pelas temporadas de gins e cantorias. Obrigado pelos filmes e séries aos domingos. Obrigado por me ouvir em momentos de frustrações e tristezas. Obrigado pela companhia escrevendo madrugada adentro. Obrigado por tudo! Você mora no meu coração, Parp!

**Aos grandes amigos** que Barretos me concedeu, **Ana Laura Alves, Aline Lourenço, Aline Rocha, Ângela Oliveira, Ariane Pereira, Bruna Sorroche, Elisa Messias, Fernanda Cury, Guilherme Datorre, Izabela Gomes, Maicon Zanon, Marcela Nunes, Mayara Goulart, Nathalia Campacci, Paula Felício, Rebeca Grasel, Renan Teixeira, Rhafaela Causin e Weder Menezes**. 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.

**Muito obrigado.**

*“Cada qual sabe amar a seu modo; o modo, pouco importa; o essencial é que saiba amar.”*

***Machado de Assis***

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Metabolismo Tumoral	1
1.2	3-Bromopiruvato	6
1.3	Melanoma	9
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>12</b>
3.1	Objetivo geral	12
3.2	Objetivos específicos	12
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
4.1	Linhagens celulares comerciais de melanoma	13
4.2	Perfil mutacional ( <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , <i>KIT</i> e <i>TERT</i> )	14
4.3	Caracterização do perfil metabólico	16
4.3.1	Imunocitoquímica	16
4.3.2	<i>Western blotting</i>	18
4.3.3	Quantificação dos níveis de glicose e lactato extracelular	20
4.4	Rastreamento de sensibilidade ao 3-bromopiruvato	20
4.5	<i>Knockdown</i> do gene <i>SLC16A1</i> (MCT1)	22
4.6	<i>Knockdown</i> do gene <i>SLC16A3</i> (MCT4) na linhagem WM164 MCT1 KD por siRNA	23
4.7	Caracterização do efeito do <i>knockdown</i> de <i>SLC16A1</i> (MCT1) e do tratamento com 3-BP <i>in vitro</i>	23
4.7.1	Viabilidade celular	24
4.7.2	Metabolismo celular (glicose e lactato extracelular)	24
4.7.3	Quantificação do metabolismo energético em tempo real ( <i>Seahorse</i> )	24
4.7.4	Proliferação celular	25
4.7.5	Migração celular ( <i>Transwell</i> )	26
4.7.6	Invasão celular ( <i>Transwell</i> )	27

4.7.7	Formação de colônias	28
4.7.8	Apoptose	28
4.7.9	Cultura organotípica de pele contendo melanoma	29
4.7.10	Perfil da expressão de genes relacionados ao metabolismo celular ( <i>NanoString</i> )	30
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
6	ASPECTOS ÉTICOS	33
7	RESULTADOS	34
7.1	Caracterização mutacional e metabólica das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma	34
7.2	Rastreamento de sensibilidade ao 3-BP	40
7.3	<i>Knockdown</i> do gene <i>SLC16A1</i> (MCT1) nas linhagens UACC-62 e WM164	43
7.4	Análise funcional do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, nas linhagens UACC-62 e WM164	45
7.5	Análise transcricional de genes relacionados ao metabolismo celular nas linhagens UACC-62 e WM164	59
7.6	Análise funcional do duplo silenciamento na linhagem WM164	65
8	DISCUSSÃO	68
9	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
	ANEXOS	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Hallmarks of Cancer</i>	1
<b>Figura 2</b>	Panorama geral do metabolismo glicolítico em células normais e tumorais	3
<b>Figura 3</b>	Efeitos da inibição da atividade dos MCTs no fenótipo tumoral	6
<b>Figura 4</b>	Mecanismo de ação e alvos do 3-BP em células tumorais	8
<b>Figura 5</b>	Resultados representativos da imunocitoquímica para MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma	36
<b>Figura 6</b>	Resultados representativos do <i>western blotting</i> para MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma	37
<b>Figura 7</b>	Densitometria dos resultados de <i>western blotting</i> para MCT1, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma	38
<b>Figura 8</b>	Consumo de glicose das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma ao longo do tempo (24 e 48 horas)	39
<b>Figura 9</b>	Efluxo de lactato das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma ao longo do tempo (24 e 48 horas)	39
<b>Figura 10</b>	Gráficos de IC <sub>50</sub> obtidos para as linhagens celulares comerciais de melanoma após tratamento com 3-BP em 24 horas (azul) e 48 horas (vermelho)	41
<b>Figura 11</b>	Classificação de sensibilidade ao 3-BP das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma	42
<b>Figura 12</b>	Expressão de MCT1 e classificação de sensibilidade ao 3-BP das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma	43
<b>Figura 13</b>	<i>Knockdown</i> do gene <i>SLC16A1</i> (MCT1) na linhagem UACC-62 por CRISPR/Cas9	44
<b>Figura 14</b>	<i>Knockdown</i> do gene <i>SLC16A1</i> (MCT1) na linhagem WM164 por CRISPR/Cas9	44

<b>Figura 15</b>	Efeito do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na viabilidade celular das linhagens UACC-62 e WM164	46
<b>Figura 16</b>	Efeito do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na proliferação celular das linhagens UACC-62 e WM164	46
<b>Figura 17</b>	Efeito do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, no consumo de glicose e efluxo de lactato das linhagens UACC-62 e WM164	48
<b>Figura 18</b>	Efeito do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na migração celular das linhagens UACC-62 e WM164	49
<b>Figura 19</b>	Efeito do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na invasão celular das linhagens UACC-62 e WM164	50
<b>Figura 20</b>	Efeito do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na capacidade de formação de colônias das linhagens UACC-62 e WM164	52
<b>Figura 21</b>	Efeito do <i>knockdown</i> de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na apoptose tardia/necrose das linhagens UACC-62 e WM164	53
<b>Figura 22</b>	Perfil bioenergético das linhagens UACC-62 e WM164 controles e MCT1 KD na ausência e presença de 3-bromopiruvato	54
<b>Figura 23</b>	Cultura organotípica de pele (pele normal)	55
<b>Figura 24</b>	Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem UACC-62 ao modelo 3D	57
<b>Figura 25</b>	Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem WM164 ao modelo 3D	58
<b>Figura 26</b>	Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao perfil glicolítico das linhagens UACC-62 e WM164 após <i>knockdown</i> de MCT1 por CRISPR/Cas9	59
<b>Figura 27</b>	Expressão diferencial de genes relacionados a vias metabólicas distintas nas linhagens UACC-62 e WM164 controles e MCT1 KD	61

<b>Figura 28</b>	Diagrama de Venn apresentando os genes diferencialmente expressos únicos e em comum das linhagens UACC-62 MCT1 KD e WM164 MCT1 KD	63
<b>Figura 29</b>	Análise de enriquecimento funcional e rede de interação gênica associada às diferentes vias metabólicas encontradas diferencialmente expressas na linhagem UACC-62 MCT1 KD	64
<b>Figura 30</b>	Análise de enriquecimento funcional e rede de interação gênica associada às diferentes vias metabólicas encontradas diferencialmente expressas na linhagem WM164 MCT1 KD	64
<b>Figura 31</b>	Avaliação do silenciamento da expressão de MCT4 por <i>western blotting</i> através da técnica de siRNA após 24 e 192 horas na linhagem WM164 MCT1 KD	65
<b>Figura 32</b>	Caracterização funcional do silenciamento de MCT4 por siRNA na linhagem WM164 MCT1 KD	66
<b>Figura 33</b>	Caracterização funcional do silenciamento de MCT4 por siRNA na linhagem WM164 MCT1 KD	67



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Linhagens celulares comerciais de melanoma utilizadas no estudo	14
<b>Tabela 2</b>	Condições e sequência dos primers utilizados para a amplificação dos genes <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> , <i>KIT</i> e <i>TERT</i>	16
<b>Tabela 3</b>	Condições e anticorpos utilizados na imunocitoquímica	18
<b>Tabela 4</b>	Condições e anticorpos utilizados no <i>western blotting</i>	19
<b>Tabela 5</b>	Perfil mutacional das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma utilizadas no estudo	34
<b>Tabela 6</b>	Valores de $IC_{50}$ obtidos para as linhagens comerciais de melanoma após tratamento com 3-BP durante 24 e 48 horas.	42
<b>Tabela 7</b>	Genes diferencialmente expressos nas linhagens UACC-62 MCT1 KD e WM164 MCT1 KD	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

3-BP	3-bromopiruvato
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ACTB	B-actina
AKT	Protein kinase B
AKT3	RAC-gamma serine/threonine-protein kinase
ATP	Adenosina trifosfato
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	Albumina de soro bovino
CA	Carbonic anhydrase
CAIX	Anidrase carbônica IX
CD147	Extracellular matrix metalloproteinase inducer
CD44	Hyaluronate receptor
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CRISPR/Cas9	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
ECAR	Extracellular acidification rate
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Transição epitélio-mesênquima
ERK	Mitogen-activated protein kinase 1
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FOV	Fields of view
G-6P	Glicose-6-fosfato
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GFP	Green fluorescent protein
GI	Growth inhibition
Globocan	Global Cancer Observatory
GLS	Glutaminase
GLUT1	Transportador de glicose 1
GSH	Glutationa
HDACs	Histona deacetilases
HIF-1 $\alpha$	Fator induzido por hipóxia 1 alfa
HIF-1 $\beta$	Fator induzido por hipóxia 1 beta

HKII	Hexoquinase II
HREs	Elementos responsivos à hipóxia
IDH	Isocitrato desidrogenase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KD	<i>Knockdown</i>
<i>KIT</i>	<i>KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MCT1	Transportador de monocarboxilato 1
MCT2	Transportador de monocarboxilato 2
MCT4	Transportador de monocarboxilato 4
MCTs	Transportadores de monocarboxilatos
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MITF	Fator de transcrição associado à microftalmia
<i>MTOR</i>	<i>Mechanistic target of rapamycin kinase</i>
<i>MYC</i>	<i>V-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
<i>NRAS</i>	<i>V-Ras neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
OCR	<i>Oxygen consumption rate</i>
OXPPOS	Fosforilação oxidativa
P/S	Penicilina/estreptomicina
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PD-1	<i>Programmed cell death 1</i>
<i>PDGFA</i>	<i>Platelet derived growth factor subunit A</i>
<i>PDGFRB</i>	<i>Platelet derived growth factor receptor B</i>
<i>PDK4</i>	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase 4</i>
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PGC-1 $\alpha$	Ativador 1 $\alpha$ do receptor- $\gamma$ ativado por proliferador de peroxissoma
PGP	Glicoproteína-P
PHDs	Prolil hidroxilases
pHe	pH extracelular
pHi	pH intracelular
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PK	Piruvato quinase
<i>PRKAB1</i>	<i>Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 1</i>
<i>PRKAB2</i>	<i>Protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit beta 2</i>
<i>PTEN</i>	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
<i>RPTOR</i>	<i>Regulatory associated protein of MTOR complex 1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio

SDH	Succinato desidrogenase
SFB	Soro fetal bovino
<i>SHMT1</i>	Serina hidroximetiltransferase 1
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>
<i>SLC16A1</i>	<i>Solute carrier family 16 member 1</i>
<i>SLC16A3</i>	<i>Solute carrier family 16 member 3</i>
<i>SLC1A5</i>	<i>Solute carrier family 1 member 5</i>
<i>SLC2A1</i>	<i>Solute carrier family 2 member 1</i>
<i>SLC38A2</i>	<i>Solute carrier family 38 member 2</i>
<i>SLC7A11</i>	<i>Solute carrier family 7 member 11</i>
<i>SLC7A5</i>	<i>Solute carrier family 7 member 5</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
<i>TERT</i>	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TIGAR	Regulador de glicose e apoptose induzido por TP53
<i>TP53</i>	<i>Tumor protein P53</i>
VDAC	Canal aniônico dependente de tensão
VHL	<i>Von hippel-lindau</i>
WT	<i>Wild type</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
=	Igual
>	Maior
±DP	Desvio-padrão
°C	Graus celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromolar
C	Cisteína
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
E	Glutamato
H <sup>+</sup>	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
K	Lisina
kDa	Kilodalton
L	Leucina
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
Q	Glutamina
R	Arginina
rpm	Rotações por minuto
T	Triptofano
V	Valina

## RESUMO

Bonatelli MQA. O MCT1 como alvo terapêutico e mediador de resposta no tratamento de melanomas. **Tese (Doutorado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2021.

**INTRODUÇÃO:** A dependência de células tumorais pela via glicolítica (efeito Warburg) está associada à superexpressão de diferentes proteínas relacionadas ao metabolismo tumoral, em especial dos transportadores de monocarboxilatos (MCTs). A elevada expressão dos MCTs tem sido descrita em diversos tipos tumorais, associando-se em alguns casos a piores prognósticos. Nesse contexto, os MCTs, em especial as isoformas 1 e 4, surgem como alvos terapêuticos promissores. Além de alvo terapêutico, o MCT1 foi identificado como o principal carreador do 3-bromopiruvato (3-BP), um análogo halogenado do piruvato que possui potente ação de inibição da glicólise. O melanoma é o câncer de pele mais agressivo, com 40-60% dos casos apresentando a mutação *BRAF* V600E. Mutações em *BRAF* tornam as células tumorais energeticamente dependentes do efeito Warburg. Nesse contexto, a inibição da expressão de MCT1, assim como o tratamento com 3-BP de pacientes com tumores que apresentam um aumento da expressão do transportador podem ser estratégias terapêuticas eficazes em melanomas. Assim, o objetivo geral desta tese foi avaliar o potencial do MCT1 como alvo terapêutico e mediador de resposta ao 3-BP para o tratamento de melanomas. **MATERIAL E MÉTODOS:** Doze linhagens celulares comerciais de melanoma foram caracterizadas quanto ao seu perfil mutacional (*BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT*) e perfil metabólico (expressão proteica de MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX, juntamente com a quantificação de glicose e lactato extracelular). Além disso, foi realizada uma triagem de sensibilidade ao 3-BP. Com base no perfil metabólico e na sensibilidade ao 3-BP encontrados, o *knockdown* (KD) de MCT1 foi realizado nas linhagens UACC-62 e WM164 com o sistema CRISPR/Cas9. Ensaios funcionais utilizando modelos de cultura 2D e 3D (pele artificial) foram realizados para avaliar o efeito do KD de MCT1 e tratamento com 3-BP, isoladamente, bem como combinados. Ainda, realizou-se a caracterização do perfil transcricional de um amplo painel de genes relacionados a diferentes vias metabólicas utilizando a plataforma *NanoString*. Posteriormente, realizou-se o silenciamento de MCT4 na linhagem WM164 MCT1 KD por siRNA, assim como a sua caracterização funcional. **RESULTADOS:** As linhagens celulares de melanoma demonstraram um perfil metabólico heterogêneo. Linhagens celulares mais sensíveis ao 3-BP apresentaram

expressão de MCT1, enquanto linhagens celulares com maior resistência ao 3-BP apresentaram expressão diminuída de MCT1. Para a linhagem UACC-62, o KD de MCT1 diminuiu significativamente a migração e invasão celular, além do efluxo de lactato e número de colônias formadas, enquanto o tratamento com 3-BP diminuiu significativamente a viabilidade, proliferação, migração e formação de colônias. Na linhagem WM164, o KD de MCT1 diminuiu significativamente a viabilidade e proliferação celular, enquanto o tratamento com 3-BP diminuiu significativamente a viabilidade celular, proliferação, invasão e formação de colônias. Inesperadamente, o KD de MCT1 aumentou significativamente a invasão celular e o número de colônias formadas pela linhagem WM164. A combinação do KD de MCT1 e exposição ao 3-BP demonstrou que o efeito do 3-BP nos parâmetros funcionais analisados é altamente dependente da presença do MCT1, sendo que o KD do transportador é capaz de reverter a ação do 3-BP. A análise da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo na linhagem WM164 MCT1 KD demonstrou um aumento da expressão de MCT4 e GLUT1. Ainda, o KD de MCT1 aumentou a expressão de genes relacionados à via da glutamina, regulação de ácidos graxos, assim como de genes reguladores do metabolismo glicolítico na linhagem UACC-62. Em contrapartida, a linhagem WM164 MCT1 KD apresentou diminuição da expressão de genes relacionados à sinalização celular, assim como o aumento da expressão de MCT4 e genes associados ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT), o que, por sua vez, conferiu maior agressividade à linhagem. Por fim, a caracterização funcional do duplo silenciamento de MCT1 e MCT4 na linhagem WM164 demonstrou uma diminuição significativa de parâmetros não antes observados no silenciamento de MCT1 sozinho, como diminuição no efluxo de lactato, migração e invasão celular. **CONCLUSÃO:** Os resultados obtidos suportam a hipótese de que o MCT1 é um promissor alvo terapêutico, bem como mediador da resposta ao tratamento com 3-BP em melanomas. Ainda, destaca-se o efeito promissor do 3-BP, quando em presença do MCT1 expresso, demonstrando resultados importantes na diminuição de diferentes parâmetros de agressividade tumoral.

**PALAVRAS-CHAVES:** 3-bromopiruvato; efeito Warburg; MCT1; melanoma; reprogramação metabólica; transportadores de monocarboxilatos.

## ABSTRACT

Bonatelli MQA. MCT1 as a therapeutic target and response mediator in melanoma treatment.

**Thesis (PhD Degree).** Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2021.

**INTRODUCTION:** The dependence of tumor cells on the glycolytic pathway (Warburg effect) is associated with the overexpression of different proteins related to tumor metabolism, especially monocarboxylate transporters (MCTs). The high expression of MCTs has been described in several tumor types, being associated in some cases with worse prognosis. In this context, MCTs, especially isoforms 1 and 4, emerge as promising therapeutic targets. In addition, MCT1 was identified as the main carrier of 3-bromopyruvate (3-BP), a halogenated pyruvate analogue that has a potent glycolysis-inhibiting action. Melanoma is the most aggressive skin cancer, with 40-60% of cases having the *BRAF* V600E mutation. *BRAF* mutations make tumor cells energetically dependent on the Warburg effect. In this context, the inhibition of MCT1 expression, as well as the treatment with 3-BP of patients with tumors that present an increased expression of MCT1 may be an effective therapeutic strategy in melanomas. Thus, the main aim of this thesis was to evaluate the potential of MCT1 as a therapeutic target and response mediator to 3-BP for melanoma treatment. **MATERIALS AND METHODS:** Twelve commercial melanoma cell lines were characterized for their mutational profile (*BRAF*, *NRAS*, *KIT* and *TERT*) and metabolic profile (protein expression of MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 and CAIX, together with the quantification of extracellular glucose and lactate). In addition, a 3-BP sensitivity screening was performed. Based on the metabolic profile and sensitivity to 3-BP found, the knockdown (KD) of MCT1 was performed in UACC-62 and WM164 cell lines with a CRISPR/Cas9 system. Functional assays using 2D and 3D culture models (artificial skin) were performed to evaluate the effect of MCT1 KD and 3-BP treatment, alone, as well as in combination. Furthermore, the transcriptional profile of a broad panel of genes related to different metabolic pathways was characterized using the NanoString platform. Subsequently, the silencing of MCT4 with siRNA in WM164 MCT1 KD cell line, as well as its functional characterization, were performed. **RESULTS:** Melanoma cell lines demonstrated a heterogeneous metabolic profile. Cell lines more sensitive to 3-BP showed expression of MCT1, while cell lines resistant to 3-BP showed decreased expression of MCT1. For the UACC-62 cell line, MCT1 KD significantly decreased cell migration and invasion, in



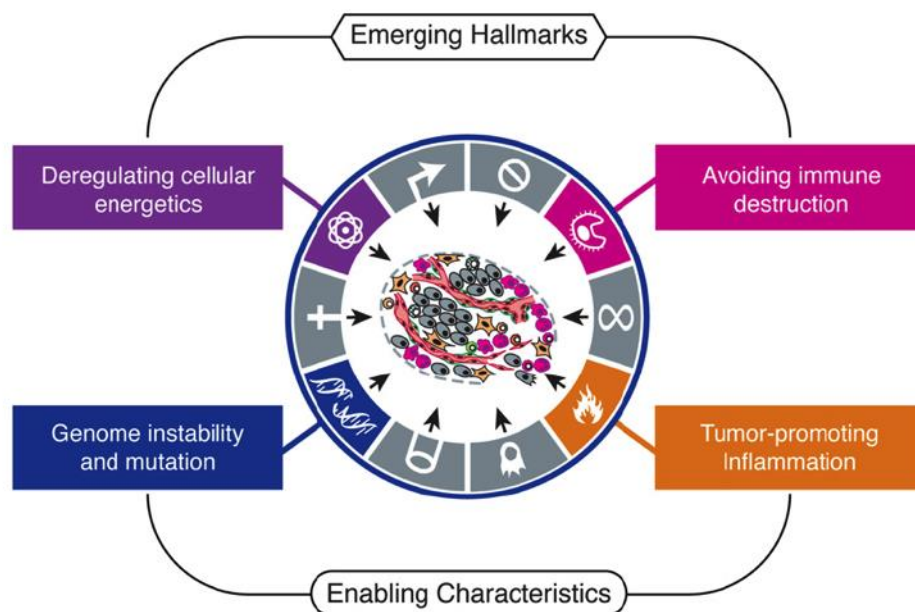
addition to lactate efflux and number of colonies formed, while 3-BP treatment significantly decreased viability, proliferation, migration and colony formation. In the WM164 cell line, MCT1 KD significantly decreased cell viability and proliferation, while 3-BP treatment significantly decreased cell viability, proliferation, invasion and colony formation. Unexpectedly, MCT1 KD significantly increased cell invasion and the number of colonies formed by the WM164 cell line. The combination of MCT1 KD and exposure to 3-BP demonstrated that the effect of 3-BP on the functional parameters analyzed is highly dependent on the presence of MCT1, and the KD of the transporter is able to reverse the action of 3-BP. The analysis of the metabolism-related proteins of WM164 MCT1 KD demonstrated an increased expression of MCT4 and GLUT1. Furthermore, MCT1 KD increased the expression of genes related to the glutamine pathway, fatty acid regulation, as well as glycolytic metabolism regulatory genes in the UACC-62 cell line. In contrast, WM164 MCT1 KD showed decreased expression of genes related to cell signaling, as well as increased expression of MCT4 and genes associated with the epithelial-mesenchymal transition process, which, in turn, presented a more aggressive phenotype. Finally, the functional characterization of the dual silencing of MCT1 and MCT4 in the WM164 cell line demonstrated a significant decrease in parameters not previously observed in MCT1 silencing alone, such as decreased lactate efflux, cell migration and invasion. **CONCLUSION:** The results obtained support the hypothesis that MCT1 is a promising therapeutic target, as well as a mediator of response to 3-BP treatment in melanomas. Furthermore, the promising effect of 3-BP is highlighted, when in the presence of expressed MCT1, demonstrating important results in the reduction of different parameters of tumor aggressiveness.

**KEYWORDS:** 3-bromopyruvate; MCT1; melanoma; metabolic reprogramming; monocarboxylate transporters, Warburg effect.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Metabolismo Tumoral

Na década de 1920, Otto Warburg descreveu pela primeira vez um dos principais mecanismos de adaptação metabólica das células tumorais, fenômeno conhecido como “Efeito Warburg” ou glicólise aeróbica<sup>1, 2</sup>. No efeito Warburg, células malignas reprogramam o seu metabolismo para obtenção de energia majoritariamente a partir da via glicolítica, mesmo na presença de altas taxas de oxigênio, apresentando um aumento no consumo de glicose e conseqüentemente um aumento na produção de lactato<sup>3</sup>. Esta reprogramação do metabolismo é reconhecida como uma das características fundamentais das células tumorais (*Hallmarks of Cancer*, Figura 1), fornecendo vantagens adaptativas aos tumores, principalmente relacionadas a proliferação e sobrevivência<sup>4</sup>.



Fonte: Hanahan & Weinberg<sup>4</sup>.

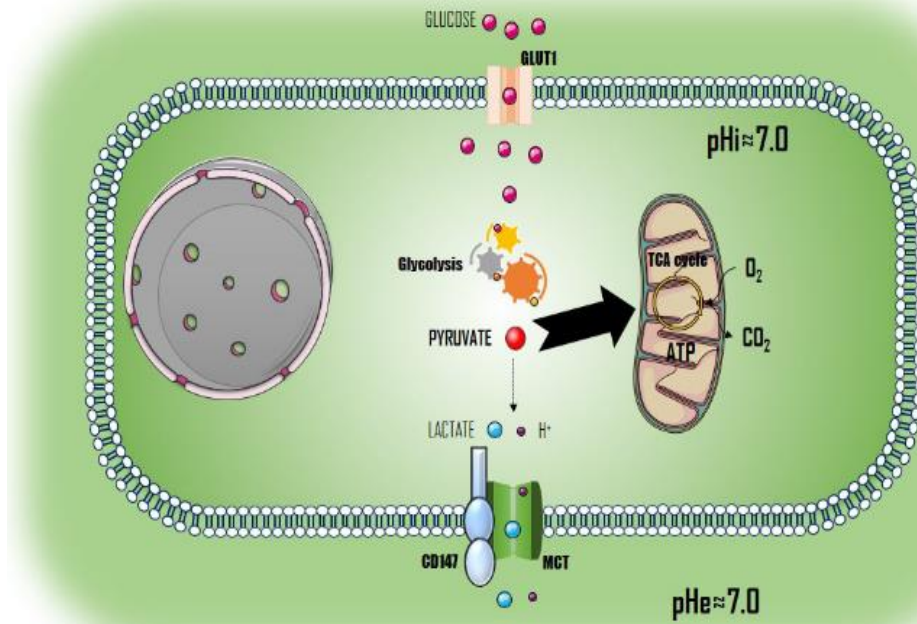
**Figura 1.** *Hallmarks of Cancer*. Características tumorais descritas como fundamentais para a promoção do fenótipo maligno, dentre elas, a reprogramação do metabolismo energético celular.

Mesmo a glicólise aeróbica apresentando menor eficiência para a produção de ATP (dois ATPs por mol de glicose) quando comparada à fosforilação oxidativa (aproximadamente 32 ATPs por mol de glicose)<sup>5, 6</sup>, essa adaptação metabólica se faz necessária devido à elevada demanda energética das células tumorais, visto que a produção de lactato a partir da glicose

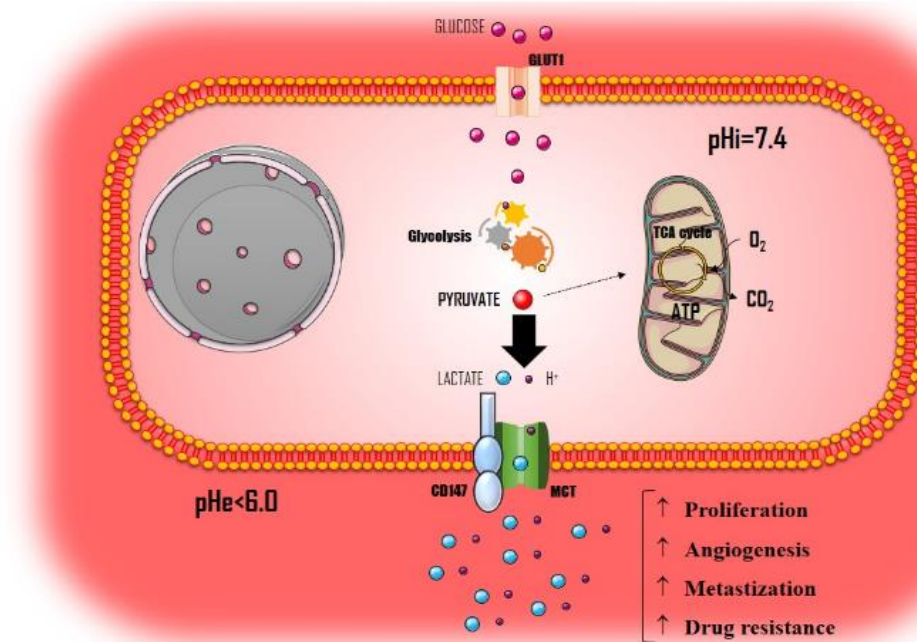
é descrita como sendo de 10-100 vezes mais rápida que a oxidação completa da glicose<sup>7</sup>. Ainda, destaca-se a utilização da glicose pelas células tumorais como molécula precursora em outras vias de fontes de carbono, participando na síntese de biomoléculas essenciais para a proliferação celular. O acúmulo dessa importante porção de carbonos como intermediários glicolíticos alimenta as vias anabólicas, produzindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, mantendo, assim, um estado aumentado de proliferação celular, que por sua vez, favorece a sobrevivência das células tumorais em relação às células normais<sup>5, 8</sup>. Como resultado desta reprogramação metabólica das células tumorais (Figura 2), o meio extracelular se torna um microambiente ácido, principalmente devido à excreção aumentada do lactato acoplado a um próton (H<sup>+</sup>). O microambiente ácido e rico em lactato contribui, entre outros, para o aumento da invasão tumoral e da capacidade de metastização, promovido tanto pela destruição das células adjacentes normais, através da morte celular induzida pelo fenótipo ácido-resistente, quanto pela ativação de metaloproteinases<sup>9</sup> e promoção da angiogênese<sup>3</sup>. Além disso, o acúmulo de lactato extracelular acaba por inibir a resposta imunológica contra as células tumorais, como a efetuada por linfócitos T citotóxicos, presentes no microambiente tumoral<sup>10</sup>. Outra característica observada em tumores hiperglicolíticos é a resistência a terapias antitumorais citotóxicas, como as quimioterapias clássicas, que tem como principal alvo a replicação do DNA (agentes alquilantes, platinas, agentes antimetabólicos e inibidores de topoisomerasas), assim como terapias-alvo dirigidas (anticorpos monoclonais e pequenas moléculas)<sup>11</sup>.

Clinicamente, o efeito Warburg provou ser uma ferramenta útil na detecção de tumores hiperglicolíticos, principalmente devido ao uso de exames de imagem como o <sup>18</sup>F-FDG PET/CT, que consiste de tomografia computadorizada por emissão de pósitrons, associada a um análogo da glicose radiomarcado, o 2-fluoro-2-deoxi-D-glicose marcado com flúor-18. Devido à alta demanda glicolítica, células tumorais acumulam o análogo da glicose intracelularmente em detrimento da maioria das células normais, possibilitando a captação e visualização dos tumores. O <sup>18</sup>F-FDG PET/CT ainda demonstra diversas aplicações que vão além do diagnóstico, como a realização do estadiamento tumoral, com função prognóstica, e predição e monitoramento de respostas terapêuticas<sup>12, 13</sup>.

A



B



Fonte: Pinheiro *et al.*<sup>14</sup>.

**Figura 2.** Panorama geral do metabolismo glicolítico em células normais e tumorais. **(A)** Metabolismo glicolítico em célula normal. O piruvato produzido pela glicólise é oxidado na mitocôndria na presença de O<sub>2</sub>. **(B)** Metabolismo glicolítico em célula tumoral. O piruvato produzido durante a glicólise é preferencialmente convertido em lactato e excretado, acoplado a um próton, pelo complexo MCTs/CD147. A acidificação do meio extracelular acaba por promover um aumento na proliferação celular, angiogênese, capacidade de invasão e resistência a fármacos. (ATP, adenosina trifosfato; pHe, pH extracelular; GLUT, transportador de glicose; pHi, pH intracelular; MCT, transportador de monocarboxilato; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico).

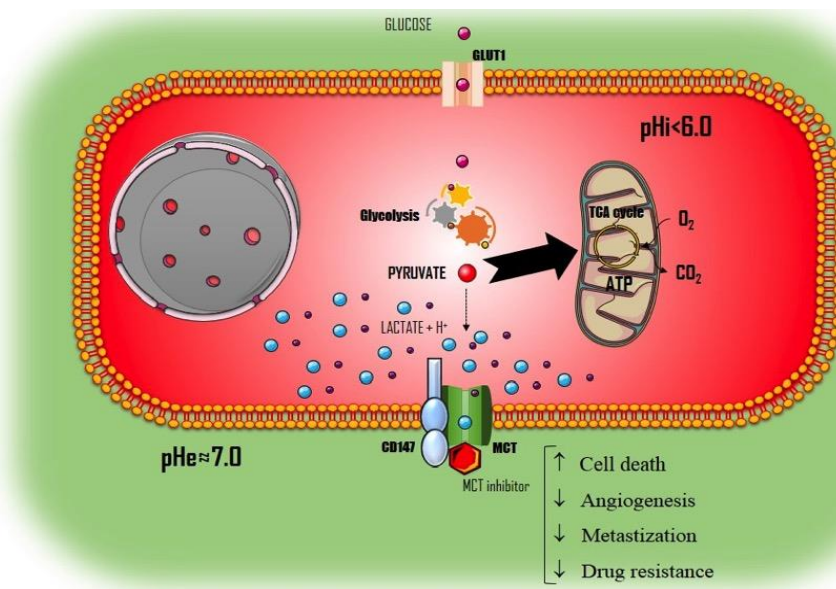
Nesse contexto, ressalta-se o papel de diferentes proteínas envolvidas na reprogramação metabólica dos tumores, como as proteínas responsáveis pelo transporte da glicose e do lactato, assim como aquelas responsáveis pela regulação do pH intracelular<sup>15</sup>. Um dos principais mecanismos de adaptação metabólica tumoral se dá pelo aumento da expressão de proteínas envolvidas na via glicolítica, que advém, por sua vez, do microambiente com baixas concentrações de oxigênio ao qual estes tumores estão expostos e também pela sinalização desregulada de oncoproteínas específicas. Essa regulação positiva da via glicolítica é principalmente impulsionada pela ativação de fatores de transcrição, como o Fator Induzido por Hipóxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) e o oncogene *MYC*, sozinhos ou em cooperação<sup>9</sup>. Em condições de normóxia, o HIF-1 $\alpha$  é rapidamente degradado pela ação de prolil hidroxilases dependentes de oxigênio (PHDs), responsáveis pela hidroxilação dos resíduos de prolina da proteína HIF. Por sua vez, a proteína Von Hippel-Lindau (VHL), uma ubiquitina ligase E3, liga-se ao HIF- $\alpha$  hidroxilado e atua como um componente de reconhecimento de substrato do complexo E3 ubiquitina ligase, levando posteriormente à degradação proteossômica de HIF<sup>16</sup>. Sob hipóxia, a atividade das PHDs é inibida e as subunidades de HIF- $\alpha$  translocam-se para o núcleo celular, ligando-se ao Fator Induzido por Hipóxia 1 beta (HIF-1 $\beta$ ). O heterodímero HIF- $\alpha$ :HIF-1 $\beta$  liga-se então aos elementos responsivos à hipóxia (HREs) de seus genes alvo, resultando na regulação positiva de sua transcrição, que por sua vez, leva à manutenção do fenótipo maligno, estimulando, entre outros, o efeito Warburg<sup>16, 17</sup>. Já o oncogene *MYC* apresenta sua expressão desregulada em diversos tumores, principalmente devido a ganho no número de cópias (amplificação ou translocação cromossômica)<sup>18</sup>, e desempenha um papel essencial na reprogramação metabólica, visto que ativa diretamente a transcrição de vários genes relacionados ao metabolismo tumoral, permitindo a rápida geração de substratos bioenergéticos e intermediários glicolíticos, favorecendo a proliferação descontrolada das células tumorais<sup>19</sup>. Entretanto, a hipóxia não é o único mecanismo de regulação do metabolismo tumoral. Fatores adicionais que exacerbam o crescimento celular e desecandeam o efeito Warburg, incluem a ativação constitutiva de oncogenes (*RAF*, *RAS*, *AKT*, *MTOR*) e a perda de genes supressores tumorais (*VHL*, *PTEN*, *TP53*), visto que os oncogenes e genes supressores de tumor também são ativadores críticos, mas não exclusivos, de HIF-1 $\alpha$ , independente da concentração de O<sub>2</sub><sup>9</sup>. Ainda, destaca-se o aumento da atividade glicolítica nas células tumorais relacionado à perda da expressão do gene supressor tumoral

*TP53*, que, por sua vez, leva à diminuição da expressão da proteína Reguladora de glicose e apoptose induzida por TP53 (TIGAR), responsável pelo bloqueio da degradação da glicose pela via glicolítica e seu direcionamento para a via das pentoses-fosfatos. Portanto, a perda da expressão de TIGAR, mediada pela inativação de *TP53*, resulta no aumento do fluxo da glicose através da via glicolítica, estimulando o efeito Warburg<sup>20</sup>.

Dentre as proteínas alvo da regulação de HIF-1 $\alpha$  e do oncogene *MYC*, destacam-se os transportadores de glicose (GLUTs, família gênica *SLC2A*)<sup>21</sup>, os transportadores de monocarboxilatos (MCTs, família gênica *SLC16A*), responsáveis pelo transporte do lactato<sup>22, 23</sup>, assim como importantes reguladores do pH intracelular, como as anidrases carbônicas (CAs, família gênica *CA*)<sup>24, 25</sup>. Ainda, ressalta-se o papel de proteínas chaperonas na reprogramação metabólica dos tumores, responsáveis pela ancoragem dos MCTs à membrana plasmática e estabelecimento de sua função, como as chaperonas CD147 e CD44<sup>26, 27</sup>. Uma vez que promovem o exporte de lactato acoplado ao exporte de um próton, os MCTs, em especial as isoformas 1 e 4, contribuem para o fenótipo hiperglicolítico das células tumorais ao permitirem que o principal produto do metabolismo energético, o lactato, não acumule intracelularmente. Ainda, devido ao seu papel como reguladores de pH, os MCTs contribuem também de forma importante para o fenótipo de resistência à acidez apresentado pelas células tumorais, desenvolvendo assim um duplo papel na reprogramação metabólica destas células<sup>28</sup>. Finalmente, graças à modelação do microambiente tumoral promovida pelo lactato e prótons que vão acumulando extracelularmente, os MCTs contribuem indiretamente para os fenômenos de angiogênese, evasão ao sistema imune, invasão e metastização tumoral<sup>9, 29</sup> (Figura 2). A expressão aumentada dos MCTs tem sido descrita em diversos tipos tumorais, associando-se em alguns casos a piores prognósticos<sup>23</sup>. Nesse contexto, estudos pré-clínicos com enfoque em modelos de inibição *in vitro* e *in vivo* dos MCTs vem ganhando destaque e apresentando resultados promissores<sup>23</sup>.

Como resultado, os MCTs surgem como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento de tumores que apresentam o efeito Warburg<sup>11</sup> (Figura 3). Atualmente, encontra-se em andamento um ensaio clínico de fase I/II, que investiga a utilização de um inibidor específico de MCT1, o AZD3965 (*AstraZeneca*), para tratamento de pacientes com tumores sólidos avançados ou linfoma (NCT01791595, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Na primeira fase do estudo, já finalizada, os principais objetivos foram descobrir a dose máxima segura do inibidor,

potenciais efeitos colaterais e destino da droga no organismo. Até o momento, 43 pacientes receberam o medicamento em forma de cápsulas por via oral, uma ou duas vezes ao dia, durante um ciclo de 28 dias. De acordo com os resultados descritos, a droga em geral foi bem tolerada com náuseas e fadiga sendo os efeitos colaterais mais comuns observados<sup>30, 31</sup>.



Fonte: Pinheiro *et al.*<sup>14</sup>.

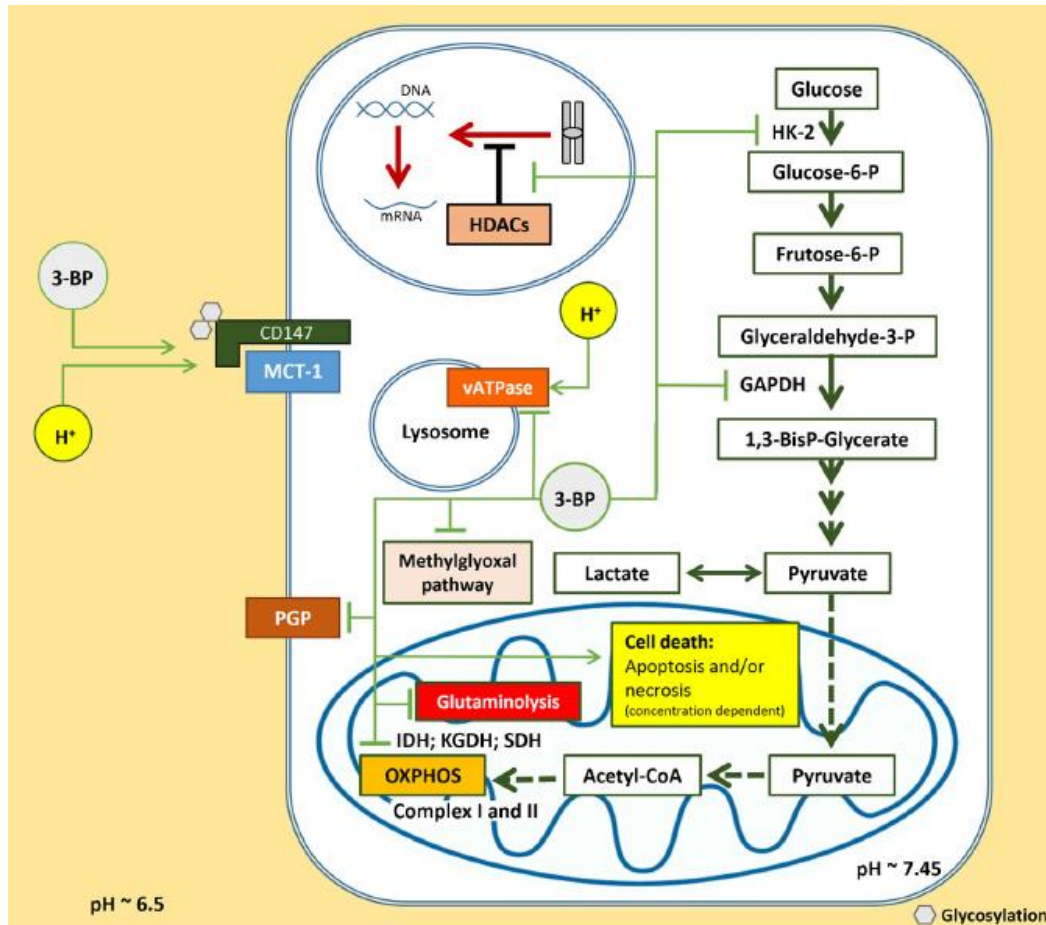
**Figura 3.** Efeitos da inibição da atividade dos MCTs no fenótipo tumoral. A inibição dos MCTs promove o acúmulo de lactato intracelular e o posterior restabelecimento da atividade mitocondrial, levando à acidificação do meio intracelular e, conseqüentemente, ao aumento da morte celular e diminuição da angiogênese, capacidade de invasão e resistência às terapias. (ATP, adenosina trifosfato; pHe, pH extracelular; GLUT, transportador de glicose; pHi, pH intracelular; MCT, transportador de monocarboxilato; TCA, ciclo do ácido tricarboxílico).

## 1.2 3-Bromopiruvato

Com base nos estudos envolvendo a reprogramação metabólica de diferentes tipos tumorais, em especial tumores com elevada expressão de MCT1, identificou-se, através do sequenciamento de última geração (*next generation sequencing*), o MCT1 como o principal determinante para a sensibilidade de células tumorais ao 3-bromopiruvato (3-BP), um potente inibidor da via glicolítica, sendo que o MCT1 está envolvido na captação do 3-BP pelas células tumorais, podendo ser utilizado como um potencial biomarcador para a seleção de tumores sensíveis ao tratamento com o fármaco<sup>32, 33</sup>. O 3-BP é um análogo halogenado do piruvato, que possui propriedades alquilantes e leva à piruvilação de grupos tiol (SH) nos resíduos de cisteína das proteínas e à conseqüente perda de sua funcionalidade. Sua ação se dá principalmente

através da inibição do metabolismo energético das células tumorais, possuindo diferentes alvos, tanto da via glicolítica como da via mitocondrial, levando à rápida depleção do ATP e morte celular (apoptose e necrose)<sup>32, 34</sup>. O 3-BP é o principal inibidor da hexoquinase II (HKII), proteína responsável pela fosforilação intracelular da glicose<sup>35</sup>. A HKII é a isoforma predominantemente expressa em tumores malignos e, considerando-se que a maioria dos tecidos normais expressam muito pouco HKII<sup>36</sup>, antecipa-se uma janela terapêutica suficientemente ampla para inibição de HKII sem efeitos colaterais importantes<sup>37</sup>. Entretanto, embora inicialmente descrito como um inibidor da HKII<sup>38</sup>, o principal alvo do 3-BP é de fato a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)<sup>39, 40</sup>, que apresenta aumento de sua atividade em diferentes tipos tumorais, atuando no metabolismo da glicose, e tem sua expressão modulada por condições de hipóxia<sup>41, 42</sup>. Outros alvos foram também descritos para o 3-BP, incluindo a piruvato quinase (PK), a lactato desidrogenase (LDH), o retículo endoplasmático e os lisossomos<sup>38, 43</sup>, além da isocitrato desidrogenase (IDH), alfa-cetoglutarato desidrogenase ( $\alpha$ KGHD), succinato desidrogenase (SDH), histonas deacetilases (HDACs) e glicoproteína-p (Figura 4)<sup>32</sup>. De acordo, o 3-BP elimina as reservas de ATP celular, diminuindo a proliferação celular e aumentando a morte celular, diminuindo também a atividade dos transportadores de cassetes de ligação de ATP (transportadores ABC) e restaurando a retenção de fármacos nas células malignas. Assim, o tratamento com 3-BP leva a uma maior sensibilidade das células tumorais a drogas antineoplásicas, tais como a daunorrubicina e a doxorrubicina, inibindo o crescimento de tumores *in vivo*, em monoterapia ou em combinação com outros agentes antineoplásicos convencionais<sup>44-47</sup>. Além disso, a depleção de ATP pelo 3-BP demonstrou reverter a resistência de células tumorais de cólon ao tratamento com oxaliplatina e 5-fluorouracila<sup>48</sup>.





Fonte: Azevedo-Silva *et al.*<sup>32</sup>.

**Figura 4.** Mecanismo de ação e alvos do 3-BP em células tumorais. A captação do 3-BP é mediada pelo complexo MCT1/CD147. Uma vez dentro da célula, os principais alvos do 3-BP são a hexoquinase II (HKII) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). O fármaco ainda exerce sua atividade no complexo I e II da cadeia respiratória mitocondrial e, conseqüentemente na fosforilação oxidativa, (OXPHOS), além de atuar na inibição das proteínas isocitrato desidrogenase (IDH), alfa-cetoglutarato desidrogenase ( $\alpha$ KGHD), succinato desidrogenase (SDH), histonas deacetilases (HDACs) e glicoproteína-p (PGP).

Na sequência de resultados promissores de estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo*<sup>43</sup>, em um relato de caso, um paciente jovem apresentando carcinoma hepatocelular fibrolamelar foi submetido ao tratamento com 3-BP, sobrevivendo durante um período mais longo do que o esperado, com uma melhoria da qualidade de vida<sup>49</sup>. No entanto, apesar de todos estes resultados promissores, o 3-BP ainda não se encontra em ensaios clínicos organizados, evidenciando, assim, a importância de novos estudos pré-clínicos para a progressão do inibidor para ensaios de fase I/II.

### 1.3 Melanoma

O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele, tendo como principal fator de risco associado ao seu desenvolvimento a exposição a radiação UV, resultando em progressivo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas<sup>50</sup>, podendo eventualmente ocorrer em mucosas e possuindo uma incidência crescente no Brasil e no mundo<sup>51</sup>. Segundo a última publicação do *Global Cancer Observatory (Globocan)*, estima-se, para o ano de 2020, uma incidência mundial de 324.635 novos casos de melanoma cutâneo, com uma mortalidade estimada de 57.043 casos<sup>52</sup>. De acordo com as estimativas brasileiras, publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer - INCA, para o biênio de 2020/2021, espera-se uma incidência de 4.200 casos para o sexo masculino e 4.250 casos para o sexo feminino<sup>53</sup>.

O manejo de pacientes portadores de melanoma tem mudado devido a uma melhor compreensão da heterogeneidade molecular da doença. Em particular, estudos demonstram que o *BRAF* é um dos oncogenes chave na tumorigênese do melanoma, sendo também um importante fator para decisões terapêuticas<sup>54</sup>. Proteínas do tipo RAF são intermediárias na cascata de sinalização da via MAPK e afetam a proliferação celular, sendo a mutação *BRAF* V600E encontrada em 40% a 60% dos casos de melanoma cutâneo<sup>55</sup>. Esta mutação ativa proteínas a jusante de BRAF na via MAPK, resultando em proliferação e sobrevivência celular mesmo na ausência de fatores de crescimento<sup>56</sup>. O desenvolvimento de fármacos inibidores da via MAPK representa um grande avanço no tratamento do melanoma metastático, sendo o vemurafenibe, um inibidor da ação da proteína BRAF com a mutação V600E, uma opção de terapia. *In vitro*, o vemurafenibe inibe a fosforilação de MEK e ERK, atuando na inibição da proliferação celular em linhagens de melanoma com a mutação *BRAF* V600E<sup>57</sup>. Entretanto, devido à sua resistência intrínseca, nem todas as linhagens celulares de melanoma *BRAF* V600E são igualmente sensíveis ao vemurafenibe e, mesmo após uma resposta inicial benéfica, na maioria dos casos, esta é temporária<sup>58,59</sup>. Apesar de evidências de que a mutação *BRAF* V600E seja preditiva de resposta aos inibidores de BRAF/MEK, a sinalização celular envolvida com a via de BRAF/MAPK pode ser mais heterogênea e localmente regulada pelo microambiente tumoral. Há também a possibilidade de ativação de outras vias, como a via de PI3K/AKT, por ativação de PDGFRB e outros receptores de tirosina quinase, ou reativação da via de MAPK, através, por exemplo, de mutações secundárias em *NRAS*<sup>58-61</sup>. Ainda não se sabe se a resistência terapêutica dos melanomas surge como o resultado de um processo evolutivo

do tumor ou da seleção de clones resistentes pré-existentes que já estavam presentes antes do início da terapia, caracterizando a heterogeneidade genética tumoral, sendo ambas as situações consideradas plausíveis<sup>62</sup>. Importante, mutações em *BRAF* tornam as células energeticamente dependentes do efeito Warburg<sup>63</sup>, sendo que esta reprogramação do metabolismo energético tem sido apontada como uma possível estratégia para o tratamento de melanomas<sup>64</sup>. De fato, mutações em *BRAF* inibem o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), e coativador 1 $\alpha$  do receptor- $\gamma$  ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 $\alpha$ ), inibindo assim a fosforilação oxidativa nas células tumorais, promovendo o efeito Warburg<sup>65-68</sup>. Além disso, a ativação constitutiva do eixo RAF-MAPK aumenta a expressão de HIF-1 $\alpha$ , contribuindo também para um aumento da glicólise<sup>69</sup>.

Recentemente, a imunoterapia revolucionou o campo da oncologia, proporcionando níveis de benefícios sem precedentes no tratamento de pacientes acometidos por diferentes tipos tumorais, incluindo pacientes com melanoma em estágio avançado<sup>70</sup>. Ao contrário dos tratamentos tradicionais, como a radioterapia e a quimioterapia, a imunoterapia atua regulando e ativando o microambiente imunológico, de modo que as células do sistema imune possam atacar e eliminar as células tumorais<sup>71</sup>. Entretanto, ressalta-se que, mesmo com a revolução no tratamento de melanomas metastáticos com o advento da imunoterapia utilizando inibidores de *checkpoint* (anti-CTLA4, anti-PD-1 e anti-PD-L1), aproximadamente 50% dos pacientes não respondem à monoterapia, 40% não respondem à imunoterapia combinada e aproximadamente 30% dos pacientes apresentam recidiva após resposta inicial, demonstrando uma resistência primária (intrínseca) ou resistência secundária (adquirida) quando tratados com as imunoterapias disponíveis<sup>72</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, novas terapias tornam-se necessárias para ultrapassar as limitações das terapias disponíveis para o tratamento de melanomas. Neste contexto, o metabolismo energético surge como um alvo particularmente interessante, dado o seu crescente interesse na última década, assim como a sua relação com uma importante característica genética dos melanomas – a mutação V600E em *BRAF*<sup>63</sup>. O MCT1 surge como uma proteína a ser pesquisada graças ao seu duplo potencial: como alvo terapêutico *per se*<sup>15</sup>, assim como o seu possível papel como mediador de resposta ao tratamento com 3-BP<sup>33</sup>. No entanto, estudos *in vitro* que considerem estas potenciais abordagens terapêuticas em melanomas são escassos, no caso do MCT1 como alvo terapêutico<sup>73</sup>, ou poucos, no caso do 3-BP<sup>74, 75</sup>, deixando demasiadas perguntas por responder, limitando a progressão para ensaios clínicos. Assim, este projeto propõe-se a realizar estudos *in vitro* para avaliar o potencial do MCT1 como alvo terapêutico, assim como reforçar e melhor explorar o potencial do 3-BP como tratamento de melanomas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar o potencial do MCT1 como alvo terapêutico e mediador de resposta ao 3-BP para o tratamento de melanomas.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil metabólico de linhagens comerciais de melanoma;
- Realizar um rastreio de sensibilidade ao 3-BP em linhagens comerciais de melanomas e associar com o perfil metabólico encontrado, com especial ênfase na expressão de MCT1;
- Associar dados de mutações comuns nos melanomas (*BRAF/NRAS/KIT/TERT*) com o perfil metabólico e a sensibilidade ao 3-BP em linhagens comerciais de melanomas;
- Avaliar o efeito do *Knockdown* (KD) de *SLC16A1* (MCT1) nos parâmetros de agressividade tumoral, em linhagens comerciais de melanoma que apresentem expressão de MCT1, em cultura 2D e 3D (pele artificial);
- Avaliar o efeito do tratamento com 3-BP nos parâmetros de agressividade tumoral, em linhagens comerciais de melanoma que apresentem sensibilidade ao 3-BP, em cultura 2D e 3D (pele artificial);
- Avaliar o efeito do KD de *SLC16A1* na resposta ao 3-BP nos parâmetros de agressividade tumoral, em linhagens comerciais de melanoma com MCT1 silenciado, em cultura 2D e 3D (pele artificial).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Linhagens celulares comerciais de melanoma

As linhagens celulares comerciais de melanoma 1205Lu, A375, SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-103, SK-MEL-173, UACC-62, WM9, WM35, WM164, WM278 e WM793 (Tabela 1), 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*), 1% de solução penicilina-estreptomicina (P/S, *Sigma-Aldrich*), e mantidas em incubadora com atmosfera úmida controlada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. A sua autenticação foi realizada através da análise de STR (*short tandem repeat*), no Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, de acordo com a padronização de referência internacional para autenticação de linhagens celulares. Para tal, utilizou-se um painel de oito *primers* fluorescentes (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX e CSF1P0)<sup>76, 77</sup>. Todas as linhagens foram testadas para contaminação por micoplasma através do *MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit* (*Lonza*), seguindo-se as recomendações do fabricante, sendo que as linhagens SK-MEL-19, UACC-62, WM35 e WM164 não apresentaram contaminação por micoplasma, enquanto as linhagens 1205Lu, A375, SK-MEL-28, SK-MEL-103, SK-MEL-173, WM9, WM278 e WM793 apresentaram contaminação.

Todos os ensaios descritos foram realizados com linhagens a partir da terceira passagem, garantindo os padrões celulares estáveis após descongelamento.

**Tabela 1** – Linhagens celulares comerciais de melanoma utilizadas no estudo.

Linhagem celular	Origem
1205Lu	Metástase – xenoinxerto da linhagem WM793
A375	Metástase
SK-MEL-19	Metástase
SK-MEL-28	Metástase
SK-MEL-103	Metástase
SK-MEL-173	Metástase
UACC-62	Metástase
WM9	Metástase
WM35	Primário pele – fase radial de crescimento
WM164	Metástase
WM278	Primário pele – fase vertical de crescimento
WM793	Primário pele – fase vertical de crescimento

#### 4.2 Perfil mutacional (*BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT*)

As diferentes linhagens celulares foram caracterizadas quanto ao status mutacional de genes frequentemente mutados em melanoma (*BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT*)<sup>78</sup>. As células foram cultivadas em condições normais até atingirem aproximadamente 70% de confluência em garrafa de cultura T25. Em seguida, foram lavadas com 1,0 mL de *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS, *Sigma-Aldrich*) e incubadas em 500 µL de *TrypLE Express 1x* (Tripsina, *Gibco*) por quatro minutos, a 37°C, para desagregação celular. A tripsina foi inativada com meio de cultura e então as células centrifugadas a 1500 rpm (rotações por minuto), por cinco minutos. Posteriormente, o DNA foi extraído a partir dos *pellets* celulares obtidos, utilizando-se o kit comercial *Biopur Mini Spin Plus* (*Biometrix Diagnóstica*), conforme as recomendações do fabricante. Em seguida, todas as amostras foram analisadas por espectrofotômetro (*NanoDrop2000*, *Thermo Fisher Scientific*) para avaliação da qualidade do material genético extraído. Somente as amostras com razões 260/280 e 260/230 entre 1,8 e 2,0 foram consideradas amostras de alta qualidade e utilizadas nos passos posteriores. Para a análise de mutações dos genes *BRAF* (éxon 15), *NRAS* (códon 61), *KIT* (éxons 9, 11, 13, 17) e região promotora do *TERT*, utilizou-se o sequenciamento direto de Sanger. Inicialmente, amplificou-se cada região de interesse com a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polymerase chain reaction*). A sequência dos *primers* utilizados, assim como as condições de

ciclagem e o tamanho dos fragmentos gerados, estão descritos na Tabela 2. Para amplificação de *BRAF*, utilizou-se um volume final de 15 µL para cada amostra, sendo: 10,6 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 1,5 µL de *10x PCR Rxn Buffer (Invitrogen)*, 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (5 mM, *Invitrogen*), 0,3 µL de *dNTPs (Invitrogen)*, 0,45 µL de *primers forward e reverse (10 µM, Sigma-Aldrich)*, 0,1 µL de *Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen)* e 1,0 µL de DNA a 50 ng/µL. Para as amplificações de *NRAS* e *KIT*, utilizou-se um volume final de 15 µL por amostra, sendo: 6,2 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 7,2 µL de *HotStarTaq Master Mix (Qiagen)*, 0,3 µL de *primers forward e reverse (10 µM, Sigma-Aldrich)* e 1,0 µL de DNA a 50 ng/µL. Para a amplificação da região promotora de *TERT*, utilizou-se um volume final de 12,5 µL para cada amostra, sendo: 3,5 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q, 0,125 µL de *primers forward e reverse (10 µM, Sigma-Aldrich)*, 6,5 µL de *HotStarTaq Master Mix (Qiagen)*, 1,25 µL de *Q-Solution (Qiagen)* e 1,0 µL de DNA a 50 ng/µL. Para confirmação de amplificação da região de interesse, realizou-se eletroforese em gel de agarose 1,5%, por 40 minutos, a 100 volts. Posteriormente, purificou-se 5,0 µL do produto de PCR com 2,0 µL de *ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific)* durante 15 minutos a 37°C, seguido de 30 minutos a 80°C para inativação enzimática. Para a reação de sequenciamento, utilizou-se 0,3 µL de *BigDye Terminator v3.1 Ready Mix (Applied Biosystems)*, 2,0 µL de *BigDye Terminator v3.1 Sequencing Buffer (Applied Biosystems)* e 1,0 µL de *primer (3,2 µM)*. As condições para a reação de sequenciamento consistiram de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, cinco segundos a 50°C e quatro minutos a 60°C. Em seguida, a reação de sequenciamento foi novamente purificada com a adição de 45 µL de *SAM Solution (Applied Biosystems)* e 10 µL de *XTerminator Solution (Applied Biosystems)*, seguido de agitação por 30 minutos e posterior centrifugação a 2000 rpm, por dois minutos. As amostras purificadas foram submetidas à eletroforese capilar no sequenciador *3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* e os resultados analisados com o auxílio do *software SeqScape v2.7 (Applied Biosystems)*.



**Tabela 2** – Condições e sequência dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes *BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT*.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Fragmento	Ciclagem
<b><i>BRAF</i></b> (éxon 15)	<b>Forward</b> 5'-AGTGGATTGCGGGGCACAGA-3'	254 pb	96°C – 15 min
	<b>Reverse</b> 5'-CAGCGCTGCCTGAAACTC-3'		<b>96°C – 45 seg</b> <b>55,5°C – 45 seg</b> <b>72°C – 45 seg</b> 72°C – 10 min
<b><i>NRAS</i></b> (códon 61)	<b>Forward</b> 5'-TCTTACAGAAAACAAGTGGT-3'	174 pb	96°C – 15 min
	<b>Reverse</b> 5'-GTAGAGGTTAATATCCGCAA-3'		<b>96°C – 45 seg</b> <b>55,6°C – 45 seg</b> <b>72°C – 45 seg</b> 72°C – 10 min
<b><i>KIT</i></b> (éxon 9)	<b>Forward</b> 5'-AGAGTAAGCCAGGGCTTTTG-3'	272 pb	96°C – 15 min
	<b>Reverse</b> 5'-AGACAGAGCCTAAACATCC-3'		<b>96°C – 45 seg</b> <b>58°C – 45 seg</b> <b>72°C – 45 seg</b> 72°C – 10 min
<b><i>KIT</i></b> (éxon 11)	<b>Forward</b> 5'-CCAGAGTGCTCTAATGACTG-3'	266 pb	96°C – 15 min
	<b>Reverse</b> 5'-GGAGTTCCTTAAAGTCACTG-3'		<b>96°C – 45 seg</b> <b>58°C – 45 seg</b> <b>72°C – 45 seg</b> 72°C – 10 min
<b><i>KIT</i></b> (éxon 13)	<b>Forward</b> 5'-CATGCGCTTGACATCAGTTT-3'	212 pb	96°C – 15 min
	<b>Reverse</b> 5'-TGACAGACAATAAAAGGCAGCTT-3'		<b>96°C – 45 seg</b> <b>58°C – 45 seg</b> <b>72°C – 45 seg</b> 72°C – 10 min
<b><i>KIT</i></b> (éxon 17)	<b>Forward</b> 5'-GGTTTCTTTTCTCCTCAACC-3'	249 pb	96°C – 15 min
	<b>Reverse</b> 5'-GGATTTACATTATGAAAATCACAGG-3'		<b>96°C – 45 seg</b> <b>58°C – 45 seg</b> <b>72°C – 45 seg</b> 72°C – 10 min
<b><i>TERT</i></b>	<b>Forward</b> 5'-AGTGGATTGCGGGGCACAGA-3'	235 pb	95°C – 15 min
	<b>Reverse</b> 5'-CAGCGCTGCCTGAAACTC-3'		<b>95°C – 30 seg</b> <b>64°C – 1 min 30 seg</b> <b>72°C – 30 seg</b> 72°C – 7 min

pb: pares de base.

### 4.3 Caracterização do perfil metabólico

As linhagens celulares de melanoma foram caracterizadas quanto à expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo (MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX), através das técnicas de imunocitoquímica e *western blotting*, assim como quanto ao seu metabolismo energético, com a quantificação dos níveis de glicose e lactato extracelular.

#### 4.3.1 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 (Trypsina, Gibco)* e posteriormente fixadas com 2,0 mL de paraformaldeído 3,7%, tamponado (pH: 7,2), *overnight*. Centrifugou-se cada linhagem por cinco minutos, a 1500 rpm, e retirou-se a solução de paraformaldeído, lavando-as por duas vezes com 1,0 mL de DPBS. Aos *pellets* celulares fixados, adicionou-se 500 µL de agarose 2%, a 60°C. Rapidamente, as células foram vortexadas e então centrifugadas novamente por dois 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 quatro micras foram utilizados para a realização da imunocitoquímica. Em síntese, cada corte foi desparafinado em estufa a 80°C, por 10 minutos, lavado por cinco minutos em três banhos de xilol consecutivos, hidratado com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70% e 50%) e, por fim, colocado em água. Após, realizou-se a recuperação antigênica. Para tal, as lâminas foram acomodadas em recipiente em banho maria com agitação, a 98°C, contendo citrato (pH = 6,0) ou EDTA (pH = 8,0), por 20 minutos, seguido de 20 minutos de arrefecimento. Posteriormente, cada lâmina foi lavada em tampão TBS (*tris buffered saline*) 1x, durante cinco minutos, por duas vezes, seguido da inativação das peroxidases endógenas com solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a 3% em metanol, durante 10 minutos. Após nova lavagem em TBS 1x, durante cinco minutos, por duas vezes, seguiu-se a incubação com o anticorpo primário. Os anticorpos primários utilizados, assim como todas as condições referentes à imunocitoquímica estão descritos na Tabela 3. Para as reações imunocitoquímicas, utilizou-se o kit *Envision+ Dual Link (Dako)*, com sistema polímero, seguindo-se as recomendações do fabricante. Para visualização das reações, utilizou-se o *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako)* como cromógeno, conforme indicado pelo fabricante. Por fim, cada corte foi lavado em água, contra corado com Hematoxilina de Harris (*EasyPath*) durante um minuto, desidratado com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%), lavado por cinco minutos em três banhos de xilol consecutivos e a lâmina montada com meio de montagem *Entellan (Merck)* e lamínula. Como controles positivos, utilizou-se carcinoma de

células escamosas de cavidade oral para MCT1, MCT4 e CD44, rim para MCT2, cólon para CD147, placenta para GLUT1 e estômago para CAIX. Regiões negativas nos cortes utilizados como controles positivos foram consideradas para controles negativos de reação.

**Tabela 3** – Condições e anticorpos utilizados na imunocitoquímica.

Proteína	Recuperação antigênica	Anticorpo	Clonalidade	Diluição, tempo e temperatura de incubação
<b>MCT1</b>	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	AB3538P Chemicon International	Policlonal	1:300, <i>overnight</i> , temperatura ambiente
<b>MCT2</b>	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	sc-50322 Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	1:800, 2 horas, temperatura ambiente
<b>MCT4</b>	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	sc-50329 Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	1:1000, 2 horas, temperatura ambiente
<b>CD147</b>	EDTA (1 mM, pH=8,0), 98°C, 20 min	sc-71038 Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal (1.BB.218)	1:1000, <i>overnight</i> , temperatura ambiente
<b>CD44</b>	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	MCA2726 AbD Serotec	Monoclonal (156-3C11)	1:2000, 2 horas, temperatura ambiente
<b>GLUT1</b>	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	ab15309 Abcam	Policlonal	1:2000, 2 horas, temperatura ambiente
<b>CAIX</b>	Tampão Citrato (0,01M, pH=6,0), 98°C, 20 min	ab15086 Abcam	Policlonal	1:4000, 2 horas, temperatura ambiente

#### 4.3.2 Western blotting

Para a análise da expressão proteica através do *western blotting*, as linhagens celulares de melanoma foram cultivadas em condições normais de crescimento até atingirem cerca de 70-80% de confluência, em duas garrafas T75. Em seguida, foram lavadas com 5,0 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, a 4°C, durante 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações proteicas determinadas utilizando-se curva padrão de albumina de soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) e o ensaio *Bradford* (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, as proteínas foram diluídas em tampão da amostra (*Laemmli 2x Concentrate, Sigma-Aldrich*) e desnaturadas a 95°C, por cinco minutos. Para evitar degradação proteica, as amostras utilizadas para marcação de GLUT1 não passaram pelo processo de desnaturação. Alíquotas de 20 µg de proteína total foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose (*Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences*) utilizando-se tampão de transferência contendo 25 mM Tris-base/Glicina. A transferência foi realizada durante 30 minutos no equipamento *TransBlot Turbo Transfer (Bio-Rad)*. 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 nos 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 4.

**Tabela 4** – Condições e anticorpos utilizados no *western blotting*.

Proteína	Anticorpo	Clonalidade	Diluição, tempo e temperatura de incubação
<b>MCT1</b>	sc-365501 Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal (H-1)	1:200, <i>overnight</i> , 4°C
<b>MCT2</b>	ab81262 Abcam	Policlonal	1:1200, <i>overnight</i> , 4°C
<b>MCT4</b>	sc-50329 Santa Cruz Biotechnology	Policlonal	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C
<b>CD147</b>	sc-71038 Santa Cruz Biotechnology	Monoclonal (1.BB.218)	1:250, <i>overnight</i> , 4°C
<b>CD44</b>	MCA2726 AbD Serotec	Monoclonal (156-3C11)	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
<b>GLUT1</b>	ab15309 Abcam	Policlonal	1:1500, <i>overnight</i> , 4°C
<b>CAIX</b>	ab15086 Abcam	Policlonal	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C
<b>ACTB</b>	8H10D10 Cell Signaling Technology	Monoclonal (8H10D10)	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C

Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas por três vezes em TBS-T (5+3+3 minutos) 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 por três vezes em TBS-T (5+3+3 minutos) e então levadas para revelação da marcação no equipamento *ImageQuant LAS 4000 mini* (*GE Healthcare Life Sciences*). Os anticorpos ligados foram visualizados por quimioluminescência através do kit *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (*Thermo Fisher Scientific*). A  $\beta$ -actina (ACTB) foi utilizada como proteína endógena normalizadora. Todos os resultados apresentados referentes ao *western blotting* são de ao menos dois experimentos independentes.

#### **4.3.3 Quantificação dos níveis de glicose e lactato extracelular**

Para a análise de glicose e lactato extracelular das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma, utilizou-se os kits *Glucose Assay* (*Spinreact*) e o *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. Posteriormente, os meios de cultura foram coletados nos tempos de 24 e 48 horas e armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até à quantificação. Para os dois tempos analisados, 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). 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 e 48 horas. O efluxo de lactato foi obtido através da subtração entre o lactato extracelular quantificado em 24 e 48 horas e o lactato extracelular quantificado no tempo zero. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e experimentais.

#### **4.4 Rastreamento de sensibilidade ao 3-bromopiruvato**

Com base em um trabalho prévio publicado pelo grupo<sup>79</sup>, o 3-BP (*Sigma-Aldrich*) foi diluído em DPBS e utilizado em uma gama de concentrações (5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 75  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$ ) para determinação de valores de  $\text{IC}_{50}$  (concentração mínima da

substância capaz de reduzir 50% da viabilidade celular) e de GI (do inglês *growth inhibition*, inibição do crescimento), após tratamento durante 24 e 48 horas. O volume de 3-BP (em DPBS) adicionado ao meio de cultura nunca excedeu os 10%. Para o tratamento com 3-BP, as células foram crescidas em condições normais de cultivo e, posteriormente,  $5,0 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM 10% SFB. Após 24 horas, o meio de plaqueamento foi retirado e, em seguida, o 3-BP, diluído em meio de cultura DMEM 0% SFB, foi adicionado às placas nas concentrações previamente descritas. Após 24 e 48 horas de tratamento, mensurou-se a biomassa celular para o cálculo dos valores de  $IC_{50}$ , no qual as células em presença do veículo (DPBS) foram utilizadas como controle, correspondendo a 100% de sobrevivência. O efeito do tratamento com o 3-BP na biomassa celular foi mensurado utilizando-se o ensaio de Sulforodamina B (*TOX-6, Sigma-Aldrich*), conforme as recomendações do fabricante. Em síntese, após a realização dos protocolos experimentais de tratamento, os poços foram lavados com 100  $\mu$ L de DPBS, seguido da adição de 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético 10% (*Sigma Aldrich*) gelado, com posterior período de incubação de uma hora, a 4°C. Após, 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  $\mu$ L de Sulforodamina B 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  $\mu$ 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 de ELISA (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*), sendo o comprimento de onda de 565 nm 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. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

Após determinação do  $IC_{50}$  para o tratamento com 3-BP em 24 e 48 horas, utilizou-se uma classificação de sensibilidade baseada no GI, que permite avaliar, em concentração fixa da droga, as médias de inibição, categorizando a resposta à terapia com 3-BP em três grupos: alta sensibilidade (GI: >60%), moderada sensibilidade (GI: 40 – 60%) e resistência (GI: <40%)<sup>77</sup>. A concentração escolhida do 3-BP para o cálculo das médias de GI para as 24 horas (100  $\mu$ M) e para as 48 horas (75  $\mu$ M) representa a concentração de 3-BP testada na determinação do

IC<sub>50</sub> que mais se aproxima da média dos valores de IC<sub>50</sub> obtidos para as 12 linhagens nos tempos descritos.

#### 4.5 **Knockdown do gene *SLC16A1* (MCT1)**

Com base nos resultados obtidos para o perfil metabólico das linhagens celulares de melanoma, especialmente a expressão de MCT1, assim como os dados obtidos para o rastreio de sensibilidade ao 3-BP, duas linhagens foram selecionadas para realização do *knockdown* do gene *SLC16A1* (gene que codifica o MCT1): UACC-62 (MCT1 expresso/alta sensibilidade ao 3-BP) e WM164 (MCT1 e MCT4 expressos/alta sensibilidade ao 3-BP).

O silenciamento de MCT1 deu-se através da técnica de CRISPR/Cas9, utilizando-se os plasmídeos MCT1 CRISPR/Cas9 (*sc-400363-KO-2*, Santa Cruz Biotechnology) para edição do gene *SLC16A1*, MCT1 HDR (*sc-400363HDR-2*, Santa Cruz Biotechnology) que confere resistência à puomicina, assim como um plasmídeo controle (*Control CRISPR/Cas9*, *sc-418922*, Santa Cruz Biotechnology) designado como controle negativo de transfecção. Em síntese,  $3,0 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de seis poços em meio DMEM 10% SFB sem a adição de antibióticos, seguindo a recomendação do fabricante. Simultaneamente, preparou-se a solução A e B para co-transfecção das linhagens e geração das células KD; a solução A, contendo 2,0 µg do plasmídeo MCT1 CRISPR/Cas9 e 2,0 µg do plasmídeo MCT1 HDR, completando-se para um volume final de 150 µL com meio de transfecção (*Plasmid Transfection Medium*, *sc-108062*, Santa Cruz Biotechnology), e a solução B, contendo 10 µL do *UltraCruz Transfection Reagent* (Santa Cruz Biotechnology) como agente de transfecção, completando-se para um volume final de 150 µL com meio de transfecção. Após o preparo, ambas soluções repousaram por cinco minutos à temperatura ambiente, sendo posteriormente misturadas e deixadas em repouso à temperatura ambiente por mais 20 minutos. Após, adicionou-se os 300 µL finais a cada linhagem, mantendo as mesmas em cultura por 24 horas, quando se retirou o meio de transfecção e se adicionou meio DMEM 10% SFB, 1% P/S. Para a geração das células controle, utilizou-se 2,0 µg do plasmídeo controle, seguindo-se o protocolo de transfecção como descrito anteriormente. A co-transfecção das células KD foi visualizada através da fluorescência vermelha (RFP, do inglês *red fluorescent protein*), presente em função do plasmídeo MCT1 HDR inserido. A transfecção das células controle foi visualizada através da fluorescência verde (GFP, do inglês *green fluorescent*

*protein*), presente em função do plasmídeo controle inserido. Cinco dias após a transfecção, as células KD foram selecionadas por tratamento com 2,0 µg de puomicina durante 15 dias, trocando-se o meio com o antibiótico a cada três dias. Posteriormente, realizou-se o *cell sorting* por citometria de fluxo (*BD FACSMelody Cell Sorter, BD Biosciences*) para a individualização de células únicas RFP (KD) e GFP (controle) positivas em placas de 96 poços. Os clones viáveis foram transferidos para placas de 24 poços e, posteriormente, para placas de seis poços, onde se realizou a extração proteica. O silenciamento da expressão de MCT1 foi confirmado por *western blotting* (como descrito no item 6.3.2) em três amostras independentes antes de se prosseguir para os experimentos funcionais. Todas as amostras foram normalizadas pela proteína endógena ACTB e as linhagens parentais consideradas controles positivos de normalização para comparação da expressão de MCT1 de seus respectivos clones.

#### **4.6 Knockdown do gene *SLC16A3* (MCT4) na linhagem WM164 MCT1 KD por siRNA**

Devido ao aumento da expressão de MCT4 após o silenciamento de MCT1 na linhagem WM164 MCT1 KD, optou-se pela utilização da metodologia de RNA de interferência para se atingir o duplo silenciamento dos transportadores (MCT1 via CRISPR/Cas9 e MCT4 via siRNA).

Para os experimentos de silenciamento do MCT4, utilizou-se a transfecção reversa na linhagem WM164 MCT1 KD como previamente descrito<sup>80</sup>. Em síntese,  $3,0 \times 10^5$  células foram semeadas em placas de seis poços na presença de 10 nM do siRNA de MCT4 (*siRNA SLC16A3, s17417, Ambion*) ou siRNA controle (*Silencer Select Negative Control No.1 siRNA, 4390843, Ambion*), ambos diluídos em 500 µL de *Opti-MEM I (Gibco)*, além de 1 µL/mL de *Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher Scientific)* e 1500 µL de meio DMEM 10% SFB sem antibióticos. O silenciamento de MCT4 foi avaliado por *western blotting* (vide item 6.3.2), sendo confirmado em 24 e 192 horas. Os tempos escolhidos para avaliação do silenciamento de MCT4 baseiam-se no tempo de execução dos ensaios funcionais, sendo o tempo de 192 horas (sete dias) utilizado para a realização do ensaio de formação de colônias e o tempo de 24 horas (um dia) utilizado para a realização dos demais ensaios.

#### **4.7 Caracterização do efeito do *knockdown* de *SLC16A1* (MCT1) e do tratamento com 3-BP *in vitro***



O efeito do silenciamento de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos ou combinados, foi avaliado através da caracterização funcional *in vitro* das linhagens UACC-62 e WM164 controles (plasmídeo controle) e KD. No caso da linhagem WM164, também se utilizou a linhagem duplamente silenciada (MCT1 via CRISPR/Cas9 e MCT4 via siRNA) para sua avaliação funcional. Para o tratamento com 3-BP, utilizou-se a concentração IC<sub>50</sub> referente a cada linhagem celular (40 µM para UACC-62 e 80 µM para WM164). As células UACC-62 e WM164 geradas como controles negativos de transfecção e na presença do veículo da droga (DPBS) foram utilizadas como controles de normalização em cada ensaio realizado. Todos os ensaios encontram-se descritos a seguir e estão otimizados pelo grupo<sup>81, 82</sup>.

#### **4.7.1 Viabilidade celular**

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na viabilidade celular, foi avaliado pela técnica de Sulforodamina B (*TOX-6, Sigma-Aldrich*), conforme descrito no item 4.4.

#### **4.7.2 Metabolismo celular (glicose e lactato extracelular)**

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, no perfil glicolítico celular, foi avaliado pela quantificação dos níveis de glicose e lactato extracelular, presentes em amostras de meio de cultura colhidas durante os ensaios de viabilidade celular (vide item 4.7.1). Conforme referido acima (vide item 4.3.3), a quantificação foi realizada através dos kits comerciais colorimétricos de glicose (*Glucose Assay, Spinreact*) e lactato (*Lactate Assay, Spinreact*), seguindo-se as instruções dos fabricantes. Os resultados obtidos foram normalizados pela biomassa total, medida pelo ensaio de Sulforodamina B (*TOX-6, Sigma-Aldrich*), conforme descrito no item 4.4. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

#### **4.7.3 Quantificação do metabolismo energético em tempo real (*Seahorse*)**

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na modulação do metabolismo energético, foi avaliado através da quantificação em tempo real do consumo de oxigênio (quantificação de O<sub>2</sub>) e acidificação do meio extracelular (quantificação de H<sup>+</sup>) através da plataforma *Seahorse Analyzer XFp (Agilent)*. Em síntese, cerca

de  $5,0 \times 10^3$  células foram semeadas com 80  $\mu\text{L}$  de meio DMEM 10% SFB, 1% P/S nas miniplacas de oito poços *Seahorse XFp Cell Culture Miniplates (Agilent)*, em duplicatas, e, em seguida, colocadas em incubadora com atmosfera úmida controlada a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas. Em paralelo, os cartuchos sensores (*Seahorse XFp Sensor Cartridges, Agilent*) foram hidratados com a adição de 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q e colocados em incubadora úmida a 37°C, sem  $\text{CO}_2$ , por 24 horas. Posteriormente, retirou-se a  $\text{H}_2\text{O}$  Milli-Q dos cartuchos sensores e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de solução de calibração (*Seahorse XF Calibrant, Agilent*), deixando-os novamente em incubadora úmida a 37°C, sem  $\text{CO}_2$ , por uma hora. Em paralelo à incubação dos cartuchos sensores com solução de calibração, retirou-se as células da incubadora e realizou-se a lavagem das mesmas com meio de cultura específico (*Seahorse XF Base Medium, Agilent*). Para a lavagem das células previamente semeadas, retirou-se 60  $\mu\text{L}$  do meio de plaqueamento, deixando-se 20  $\mu\text{L}$  residuais em cada poço, e, então, adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  de *XF Base Medium*. Novamente, retirou-se 200  $\mu\text{L}$  do *XF Base Medium*, deixando-se um volume residual de 20  $\mu\text{L}$  em cada poço, e então adicionou-se 160  $\mu\text{L}$  de *XF Base Medium*, completando para um volume final de 180  $\mu\text{L}$ . Em seguida, as células foram colocadas em incubadora úmida a 37°C e sem  $\text{CO}_2$ , durante 45 minutos. Posteriormente, retirou-se os cartuchos sensores da incubadora e adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de 3-BP ( $\text{IC}_{50}$ ) ao compartimento A de cada poço. Em seguida, os cartuchos foram levados ao *Seahorse Analyzer XFp (Agilent)* para verificação e calibração de todos os sensores. Assim que calibrados, os cartuchos sensores mantiveram-se no equipamento para a posterior quantificação de  $\text{O}_2$  e  $\text{H}^+$  nas miniplacas com as linhagens celulares UACC-62 e WM164 controles e MCT1 KD. A quantificação foi composta por um total de 30 ciclos, sendo os primeiros 10 ciclos mensurados sem a adição de 3-BP (60 minutos - *baseline*) e os 20 ciclos posteriores mensurados na presença do inibidor (120 minutos - tratamento).

#### 4.7.4 Proliferação celular

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, no potencial de proliferação celular, foi avaliado pelo kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric (Roche)*, de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese,  $5,0 \times 10^3$  células foram semeadas em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM 10% SFB. Após 24 horas, o meio de plaqueamento foi retirado e, em seguida, o 3-BP, diluído em meio de cultura DMEM

0% SFB, adicionado aos poços. Após, adicionou-se 1,0 µL da solução de marcação BrdU, numa concentração final de 10 µM/poço. Após 24 horas de exposição ao fármaco e ao BrdU, o meio foi aspirado, seguido da adição de 200 µL da solução fixadora e desnaturante de DNA, por um período de 30 minutos, à temperatura ambiente. Após, aspirou-se a solução dos poços, adicionando-se em seguida 100 µL do anticorpo anti-BrdU, com incubação por 90 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados com 200 µL de solução de lavagem, seguido da adição de 100 µL 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 de ELISA (*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. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

#### **4.7.5 Migração celular (*Transwell*)**

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na capacidade de migração celular, foi avaliado utilizando-se o ensaio de migração *transwell*, com os insertos *Falcon Permeable Support for 24-well Plate with 8.0 µm Transparent PET Membrane (Corning)*, de acordo com as instruções do fabricante. Em síntese,  $2,5 \times 10^5$  células foram semeadas no compartimento superior dos insertos, em 500 µL de meio de cultura DMEM 0% SFB contendo 3-BP, permitindo a migração das células até o compartimento inferior, contendo 750 µL 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 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. Por fim, as membranas presentes em cada inserto foram retiradas e montadas sobre lâmina

utilizando meio de montagem *Entellan* (Merck) e lamínula, e então fotografadas em sua totalidade (aproximadamente 10 campos) no microscópio Olympus BX43 (100× magnificação). Posteriormente, as células migratórias foram quantificadas com o *software OpenCFU* (versão 3.8)<sup>83</sup>. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e triplicatas biológicas.

#### 4.7.6 Invasão celular (*Transwell*)

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na capacidade de invasão celular, foi avaliado utilizando-se o ensaio de invasão *transwell*, com as placas e insertos de invasão *Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber with BD Matrigel Matrix* (Corning), com membrana contendo matrigel e seguindo-se as recomendações do fabricante. Inicialmente, hidratou-se o matrigel presente no compartimento superior dos insertos adicionando-se 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, retirou-se o meio utilizado para a hidratação do matrigel e semeou-se  $2,5 \times 10^5$  células no compartimento superior dos insertos em 500 µL de meio de cultura DMEM 0% SFB contendo 3-BP, 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, 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 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. Por fim, as membranas presentes em cada inserto foram retiradas e montadas sobre lâmina utilizando meio de montagem *Entellan* (Merck) e lamínula, e então fotografadas em sua totalidade (aproximadamente 10 campos) no microscópio Olympus BX43 (100× magnificação). Posteriormente, as células capazes de invadir a membrana foram quantificadas

com o *software OpenCFU* (versão 3.8)<sup>83</sup>. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e triplicatas biológicas.

#### 4.7.7 Formação de colônias

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, no potencial de formação de colônias, foi avaliado utilizando-se o ensaio clonogênico dependente de ancoragem. Em síntese,  $5,0 \times 10^2$  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 3-BP, diluído em meio de cultura DMEM 10% SFB, adicionado aos poços. Após sete 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 foto-documentados com o auxílio do microscópio estereoscópico SZX7 (*Olympus Life Science*) e quantificados pelo programa *OpenCFU* (versão 3.8)<sup>83</sup>. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas experimentais e triplicatas biológicas.

#### 4.7.8 Apoptose

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na apoptose celular, foi avaliado utilizando-se o anticorpo *BV421 Annexin V* (*BD Horizon*) em conjunto com o corante de viabilidade celular *7-Aminoactinomycin D* (*7-AAD*, *BD Horizon*). Para tal,  $3,0 \times 10^5$  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 3-BP, diluído em meio de cultura DMEM 0% SFB, adicionado aos poços. Após 24 horas de exposição à droga, seguiram-se as recomendações do fabricante. Em síntese, todos os meios foram coletados e reservados (para avaliação das células em suspensão) e as células aderidas colhidas a partir de desagregação celular com *Accutase Solution* (*Sigma-Aldrich*). Em seguida, as células aderidas desagregadas foram adicionadas aos meios coletados previamente, centrifugando-se a 1.500 rpm, por cinco minutos, seguido da adição de 1,0 mL de DPBS. Transferiu-se 250  $\mu$ L

da solução celular em suspensão para tubo de citometria, adicionando-se 2,5  $\mu$ L do *BV421 Annexin V (BD Horizon)* e 2,5  $\mu$ L do *7-AAD (BD Horizon)*, seguido de incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente e protegido da luz. Em seguida, adicionou-se 200  $\mu$ L de *Annexin V Binding 1x (BD Pharmingen)* a cada tubo. Posteriormente, a porcentagem de células em apoptose (dupla marcação) foi determinada através de citometria de fluxo (*BD FACSMelody Cell Sorter, BD Biosciences*), com um total de 30.000 eventos coletados para cada condição analisada. Os resultados foram analisados com o auxílio do *software BD FACSCorus (BD Biosciences, versão 1.3)*. Os experimentos envolvendo a linhagem UACC-62 foram realizados em duplicatas biológicas. Os experimentos envolvendo a linhagem WM164 foram realizados em triplicatas biológicas.

#### **4.7.9 Cultura organotípica de pele contendo melanoma**

O efeito do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, também foi avaliado em culturas organotípicas de pele (modelo 3D) contendo melanoma. A cultura organotípica de pele permite a reconstrução *in vitro* das camadas da derme e epiderme, possibilitando a análise do potencial de invasão de tumores cutâneos, assim como a avaliação do crescimento e progressão das linhagens celulares de melanoma.

Para a reconstrução da pele *in vitro* (cultura organotípica), seguiu-se o protocolo de Faião-Flores e colaboradores<sup>84</sup>. Resumidamente, os equivalentes dérmicos foram preparados em placas de seis poços, com o plaqueamento de  $1,5 \times 10^5$  de fibroblastos humanos em uma matriz de colágeno tipo 1 (*BD Biosciences*). Após a polimerização do equivalente dérmico, foram plaqueados  $1,5 \times 10^5$  queratinócitos humanos e  $10^4$  melanócitos humanos na presença de  $50 \times 10^4$  células de melanoma das linhagens UACC-62 e WM164 (controles e MCT1 KD), sobre o equivalente dérmico, mantendo-se a pele submersa em meio de cultura DMEM 10% SFB por 24 horas. Em seguida, a estrutura foi transferida para uma tela de aço, gerando uma interface ar-líquido. A pele reconstituída foi mantida na interface ar-líquido por 10 dias, permitindo assim a completa estratificação e diferenciação dos queratinócitos. Durante os 10 dias, a parte inferior da pele reconstituída foi mantida em contato com meio de cultura específico, composto de 67,5% de DMEM (*Gibco*), 10% SFB (*Gibco*), 22,5% de Ham's F-12 (*Gibco*), 5  $\mu$ g/mL Apo-transferrina (*Sigma-Aldrich*), 5  $\mu$ g/mL de Insulina (*Sigma-Aldrich*), 0,4 mg/mL de Hidrocortisona 21-hemisuccinato de sódio (*Sigma-Aldrich*), 1 ng/mL de EGF (do

inglês *epidermal growth factor*, Gibco) e 0,1 nM de Toxina colérica (*Sigma-Aldrich*). Após os 10 dias em cultura na interface ar-líquido, adicionou-se os tratamentos com o 3-BP ou DPBS, diluídos em meio DMEM 0% SFB, por 24 horas. Após as 24 horas, todas as peles foram lavadas com DPBS e em seguida fixadas por 24 horas em formol tamponado 10%, a 4°C. Posteriormente, as peles foram lavadas em etanol 70% e emblocadas em parafina para cortes e análise de histologia, utilizando-se a coloração com hematoxilina e eosina para confirmação da organização tecidual e análise das condições testadas. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas biológicas.

#### **4.7.10 Perfil da expressão de genes relacionados ao metabolismo celular (*NanoString*)**

O efeito do silenciamento de MCT1 no perfil de expressão de 180 genes relacionados ao metabolismo celular foi avaliado pela 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 Kit* (*Invitrogen*), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram extraídos *pellets* celulares das linhagens UACC-62 e WM164 controles e MCT1 KD, 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 20 ng/μL.

Para as reações de hibridização, utilizou-se um volume final de 15 μL por amostra, sendo: 10 μL de *TagSet Master Mix*, contendo 2,0 μL de *TagSet*, 5,0 μL de *Hybridization Buffer*, 0,5 μL de *Probe A* (5 nM), 0,5 μL de *Probe B* (25 nM), além de 2,0 μL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Após a adição de 10 μL do *TagSet Master Mix* em tubos *strip*, adicionou-se 5,0 μL de cada amostra (100 ng totais). 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>85</sup>, definindo-se assim o melhor método de normalização. Com o auxílio do pacote *NanoStringNorm, versão 1.2.1.1*<sup>86</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 (*log2*). Após a normalização, avaliou-se os genes diferencialmente expressos nas linhagens controle e MCT1 KD, com o auxílio do pacote *NanoStringNorm, versão 1.2.1.1*<sup>86</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* de 2,0. A análise estatística realizada encontra-se descrita no item 5. Por fim, a *clusterização* hierárquica e construção dos *heatmaps* foi realizada com o pacote *ComplexHeatmap, versão 2.0.0*<sup>87</sup>. A análise de enriquecimento funcional de vias e construção dos gráficos de interação gênica, foi realizada no *software STRING*<sup>88</sup>. A entrada de dados foi referente aos genes diferencialmente expressos e únicos das linhagens UACC-62 MCT1 KD e WM164 MCT1 KD que apresentaram *fold change* de 2,0 e  $p < 0,05$ . Os dados apresentados foram adquiridos com base num *score* de interação gênica de 0,400.



## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados coletados foram armazenados e analisados no *software GraphPad Prism 7*. Os dados quantitativos relacionados aos ensaios funcionais 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). O IC<sub>50</sub> foi calculado utilizando-se a análise de regressão não-linear. Para o IC<sub>50</sub>, estão representados média e desvio padrão de no mínimo três experimentos independentes realizados em triplicata. Realizaram-se os testes de normalidade *Shapiro Wilk* e *Kolmogorov Smirnov* para avaliação prévia da distribuição em cada condição analisada. Para considerar uma condição com distribuição normal, ambos os testes precisaram apresentar  $p > 0,05$ . Em caso de ao menos um dos testes apresentar  $p < 0,05$ , considerou-se a não normalidade da condição avaliada. Para amostras com distribuição normal, as diferenças foram analisadas pelo teste *t de Student*. Para amostras com distribuição não normal, as diferenças foram analisadas pelo teste de *Mann-Whitney*.

A análise estatística do perfil de expressão diferencial das linhagens controles e MCT1 KD foi realizada em ambiente R, utilizando-se o teste *t de Student* para comparação dos grupos considerando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## **6 ASPECTOS ÉTICOS**

O presente projeto encontra-se cadastrado sob o número 1166/2016, após ciência do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional sobre sua realização. Por se tratar de um projeto que utilizará linhagens celulares comerciais e não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não houve necessidade de apreciação/aprovação pelo CEP (ANEXO 1).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterização mutacional e metabólica das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma

Realizou-se a caracterização das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma utilizadas no presente estudo, que abrangeu: perfil mutacional de genes frequentemente mutados em melanoma (*BRAF*, *NRAS*, *KIT* e *TERT*), perfil de expressão de proteínas envolvidas no metabolismo glicolítico (MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX) e quantificação de glicose e lactato extracelular.

Quanto ao perfil mutacional (Tabela 5), observa-se que apenas duas linhagens não apresentaram a mutação p.V600E em *BRAF*: SK-MEL-103 e SK-MEL-173. Estas duas linhagens, *wild type* (selvagens) para *BRAF*, apresentaram mutações distintas, localizadas no códon 61 do oncogene *NRAS* (p.Q61R e p.Q61K, respectivamente).

**Tabela 5** – Perfil mutacional das 12 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>
1205Lu	Metástase - xenoenxerto da linhagem WM793	p.V600E	WT	WT	C228T; rs2853669
A375	Metástase	p.V600E	WT	p.L798L	C250T
SK-MEL-19	Metástase	p.V600E	WT	WT	C228T
SK-MEL-28	Metástase	p.V600E	WT	WT	WT
SK-MEL-103	Metástase	WT	p.Q61R	WT	C228T
SK-MEL-173	Metástase	WT	p.Q61K	WT	C250T
UACC-62	Metástase	p.V600E	WT	WT	C250T
WM9	Metástase	p.V600E	WT	WT	C228T; rs2853669
WM35	Primário pele - fase radial de crescimento	p.V600E	WT	WT	C242T/C243T
WM164	Metástase	p.V600E	WT	WT	C250T
WM278	Primário pele - fase vertical de crescimento	p.V600E	WT	p.L798L	C228T; rs2853669
WM793	Primário pele - fase vertical de crescimento	p.V600E	WT	WT	C228T; rs2853669

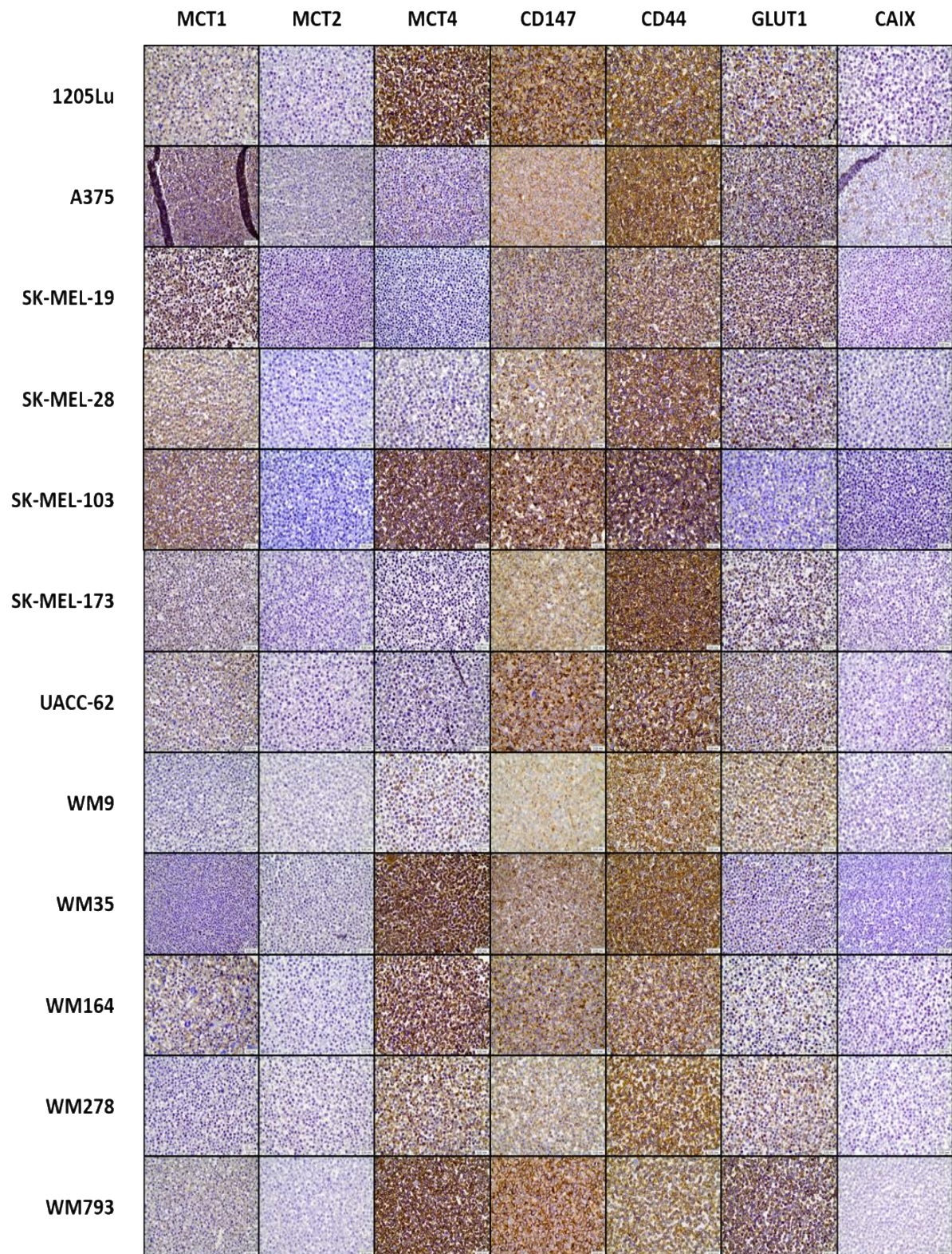
WT: *wild type* (selvagem).

Em relação às mutações em *KIT*, duas linhagens celulares (A375 e WM278) apresentaram uma mutação silenciosa, encontrada no éxon 17 do gene (p.L798L). Quanto à pesquisa de variantes na região promotora do gene *TERT*, observou-se com maior frequência a presença das mutações C228T, C250T e C242T/C243T, além do polimorfismo rs2853669 em grande parte das linhagens pesquisadas, com exceção da linhagem SK-MEL-28, que não apresentou nenhuma variante em *TERT*.

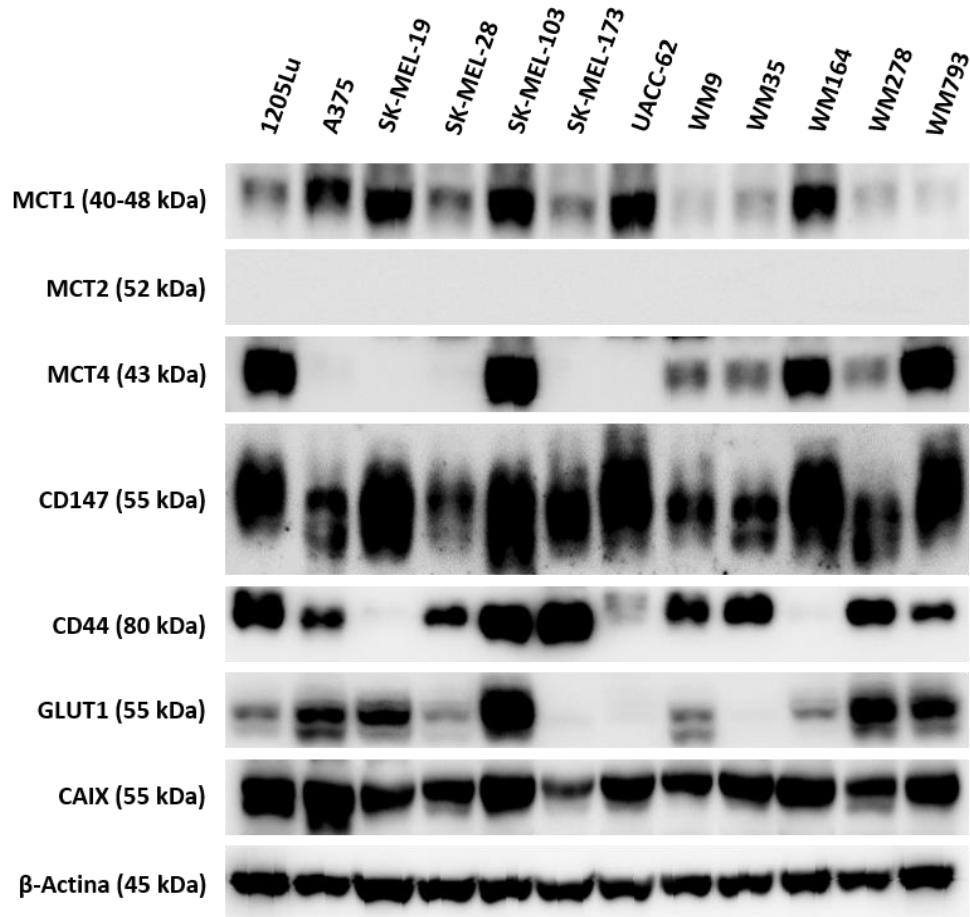
No que diz respeito aos ensaios *in vitro*, foi realizada a caracterização do perfil metabólico das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma. Nas Figuras 5 a 9, observam-se os resultados obtidos para as técnicas de imunocitoquímica (Figura 5), *western blotting* (Figuras 6 e 7) e quantificação de glicose e lactato no meio extracelular, após 24 e 48 horas de cultura em condições normais de crescimento (Figuras 8 e 9). É possível observar que as linhagens possuem um perfil de expressão proteica heterogêneo, com as linhagens SK-MEL-103 e WM164 apresentando um perfil metabólico preferencialmente glicolítico, com a expressão associada de MCT1, MCT4, CD147, GLUT1 e CAIX (*western blotting*), enquanto a linhagem SK-MEL-173 apresenta um perfil preferencialmente oxidativo (baixa expressão de MCT1 e ausência de expressão de MCT4 e GLUT1). Ainda, observou-se a ausência de expressão de MCT2 em todas as linhagens analisadas.

Em relação aos resultados obtidos para glicose extracelular, apresentados na Figura 8 como consumo de glicose, observa-se que as linhagens SK-MEL-19, WM35, WM164, WM278 e WM793 apresentaram os maiores valores consumidos dentre as 12 linhagens analisadas, enquanto as linhagens 1205Lu, A375 e UACC-62 apresentaram os menores valores de glicose consumida. Adicionalmente, observa-se que nove linhagens apresentaram um consumo de glicose tempo-dependente, com um aumento às 48 horas em relação ao tempo de 24 horas ( $p < 0,05$ ). Ainda, não se observou diferença no consumo de glicose após 48 horas para as linhagens SK-MEL-103, SK-MEL-173 e WM9. Quanto ao lactato extracelular, apresentado na Figura 9 como efluxo de lactato, observou-se que as linhagens 1205Lu, SK-MEL-28, UACC-62 e WM164 apresentaram os maiores valores de lactato excretados, enquanto as linhagens SK-MEL-173, WM278 e WM793 apresentaram os menores valores. Em relação à quantificação do lactato em relação ao tempo (24 e 48 horas), observou-se que 11 linhagens apresentaram um aumento significativo no efluxo de lactato ( $p < 0,001$ ) às 48 horas em relação às 24 horas,

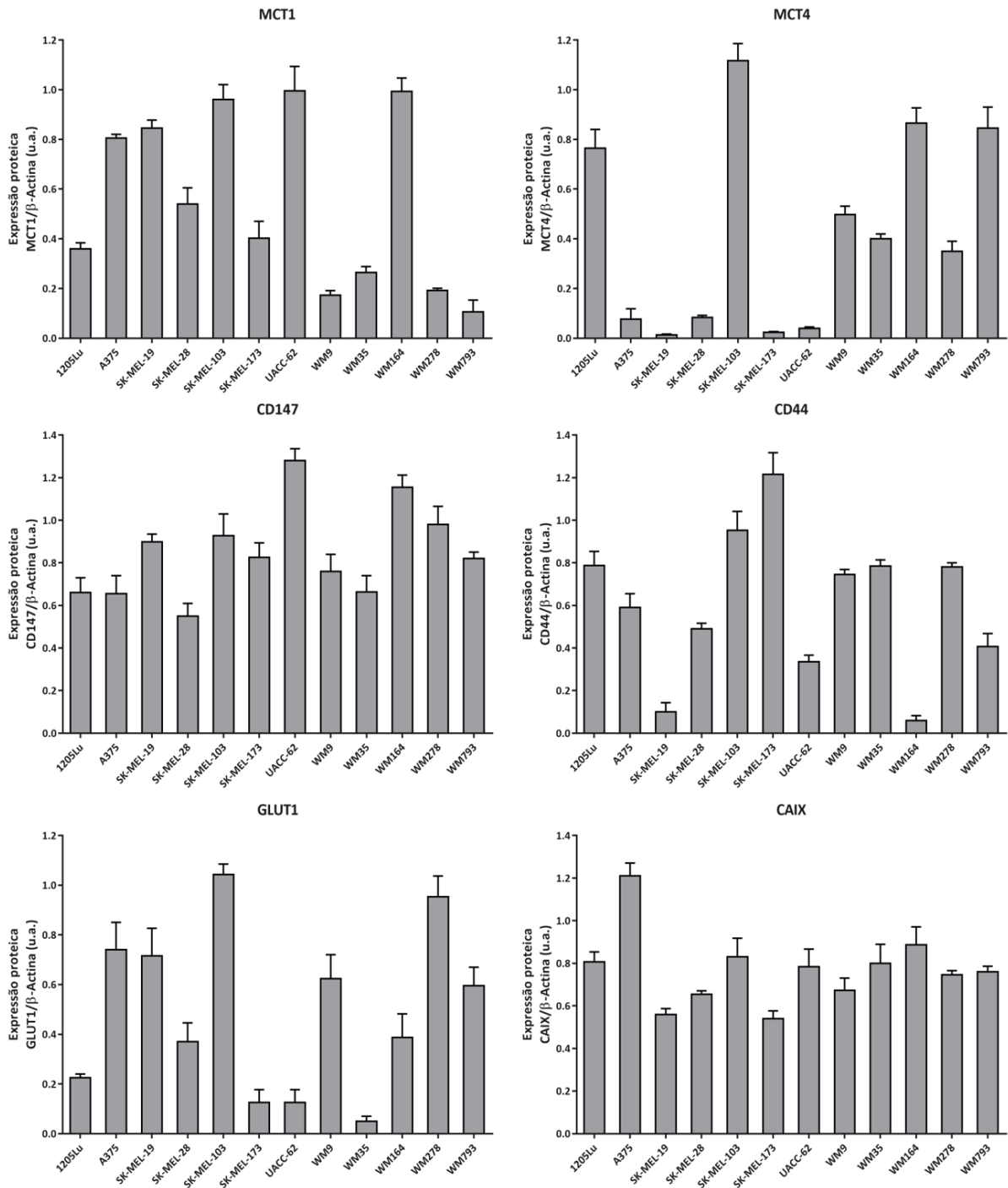
sendo que somente a linhagem SK-MEL-28, linhagem que mais excretou lactato, não apresentou aumento no efluxo de lactato em relação ao tempo.



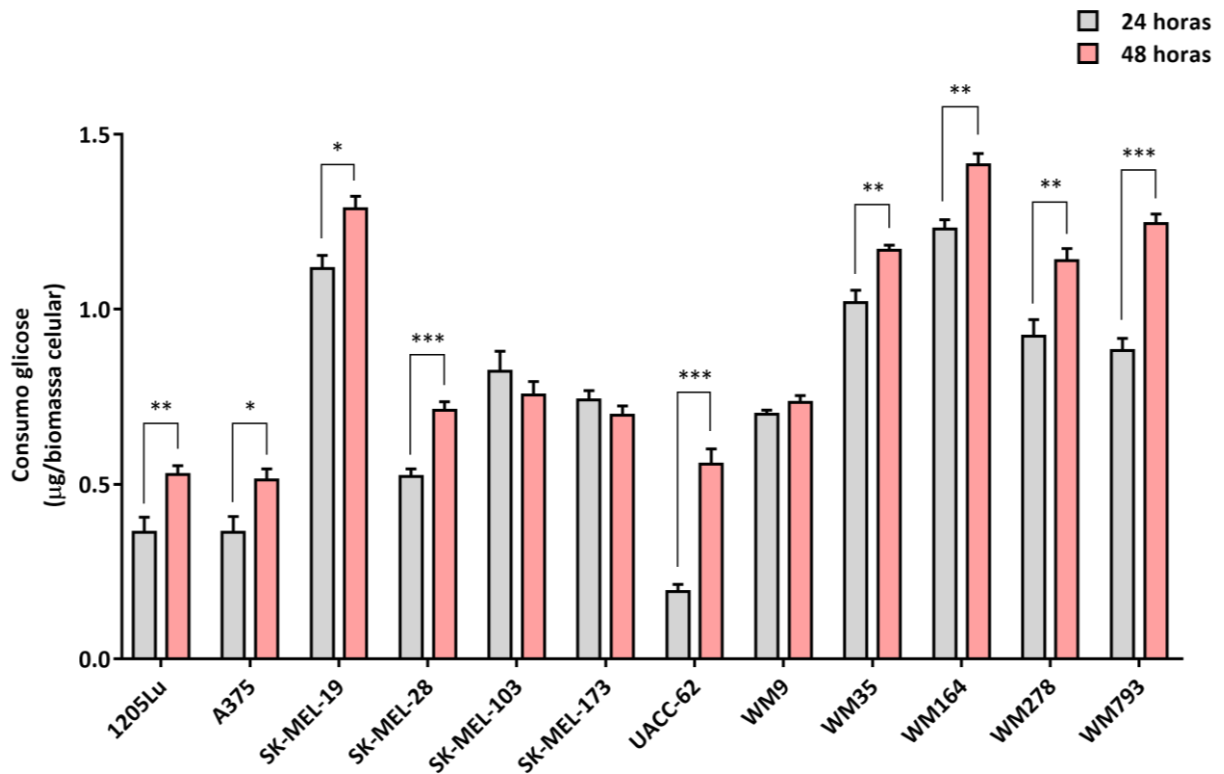
**Figura 5.** Resultados representativos da imunocitoquímica para MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma. Magnificação: 400x.



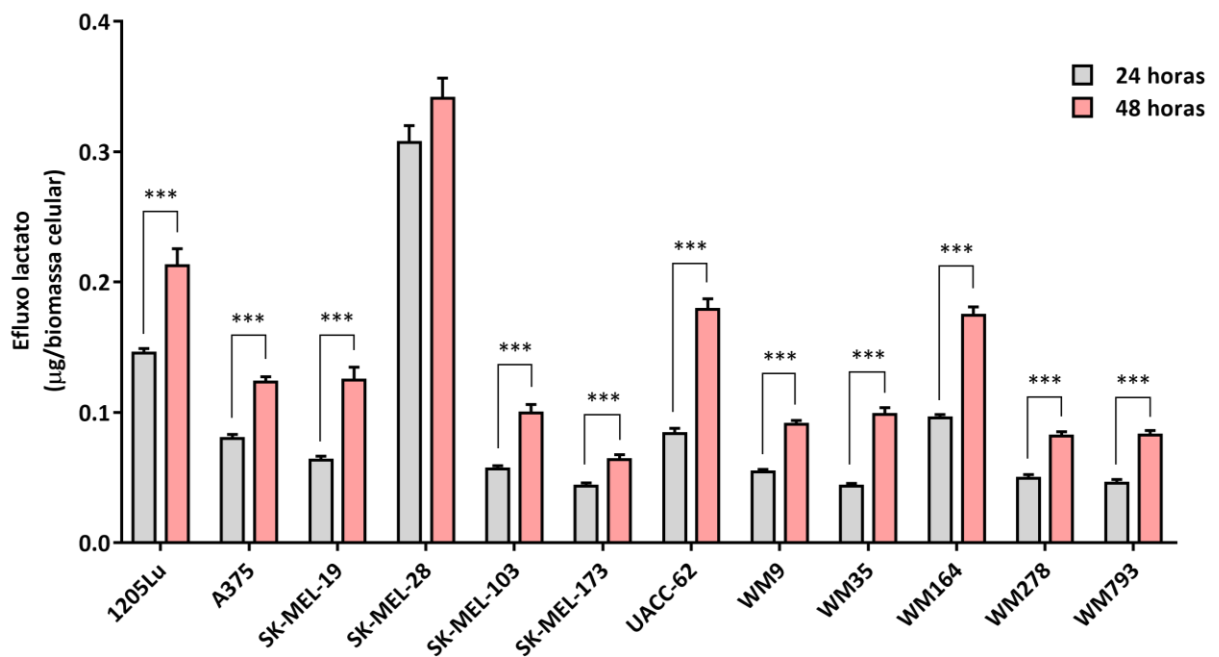
**Figura 6.** Resultados representativos do *western blotting* para MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma.  $\beta$ -Actina utilizada como proteína endógena normalizadora das diferentes proteínas associadas ao metabolismo glicolítico. kDa: kilodalton.



**Figura 7.** Densitometria dos resultados de *western blotting* para MCT1, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma. Todos os resultados foram normalizados pela  $\beta$ -Actina. Os valores expressam a média e erro padrão de dois experimentos independentes. u.a., unidade arbitrária.



**Figura 8.** Consumo de glicose das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma ao longo do tempo (24 e 48 horas). Os resultados obtidos foram normalizados pela biomassa celular total e expressam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

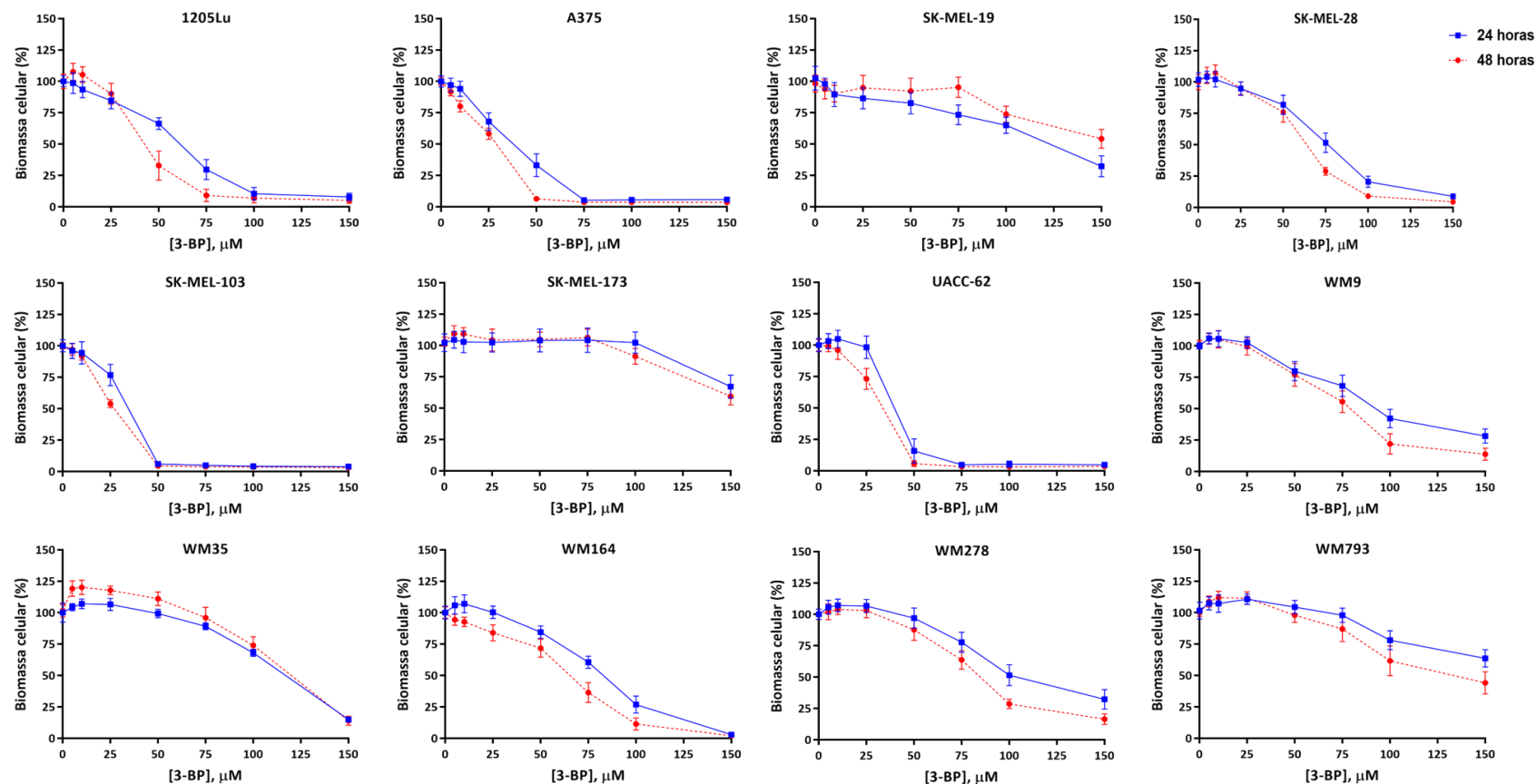


**Figura 9.** Efluxo de lactato das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma ao longo do tempo (24 e 48 horas). Os resultados obtidos foram normalizados pela biomassa celular total e expressam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. \*\*\* $p < 0,001$ .



## 7.2 Rastreio de sensibilidade ao 3-BP

Relativamente ao rastreio de sensibilidade ao 3-BP, a Figura 10 apresenta os resultados obtidos para as diferentes concentrações de 3-BP utilizadas no tratamento das 12 linhagens de melanoma, em 24 e 48 horas, sendo que os valores de  $IC_{50}$  encontram-se listados na Tabela 6. A Figura 11 apresenta uma comparação do efeito do 3-BP na biomassa celular das diferentes linhagens, baseada na inibição do crescimento (GI, do inglês *growth inhibition*). Conforme pode ser observado nas Figuras 10 e 11 e na Tabela 6, as linhagens A375, SK-MEL-103 e UACC-62 apresentaram maior sensibilidade ao tratamento com o 3-BP, enquanto as linhagens SK-MEL-19, SK-MEL-173, WM35 e WM793 apresentaram maior resistência ao fármaco.

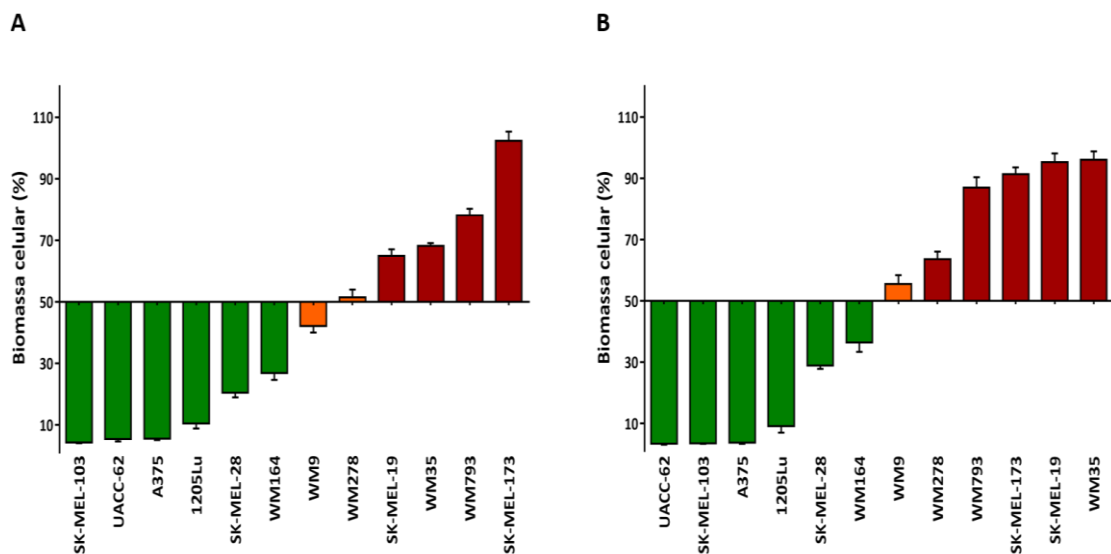


**Figura 10.** Gráficos de IC<sub>50</sub> obtidos para as linhagens celulares comerciais de melanoma após tratamento com 3-BP em 24 horas (azul) e 48 horas (vermelho). Os resultados estão representados pela porcentagem de biomassa celular normalizada pelo controle. Média e desvio padrão de cada concentração do inibidor utilizada estão representados nos gráficos. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais e biológicas.

**Tabela 6** – Valores de IC<sub>50</sub> obtidos para as linhagens comerciais de melanoma após tratamento com 3-BP durante 24 e 48 horas.

Linhagem celular	IC <sub>50</sub> 24 horas 3-BP (µM) Média ± DP*	IC <sub>50</sub> 48 horas 3-BP (µM) Média ± DP*
1205Lu	57,69 ± 3,77	42,41 ± 7,67
A375	33,22 ± 2,96	25,49 ± 0,98
SK-MEL-19	125,27 ± 17,44	156,23 ± 8,94
SK-MEL-28	74,20 ± 5,52	62,49 ± 2,52
SK-MEL-103	31,17 ± 0,90	25,56 ± 1,08
SK-MEL-173	155,67 ± 2,11	178,80 ± 5,37
UACC-62	35,23 ± 8,64	27,13 ± 6,28
WM9	97,32 ± 6,65	78,49 ± 6,56
WM35	112,70 ± 0,92	115,45 ± 7,42
WM164	80,36 ± 4,40	55,89 ± 5,66
WM278	104,75 ± 4,97	83,37 ± 3,93
WM793	171,23 ± 12,01	127,07 ± 25,26

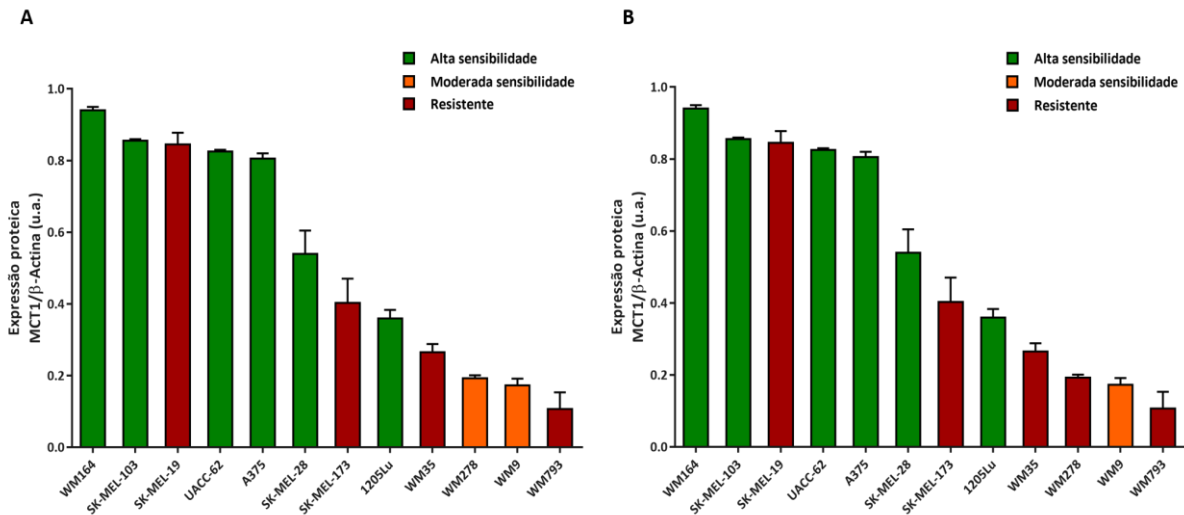
\*Média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.



**Figura 11.** Classificação de sensibilidade ao 3-BP das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma. **(A)** Sensibilidade ao 3-BP em 24 horas de tratamento com 100 µM de inibidor. **(B)** Sensibilidade ao 3-BP em 48 horas de tratamento com 75 µM de inibidor. Média e erro padrão da biomassa celular estão representados nos gráficos. Verde: alta sensibilidade; laranja: moderada sensibilidade; vermelho: resistente.

Considerando a expressão de MCT1 das diferentes linhagens e sua relação de sensibilidade ao 3-BP (Figura 12), verificou-se que aquelas mais sensíveis ao 3-BP apresentaram expressão de MCT1. Em contrapartida, as linhagens com maior resistência ao

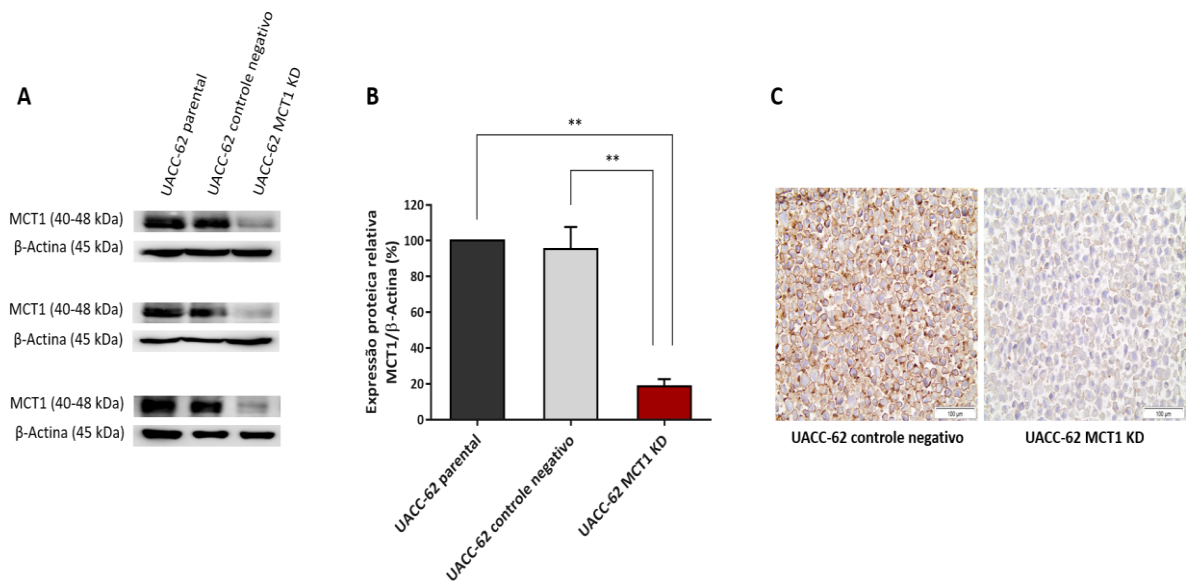
inibidor apresentaram expressão diminuída do transportador. Entretanto, observou-se que o mesmo não ocorre nas linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-173, que, apesar de apresentarem resistência ao 3-BP, apresentam expressão de MCT1.



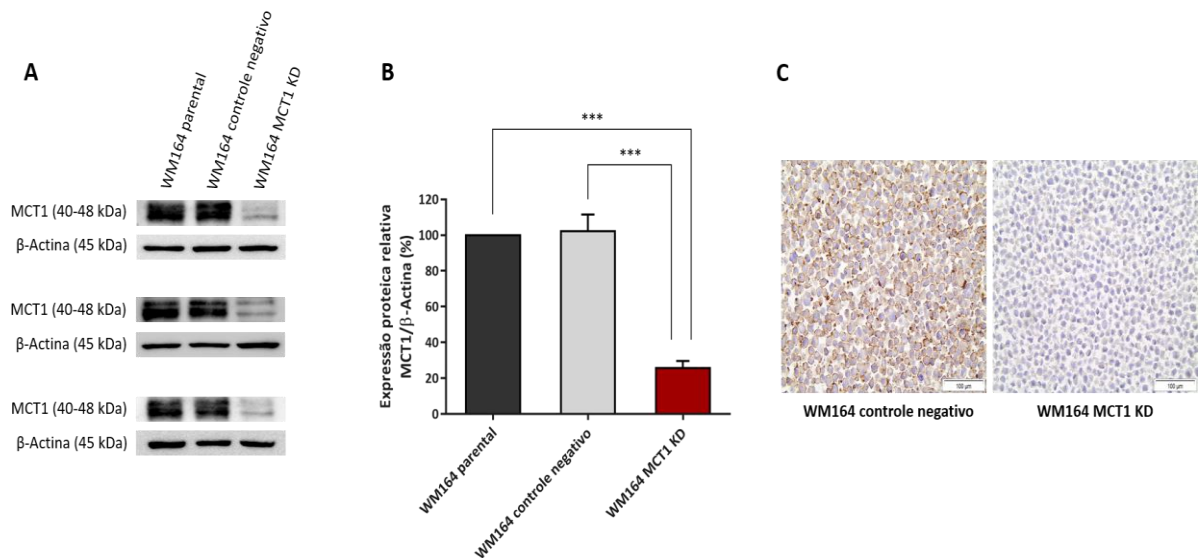
**Figura 12.** Expressão de MCT1 e classificação de sensibilidade ao 3-BP das 12 linhagens celulares comerciais de melanoma. **(A)** 24 horas. **(B)** 48 horas. Todos os resultados foram normalizados pela  $\beta$ -Actina. Os valores expressam a média e erro padrão de dois experimentos independentes. u.a., unidade arbitrária.

### 7.3 *Knockdown* do gene *SLC16A1* (MCT1) nas linhagens UACC-62 e WM164

De acordo com os resultados obtidos na caracterização do perfil metabólico, com ênfase na expressão de MCT1, assim como no rastreio de sensibilidade ao 3-BP, duas linhagens celulares foram selecionadas para realização do *knockdown* do gene *SLC16A1* (gene que codifica o MCT1): UACC-62 (MCT1 expresso/alta sensibilidade ao 3-BP) e WM164 (MCT1 e MCT4 expressos/alta sensibilidade ao 3-BP). As Figuras 13 e 14 mostram os resultados do *knockdown* de MCT1 nas linhagens UACC-62 e WM164, respectivamente, observando-se uma diminuição significativa da expressão do transportador em relação às linhagens parentais e controles negativos de transfecção ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,001$ ; Figuras 13B e 14B, respectivamente). Ressalta-se que a expressão de MCT1 foi verificada (*western blotting*) em três momentos distintos (três passagens consecutivas) após a edição, confirmando assim que não houve o restabelecimento funcional do mesmo (Figuras 13A e 14A). Ainda, confirmou-se a diminuição da expressão de MCT1 através da imunocitoquímica, realizada em cortes de *cell blocks* dos controles negativos e células KD (Figuras 13C e 14C).



**Figura 13.** *Knockdown* do gene *SLC16A1* (MCT1) na linhagem UACC-62 por CRISPR/Cas9. **(A)** Expressão proteica de MCT1 avaliada por *western blotting* em três momentos distintos (três passagens consecutivas). **(B)** Análise da expressão proteica de MCT1 por densitometria. Média e erro padrão estão representados no gráfico. **(C)** Expressão proteica de MCT1 avaliada por imunocitoquímica em cortes oriundos de *cell blocks*. Magnificação: 400×. kDa: kilodalton. \*\* $p < 0,01$ .



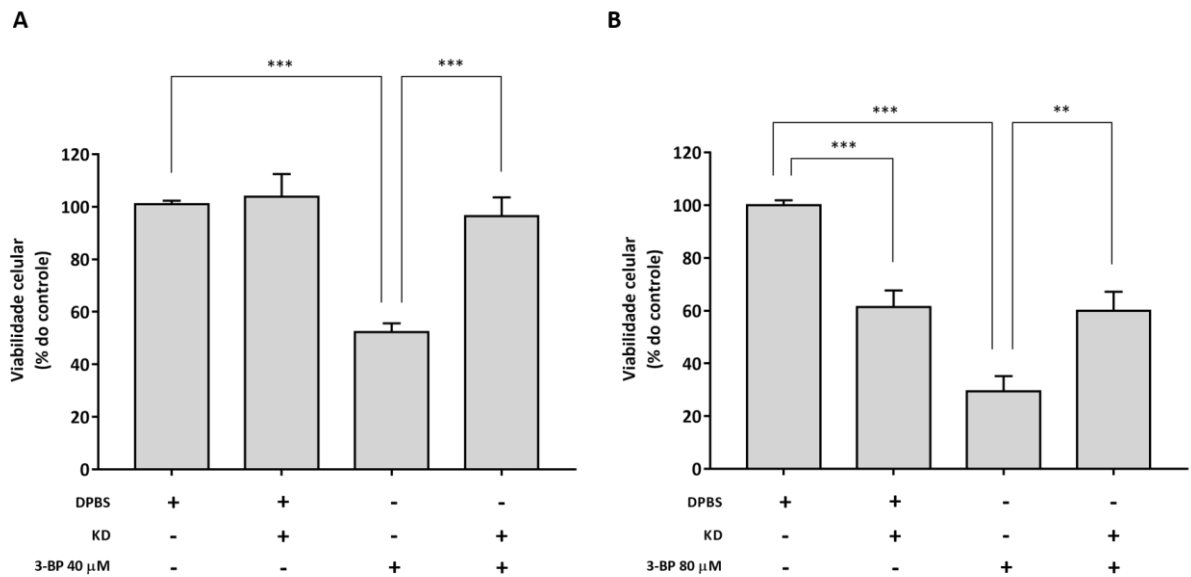
**Figura 14.** *Knockdown* do gene *SLC16A1* (MCT1) na linhagem WM164 por CRISPR/Cas9. **(A)** Expressão proteica de MCT1 avaliada por *western blotting* em três momentos distintos (três passagens consecutivas). **(B)** Análise da expressão proteica de MCT1 por densitometria. Média e erro padrão estão representados no gráfico. **(C)** Expressão proteica de MCT1 avaliada por imunocitoquímica em cortes oriundos de *cell blocks*. Magnificação: 400×. kDa: kilodalton. \*\*\* $p < 0,001$ .

#### 7.4 Análise funcional do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, nas linhagens UACC-62 e WM164

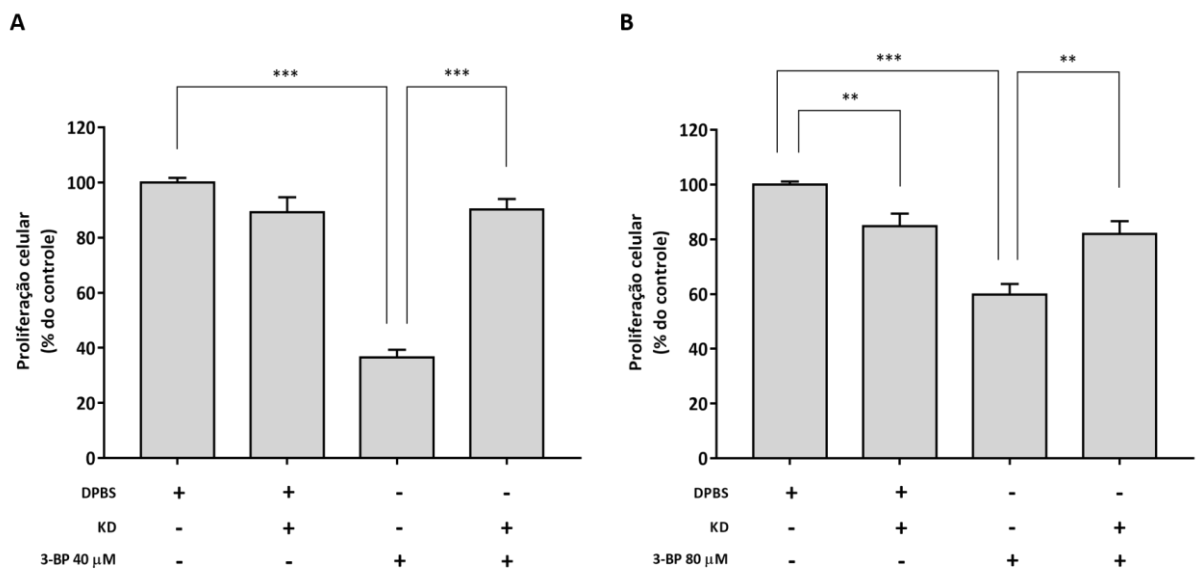
Após confirmada a diminuição da expressão de MCT1, buscou-se a caracterização funcional *in vitro* das linhagens UACC-62 e WM164 controles (plasmídeo controle) e KD, objetivando avaliar o efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação.

Em relação aos resultados de viabilidade celular obtidos e o efeito do silenciamento de MCT1 (Figura 15), não se observou uma redução relevante no número de células viáveis na linhagem UACC-62 MCT1 KD. Em contrapartida, a diminuição da expressão de MCT1 na linhagem WM164 foi capaz de reduzir significativamente a sua viabilidade ( $p < 0,001$ ). Já o tratamento com 3-BP demonstrou efeito em ambas as linhagens controles, visto que as mesmas expressam o MCT1, reduzindo o número de células UACC-62 controle ( $p < 0,001$ ) e WM164 controle ( $p < 0,001$ ) viáveis quando comparadas às linhagens controle expostas ao veículo da droga (DPBS). Em contrapartida, combinando o silenciamento de MCT1 com o tratamento com 3-BP, observou-se que o silenciamento de MCT1 reverte o efeito do 3-BP na viabilidade das linhagens UACC-62 ( $p < 0,001$ ) e WM164 ( $p < 0,01$ ), observando-se valores de viabilidade similares aos observados para o KD sozinho, sugerindo que o efeito do 3-BP é dependente da expressão de MCT1.

Para a proliferação celular (Figura 16), observaram-se resultados semelhantes aos encontrados nos ensaios de viabilidade, com o *knockdown* de MCT1 diminuindo de maneira significativa a proliferação da linhagem WM164 ( $p < 0,01$ ), enquanto que, para a linhagem UACC-62, o silenciamento do transportador não demonstrou efeito relevante. Em relação aos efeitos da exposição ao 3-BP, ambas as linhagens controles apresentaram redução significativa de sua proliferação, quando comparadas às linhagens controle expostas ao DPBS ( $p < 0,001$ ), demonstrando a eficácia do fármaco na presença do MCT1 expresso. Novamente, quando combinados, o silenciamento de MCT1 foi capaz de reverter de maneira significativa os efeitos da exposição ao 3-BP ( $p < 0,001$  para UACC-62 e  $p < 0,01$  para WM164), sendo observados valores de proliferação similares aos obtidos para o KD sozinho.



**Figura 15.** Efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na viabilidade celular das linhagens UACC-62 e WM164. **(A)** Viabilidade celular da linhagem UACC-62 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. **(B)** Viabilidade celular da linhagem WM164 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

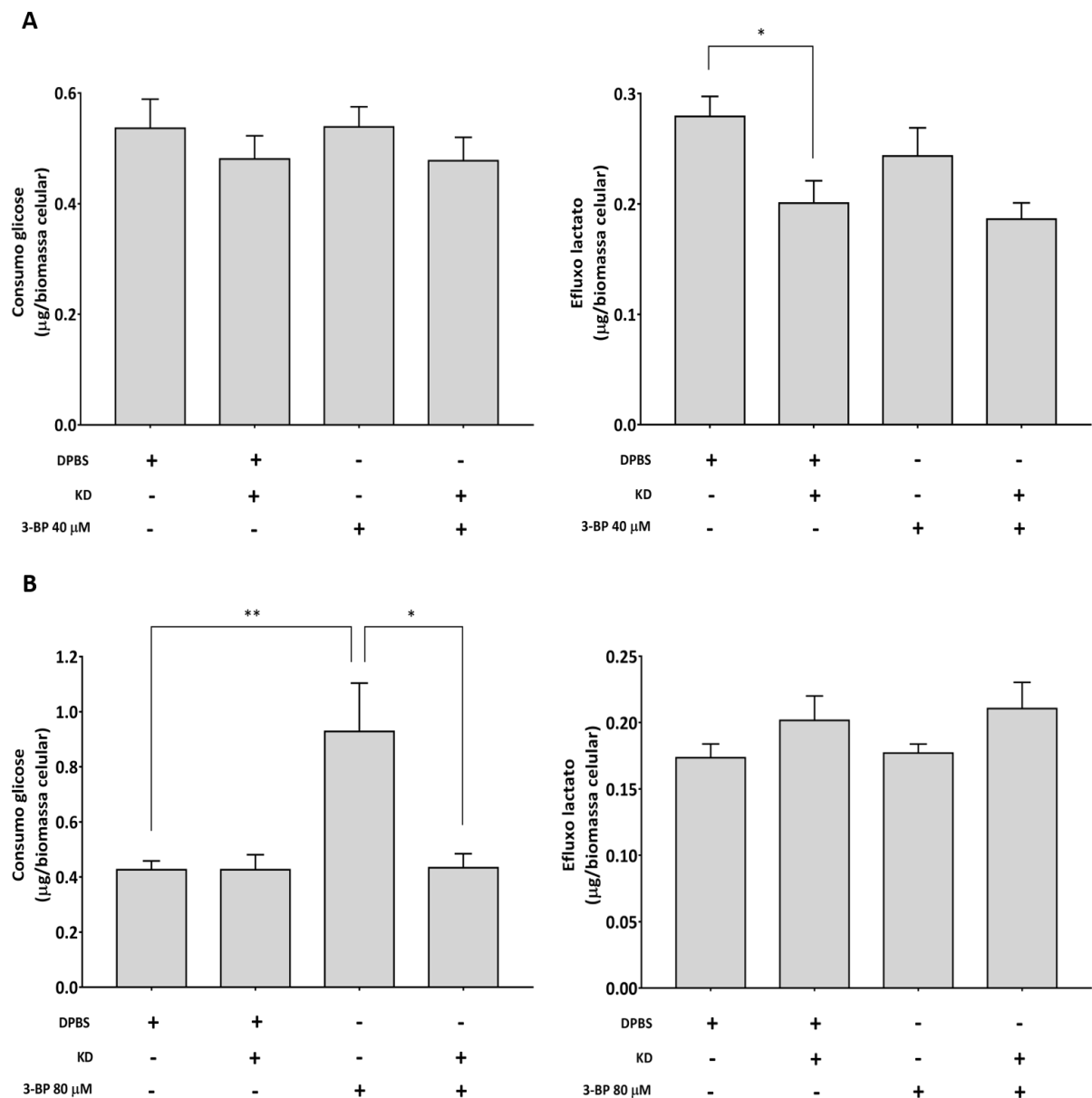


**Figura 16.** Efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na proliferação celular das linhagens UACC-62 e WM164. **(A)** Proliferação celular da linhagem UACC-62 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. **(B)** Proliferação celular da linhagem WM164 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Para os ensaios de metabolismo celular referentes ao consumo de glicose e efluxo de lactato (Figura 17), observou-se que, para a linhagem UACC-62, não houve efeito significativo tanto do silenciamento de MCT1, da exposição ao 3-BP, assim como da combinação das condições no consumo de glicose. Em contrapartida, o *knockdown* de MCT1 foi capaz de diminuir significativamente o efluxo de lactato na linhagem UACC-62 MCT1 KD ( $p < 0,05$ ). Em relação à linhagem WM164, observou-se que a diminuição da expressão de MCT1 não apresentou efeito relevante no consumo de glicose. Inesperadamente, a exposição da linhagem WM164 controle ao 3-BP levou a um aumento significativo no consumo de glicose, em comparação à exposição da linhagem controle ao DPBS ( $p < 0,01$ ). Já para a combinação das duas condições, observou-se que o silenciamento de MCT1 impede de maneira significativa o aumento no consumo de glicose promovido pelo 3-BP na linhagem WM164 controle ( $p < 0,05$ ). Em relação ao efluxo de lactato da linhagem WM164, não se observaram efeitos significativos nas condições analisadas.

Os resultados referentes ao ensaio de migração celular (Figura 18) demonstraram que o *knockdown* de MCT1 foi capaz de diminuir significativamente a capacidade migratória da linhagem UACC-62 ( $p < 0,001$ ). Ainda, observou-se que a exposição da linhagem UACC-62 controle ao 3-BP reduziu de maneira significativa o número de células migratórias, quando comparado à exposição ao DPBS ( $p < 0,001$ ). Em relação à condição combinada, observou-se que o silenciamento de MCT1 na linhagem UACC-62 diminuiu de maneira significativa os efeitos de exposição ao 3-BP ( $p < 0,05$ ), revertendo os níveis de migração para os valores observados para o KD sozinho. Já para a linhagem WM164, observou-se que a condição MCT1 KD não alterou a capacidade migratória da linhagem. Em contrapartida, o tratamento com 3-BP demonstrou diminuir significativamente a migração celular da linhagem WM164 controle quando comparado à exposição ao DPBS ( $p < 0,001$ ). Em relação à combinação das condições, os resultados demonstraram que a diminuição da expressão de MCT1 impede os efeitos da exposição ao 3-BP na migração celular ( $p < 0,05$ ), sugerindo novamente a importância do transportador na eficácia do tratamento com o fármaco.

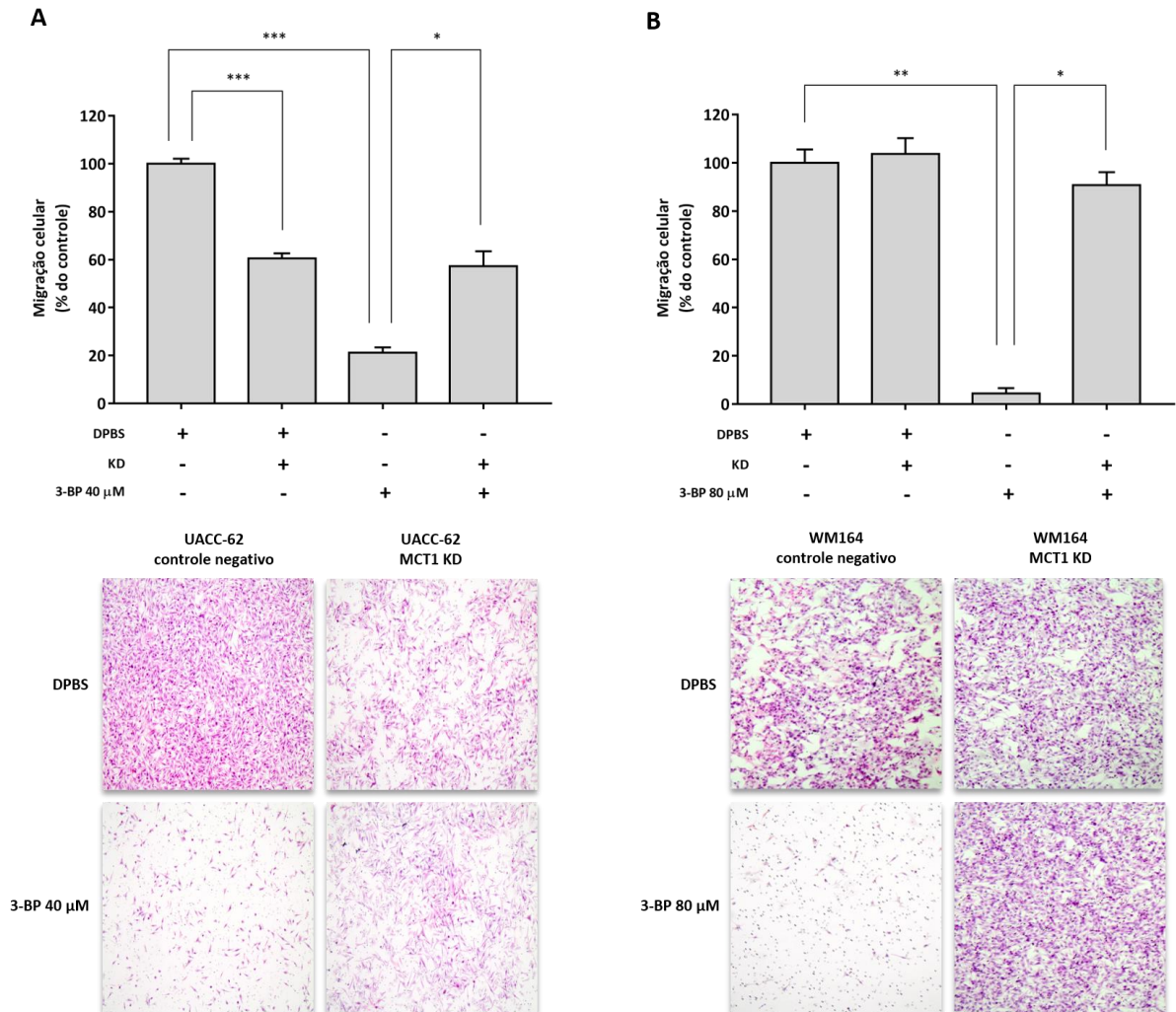




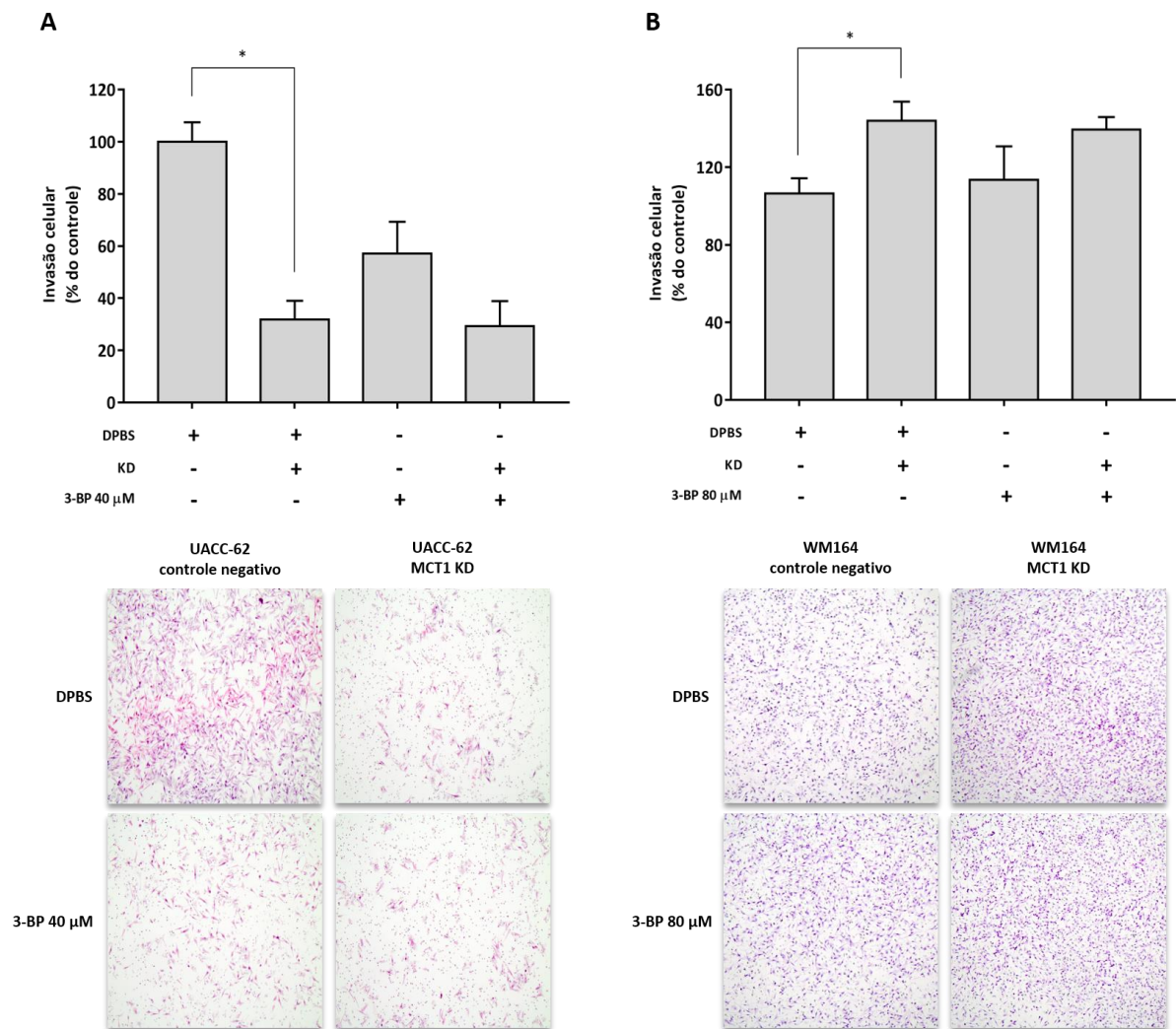
**Figura 17.** Efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, no consumo de glicose e efluxo de lactato das linhagens UACC-62 e WM164. **(A)** Consumo de glicose e efluxo de lactato da linhagem UACC-62 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. **(B)** Consumo de glicose e efluxo de lactato da linhagem WM164 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Relativamente aos ensaios de invasão celular (Figura 19), os resultados obtidos demonstram que a linhagem UACC-62 MCT1 KD apresentou diminuição significativa de sua invasão ( $p < 0,05$ ). Em oposição, observou-se um aumento significativo na capacidade de invasão da linhagem WM164 MCT1 KD ( $p < 0,05$ ), sugerindo assim, um fenótipo de

agressividade provavelmente decorrente do silenciamento de MCT1. Em relação à exposição ao 3-BP e à combinação das duas condições analisadas, não se observou resultados relevantes que impactaram na capacidade de invasão das linhagens UACC-62 e WM164.



**Figura 18.** Efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na migração celular das linhagens UACC-62 e WM164. **(A)** Migração celular da linhagem UACC-62 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. **(B)** Migração celular da linhagem WM164 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicatas experimentais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



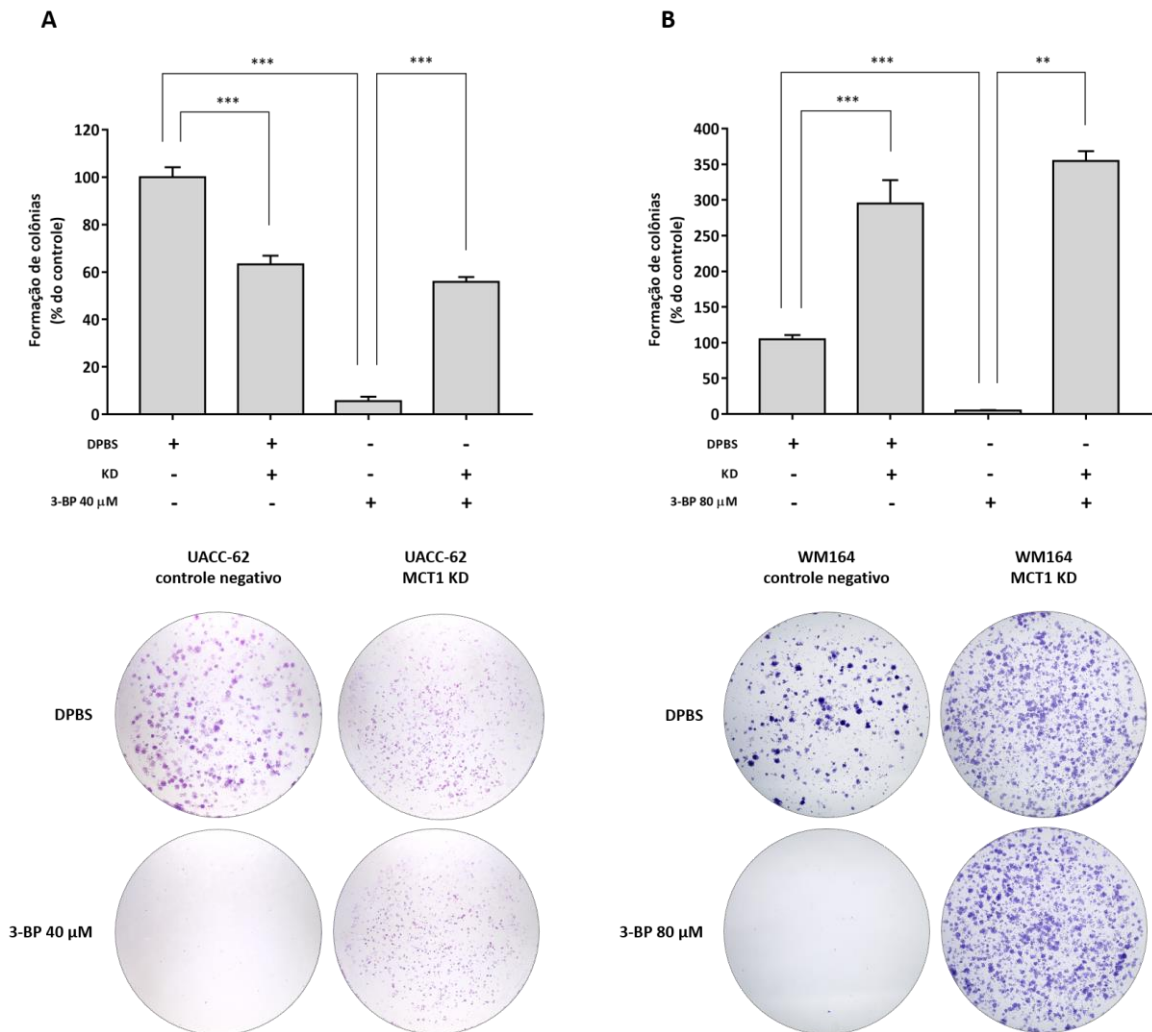
**Figura 19.** Efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na invasão celular das linhagens UACC-62 e WM164. **(A)** Invasão celular da linhagem UACC-62 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. **(B)** Invasão celular da linhagem WM164 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicatas experimentais. \* $p < 0,05$ .

Dentre os resultados obtidos nos ensaios referentes à capacidade de formação de colônias (Figura 20), observa-se que o *knockdown* de MCT1 diminuiu de forma significativa a capacidade clonogênica da linhagem UACC-62 MCT1 KD ( $p < 0,001$ ). Já em relação à exposição ao 3-BP, observou-se uma diminuição significativa no número de colônias formadas pela linhagem UACC-62 controle negativo em relação ao veículo da droga ( $p < 0,001$ ). Quando combinadas as duas condições, observa-se que o número de colônias formadas pela linhagem UACC-62 MCT1 KD não sofreu a ação do inibidor ( $p < 0,001$ ), demonstrando que o KD de MCT1 foi capaz de reverter de maneira significativa os efeitos da exposição ao 3-BP, com um número

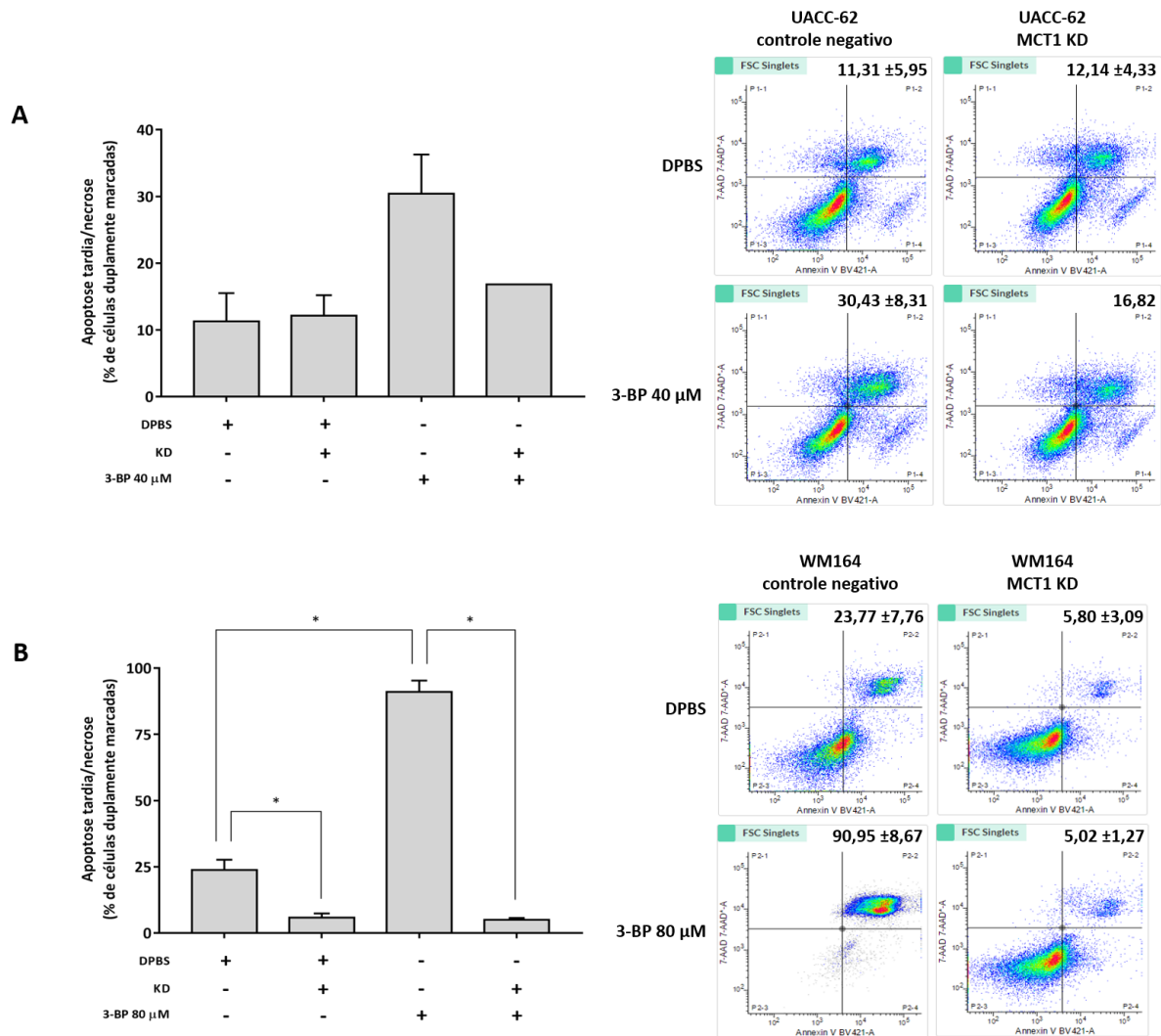
de colônias formadas semelhante aos obtidos para o KD sozinho. Já para a linhagem WM164, observa-se que o silenciamento de MCT1 aumentou significativamente sua capacidade clonogênica ( $p < 0,001$ ). Esse resultado, em conjunto ao aumento significativo da invasão celular, apresentado pela linhagem WM164 MCT1 KD (Figura 19B), sugere que o silenciamento de MCT1 levou a uma alteração funcional relevante e conseqüentemente ao aumento de seu fenótipo de agressividade. Em contrapartida, quando a linhagem WM164 controle (MCT1 expresso) é exposta ao 3-BP, há uma diminuição significativa e quase total no número de colônias formadas em relação à linhagem WM164 controle exposta ao DPBS ( $p < 0,001$ ). Em vista da combinação do silenciamento de MCT1 e exposição ao 3-BP, os resultados obtidos demonstram que a diminuição da expressão do transportador é capaz de bloquear os efeitos do 3-BP, ocorrendo um aumento significativo no número de colônias formadas em relação à linhagem WM164 controle exposta ao 3-BP ( $p < 0,01$ ), sugerindo que ação do inibidor é dependente da expressão de MCT1.

Os resultados de citometria de fluxo, visando a avaliação dos efeitos do silenciamento de MCT1 e exposição ao 3-BP no mecanismo de morte celular obtidos para a linhagem UACC-62 (Figura 21A) não estão completos, com apenas dois experimentos independentes realizados, o que não possibilitou uma análise estatística adequada. Entretanto, observa-se uma tendência de aumento na apoptose tardia/necrose apresentada pela linhagem UACC-62 controle quando exposta ao 3-BP, comparada à linhagem UACC-62 controle quando exposta ao veículo da droga. Relativamente às duas condições combinadas (silenciamento de MCT1 e tratamento com 3-BP), observou-se uma tendência de diminuição da apoptose tardia/necrose na linhagem UACC-62 MCT1 KD quando comparada à linhagem UACC-62 controle, com os valores de apoptose tardia/necrose apresentados pela linhagem silenciada e exposta ao fármaco semelhantes à condição KD sozinha, favorecendo a hipótese de que a expressão de MCT1 aumenta a eficácia do tratamento com 3-BP e tem impacto na morte celular. Já os resultados obtidos para a linhagem WM164 (Figura 21B), demonstram que o *knockdown* de MCT1 levou a uma diminuição significativa na apoptose tardia/necrose na linhagem WM164 ( $p < 0,05$ ). Novamente, o resultado observado favorece a hipótese de que o silenciamento de MCT1 na linhagem WM164 levou ao aumento de seu fenótipo de agressividade. Considerando os efeitos do 3-BP sozinho, observou-se que o mesmo apresentou influência na morte celular, com um aumento significativo da apoptose tardia/necrose na linhagem WM164 controle

exposta ao fármaco em relação à linhagem WM164 controle exposta ao DPBS ( $p < 0,05$ ). Quando avaliados em conjunto, o *knockdown* de MCT1 foi capaz de diminuir de forma significativa os efeitos da exposição ao 3-BP na apoptose tardia/necrose celular ( $p < 0,05$ ), apresentando valores similares aos observados para o *knockdown* sozinho, sugerindo que a expressão de MCT1 se faz necessária para se atingir a eficácia no tratamento com o 3-BP.



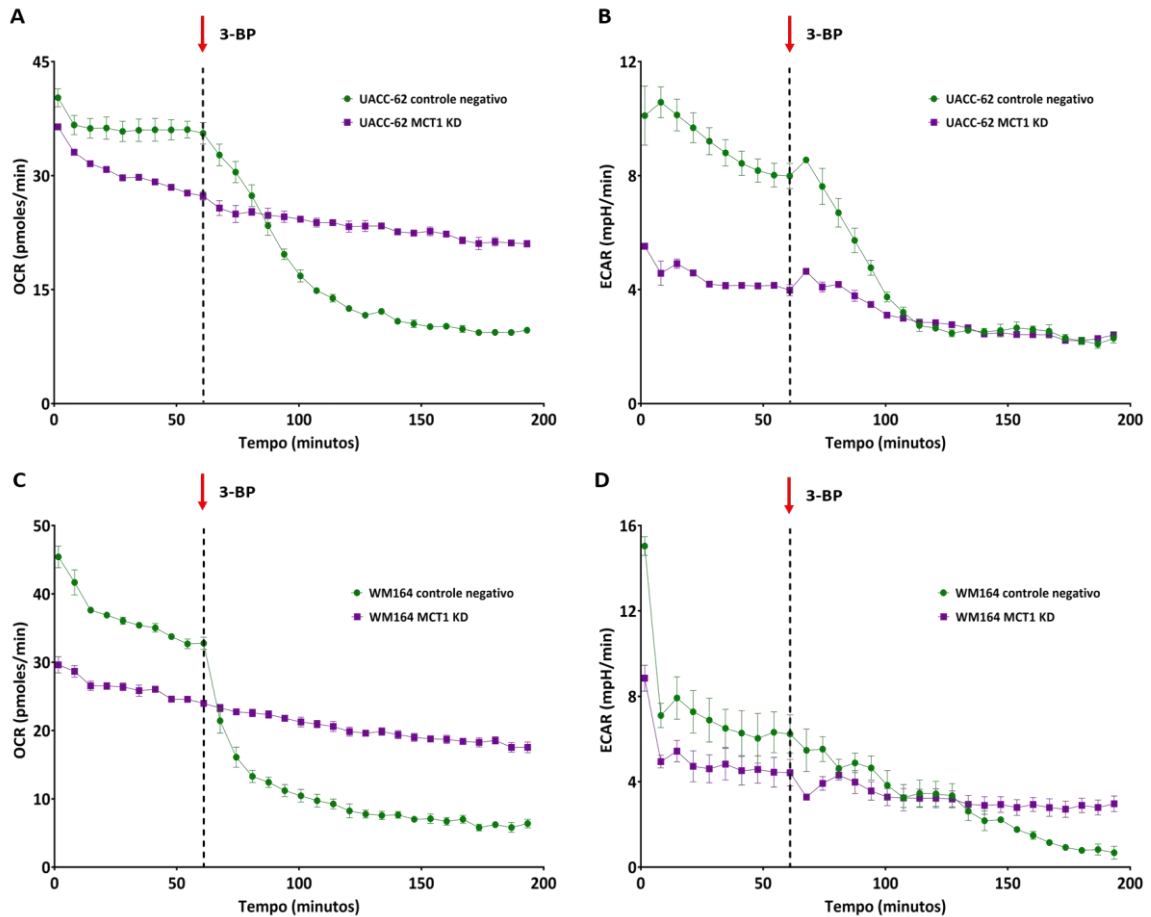
**Figura 20.** Efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na capacidade de formação de colônias das linhagens UACC-62 e WM164. **(A)** Formação de colônias da linhagem UACC-62 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. **(B)** Formação de colônias da linhagem WM164 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicatas experimentais. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 21.** Efeito do *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação, na apoptose tardia/necrose das linhagens UACC-62 e WM164. **(A)** Apoptose tardia/necrose da linhagem UACC-62 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. **(B)** Apoptose tardia/necrose da linhagem WM164 após *knockdown* de MCT1 e tratamento com 3-BP, sozinhos e em combinação. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de dois experimentos independentes para a linhagem UACC-62 e três experimentos independentes para a linhagem WM164, após coleta de 30.000 eventos por citometria de fluxo para cada condição analisada. \* $p < 0,05$ .

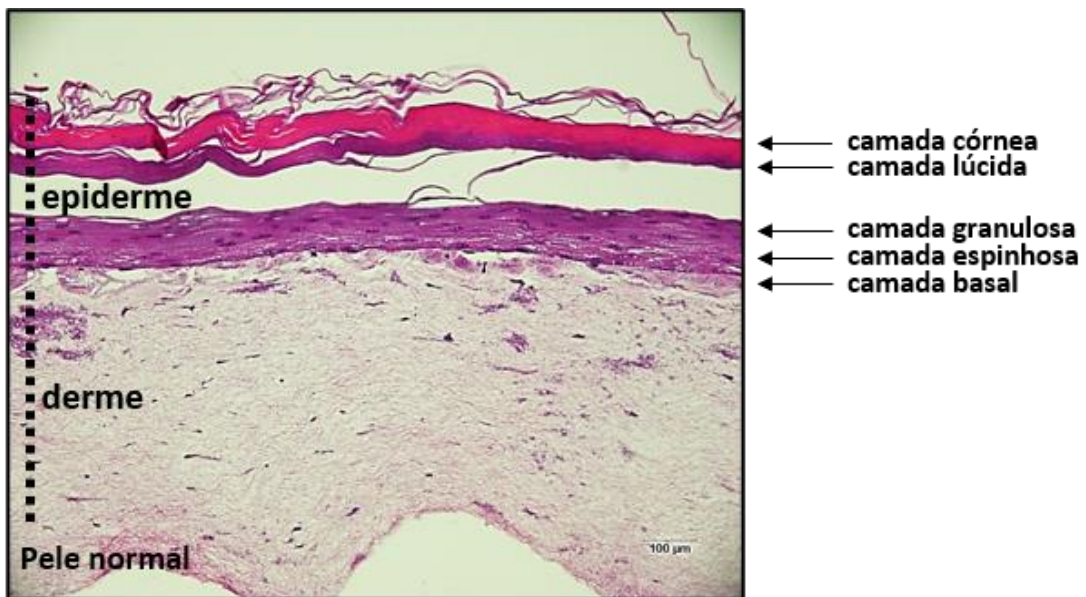
Em relação aos resultados obtidos com a quantificação em tempo real da taxa de consumo de  $O_2$  (OCR, do inglês *oxygen consumption rate*) e acidificação do meio extracelular, com a quantificação de  $H^+$  (ECAR, do inglês *extracellular acidification rate*) (Figura 22), observou-se que o silenciamento de MCT1 diminuiu as taxas de OCR e ECAR nas linhagens UACC-62 MCT1 KD e WM164 MCT1 KD, quando comparadas aos respectivos controles. Já na presença do 3-BP, observou-se que o inibidor apresentou efeito na redução das taxas de OCR

e ECAR nas linhagens UACC-62 e WM164 controles, que apresentam expressão de MCT1, quando comparadas às linhagens MCT1 KD. Sendo assim, os resultados demonstram que a ação do 3-BP é dependente da expressão de MCT1 e que o seu efeito impacta em parâmetros metabólicos essenciais para a obtenção de energia.



**Figura 22.** Perfil bioenergético das linhagens UACC-62 e WM164 controles e MCT1 KD na ausência e presença de 3-bromopiruvato. **(A)** Quantificação em tempo real das taxas de consumo de oxigênio (OCR) das linhagens UACC-62 controle negativo e UACC-62 MCT1 KD na ausência e presença de 3-bromopiruvato. **(B)** Quantificação em tempo real das taxas de acidificação do meio extracelular (ECAR) das linhagens UACC-62 controle negativo e UACC-62 MCT1 KD na ausência e presença de 3-bromopiruvato. **(C)** Quantificação em tempo real das taxas de consumo de oxigênio (OCR) das linhagens WM164 controle negativo e WM164 MCT1 KD na ausência e presença de 3-bromopiruvato. **(D)** Quantificação em tempo real das taxas de acidificação do meio extracelular (ECAR) das linhagens WM164 controle negativo e WM164 MCT1 KD na ausência e presença de 3-bromopiruvato. A linha tracejada representa o ciclo 11 de quantificação com a adição do 3-bromopiruvato (seta vermelha). As quantificações estão representadas em pmol/min para o consumo de oxigênio e mpH/min para acidificação extracelular. Os valores dos gráficos estão representados pela média e erro padrão de um experimento realizado em triplicata experimental.

Relativamente aos experimentos envolvendo a reconstrução da pele *in vitro* (cultura organotípica), observa-se, na Figura 23, o modelo de pele normal, sem a adição das células de melanoma. A pele sem melanoma é considerada o controle da técnica, demonstrando que o modelo é funcional. Observa-se na pele normal todas as suas camadas diferenciadas, como a derme (camada inferior), com a presença de fibroblastos, assim como a epiderme (camada superior) e sua estratificação em camadas basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea.



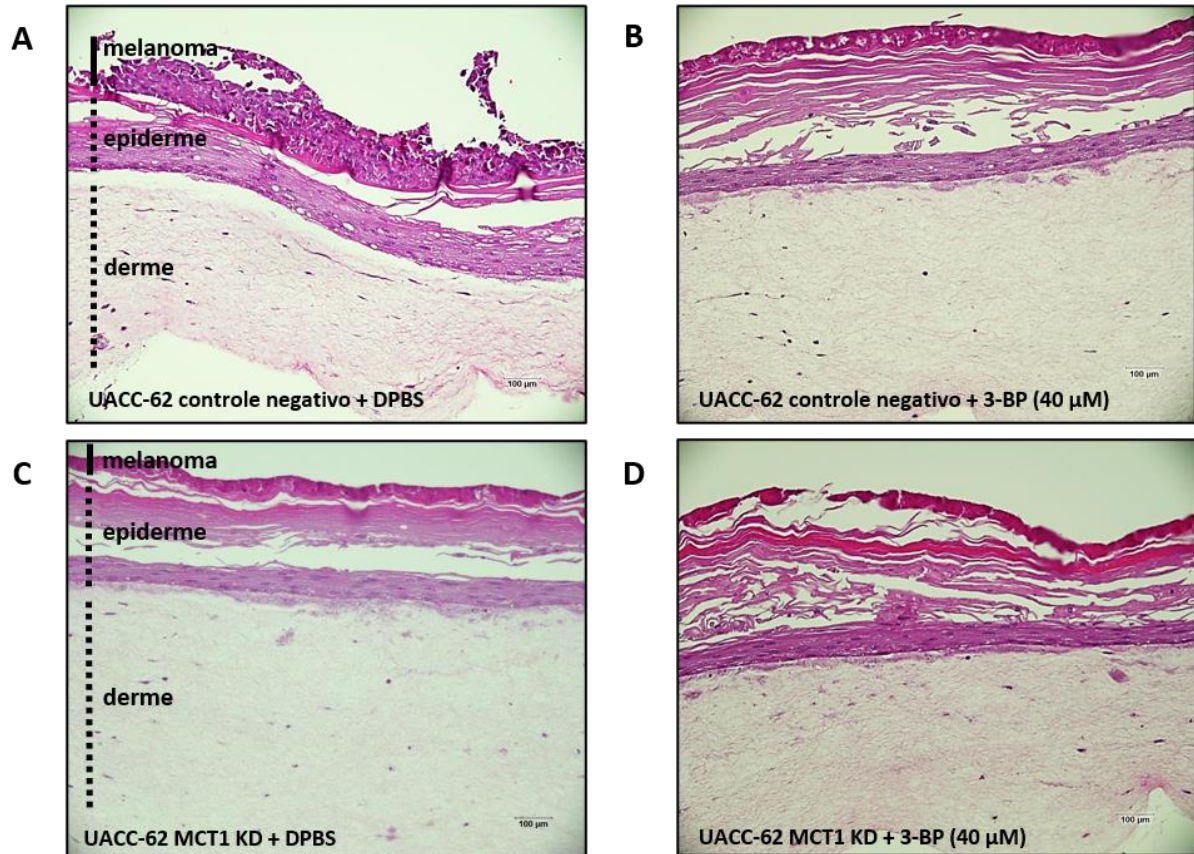
**Figura 23.** Cultura organotípica de pele (pele normal). Para a construção da pele *in vitro*, fibroblastos humanos foram adicionados a uma matriz de colágeno para a formação do equivalente dérmico. Após a polimerização da matriz de colágeno, queratinócitos e melanócitos humanos foram adicionados ao equivalente dérmico. Por fim, a pele reconstituída foi mantida em meio de cultura específico por 10 dias, para a completa diferenciação e estratificação tecidual. Após 10 dias, realizou-se a coleta das peles para fixação, emblocamento e cortes histológicos. Magnificação: 100×.

Em relação aos resultados obtidos para a pele reconstruída *in vitro*, com a adição da linhagem UACC-62 ao modelo 3D (Figura 24), observa-se que a linhagem UACC-62 MCT1 KD apresentou uma redução no tamanho do tumor formado em comparação à linhagem UACC-62 controle, sugerindo que o silenciamento de MCT1 foi capaz de diminuir parâmetros de agressividade da linhagem, assim como observado nos ensaios funcionais realizados em modelo 2D. Quanto ao efeito do tratamento com 3-BP, observa-se que houve uma redução no número de células tumorais da linhagem UACC-62 controle exposta ao inibidor em comparação à linhagem UACC-62 controle exposta ao DPBS, indicando a efetividade do 3-BP.

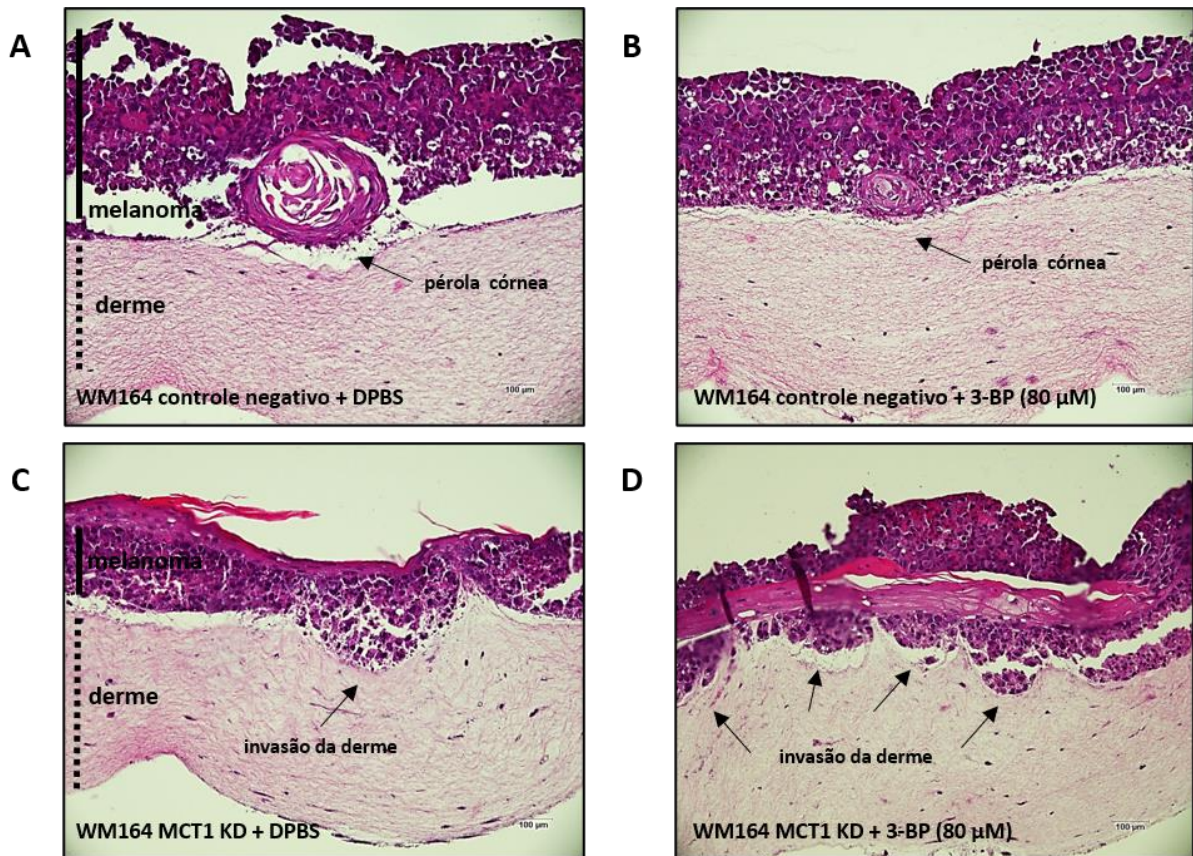


Já quando comparadas as duas condições combinadas, observa-se que o KD de MCT1 impediu a ação do 3-BP, com a linhagem UACC-62 MCT1 KD exposta ao 3-BP apresentando uma formação tumoral semelhante à condição KD exposta ao DPBS. Destaca-se ainda a ausência de invasão da derme apresentada pela linhagem UACC-62 em todas as condições analisadas.

Já nos resultados da reconstrução da pele *in vitro* com a adição da linhagem WM164 ao modelo 3D (Figura 25), observa-se que a linhagem WM164 controle apresenta a formação de pérolas córneas (setas indicativas, Figura 25A e 25B), relacionadas a tumores com baixo grau de diferenciação, as quais não são observadas na linhagem WM164 MCT1 KD. Ainda, o KD de MCT1 demonstrou reduzir o número de células da linhagem WM164 presentes na pele quando comparada à linhagem WM164 controle, sugerindo uma diminuição da proliferação celular, corroborando os resultados observados no modelo 2D. Entretanto, ressalta-se o maior grau de invasão na derme apresentado pela linhagem WM164 MCT1 KD (setas indicativas, Figura 25C e 25D) em comparação à linhagem WM 164 controle, constatando-se, assim, um maior grau de agressividade, assim como o observado nos ensaios funcionais realizados em modelo 2D. Quanto ao efeito do tratamento com 3-BP, observou-se que não houve alteração no tamanho do tumor formado entre a linhagem WM164 controle exposta ao inibidor em relação à linhagem WM164 controle exposta ao DPBS. Quando combinadas as duas condições, observou-se que a agressividade da linhagem WM164 MCT1 KD se manteve, não havendo impacto no crescimento do tumor e invasão da derme apresentados pela linhagem.



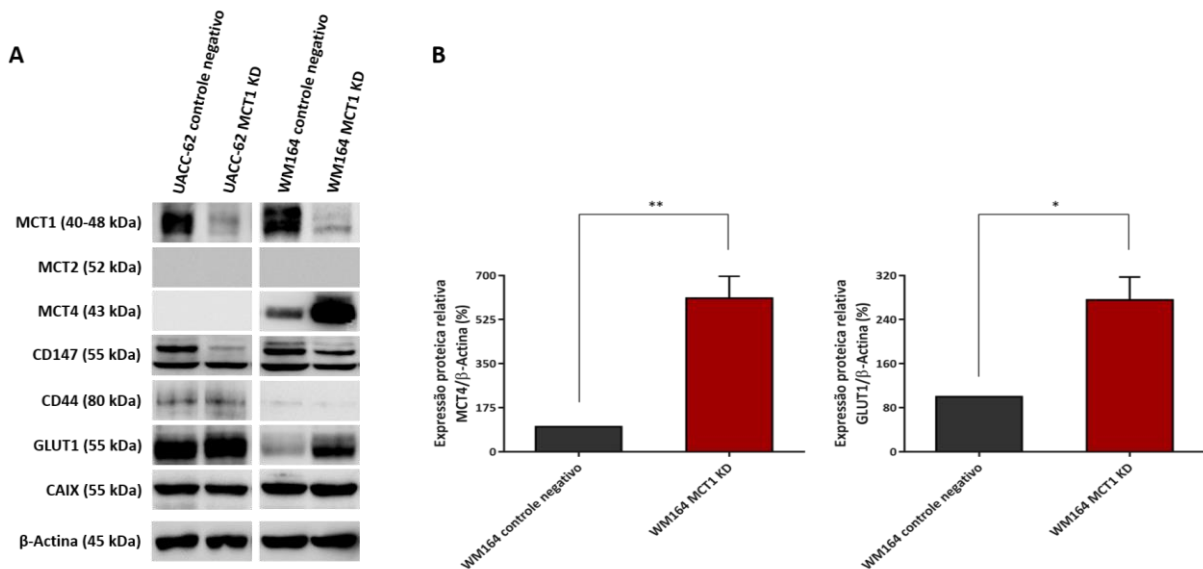
**Figura 24.** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem UACC-62 ao modelo 3D. **(A)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem UACC-62 controle negativo ao modelo e tratamento com DPBS. **(B)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem UACC-62 controle negativo ao modelo e tratamento com 3-BP. **(C)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem UACC-62 MCT1 KD ao modelo e tratamento com DPBS. **(D)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem UACC-62 MCT1 KD ao modelo e tratamento com 3-BP. Dois experimentos independentes foram realizados para cada condição apresentada. Magnificação: 100×.



**Figura 25.** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem WM164 ao modelo 3D. **(A)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem WM164 controle negativo ao modelo e tratamento com DPBS. **(B)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem WM164 controle negativo ao modelo e tratamento com 3-BP. **(C)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem WM164 MCT1 KD ao modelo e tratamento com DPBS. **(D)** Cultura organotípica de pele com a adição da linhagem WM164 MCT1 KD ao modelo e tratamento com 3-BP. Dois experimentos independentes foram realizados para cada condição apresentada. Magnificação: 100x.

Devido aos resultados inesperados apresentados pela linhagem WM164 MCT1 KD em relação ao aumento de alguns dos parâmetros de agressividade tumoral avaliados, como o aumento da invasão celular (modelo 2D e 3D), aumento no número de colônias formadas e diminuição da apoptose, buscou-se identificar mecanismos metabólicos compensatórios, provavelmente originados como um mecanismo de resistência intrínseco decorrente do silenciamento de MCT1. Importante, a linhagem WM164 apresenta, além da expressão de MCT1, a expressão de outro transportador de monocarboxilato, o MCT4, também responsável pelo efluxo de lactato. Avaliando a expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico nas linhagens UACC-62 controle negativo e UACC-62 MCT1 KD (Figura 26A), não se observou diferença significativa na expressão das proteínas avaliadas entre as duas linhagens,

excetuando-se o próprio MCT1 pré e pós edição gênica, como já apresentado no item 9.3. Em contrapartida, quando comparada a expressão das proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico na linhagem WM164 MCT1 KD em relação à linhagem WM164 controle negativo (Figura 26A), observou-se um aumento significativo de MCT4 e GLUT1 ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente, Figura 26B). Sendo assim, sugere-se que o aumento do fenótipo de agressividade apresentado pela linhagem WM164 MCT1 KD na avaliação funcional realizada seja consequência do aumento da expressão de MCT4 e GLUT1, com ênfase na atividade exacerbada de MCT4, atuando como um mecanismo metabólico compensatório devido ao silenciamento de MCT1.



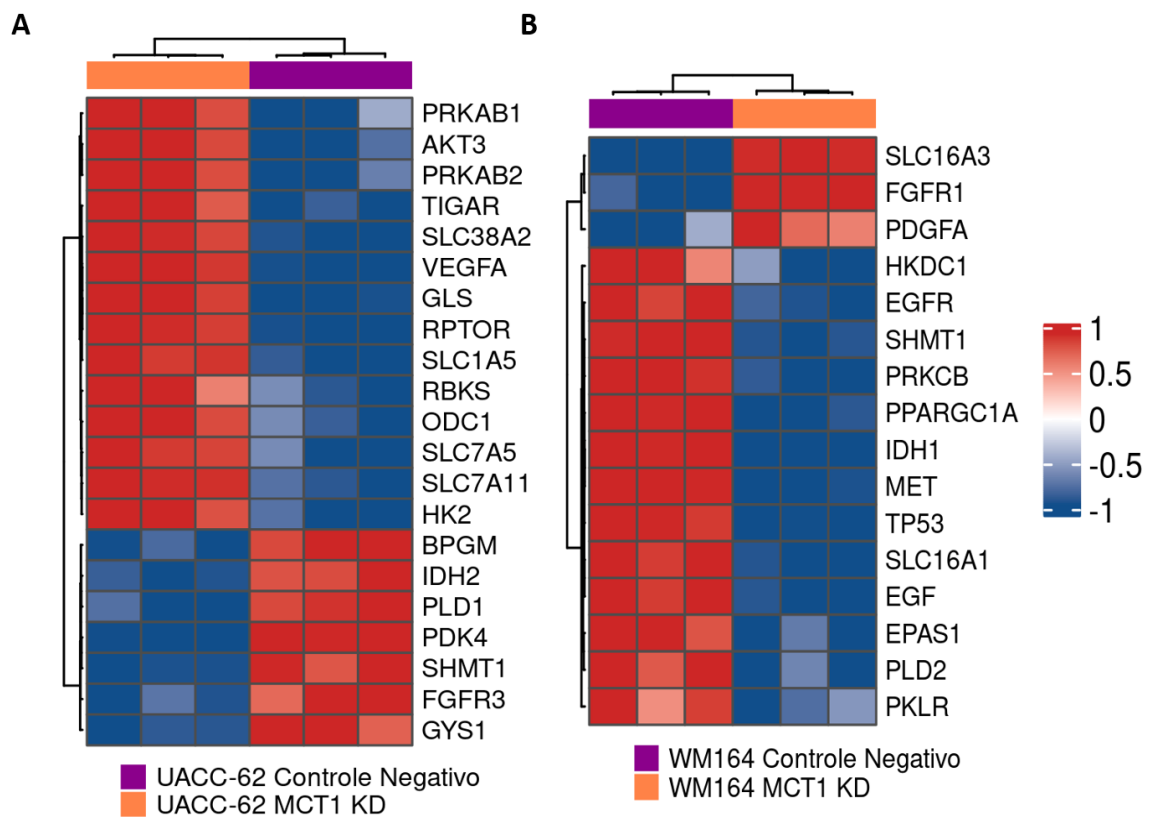
**Figura 26.** Avaliação da expressão de proteínas relacionadas ao perfil glicolítico das linhagens UACC-62 e WM164 após *knockdown* de MCT1 por CRISPR/Cas9. **(A)** Resultado representativo do *western blotting* para avaliação da expressão MCT1, MCT2, MCT4, CD147, CD44, GLUT1 e CAIX das linhagens UACC-62 e WM164 (controles negativos de edição gênica e MCT1 KD). **(B)** Análise de densitometria para a expressão de MCT4 e GLUT1 na linhagem WM164 (controle negativo e MCT1 KD). β-Actina utilizada como proteína endógena normalizadora das diferentes proteínas associadas ao metabolismo glicolítico. Os valores expressam a média e erro padrão de dois experimentos independentes. kDa: kilodalton. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

## 7.5 Análise transcricional de genes relacionados ao metabolismo celular nas linhagens UACC-62 e WM164

De acordo com os resultados obtidos na análise da expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico, observados na linhagem WM164 pós silenciamento de MCT1

(aumento da expressão de MCT4 e GLUT1), buscou-se avaliar o perfil transcricional de um amplo painel de genes relacionados a diferentes vias metabólicas. Sendo assim, analisou-se a expressão de 180 genes pela plataforma *Nanostring*, tendo como objetivo a identificação de outros mecanismos compensatórios ou vias correlatas que possam ser alvo de uma modulação metabólica em consequência do *knockdown* de MCT1.

Dentre o perfil transcricional encontrado nas linhagens UACC-62 e WM164 MCT1 KD, quando comparadas às linhagens controles (Figura 27, observou-se uma expressão diferencial de 21 genes na linhagem UACC-62 MCT1 KD (Tabela 7,  $p < 0,05$ , *fold change* de 2,0), com 14 genes apresentando diminuição de expressão e sete apresentando superexpressão. Para a linhagem WM164 MCT1 KD, observou-se uma expressão diferencial em 16 genes (Tabela 7,  $p < 0,05$ , *fold change* de 2,0), com diminuição da expressão de 13 genes e superexpressão de três genes. Ressalta-se ainda a diminuição significativa ( $p = 0,018$ , *fold change* de -1,3) da expressão gênica de *SLC16A1* (MCT1) na linhagem UACC-62 MCT1 KD (resultado não apresentado). Mesmo sua expressão diferencial apresentando um *fold change* de -1,3, valor abaixo do *cut-off* utilizado, esta diminuição da expressão gênica de *SLC16A1* está associada a uma importante diminuição da expressão proteica de MCT1, observado após o silenciamento do transportador na linhagem. Já de acordo com os resultados de expressão diferencial apresentados na Tabela 7, observa-se que, dentre os genes superexpressos na linhagem WM164 MCT1 KD, está o gene *SLC16A3* (MCT4), que apresentou um *fold change* de 2,5 ( $p = 0,001$ ), validando, assim, os achados referentes ao transportador em nível proteico e provavelmente relacionados ao aumento das características de agressividade evidenciados pela análise funcional da linhagem após o silenciamento de MCT1. Ressalta-se ainda o aumento significativo ( $p = 0,01$ , *fold change* de 1,7) da expressão gênica de *SLC2A1* (GLUT1) na linhagem WM164 MCT1 KD (resultado não apresentado). Mesmo sua expressão diferencial apresentando um *fold change* de 1,7, valor abaixo do *cut-off* utilizado, este aumento da expressão gênica de *SLC2A1* está associado com o aumento da expressão proteica de GLUT1, observado após o silenciamento de MCT1 na linhagem.



**Figura 27.** Expressão diferencial de genes relacionados a vias metabólicas distintas nas linhagens UACC-62 e WM164 controles e MCT1 KD. **(A)** *Heatmap* representativo dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens UACC-62 controle negativo (roxo) e UACC-62 MCT1 KD (laranja). **(B)** *Heatmap* representativo dos genes diferencialmente expressos entre as linhagens WM164 controle negativo (roxo) e WM164 MCT1 KD (laranja). Em vermelho estão representados os genes com aumento de expressão e em azul representados os genes com diminuição de expressão. Os *heatmaps* apresentam os resultados de expressão de três experimentos independentes realizados para cada linhagem. Todos os genes diferencialmente expressos com *fold change* de 2,0 e  $p < 0,05$  estão representados nos *heatmaps*.

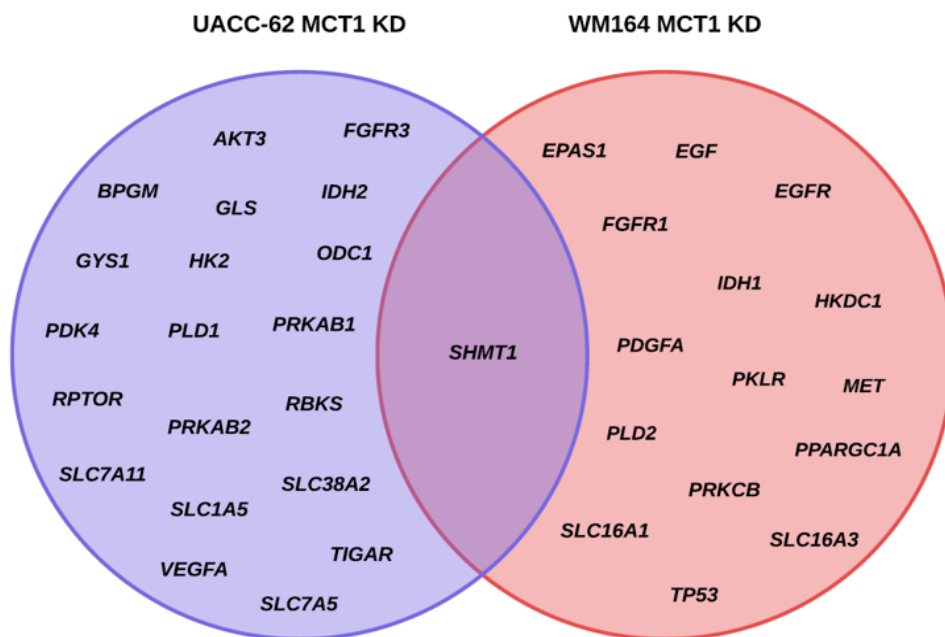
Adicionalmente, buscou-se identificar os genes diferencialmente expressos únicos e em comum das linhagens UACC-62 MCT1 KD e WM164 MCT1 KD (Figura 28). Devido ao comportamento divergente das linhagens frente à sua caracterização funcional nas condições analisadas, esperava-se um número reduzido de genes diferencialmente expressos compartilhados. Como esperado, o único gene diferencialmente expresso nas duas linhagens, com diminuição significativa de sua expressão, foi o *SHMT1* (serina hidroximetiltransferase 1), gene responsável pela conversão reversível da serina e tetraidrofolato em glicina, e também com participação na doação de unidades de carbono para a síntese do ácido timidílico, um metabólito essencial para a síntese e reparo do DNA.

**Tabela 7** – Genes diferencialmente expressos nas linhagens UACC-62 MCT1 KD e WM164 MCT1 KD.

UACC-62 MCT1 KD			WM164 MCT1 KD		
Genes	Fold change	p valor	Genes	Fold change	p valor
<i>PDK4</i>	-8,0	0,0000049	<i>PRKCB</i>	-8,6	0,0012
<i>FGFR3</i>	-5,7	0,0052	<i>IDH1</i>	-4,6	0,00021
<i>IDH2</i>	-3,2	0,0087	<i>SLC16A1</i>	-3,7	0,00036
<i>SHMT1</i>	-2,6	0,0095	<i>EGFR</i>	-3,5	0,0025
<i>BPGM</i>	-2,5	0,0044	<i>MET</i>	-3,5	0,00018
<i>PLD1</i>	-2,3	0,0044	<i>EGF</i>	-2,8	0,00027
<i>GYS1</i>	-2,1	0,0044	<i>PPARGC1A</i>	-2,8	0,002
<i>HK2</i>	2,0	0,0044	<i>HKDC1</i>	-2,3	0,01
<i>PRKAB1</i>	2,0	0,039	<i>PKLR</i>	-2,1	0,017
<i>SLC1A5</i>	2,0	0,0025	<i>SHMT1</i>	-2,1	0,0027
<i>TIGAR</i>	2,0	0,0044	<i>TP53</i>	-2,1	0,0025
<i>SLC7A5</i>	2,1	0,018	<i>EPAS1</i>	-2,0	0,0033
<i>RBKS</i>	2,3	0,013	<i>PLD2</i>	-2,0	0,0057
<i>AKT3</i>	2,5	0,0044	<i>PDGFA</i>	2,3	0,017
<i>GLS</i>	2,6	0,0044	<i>SLC16A3</i>	2,5	0,001
<i>RPTOR</i>	2,6	0,0049	<i>FGFR1</i>	3,0	0,005
<i>ODC1</i>	2,8	0,031			
<i>SLC38A2</i>	2,8	0,0044			
<i>PRKAB2</i>	3,2	0,0095			
<i>VEGFA</i>	5,3	0,0036			
<i>SLC7A11</i>	9,8	0,017			

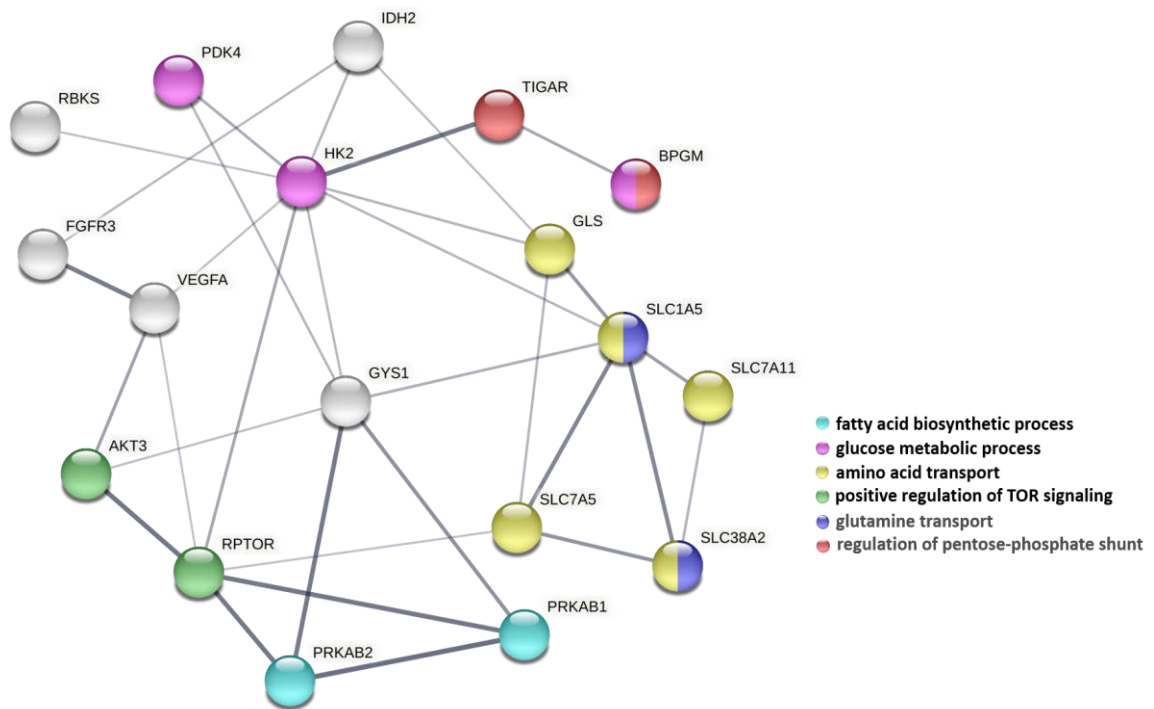
Em relação aos resultados obtidos no enriquecimento funcional de vias e de interações gênicas realizado no *software STRING*, observou-se que ambas as linhagens com o MCT1 silenciado apresentaram modulação de seu metabolismo. Para a linhagem UACC-62 MCT1 KD (Figura 29), observou-se a expressão diferencial de genes reguladores do metabolismo glicolítico (*PDK4*, *HK2* e *TIGAR*), reguladores da via das pentoses-fosfato (*TIGAR*), assim como de genes sinalizadores da via de mTOR (*AKT3* e *RPTOR*). Ressalta-se ainda o aumento da expressão de um elevado número de genes relacionados ao transporte da glutamina (*SLC1A5* e *SLC38A2*), transporte de aminoácidos (*GLS*, *SLC1A5*, *SLC7A5*, *SLC7A11*, *SLC38A2*) e na biossíntese dos ácidos graxos (*PRKAB1* e *PRKAB2*), indicando um possível desvio da via glicolítica, decorrente do silenciamento de MCT1, para a via da glutamina na obtenção de energia e intermediários anabólicos. Já os resultados de enriquecimento funcional de vias e

interações gênicas obtidos para a linhagem WM164 MCT1 KD (Figura 30) demonstram a expressão diferencial de genes relacionados à ativação da via MAPK, com a diminuição da expressão de genes como o *EGF* e *EGFR*. Em contrapartida, observou-se a expressão diferencial de genes associados principalmente aos processos de transição epitélio-mesênquima e quimiotaxia celular, com o aumento da expressão de *FGFR1* e *PDGFA*, respectivamente. Ainda, ressalta-se a expressão diferencial do gene *SLC16A3* (MCT4), que apesar de não apresentar conexões diretas com os genes de outras vias apresentados, demonstrou o aumento de sua expressão, indicando, em conjunto aos achados relacionados aos processos da EMT e quimiotaxia celular, uma possível hipótese para o aumento da agressividade da linhagem WM164, decorrente do silenciamento de MCT1.

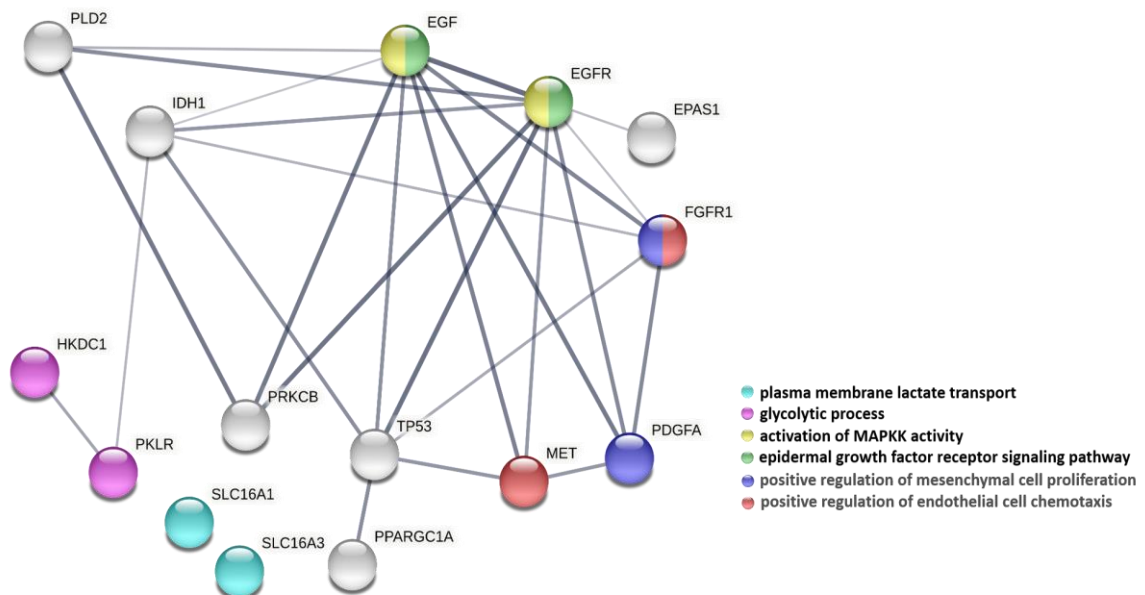


**Figura 28.** Diagrama de Venn apresentando os genes diferencialmente expressos únicos e em comum das linhagens UACC-62 MCT1 KD e WM164 MCT1 KD.





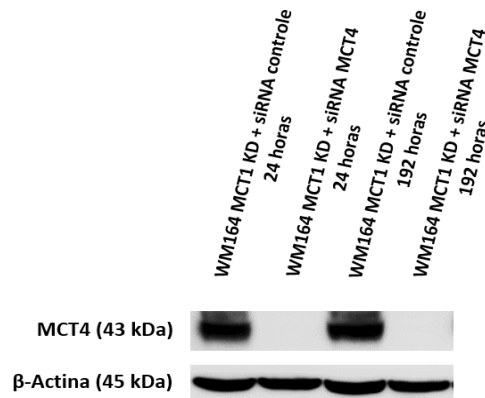
**Figura 29.** Análise de enriquecimento funcional e rede de interação gênica associada às diferentes vias metabólicas encontradas diferencialmente expressas na linhagem UACC-62 MCT1 KD. Cada círculo é representado por um gene e cada conexão é representada pela linha em cinza. A espessura da linha de conexão indica a força de suporte dos dados da interação entre os genes. As cores de cada gene indicam os processos biológicos aos quais estão relacionados.



**Figura 30.** Análise de enriquecimento funcional e rede de interação gênica associada às diferentes vias metabólicas encontradas diferencialmente expressas na linhagem WM164 MCT1 KD. Cada círculo é representado por um gene e cada conexão é representada pela linha em cinza. A espessura da linha de conexão indica a força de suporte dos dados da interação entre os genes. As cores de cada gene indicam os processos biológicos aos quais estão relacionados.

## 7.6 Análise funcional do duplo silenciamento na linhagem WM164

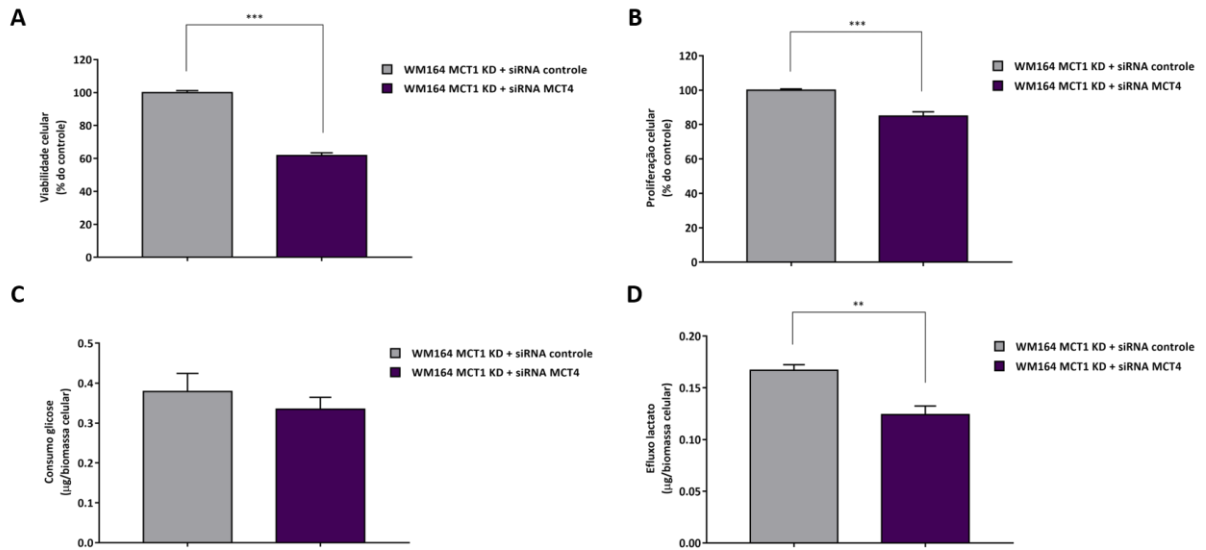
Com relação aos achados referentes ao aumento de agressividade da linhagem WM164 após o silenciamento de MCT1 com consequente superexpressão de MCT4, realizou-se o duplo silenciamento na linhagem (MCT1 via CRISPR/Cas9 e MCT4 via siRNA) e sua caracterização funcional. Dessa forma, visou-se validar o mecanismo metabólico compensatório como um dos responsáveis pelo aumento do fenótipo maligno apresentado. O duplo silenciamento foi obtido com sucesso na linhagem WM164 MCT1 KD (Figura 31), com a diminuição da expressão de MCT4 mantendo-se até às 192 horas avaliadas (momento escolhido devido ao tempo total do ensaio de formação de colônias realizado na linhagem duplamente silenciada).



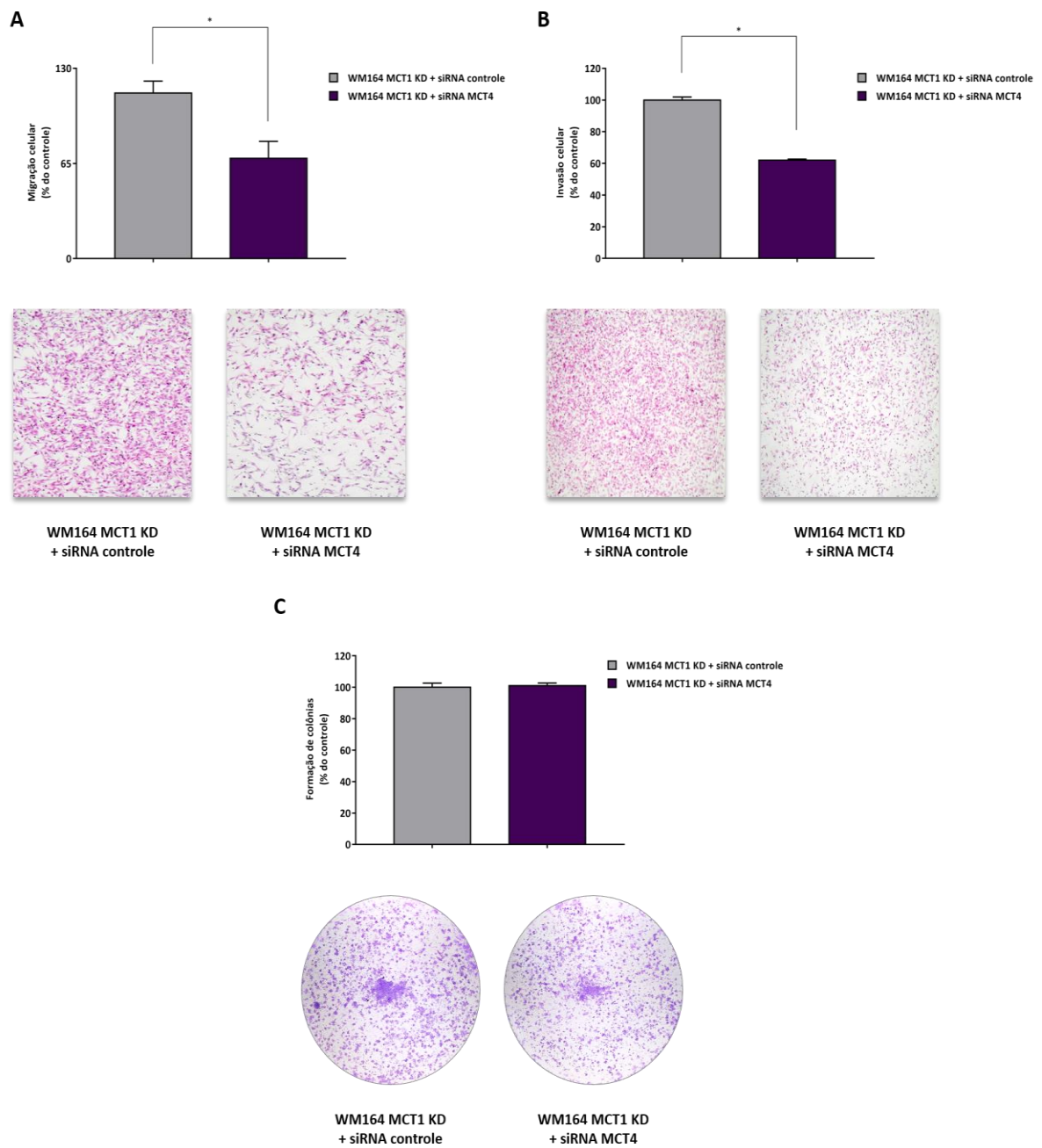
**Figura 31.** Avaliação do silenciamento da expressão de MCT4 por *western blotting* através da técnica de siRNA após 24 e 192 horas na linhagem WM164 MCT1 KD. A β-Actina foi utilizada como controle de carregamento. kDa: kilodalton.

A caracterização funcional mostrou que o duplo silenciamento levou à diminuição significativa de parâmetros celulares que não haviam sido afetados, anteriormente, pelo silenciamento isolado de MCT1. De acordo com a Figura 32, observa-se uma diminuição significativa da viabilidade (Figura 32A,  $p < 0,001$ ) e proliferação celular (Figura 32B,  $p < 0,001$ ), assim como do efluxo de lactato (Figura 32D,  $p < 0,01$ ) na linhagem duplamente silenciada quando comparada à linhagem controle. Em relação ao resultado do consumo de glicose, não se observou diferença significativa (Figura 32C). Quando avaliadas a migração e invasão celular da linhagem WM164 com MCT1 e MCT4 silenciados, observou-se uma diminuição significativa nos dois parâmetros, quando comparadas às linhagens controles (Figura 33A e 33B,  $p < 0,05$ ). Entretanto, para a capacidade de formação de colônias, não se observou o mesmo, com as

duas linhagens apresentando resultados semelhantes no número de colônias formadas (Figura 33C). Com os resultados obtidos após o duplo silenciamento de MCT1 e MCT4, suporta-se a hipótese de que o MCT4 teve impacto no aumento do comportamento agressivo da linhagem WM164 MCT1 KD, evidenciado previamente nos ensaios funcionais após o silenciamento de MCT1.



**Figura 32.** Caracterização funcional do silenciamento de MCT4 por siRNA na linhagem WM164 MCT1 KD. **(A)** Viabilidade celular. **(B)** Proliferação celular. **(C)** Consumo de glicose. **(D)** Efluxo de lactato. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicas experimentais. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



**Figura 33.** Caracterização funcional do silenciamento de MCT4 por siRNA na linhagem WM164 MCT1 KD. **(A)** Migração celular. **(B)** Invasão celular. **(C)** Formação de colônias. Os valores dos gráficos representam a média e erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicatas experimentais. \* $p < 0,05$ .

## 8 DISCUSSÃO

A caracterização metabólica de um amplo painel de linhagens celulares comerciais de melanoma demonstrou a expressão diferencial de proteínas relacionadas à via glicolítica, como os transportadores de monocarboxilatos (MCT1 e MCT4), suas chaperonas (CD147 e CD44) e outras importantes proteínas relacionadas à captação de glicose (GLUT1) e controle do pH intracelular (CAIX), permitindo identificar linhagens com um perfil mais hiperglicolítico e linhagens com um perfil mais oxidativo. Os ensaios de inibição com 3-bromopiruvato, um potente inibidor da via glicolítica, realizados nas linhagens UACC-62 e WM164, demonstraram que a ação do inibidor é altamente dependente da expressão de MCT1, sugerindo o papel do MCT1 como mediador de resposta ao 3-BP para o tratamento de melanomas. Além disso, à partir do silenciamento de MCT1, realizado nas duas linhagens via CRISPR/Cas9, foi possível observar que parâmetros de agressividade tumoral são inibidos de maneira importante, reforçando o papel do transportador como um promissor alvo terapêutico. Ainda, foi observado que o silenciamento de MCT1 na linhagem WM164 levou ao aumento da expressão de MCT4, já previamente expresso à edição gênica realizada. O aumento na expressão de MCT4 sugere um mecanismo metabólico compensatório, favorecendo a agressividade da linhagem WM164 em processos como aumento da capacidade clonogênica e invasão celular, assim como de evasão à apoptose, resultados não observados na linhagem UACC-62, que não possui expressão do MCT4. A análise de um amplo painel de genes relacionados a diferentes vias metabólicas demonstrou que ambas as linhagens com o MCT1 silenciado apresentaram superexpressão de vias alternativas para a obtenção de energia, com o aumento da expressão de genes relacionados à via da glutamina na linhagem UACC-62 MCT1 KD e o aumento da expressão de MCT4 e de genes relacionados à EMT na linhagem WM164 MCT1 KD. Por fim, o duplo silenciamento de MCT1/MCT4 realizado na linhagem WM164 demonstrou diminuição importante dos parâmetros de agressividade desenvolvidos após o silenciamento de MCT1 de maneira isolada.

A reprogramação metabólica, também conhecida como efeito Warburg ou glicólise aeróbica<sup>1,2</sup>, já descrita em diferentes tipos tumorais<sup>3</sup>, foi também previamente observada em linhagens celulares de melanoma<sup>89</sup>. Os resultados obtidos por Scott e colaboradores<sup>89</sup> apontam que células de melanoma apresentam maior consumo de glicose e produção de lactato quando comparadas a melanócitos, tanto em situações de normóxia como em hipóxia,

caracterizando o efeito Warburg. Ainda, estudo de Pinheiro e colaboradores<sup>90</sup>, realizado em 356 pacientes com melanoma, demonstra que a reprogramação metabólica pela qual passam estes tumores é caracterizada por uma elevada expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica, em especial os transportadores de monocarboxilato MCT1 e MCT4, apresentando valor prognóstico na sobrevida destes pacientes. Nesse contexto, os MCTs emergem como alvos terapêuticos importantes<sup>15</sup>, sendo mais uma opção de tratamento, aliados principalmente aos inibidores de BRAF e MEK, já rotineiramente utilizados no manejo clínico de pacientes com melanomas metastáticos<sup>91</sup>.

Como abordado, uma importante característica dos melanomas é a presença de variantes encontradas no gene *BRAF*, com destaque para a mutação V600E, que apresenta uma alta frequência nestes tumores (cerca de 40-60%)<sup>55, 92, 93</sup> e é capaz de induzir uma maior agressividade das células malignas<sup>94</sup>, sendo que pacientes com a mutação V600E possuem piores prognósticos, com rápida evolução da doença<sup>95</sup> e uma menor sobrevida<sup>96</sup>. Além disso, a mutação V600E modula o metabolismo celular, promovendo o efeito Warburg<sup>63</sup>. Ressalta-se que a mutação V600E em *BRAF* induz o aumento da expressão de HIF-1 $\alpha$  em melanomas<sup>65, 68</sup>, um dos principais mecanismos responsáveis pela dependência dos tumores na via glicolítica<sup>97</sup>, reforçando seu papel no contexto da reprogramação metabólica destes tumores. Outra característica importante dos melanomas está em variantes encontradas no gene *NRAS*, presente em cerca de 15-20% dos casos, que se relaciona, assim como a mutação V600E em *BRAF*, a piores prognósticos<sup>93, 98</sup>. No presente estudo, realizou-se a caracterização mutacional de 12 linhagens celulares comerciais de melanoma, encontrando-se resultados de frequência semelhantes aos previamente descritos<sup>93</sup>, com 10 linhagens celulares apresentando a mutação V600E em *BRAF*, e duas linhagens (SK-MEL-103 e SK-MEL-173) apresentando mutações no códon 61 do gene *NRAS*. Adicionalmente, destacam-se as variantes C228T e C250T detectadas na região promotora do gene *TERT*, já descritas em diferentes tipos tumorais<sup>99</sup>, assim como nos melanomas, com uma frequência de 70-80%<sup>100, 101</sup>. Dez das 12 linhagens analisadas apresentaram as variantes C228T ou C250T, corroborando a alta frequência de mutações no gene *TERT* encontradas nesses tumores<sup>100, 101</sup>.

Em relação ao perfil metabólico, observou-se uma alta heterogeneidade entre as linhagens analisadas, com algumas linhagens apresentando maior dependência na via glicolítica (SK-MEL-103 e WM164) e outras apresentando um perfil preferencialmente

oxidativo (SK-MEL-173). Sabe-se que a reprogramação metabólica dos melanomas não se dá exclusivamente pela glicólise, como observado em diferentes estudos, que apontam uma dependência conjunta da produção de ATP pela via mitocondrial, assim como pela via da glutamina, especialmente na biossíntese de outras moléculas, como os lipídios, ácidos graxos e proteínas<sup>89, 102</sup>.

Visando alvejar uma característica importante dos tumores, baseada na reprogramação de seu metabolismo, Birsoy e colaboradores demonstraram o efeito anti-tumoral de um potente inibidor glicolítico, o 3-bromopiruvato, em linhagens celulares de mama e uma linhagem de origem leucêmica, e apontaram que a sua ação é altamente dependente do aumento da expressão de MCT1<sup>33</sup>. Assim como descrito por Birsoy, outros estudos apontam a eficácia do 3-BP no tratamento de tumores hiperglicolíticos<sup>34, 103-110</sup>. Com base no exposto e de acordo com os resultados encontrados, este projeto visou avaliar os efeitos do 3-BP em diferentes contextos funcionais em duas linhagens celulares (UACC-62 e WM164), escolhidas a partir de seu perfil metabólico analisado, com especial ênfase na expressão de MCT1. Adicionalmente, foi avaliado em conjunto o efeito do *knockdown* de MCT1, assim como a associação do silenciamento do transportador combinado à exposição ao 3-BP. Os resultados demonstram que o efeito da exposição ao 3-BP é altamente dependente da expressão de MCT1, com seis das 12 linhagens expostas ao 3-BP apresentando alta sensibilidade relacionada à presença de MCT1. Entretanto, duas linhagens (SK-MEL-19 e SK-MEL-173), que apresentaram MCT1 expresso, foram resistentes ao tratamento com o inibidor. Estudos prévios destacam que elevados níveis de glutatona (GSH) impactam no efeito do 3-BP, sendo este um provável mecanismo de resistência intrínseco ao fármaco, ainda que apresentem o MCT1 expresso<sup>74, 111-113</sup>. Ao contrário das linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-173 e de acordo com o esperado, quatro linhagens com baixa expressão do transportador (WM9, WM35, WM278 e WM793) apresentaram um perfil de sensibilidade moderada a resistente.

No contexto funcional, os resultados deste projeto demonstraram que o silenciamento de MCT1 foi capaz de diminuir significativamente o efluxo de lactato da linhagem UACC-62, assim como a sua capacidade de migração, invasão celular e número de colônias formadas. Ainda, foi observado que o KD de MCT1 foi capaz de reduzir a viabilidade e a proliferação da linhagem celular WM164. Outros trabalhos demonstram que o silenciamento de MCT1/MCT4 induz a diminuição da agressividade de diferentes tipos tumorais, como observado em

estudos prévios que utilizaram linhagens celulares de tumores colorretais, mama, colo do útero, bexiga e gliomas<sup>80-82, 114-118</sup>. Entretanto, para a linhagem WM164 MCT1 KD, observou-se um aumento da expressão de MCT4 e GLUT1, sugerindo que há um mecanismo metabólico compensatório em vista da deficiência de MCT1, o que levou ao aumento da agressividade da linhagem no contexto funcional, com o conseqüente aumento de sua capacidade clonogênica e de invasão celular, assim como de evasão à apoptose. Estudos prévios demonstram que a superexpressão de MCT4 pós inibição de MCT1 é um mecanismo intrínseco de sobrevivência adaptativa já observado em linhagens de neuroblastoma, linfoma de células B, cólon e pulmão não pequenas células, que tiveram a atividade de MCT1 abolida farmacologicamente<sup>119-121</sup>. Importante, o mesmo resultado não foi observado na linhagem UACC-62, que não apresenta expressão de MCT4, conforme verificado antes e depois da realização do KD de MCT1.

Em relação aos efeitos da exposição das linhagens UACC-62 e WM164 ao 3-BP, os resultados demonstram que, na presença do MCT1 expresso, o 3-BP foi capaz de diminuir significativamente a viabilidade, proliferação, migração celular e número de colônias formadas de ambas as linhagens. Adicionalmente, para a linhagem WM164 com MCT1 expresso e exposta ao 3-BP, observou-se o aumento significativo da morte celular. De fato, o 3-BP é descrito com um potente inibidor, tendo como principais alvos proteínas chaves da via glicolítica, como o GAPDH e HKII. O mecanismo de atuação do 3-BP se dá através da alquilação das estruturas proteicas (resíduos de cisteína) do GAPDH e HKII levando, em especial, à dissociação entre a HKII e o canal aniônico dependente de tensão (VDAC), localizados na membrana mitocondrial externa, gerando, assim, a despolarização da membrana mitocondrial e posterior liberação de fatores pró-apoptóticos e depleção do ATP<sup>32, 122</sup>, dando origem ao que alguns autores denominam de “catástrofe metabólica”<sup>123</sup>. Inesperadamente, a exposição da linhagem WM164 ao 3-BP elevou de maneira significativa o seu consumo de glicose, o que é um contraponto à literatura, com estudos demonstrando que a exposição de células tumorais ao 3-BP tem um efeito negativo na captação de glicose<sup>110, 124</sup>. Dentre as hipóteses formuladas para esse resultado, dois estudos<sup>125, 126</sup> apontam que a depleção do ATP celular, efeito já esperado pela exposição ao 3-BP, tem como consequência direta o aumento do consumo de glicose, como previamente observado em células expostas ao fármaco metformina, sugerindo que a captação aumentada de glicose é um mecanismo metabólico adaptativo na tentativa de restaurar os níveis celulares de ATP<sup>127</sup>. Adicionalmente, Irhlund e



colaboradores, demonstraram que o tratamento de 24 horas com uma concentração de 50  $\mu\text{M}$  de 3-BP diminuiu significativamente os níveis de ATP celular, sem afetar a captação de glicose da linhagem HCT116<sup>128</sup>. Aliado a esse resultado, dois estudos demonstram que o principal alvo do 3-BP é de fato a proteína GAPDH<sup>39, 40</sup>. No primeiro estudo, da Silva e colaboradores<sup>40</sup> apontam uma inibição de 70% da atividade de GAPDH na linhagem HepG2 com uma concentração de 150  $\mu\text{M}$  do fármaco, enquanto que, para a mesma concentração testada, não se observou a inibição de HKII. Ainda, os autores demonstram que somente a exposição da linhagem HepG2 a uma concentração 10-50x maior de 3-BP foi capaz de inibir 20% da atividade de HKII. No segundo estudo, Ehrke e colaboradores<sup>39</sup> demonstram que a exposição de astrócitos murinos a 100  $\mu\text{M}$  de 3-BP foi capaz de inibir cerca de 90% da atividade de GAPDH, enquanto que concentrações de até 1000  $\mu\text{M}$  do fármaco não apresentaram efeito significativo na redução da atividade das HKs. Os resultados obtidos neste estudo vão de encontro ao já descrito, visto que a exposição da linhagem UACC-62 ao 3-BP não afetou de forma significativa o seu consumo de glicose, enquanto que, para a linhagem WM164, se observou um aumento no consumo de glicose frente à exposição ao 3-BP, sugerindo que a atividade de HKII em “aprisionar” a glicose no interior da célula por meio de sua fosforilação em glicose-6-fosfato (G-6P)<sup>129</sup> não é afetada, mantendo o fluxo glicolítico no eixo GLUT1/HKII. Entretanto, mais estudos são necessários para a elucidação completa do resultado encontrado, visto que o 3-BP possui inúmeros alvos celulares, não afetando exclusivamente proteínas da via glicolítica<sup>32</sup>.

Em relação aos resultados da combinação do KD de MCT1 e exposição ao 3-BP, observou-se que a diminuição da expressão do transportador é capaz de reverter todos os efeitos causados pela exposição ao 3-BP na presença da proteína, restaurando o status de viabilidade, proliferação, migração celular e número de colônias formadas das linhagens UACC-62 e WM164 à sua condição KD. Ainda, observou-se que o KD de MCT1 na linhagem WM164 foi capaz de reverter os efeitos do 3-BP na morte celular, com resultados semelhantes aos encontrados na condição KD sozinha, sem a presença do inibidor. Este é o primeiro trabalho que descreve a associação do KD de MCT1 e exposição ao 3-BP em diferentes linhagens celulares de melanoma. Outros estudos têm demonstrado o efeito antitumoral do 3-BP no tratamento de um amplo espectro de tumores sólidos e hematológicos, que incluem tumores de mama e ovário<sup>106, 130</sup>, próstata<sup>131, 132</sup>, pâncreas<sup>133</sup>, renal<sup>134</sup>, colorretal<sup>108</sup>,

hepático<sup>113,124</sup>, pulmão<sup>135</sup>, mieloma<sup>140</sup> e leucemia<sup>34,136</sup>. Na sequência de achados envolvendo os efeitos antitumorais do 3-BP *in vitro* para diferentes tumores sólidos, Xintaropoulou e colaboradores demonstram que os valores de IC<sub>50</sub> obtidos no tratamento de um amplo painel de linhagens de mama e ovário, variaram de 10 a 84 µM, com a consequente redução da viabilidade e aumento da morte celular. Diferente dos resultados obtidos no presente estudo, o tratamento com 3-BP apresentou redução importante no consumo de glicose e efluxo de lactato das linhagens MCF-7 e HBL100<sup>130</sup>. Para próstata, o tratamento com 3-BP demonstrou reduzir a viabilidade celular e induzir necrose, relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e depleção do ATP<sup>132</sup>. Ainda, o tratamento com 3-BP na linhagem PC3, demonstrou diminuir a sua capacidade de proliferação, assim como o lactato intra e extracelular e o ATP intracelular<sup>131</sup>. Para pâncreas, Chapiro e colaboradores demonstraram que o tratamento com 3-BP apresentou uma redução significativa no processo de invasão celular<sup>133</sup>, assim como o observado no presente estudo. Utilizando linhagens primárias de carcinoma renal de células claras, Nilsson e colaboradores apontaram que o tratamento com 3-BP diminuiu de maneira importante a proliferação celular e levou ao aumento significativo da morte celular. Adicionalmente, linhagens primárias de rim normais apresentaram boa tolerância ao fármaco, não se observando morte celular nas mesmas concentrações utilizadas para as linhagens primárias tumorais. Ainda, os autores apontaram que as linhagens primárias tumorais apresentaram uma alta expressão de MCT1 quando comparadas às linhagens primárias normais, o que justifica a maior eficácia do 3-BP nas linhagens tumorais. Adicionalmente, o tratamento com o inibidor demonstrou reduzir o lactato extracelular e ATP intracelular das linhagens primárias tumorais de rim<sup>134</sup>, diferente do observado no presente estudo para as linhagens UACC-62 e WM164. Em linhagens de tumores colorretais, o tratamento com o 3-BP levou ao aumento da morte celular, assim como o observado no presente estudo para as linhagens UACC-62 e WM164. Ressalta-se que as linhagens de tumores colorretais mais sensíveis ao inibidor apresentaram elevada expressão de HKII. Entretanto, o silenciamento de HKII não reduziu de maneira significativa a sensibilidade ao 3-BP, demonstrando que a proteína não é o principal mediador de sensibilidade ao fármaco<sup>108</sup>. Por sua vez, o tratamento com 3-BP realizado em linhagens de tumores hepáticos demonstrou induzir um aumento no estresse oxidativo, com maior produção de ROS. Ainda, observou-se uma redução do lactato intracelular e da capacidade de

invasão das linhagens expostas ao inibidor<sup>113</sup>. No estudo de Zhang e colaboradores, o tratamento de linhagens tumorais de pulmão com o 3-BP demonstrou reduzir de maneira importante as taxas de ECAR e OCR apresentadas<sup>135</sup>, resultado em acordo ao obtido no presente estudo, com a exposição ao 3-BP diminuindo as taxas de ECAR e OCR das linhagens UACC-62 e WM164 com expressão de MCT1 mantida. Já em relação aos estudos *in vitro* com o uso do 3-BP em tumores hematológicos, Calviño e colaboradores demonstram que o tratamento com 3-BP levou à redução da proliferação celular e ao aumento da morte celular (necrose) de linhagens celulares leucêmicas. Em relação ao seu perfil energético, a exposição ao 3-BP diminuiu consideravelmente o ATP intracelular e aumentou a produção de ROS, mecanismos indutores de morte celular<sup>34</sup>. Por fim, um estudo de associação da exposição do 3-BP com parâmetros de agressividade tumoral, realizado em uma linhagem celular de mieloma, demonstrou uma diminuição significativa da viabilidade celular e depleção de ATP, o que, por sua vez, aumentou de maneira importante a morte celular observada. Ainda, ressalta-se a elevada expressão de MCT1 e a produção concomitante exacerbada do lactato, observados na linhagem tumoral em relação a leucócitos normais. A maior atividade glicolítica apresentada pela linhagem de mieloma, associada à alta expressão de MCT1, sugere, portanto, maior sensibilidade no tratamento com 3-BP<sup>137</sup>, assim como o observado no presente estudo. Ainda, estudos pré-clínicos que validam o MCT1 como mediador de resposta ao 3-BP foram conduzidos em diferentes tipos tumorais, como mama<sup>103, 138</sup>, glioma<sup>139</sup>, colo do útero<sup>140</sup> e leucemia<sup>141</sup>, assim como o estudo de Birsoy e colaboradores, que utilizou um amplo painel de linhagens tumorais de mama (BT-20, BT-549, MDA-MB-231, MDA-MB-468, Sk-Br-3) e uma linhagem de origem leucêmica (KBM7), demonstrando que o *knockdown* de MCT1 impede a ação do 3-BP, em oposição ao observado em linhagens com elevada expressão do transportador, que apresentaram maior sensibilidade ao fármaco<sup>33</sup>.

Um ponto importante a ser considerado ao se testar novas terapias está na heterogeneidade tumoral, onde as interações célula-célula e célula-matriz desempenham um papel essencial na iniciação, desenvolvimento e progressão tumoral. Pelo fato de modelos 2D não apresentarem todos os componentes celulares presentes no microambiente tumoral, modelos de cultura 3D têm sido incorporados como modelos factíveis e mais sofisticados para o estudo da biologia tumoral. Nesse contexto, o ensaio 3D está se tornando um modelo de escolha, especialmente por mimietizar o microambiente tumoral e fornecer informações mais

fidedignas acerca da resposta de novos fármacos em desenvolvimento para o tratamento de uma diversidade de tumores<sup>142, 143</sup>. No caso de tumores cutâneos invasivos, como o melanoma, as reconstruções de pele *in vitro* são muito convenientes para modelar não apenas o crescimento e a progressão das células de melanoma em um microambiente 3D, mas também para estudar a comunicação entre as células de melanoma e os outros componentes celulares presentes, como os queratinócitos epidérmicos e os fibroblastos dérmicos<sup>144, 145</sup>. Estudos prévios com o uso do modelo de pele artificial em associação ao melanoma demonstram a capacidade das células tumorais em recrutar fibroblastos, que, por sua vez, promovem sinais de sobrevivência para o melanoma na forma de deposição da matriz-extracelular e fatores de crescimento, além de estimularem a produção de metaloproteinases, promovendo a invasão das células tumorais<sup>145, 146</sup>. Ainda, o uso do modelo 3D de pele artificial para a validação de novas terapias no tratamento de melanomas vem ganhando destaque<sup>147-149</sup>, assim como em modelos de edição gênica para a avaliação de mecanismos de resgate à resistência adquirida decorrente do tratamento com vemurafenibe<sup>84</sup>. No presente estudo, os resultados obtidos no modelo 2D foram validados na cultura organotípica da pele, reconstruída em associação com as linhagens celulares UACC-62 e WM164. Os efeitos antitumorais do KD de MCT1 e do tratamento com 3-BP puderam ser observados no modelo 3D, assim como o aumento da agressividade da linhagem WM164 MCT1 KD, que apresentou maior capacidade de invasão em relação à linhagem WM164 controle, como previamente observado no modelo 2D.

O aumento significativo dos vários parâmetros de agressividade, observados na linhagem WM164 após o silenciamento de MCT1, com ênfase no aumento da expressão proteica de MCT4 e GLUT1, trouxe a necessidade de uma caracterização metabólica mais sofisticada e ampla. Com base nos resultados encontrados, realizou-se, então, a caracterização da expressão de um amplo painel de genes relacionados a vias metabólicas distintas, visando identificar mecanismos metabólicos compensatórios que pudessem estar alterados devido ao KD de MCT1, tanto na linhagem WM164, como na linhagem UACC-62. Apesar de a linhagem UACC-62 não apresentar aumento de agressividade após o silenciamento de MCT1 na caracterização funcional realizada, observou-se um desvio da via glicolítica para a via da glutamina no perfil gênico investigado. Sabe-se que inúmeros tumores apresentam adição pela via da glutamina, incluindo os melanomas (revisado em<sup>150</sup>). A glutamina

é utilizada principalmente como um substrato doador do nitrogênio (biossíntese de nucleotídeos) ou carbono (biossíntese de ácidos graxos), alimentando o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e participando, ainda, como molécula precursora na biossíntese de aminoácidos, como o glutamato, aspartato, prolina e asparagina<sup>151, 152</sup>. Devido à sua tamanha versatilidade, assim como a glicose, a glutamina é mais uma fonte de energia e de intermediários que potencializam a sinalização celular para promoção do crescimento e proliferação<sup>152</sup>. A alta expressão de *TIGAR* e *PDK4* observada na linhagem UACC-62 MCT1 KD, sugere o bloqueio do metabolismo glicolítico independente do TCA<sup>20, 153</sup>, e, concomitantemente, a elevada expressão de genes relacionados ao transporte da glutamina (*SLC1A5* e *SLC38A2*), transporte de aminoácidos (*GLS*, *SLC1A5*, *SLC7A5*, *SLC7A11*, *SLC38A2*) e na biossíntese dos ácidos graxos (*PRKAB1* e *PRKAB2*) demonstra uma alteração metabólica para maior utilização da glutamina. Adicionalmente, a glutamina também atua como uma molécula de sinalização, estimulando a via mTOR<sup>154</sup>, o que sugere mais um indício de adição à glutamina pela linhagem UACC-62 após o silenciamento de MCT1, principalmente devido ao aumento da expressão de genes reguladores da via de mTOR, como *AKT3* e *RPTOR*, observada. Sendo assim, abrem-se possibilidades de terapias-alvo adicionais disponíveis para a inibição do metabolismo energético tumoral, com destaque para os inibidores da via da glutamina (revisto em<sup>151</sup>) e mTOR (revisto em<sup>155</sup>). Já para a linhagem WM164, observou-se que as características de agressividade encontradas podem estar relacionadas ao grupo de genes que apresentaram aumento de sua expressão após o silenciamento de MCT1. Dentre os genes superexpressos, destacam-se os genes *SLC16A3* (MCT4) e *SLC2A1* (GLUT1), importantes para a manutenção do metabolismo glicolítico e do efeito Warburg<sup>8</sup>. Com o KD de MCT1, observou-se uma regulação positiva de *SLC16A3*, sugerindo um mecanismo metabólico compensatório, como já descrito em outros modelos<sup>119-121</sup>. Adicionalmente, observou-se a superexpressão de genes envolvidos em diferentes processos celulares, em especial, aqueles relacionados à diferenciação celular e estímulo ao mecanismo da EMT (*FGRF1* e *PDGFA*), favorecendo assim o aumento do fenótipo de agressividade da linhagem. Durante a transição epitélio-mesênquima, as células epiteliais perdem junções célula-célula, além de sua polaridade basal-apical, reorganizando o seu citoesqueleto e alterando sua morfologia. Todo o processo se dá pela reprogramação de genes específicos e estímulo a fatores de crescimento, responsáveis pelo aumento da motilidade celular, favorecendo o fenótipo invasivo<sup>156</sup>. Os genes *FGFR1* e

*PDGFA*, diferencialmente expressos na linhagem WM164 MCT1 KD, têm sido descritos como genes regulatórios da EMT<sup>157-159</sup>, o que, por sua vez, sugere um mecanismo adicional, além da superexpressão de MCT4, que levou ao aumento dos parâmetros de agressividade observados nos ensaios funcionais de invasão celular e capacidade de formação de colônias da linhagem WM164 silenciada. Curiosamente, apesar do aumento na maioria dos parâmetros de agressividade da linhagem WM164 após o KD de MCT1, observou-se a redução de sua proliferação em relação à linhagem WM164 controle. Entretanto, ao avaliar a expressão dos genes relacionados ao metabolismo glicolítico, observou-se uma redução significativa da expressão de *EGF* e *EGFR*. A diminuição conjunta de EGF (fator de crescimento) e EGFR (receptor de EGF) tem um impacto importante na progressão do ciclo celular, e a sua inibição tem sido amplamente descrita na literatura, por reduzir um dos principais mecanismos de estímulo ao crescimento e proliferação das células tumorais (revisto em<sup>160</sup>). Sendo assim, o resultado de redução da proliferação celular encontrado na linhagem WM164 silenciada, pode, em parte, ser explicado pela redução conjunta da expressão de *EGF* e *EGFR* observada. Em relação aos resultados apresentados pela linhagem relacionados com a diminuição da morte celular, observou-se, ainda, uma diminuição significativa da expressão de *TP53* decorrente do silenciamento de MCT1, favorecendo a evasão à apoptose<sup>161</sup>, como observado nos ensaios realizados.

Por fim, buscou-se validar a elevada expressão de MCT4, decorrente do silenciamento de MCT1, como o mecanismo responsável pelo aumento do fenótipo maligno da linhagem WM164. O duplo silenciamento de MCT1 e MCT4 demonstrou reduzir características tumorais não observadas nos ensaios realizados com o KD de MCT1 isolado. Em estudo de Morais-Santos, o duplo silenciamento de MCT1/MCT4 na linhagem MDA-MB-468 foi capaz de reduzir processos celulares importantes como efluxo de lactato, proliferação, migração e invasão em condições de normóxia e hipóxia, além de impactar o crescimento tumoral no modelo *in vivo*<sup>116</sup>. Por fim, a redução da viabilidade, proliferação, efluxo de lactato, migração e invasão celular, obtidos com o duplo silenciamento de MCT1 e MCT4 na linhagem WM164, sugere a elevada expressão de MCT4 como um dos principais mecanismos envolvidos no fenótipo de maior agressividade associado ao silenciamento de MCT1. Nesse contexto, o inibidor de MCT1, desenvolvido pela *AstraZeneca* (AZD3965), tem apresentado resultados promissores em modelos pré-clínicos, além de boa tolerância nos ensaios de fase I realizados<sup>30, 31</sup>.

Entretanto, diferentes estudos têm demonstrado a resistência de tumores que possuem a co-expressão de MCT1 e MCT4 ao AZD3965, sendo a expressão de MCT4 preditiva de resistência à terapia com o inibidor de MCT1<sup>121, 162</sup>.

Em relação ao uso do 3-BP como um agente quimioterápico na oncologia clínica moderna, ainda existem obstáculos a serem ultrapassados, principalmente relacionados ao seu uso na forma bruta (não formulado), visto que o tratamento de pacientes humanos não apresenta os resultados promissores evidenciados nos ensaios pré-clínicos, tanto *in vitro*, com modelos de cultura 2D e 3D (esferoides), como *in vivo*, com modelos de xenoinxerto experimental em pequenos animais, como camundongos e ratos<sup>163, 164</sup>. Dentre as principais adversidades encontradas para o uso do 3-BP não formulado na prática clínica está a sua rápida ligação aos grupos tiol de proteínas séricas, como a glutatona (GSH), o que acaba por diminuir a sua eficácia e longevidade no organismo, visto que existem tumores ricos em GSH e, portanto, apresentam resistência intrínseca ao tratamento com o inibidor. Outra limitação para o seu uso clínico se dá pela sua incapacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, o que impactaria, principalmente, no tratamento de tumores primários do sistema nervoso central ou metástases que comumente acometem o sistema nervoso central. Entretanto, a associação do 3-BP a lipossomas, álcool perílico ou ainda ao polietilenoglicol, são hipóteses encontradas (revisto em<sup>165</sup>), que facilitariam o seu uso clínico, principalmente por favorecer a administração do fármaco, além de permitir uma adequada entrega e retenção do inibidor pelos tumores, ser passível de atravessar a barreira hematoencefálica, além de, em última instância, conferir maior longevidade do fármaco no organismo, mascarando-o dos grupos tiol e principalmente da GSH, superando-se a resistência intrínseca de tumores ricos em GSH. Ressalta-se, portanto, a importância de estudos envolvendo o uso racional do 3-BP (não formulado) em modelos pré-clínicos, que permitam a identificação dos desafios para a sua implementação na oncologia clínica, e forneçam soluções, como a sua conjugação a outras moléculas, com o intuito de se atingir todo o potencial e eficácia do inibidor no tratamento de diferentes tipos tumorais, principalmente aqueles que apresentam elevada expressão de MCT1.

Como limitações do estudo, destaca-se que o mecanismo de resistência ao 3-BP apresentado por linhagens que expressam o MCT1 não foi validado (SK-MEL-19 e WM793). Novos estudos avaliando a atividade da GSH intracelular em linhagens celulares com

expressão de MCT1 e expostas ao 3-BP são necessários. Outra limitação esbarra na não realização de todos os experimentos para a avaliação da morte celular da linhagem UACC-62, incluindo o modelo do duplo silenciamento de MCT1 e MCT4 na linhagem WM164. Ainda, a não realização de ensaios *in vivo* também impacta a evolução e validação de todos os resultados aqui apresentados. Como perspectivas, espera-se finalizar os ensaios de morte celular; realizar a avaliação do MCT1 como alvo terapêutico e mediador de resposta ao 3-BP no modelo *in vivo*; além de avaliar a expressão de diferentes marcadores de proliferação, invasão e morte em cortes histológicos do modelo de cultura organotípica da pele, visando a melhor compreensão e completude dos mecanismos envolvidos nas condições analisadas.



## 9 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste estudo e de acordo com os objetivos propostos, conclui-se que os melanomas possuem um perfil metabólico heterogêneo, com uma parcela significativa dos tumores apresentando uma dependência da via glicolítica e do efeito Warburg. Demonstrou-se ainda que os melanomas apresentam um perfil de resposta heterogêneo ao tratamento com 3-BP, sendo a expressão de MCT1 um marcador de resposta ao fármaco, visto que tumores com elevada expressão do transportador foram mais sensíveis ao rastreio de sensibilidade realizado. Destaca-se que o silenciamento de MCT1 impediu a ação do 3-BP em diferentes abordagens funcionais, caracterizando-o como o transportador chave para a sensibilidade de melanomas ao 3-BP. Adicionalmente, o MCT1 surge como um alvo terapêutico promissor em melanomas, visto que o seu silenciamento impactou características funcionais importantes, reduzindo o fenótipo maligno das células tumorais. Entretanto, deve-se levar em consideração todos os mecanismos metabólicos compensatórios originados a partir do silenciamento gênico do transportador, em especial de tumores que apresentam a co-expressão de MCT4, que está aqui descrito como um mecanismo envolvido no fenótipo de agressividade associado ao silenciamento de MCT1. Ressalta-se que os resultados obtidos no modelo 2D *in vitro* foram validados no modelo 3D, com a reconstrução da pele *in vitro*, demonstrando que o silenciamento de MCT1 ainda impactou o crescimento tumoral e impediu a ação do 3-BP, mesmo na presença de outros componentes do microambiente tumoral dos melanomas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warburg O, Wind F, Negelein E. *The Metabolism of Tumors in the Body*. **J Gen Physiol**. 1927;8(6):519-30.
2. Warburg O. *On the origin of cancer cells*. **Science**. 1956;123(3191):309-14.
3. Gatenby RA, Gillies RJ. *Why do cancers have high aerobic glycolysis?* **Nat Rev Cancer**. 2004;4(11):891-9.
4. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
5. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. *Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation*. **Science**. 2009;324(5930):1029-33.
6. Cheng Z, Ristow M. *Mitochondria and metabolic homeostasis*. **Antioxid Redox Signal**. 2013;19(3):240-2.
7. Shestov AA, Liu X, Ser Z, Cluntun AA, Hung YP, Huang L, et al. *Quantitative determinants of aerobic glycolysis identify flux through the enzyme GAPDH as a limiting step*. **Elife**. 2014;3.
8. Serpa J. *Tumor Microenvironment: The Main Driver of Metabolic Adaptation*. 1 ed. Serpa J, editor: **Springer International Publishing**; 2020. VII, 443 p.
9. Marchiq I, Pouyssegur J. *Hypoxia, cancer metabolism and the therapeutic benefit of targeting lactate/H(+) symporters*. **J Mol Med (Berl)**. 2016;94(2):155-71.
10. Renner K, Bruss C, Schnell A, Koehl G, Becker HM, Fante M, et al. *Restricting Glycolysis Preserves T Cell Effector Functions and Augments Checkpoint Therapy*. **Cell Reports**. 2019;29(1):135-50.e9.
11. Granja S, Pinheiro C, Reis RM, Martinho O, Baltazar F. *Glucose Addiction in Cancer Therapy: Advances and Drawbacks*. **Curr Drug Metab**. 2015;16(3):221-42.
12. Aide N, Lasnon C, Veit-Haibach P, Sera T, Sattler B, Boellaard R. *EANM/EARL harmonization strategies in PET quantification: from daily practice to multicentre oncological studies*. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 2017;44(Suppl 1):17-31.
13. Im HJ, Bradshaw T, Solaiyappan M, Cho SY. *Current Methods to Define Metabolic Tumor Volume in Positron Emission Tomography: Which One is Better?* **Nucl Med Mol Imaging**. 2018;52(1):5-15.
14. Pinheiro C, Morais-Santos F, Granja S, Miranda-Gonçalves V, Afonso J, Amorim R, et al. *Targeting Metabolic Reprogramming as an Anti-Cancer Strategy: Aiming at Monocarboxylate Transporters*. **Frontiers in Anti-Cancer Drug Discovery**. 2015;6:3.
15. Baltazar F, Pinheiro C, Morais-Santos F, Azevedo-Silva J, Queiros O, Preto A, et al. *Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response*. **Histol Histopathol**. 2014.
16. Lee JW, Ko J, Ju C, Eltzschig HK. *Hypoxia signaling in human diseases and therapeutic targets*. **Exp Mol Med**. 2019;51(6):1-13.

17. Al Tameemi W, Dale TP, Al-Jumaily RMK, Forsyth NR. *Hypoxia-Modified Cancer Cell Metabolism*. **Front Cell Dev Biol**. 2019;7:4.
18. Dong Y, Tu R, Liu H, Qing G. *Regulation of cancer cell metabolism: oncogenic MYC in the driver's seat*. **Signal Transduct Target Ther**. 2020;5(1):124.
19. Morrish F, Neretti N, Sedivy JM, Hockenbery DM. *The oncogene c-Myc coordinates regulation of metabolic networks to enable rapid cell cycle entry*. **Cell Cycle**. 2008;7(8):1054-66.
20. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, et al. *TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis*. **Cell**. 2006;126(1):107-20.
21. Szablewski L. *Expression of glucose transporters in cancers*. **Biochim Biophys Acta**. 2013;1835(2):164-9.
22. Halestrap AP. *The SLC16 gene family - Structure, role and regulation in health and disease*. **Mol Aspects Med**. 2013;34(2-3):337-49.
23. Payen VL, Mina E, Van Hee VF, Porporato PE, Sonveaux P. *Monocarboxylate transporters in cancer*. **Mol Metab**. 2020;33:48-66.
24. Chiche J, Ilc K, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. *Membrane-bound carbonic anhydrases are key pH regulators controlling tumor growth and cell migration*. **Adv Enzyme Regul**. 2010;50(1):20-33.
25. Becker HM. *Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer*. **Br J Cancer**. 2020;122(2):157-67.
26. Pinheiro C, Longatto-Filho A, Simoes K, Jacob CE, Bresciani CJ, Zilberstein B, et al. *The prognostic value of CD147/EMMPRIN is associated with monocarboxylate transporter 1 co-expression in gastric cancer*. **Eur J Cancer**. 2009;45(13):2418-24.
27. Slomiany MG, Grass GD, Robertson AD, Yang XY, Maria BL, Beeson C, et al. *Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells*. **Cancer Res**. 2009;69(4):1293-301.
28. 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.
29. Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. *Lactate: a metabolic key player in cancer*. **Cancer Res**. 2011;71(22):6921-5.
30. Halford SER, Jones P, Wedge S, Hirschberg S, Katugampola S, Veal G, et al. *A first-in-human first-in-class (FIC) trial of the monocarboxylate transporter 1 (MCT1) inhibitor AZD3965 in patients with advanced solid tumours*. 2017;35(15\_suppl):2516-.
31. Puri S, Juvale K. *Monocarboxylate transporter 1 and 4 inhibitors as potential therapeutics for treating solid tumours: A review with structure-activity relationship insights*. **Eur J Med Chem**. 2020;199:112393.

32. Azevedo-Silva J, Queiros O, Baltazar F, Ulaszewski S, Goffeau A, Ko YH, et al. *The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside.* **J Bioenerg Biomembr.** 2016;48(4):349-62.
33. Birsoy K, Wang T, Possemato R, Yilmaz OH, Koch CE, Chen WW, et al. *MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors.* **Nat Genet.** 2013;45(1):104-8.
34. Calvino E, Estan MC, Sanchez-Martin C, Brea R, de Blas E, Boyano-Adanez Mdel C, et al. *Regulation of death induction and chemosensitizing action of 3-bromopyruvate in myeloid leukemia cells: energy depletion, oxidative stress, and protein kinase activity modulation.* **J Pharmacol Exp Ther.** 2014;348(2):324-35.
35. Porporato PE, Dhup S, Dadhich RK, Copetti T, Sonveaux P. *Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review.* **Front Pharmacol.** 2011;2:49.
36. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. *Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy.* **Semin Cancer Biol.** 2009;19(1):17-24.
37. Vander Heiden MG. *Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens.* **Nat Rev Drug Discov.** 2011;10(9):671-84.
38. Shoshan MC. *3-Bromopyruvate: targets and outcomes.* **J Bioenerg Biomembr.** 2012;44(1):7-15.
39. Ehrke E, Arend C, Dringen R. *3-bromopyruvate inhibits glycolysis, depletes cellular glutathione, and compromises the viability of cultured primary rat astrocytes.* **J Neurosci Res.** 2015;93(7):1138-46.
40. Pereira da Silva AP, El-Bacha T, Kyaw N, dos Santos RS, da-Silva WS, Almeida FC, et al. *Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate.* **Biochem J.** 2009;417(3):717-26.
41. Krasnov GS, Dmitriev AA, Snezhkina AV, Kudryavtseva AV. *Deregulation of glycolysis in cancer: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a therapeutic target.* **Expert Opin Ther Targets.** 2013;17(6):681-93.
42. Zhang JY, Zhang F, Hong CQ, Giuliano AE, Cui XJ, Zhou GJ, et al. *Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells.* **Cancer Biol Med.** 2015;12(1):10-22.
43. Ganapathy-Kanniappan S, Kunjithapatham R, Geschwind JF. *Anticancer efficacy of the metabolic blocker 3-bromopyruvate: specific molecular targeting.* **Anticancer Res.** 2013;33(1):13-20.
44. Nakano A, Tsuji D, Miki H, Cui Q, El Sayed SM, Ikegame A, et al. *Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells.* **PLoS One.** 2011;6(11):e27222.
45. Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, et al. *Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia.* **Cancer Res.** 2005;65(2):613-21.

46. Cao X, Bloomston M, Zhang T, Frankel WL, Jia G, Wang B, et al. *Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor.* **Clin Cancer Res.** 2008;14(6):1831-9.
47. Ko YH, Smith BL, Wang Y, Pomper MG, Rini DA, Torbenson MS, et al. *Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP.* **Biochem Biophys Res Commun.** 2004;324(1):269-75.
48. Zhou Y, Tozzi F, Chen J, Fan F, Xia L, Wang J, et al. *Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells.* **Cancer Res.** 2012;72(1):304-14.
49. Ko YH, Verhoeven HA, Lee MJ, Corbin DJ, Vogl TJ, Pedersen PL. *A translational study "case report" on the small molecule "energy blocker" 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: from bench side to bedside.* **J Bioenerg Biomembr.** 2012;44(1):163-70.
50. Merlino G, Herlyn M, Fisher DE, Bastian BC, Flaherty KT, Davies MA, et al. *The state of melanoma: challenges and opportunities.* **Pigment Cell Melanoma Res.** 2016;29(4):404-16.
51. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, et al. *International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk?* **Int J Cancer.** 2013;132(2):385-400.
52. 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.
53. INCA. *Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil.* [Internet] Rio de Janeiro INCA; 2019 [cited 24 Feb]; Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>.
54. Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. *Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond.* **Nat Rev Cancer.** 2014;14(7):455-67.
55. 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.
56. 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.
57. Bollag G, Hirth P, Tsai J, Zhang J, Ibrahim PN, Cho H, et al. *Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma.* **Nature.** 2010;467(7315):596-9.
58. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. *Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation.* **Nature.** 2010;468(7326):973-7.
59. 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 cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K.* **Cancer Cell.** 2010;18(6):683-95.

60. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. *COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation*. **Nature**. 2010;468(7326):968-72.
61. Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, et al. *Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma*. **Cancer Res**. 2008;68(12):4853-61.
62. Chapman A, Fernandez del Ama L, Ferguson J, Kamarashev J, Wellbrock C, Hurlstone A. *Heterogeneous tumor subpopulations cooperate to drive invasion*. **Cell Rep**. 2014;8(3):688-95.
63. 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.
64. Hersey P, Watts RN, Zhang XD, Hackett J. *Metabolic approaches to treatment of melanoma*. **Clin Cancer Res**. 2009;15(21):6490-4.
65. Abildgaard C, Guldberg P. *Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma*. **Trends Mol Med**. 2015;21(3):164-71.
66. Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, et al. *Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF*. **Cancer Cell**. 2013;23(3):302-15.
67. Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girnun G, Pierce K, et al. *PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress*. **Cancer Cell**. 2013;23(3):287-301.
68. 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.
69. Hosseini M, Kasraian Z, Rezvani HR. *Energy metabolism in skin cancers: A therapeutic perspective*. **Biochim Biophys Acta Bioenerg**. 2017;1858(8):712-22.
70. Petrova V, Arkhypov I, Weber R, Groth C, Altevogt P, Utikal J, et al. *Modern Aspects of Immunotherapy with Checkpoint Inhibitors in Melanoma*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(7).
71. Tan S, Li D, Zhu X. *Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond*. **Biomed Pharmacother**. 2020;124:109821.
72. Olbryt M, Rajczykowski M, Widlak W. *Biological Factors behind Melanoma Response to Immune Checkpoint Inhibitors*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(11).
73. Tasdogan A, Faubert B, Ramesh V, Ubellacker JM, Shen B, Solmonson A, et al. *Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential*. **Nature**. 2020;577(7788):115-20.
74. Qin JZ, Xin H, Nickoloff BJ. *3-Bromopyruvate induces necrotic cell death in sensitive melanoma cell lines*. **Biochem Biophys Res Commun**. 2010;396(2):495-500.

75. El Sayed SM, Mohamed WG, Seddik MA, Ahmed AS, Mahmoud AG, Amer WH, et al. *Safety and outcome of treatment of metastatic melanoma using 3-bromopyruvate: a concise literature review and case study.* **Chin J Cancer.** 2014;33(7):356-64.
76. 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.
77. 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.
78. Cancer Genome Atlas N. *Genomic Classification of Cutaneous Melanoma.* **Cell.** 2015;161(7):1681-96.
79. Queiros O, Preto A, Pacheco A, Pinheiro C, Azevedo-Silva J, Moreira R, et al. *Butyrate activates the monocarboxylate transporter MCT4 expression in breast cancer cells and enhances the antitumor activity of 3-bromopyruvate.* **J Bioenerg Biomembr.** 2012;44(1):141-53.
80. Miranda-Goncalves V, Bezerra F, Costa-Almeida R, Freitas-Cunha M, Soares R, Martinho O, et al. *Monocarboxylate transporter 1 is a key player in glioma-endothelial cell crosstalk.* **Mol Carcinog.** 2017;56(12):2630-42.
81. Morais-Santos F, Miranda-Goncalves 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.
82. Miranda-Goncalves 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.
83. Geissmann Q. *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects.* **PLoS One.** 2013;8(2):e54072.
84. Faiao-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, Sandri S, Vicente AL, Scapulatempo-Neto C, et al. *Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells.* **Oncogene.** 2017;36(13):1849-61.
85. Hicks SC, Irizarry RA. *quantro: a data-driven approach to guide the choice of an appropriate normalization method.* **Genome Biol.** 2015;16:117.
86. 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.
87. Gu Z, Eils R, Schlesner M. *Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data.* **Bioinformatics.** 2016;32(18):2847-9.
88. Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, et al. *STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets.* **Nucleic Acids Res.** 2019;47(D1):D607-D13.

89. 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.
90. Pinheiro C, Miranda-Goncalves V, Longatto-Filho A, Vicente AL, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, et al. *The metabolic microenvironment of melanomas: Prognostic value of MCT1 and MCT4.* **Cell Cycle.** 2016;15(11):1462-70.
91. Sanchez JN, Wang T, Cohen MS. *BRAF and MEK Inhibitors: Use and Resistance in BRAF-Mutated Cancers.* **Drugs.** 2018;78(5):549-66.
92. Anderson S, Bloom KJ, Vallera 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.* **Arch Pathol Lab Med.** 2012;136(11):1385-91.
93. 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.
94. Hugdahl E, Kalvenes MB, Puntervoll HE, Ladstein RG, Akslen LA. *BRAF-V600E expression in primary nodular melanoma is associated with aggressive tumour features and reduced survival.* **Br J Cancer.** 2016;114(7):801-8.
95. Barbour AP, Tang YH, Armour N, Dutton-Regester K, Krause L, Loffler KA, et al. *BRAF mutation status is an independent prognostic factor for resected stage IIIB and IIIC melanoma: implications for melanoma staging and adjuvant therapy.* **Eur J Cancer.** 2014;50(15):2668-76.
96. Long GV, Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. *Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma.* **J Clin Oncol.** 2011;29(10):1239-46.
97. Kroemer G, Pouyssegur J. *Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel.* **Cancer Cell.** 2008;13(6):472-82.
98. van Elsas A, Zerp SF, van der Flier S, Kruse KM, Aarnoudse C, Hayward NK, et al. *Relevance of ultraviolet-induced N-ras oncogene point mutations in development of primary human cutaneous melanoma.* **Am J Pathol.** 1996;149(3):883-93.
99. Vinagre J, Almeida A, Populo H, Batista R, Lyra J, Pinto V, et al. *Frequency of TERT promoter mutations in human cancers.* **Nat Commun.** 2013;4:2185.
100. 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.
101. 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.



102. Choi YK, Park KG. *Targeting Glutamine Metabolism for Cancer Treatment*. **Biomol Ther (Seoul)**. 2018;26(1):19-28.
103. Azevedo-Silva J, Queiros O, Ribeiro A, Baltazar F, Young KH, Pedersen PL, et al. *The cytotoxicity of 3-bromopyruvate in breast cancer cells depends on extracellular pH*. **Biochem J**. 2015;467(2):247-58.
104. Pereira-Vieira J, Azevedo-Silva J, Preto A, Casal M, Queiros O. *MCT1, MCT4 and CD147 expression and 3-bromopyruvate toxicity in colorectal cancer cells are modulated by the extracellular conditions*. **Biol Chem**. 2019;400(6):787-99.
105. Sprowl-Tanio S, Habowski AN, Pate KT, McQuade MM, Wang K, Edwards RA, et al. *Lactate/pyruvate transporter MCT-1 is a direct Wnt target that confers sensitivity to 3-bromopyruvate in colon cancer*. **Cancer Metab**. 2016;4:20.
106. Attia YM, El-Abhar HS, Al Marzabani MM, Shouman SA. *Targeting glycolysis by 3-bromopyruvate improves tamoxifen cytotoxicity of breast cancer cell lines*. **BMC Cancer**. 2015;15:838.
107. Gan L, Xiu R, Ren P, Yue M, Su H, Guo G, et al. *Metabolic targeting of oncogene MYC by selective activation of the proton-coupled monocarboxylate family of transporters*. **Oncogene**. 2016;35(23):3037-48.
108. Ho N, Morrison J, Silva A, Coomber BL. *The effect of 3-bromopyruvate on human colorectal cancer cells is dependent on glucose concentration but not hexokinase II expression*. **Biosci Rep**. 2016;36(1):e00299.
109. Ideno M, Sasaki S, Kobayashi M, Futagi Y, Narumi K, Iseki K. *Influence of high glucose state on bromopyruvate-induced cytotoxicity by human colon cancer cell lines*. **Drug Metab Pharmacokinet**. 2016;31(1):67-72.
110. Isayev O, Rausch V, Bauer N, Liu L, Fan P, Zhang Y, et al. *Inhibition of glucose turnover by 3-bromopyruvate counteracts pancreatic cancer stem cell features and sensitizes cells to gemcitabine*. **Oncotarget**. 2014;5(13):5177-89.
111. Chen TC, Yu J, Nouri Nigjeh E, Wang W, Myint PT, Zandi E, et al. *A perillyl alcohol-conjugated analog of 3-bromopyruvate without cellular uptake dependency on monocarboxylate transporter 1 and with activity in 3-BP-resistant tumor cells*. **Cancer Lett**. 2017;400:161-74.
112. El Sayed SM, Baghdadi H, Zolaly M, Almaramhy HH, Ayat M, Donki JG. *The promising anticancer drug 3-bromopyruvate is metabolized through glutathione conjugation which affects chemoresistance and clinical practice: An evidence-based view*. **Med Hypotheses**. 2017;100:67-77.
113. Lee M, Jo A, Lee S, Kim JB, Chang Y, Nam JY, et al. *3-bromopyruvate and buthionine sulfoximine effectively kill anoikis-resistant hepatocellular carcinoma cells*. **PLoS One**. 2017;12(3):e0174271.
114. Amorim R, Pinheiro C, Miranda-Goncalves V, Pereira H, Moyer MP, Preto A, et al. *Monocarboxylate transport inhibition potentiates the cytotoxic effect of 5-fluorouracil in colorectal cancer cells*. **Cancer Lett**. 2015;365(1):68-78.

115. Miranda-Goncalves V, Granja S, Martinho O, Honavar M, Pojo M, Costa BM, et al. *Hypoxia-mediated upregulation of MCT1 expression supports the glycolytic phenotype of glioblastomas*. **Oncotarget**. 2016;7(29):46335-53.
116. Morais-Santos F, Granja S, Miranda-Goncalves V, Moreira AH, Queiros S, Vilaca JL, et al. *Targeting lactate transport suppresses in vivo breast tumour growth*. **Oncotarget**. 2015;6(22):19177-89.
117. Payen VL, Hsu MY, Radecke KS, Wyart E, Vazeille T, Bouzin C, et al. *Monocarboxylate Transporter MCT1 Promotes Tumor Metastasis Independently of Its Activity as a Lactate Transporter*. **Cancer Res**. 2017;77(20):5591-601.
118. Zhang G, Zhang Y, Dong D, Wang F, Ma X, Guan F, et al. *MCT1 regulates aggressive and metabolic phenotypes in bladder cancer*. **J Cancer**. 2018;9(14):2492-501.
119. Khan A, Valli E, Lam H, Scott DA, Murray J, Hanssen KM, et al. *Targeting metabolic activity in high-risk neuroblastoma through Monocarboxylate Transporter 1 (MCT1) inhibition*. **Oncogene**. 2020;39(17):3555-70.
120. Quanz M, Bender E, Kopitz C, Grunewald S, Schlicker A, Schwede W, et al. *Preclinical Efficacy of the Novel Monocarboxylate Transporter 1 Inhibitor BAY-8002 and Associated Markers of Resistance*. **Mol Cancer Ther**. 2018;17(11):2285-96.
121. Polanski R, Hodgkinson CL, Fusi A, Nonaka D, Priest L, Kelly P, et al. *Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor AZD3965 in small cell lung cancer*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(4):926-37.
122. Chen Z, Zhang H, Lu W, Huang P. *Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate*. **Biochim Biophys Acta**. 2009;1787(5):553-60.
123. Parks SK, Chiche J, Pouyssegur J. *Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy*. **Nat Rev Cancer**. 2013;13(9):611-23.
124. Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. *Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase*. **Cancer Lett**. 2001;173(1):83-91.
125. Andrzejewski S, Gravel SP, Pollak M, St-Pierre J. *Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics*. **Cancer Metab**. 2014;2:12.
126. Griss T, Vincent EE, Egnatchik R, Chen J, Ma EH, Faubert B, et al. *Metformin Antagonizes Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mitochondrial-Dependent Biosynthesis*. **PLoS Biol**. 2015;13(12):e1002309.
127. Andrzejewski S, Siegel PM, St-Pierre J. *Metabolic Profiles Associated With Metformin Efficacy in Cancer*. **Front Endocrinol (Lausanne)**. 2018;9:372.
128. Ihlund LS, Hernlund E, Khan O, Shoshan MC. *3-Bromopyruvate as inhibitor of tumour cell energy metabolism and chemopotentiator of platinum drugs*. **Mol Oncol**. 2008;2(1):94-101.

129. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. *Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria*. **Oncogene**. 2006;25(34):4777-86.
130. Xintaropoulou C, Ward C, Wise A, Marston H, Turnbull A, Langdon SP. *A comparative analysis of inhibitors of the glycolysis pathway in breast and ovarian cancer cell line models*. **Oncotarget**. 2015;6(28):25677-95.
131. Marrache S, Dhar S. *The energy blocker inside the power house: Mitochondria targeted delivery of 3-bromopyruvate*. **Chem Sci**. 2015;6(3):1832-45.
132. Valenti D, Vacca RA, de Bari L. *3-Bromopyruvate induces rapid human prostate cancer cell death by affecting cell energy metabolism, GSH pool and the glyoxalase system*. **J Bioenerg Biomembr**. 2015;47(6):493-506.
133. Chapiro J, Sur S, Savic LJ, Ganapathy-Kanniappan S, Reyes J, Duran R, et al. *Systemic delivery of microencapsulated 3-bromopyruvate for the therapy of pancreatic cancer*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(24):6406-17.
134. Nilsson H, Lindgren D, Mandahl Forsberg A, Mulder H, Axelson H, Johansson ME. *Primary clear cell renal carcinoma cells display minimal mitochondrial respiratory capacity resulting in pronounced sensitivity to glycolytic inhibition by 3-Bromopyruvate*. **Cell Death Dis**. 2015;6:e1585.
135. Zhang Q, Pan J, Lubet RA, Komasa SM, Kalyanaraman B, Wang Y, et al. *Enhanced antitumor activity of 3-bromopyruvate in combination with rapamycin in vivo and in vitro*. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2015;8(4):318-26.
136. Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A, VanderWeele DJ, Rudin CM, Broekhuis MJ, et al. *Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells*. **Blood**. 2009;113(9):2014-21.
137. Majkowska-Skrobek G, Augustyniak D, Lis P, Bartkowiak A, Gonchar M, Ko YH, et al. *Killing multiple myeloma cells with the small molecule 3-bromopyruvate: implications for therapy*. **Anticancer Drugs**. 2014;25(6):673-82.
138. Liu Z, Sun Y, Hong H, Zhao S, Zou X, Ma R, et al. *3-bromopyruvate enhanced daunorubicin-induced cytotoxicity involved in monocarboxylate transporter 1 in breast cancer cells*. **Am J Cancer Res**. 2015;5(9):2673-85.
139. Sheng Y, Jiang Q, Dong X, Liu J, Liu L, Wang H, et al. *3-Bromopyruvate inhibits the malignant phenotype of malignantly transformed macrophages and dendritic cells induced by glioma stem cells in the glioma microenvironment via miR-449a/MCT1*. **Biomed Pharmacother**. 2020;121:109610.
140. Cardaci S, Rizza S, Filomeni G, Bernardini R, Bertocchi F, Mattei M, et al. *Glutamine deprivation enhances antitumor activity of 3-bromopyruvate through the stabilization of monocarboxylate transporter-1*. **Cancer Res**. 2012;72(17):4526-36.
141. Lopes-Coelho F, Nunes C, Gouveia-Fernandes S, Rosas R, Silva F, Gameiro P, et al. *Monocarboxylate transporter 1 (MCT1), a tool to stratify acute myeloid leukemia (AML) patients and a vehicle to kill cancer cells*. **Oncotarget**. 2017;8(47):82803-23.

142. Brohem CA, Cardeal LB, Tiago M, Soengas MS, Barros SB, Maria-Engler SS. *Artificial skin in perspective: concepts and applications*. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2011;24(1):35-50.
143. Chioni AM, Grose R. *Organotypic modelling as a means of investigating epithelial-stromal interactions during tumourigenesis*. **Fibrogenesis Tissue Repair.** 2008;1(1):8.
144. Berking C, Herlyn M. *Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology*. **Histol Histopathol.** 2001;16(2):669-74.
145. Smalley KS, Lioni M, Herlyn M. *Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension*. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 2006;42(8-9):242-7.
146. Haass NK, Smalley KS, Li L, Herlyn M. *Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma*. **Pigment Cell Res.** 2005;18(3):150-9.
147. Brohem CA, Massaro RR, Tiago M, Marinho CE, Jasiulionis MG, de Almeida RL, et al. *Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death*. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2012;25(3):354-69.
148. Massaro RR, Faiao-Flores F, Rebecca VW, Sandri S, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, et al. *Inhibition of proliferation and invasion in 2D and 3D models by 2-methoxyestradiol in human melanoma cells*. **Pharmacol Res.** 2017;119:242-50.
149. Sandri S, Watanabe LRM, Oliveira EA, Faiao-Flores F, Migliorini S, Tiago M, et al. *Indoleamine 2,3-dioxygenase in melanoma progression and BRAF inhibitor resistance*. **Pharmacol Res.** 2020;159:104998.
150. Filipp FV, Ratnikov B, De Ingeniis J, Smith JW, Osterman AL, Scott DA. *Glutamine-fueled mitochondrial metabolism is decoupled from glycolysis in melanoma*. **Pigment Cell Melanoma Res.** 2012;25(6):732-9.
151. Wang Z, Liu F, Fan N, Zhou C, Li D, Macvicar T, et al. *Targeting Glutaminolysis: New Perspectives to Understand Cancer Development and Novel Strategies for Potential Target Therapies*. **Front Oncol.** 2020;10:589508.
152. Zhang J, Pavlova NN, Thompson CB. *Cancer cell metabolism: the essential role of the nonessential amino acid, glutamine*. **EMBO J.** 2017;36(10):1302-15.
153. Kaplon J, Zheng L, Meissl K, Chaneton B, Selivanov VA, Mackay G, et al. *A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence*. **Nature.** 2013;498(7452):109-12.
154. Duran RV, Oppliger W, Robitaille AM, Heiserich L, Skendaj R, Gottlieb E, et al. *Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling*. **Mol Cell.** 2012;47(3):349-58.
155. Magaway C, Kim E, Jacinto E. *Targeting mTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations*. **Cells.** 2019;8(12).

156. Lamouille S, Xu J, Derynck R. *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2014;15(3):178-96.
157. Hu Y, Feng X, Mintz A, Petty WJ, Hsu W. *Regulation of brachyury by fibroblast growth factor receptor 1 in lung cancer*. **Oncotarget**. 2016;7(52):87124-35.
158. Kong D, Wang Z, Sarkar SH, Li Y, Banerjee S, Saliganan A, et al. *Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cancer cells*. **Stem Cells**. 2008;26(6):1425-35.
159. Yang L, Lin C, Liu ZR. *P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin*. **Cell**. 2006;127(1):139-55.
160. Wee P, Wang Z. *Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways*. **Cancers (Basel)**. 2017;9(5).
161. Mantovani F, Collavin L, Del Sal G. *Mutant p53 as a guardian of the cancer cell*. **Cell Death Differ**. 2019;26(2):199-212.
162. Belouèche-Babari M, Wantuch S, Casals Galobart T, Koniordou M, Parkes HG, Arunan V, et al. *MCT1 Inhibitor AZD3965 Increases Mitochondrial Metabolism, Facilitating Combination Therapy and Noninvasive Magnetic Resonance Spectroscopy*. **Cancer Res**. 2017;77(21):5913-24.
163. El Sayed SM, El-Magd RM, Shishido Y, Chung SP, Diem TH, Sakai T, et al. *3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects*. **J Bioenerg Biomembr**. 2012;44(1):61-79.
164. El Sayed SM, El-Magd RM, Shishido Y, Yorita K, Chung SP, Tran DH, et al. *D-Amino acid oxidase-induced oxidative stress, 3-bromopyruvate and citrate inhibit angiogenesis, exhibiting potent anticancer effects*. **J Bioenerg Biomembr**. 2012;44(5):513-23.
165. El Sayed SM. *Enhancing anticancer effects, decreasing risks and solving practical problems facing 3-bromopyruvate in clinical oncology: 10 years of research experience*. **Int J Nanomedicine**. 2018;13:4699-709.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa Institucional.

**Comitê de Ética em Pesquisa**  
**Parecer *Ad Referendum***

Para: Céline Marques Pinheiro

De: Daniel Onofre Vidal  
*Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa*

Data: 30/06/2016

Projeto de pesquisa: **1166/2016**

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos recebeu o estudo intitulado “**O MCT1 como alvo terapêutico e mediador de resposta no tratamento de melanomas: estudos in vitro e in vivo.**”, o qual foi cadastrado sob o número **1166/2016**.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por utilizar linhagens celulares comerciais e não se tratar de pesquisa envolvendo seres humanos, não há necessidade de apreciação/aprovação do CEP.

Atenciosamente,

**Thiago Buosi Silva**  
*Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa*  
**Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos**