

PATRIK DA SILVA VITAL

**EFEITO DO 3-BROMOPIRUVATO EM CÉLULAS DE MELANOMA RESISTENTES AO
VEMURAFENIBE**

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Céline Marques
Pinheiro

Barretos, SP

2021

PATRIK DA SILVA VITAL

**EFEITO DO 3-BROMOPIRUVATO EM CÉLULAS DE MELANOMA RESISTENTES AO
VEMURAFENIBE**

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Céline Marques
Pinheiro

Barretos, SP

2021

V836e Vital, Patrik da Silva.

O efeito do 3-bromopiruvato em células de melanoma resistentes ao vemurafenibe. / Patrik da Silva Vital. - Barretos, SP - 2021.

80 f.; il.

Orientadora: Céline Marques Pinheiro.

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

1. Efeito Warburg em oncologia. 2. Melanoma. 3. Proteínas proto-oncogênicas B-raf. 4. Radicais livres. 5. Resistência a medicamentos. 6. Vemurafenibe. I. Autor. II. Título.

CDD 616.994 77

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Nayara Bernardo de Mattos CRB 8/10172
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos



HOSPITAL de
CÂNCER de
BARRETOS

INSTITUTO DE ENSINO & PESQUISA

Rua Antenor Duarte Villela, 1331
Bairro Dr. Paulo Prata
Barretos (SP), Brasil
CEP: 14.784-400
Telefone: +55 (17) 3321-6600

FOLHA DE APROVAÇÃO

Patrik da Silva Vital

Título: EFEITO DO 3-BROMOPIRUVATO EM CÉLULAS DE MELANOMA RESISTENTES AO VEMURAFENIBE

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

Data da aprovação: 19/10/2021

Banca Examinadora:

Dra. Alison Colquhoun

Instituição: Universidade de São Paulo.

Dra. Maria Fatima Monginho Baltazar

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade do Minho

Dra. Céline Marques Pinheiro

Orientador



www.hospitaldeamor.com.br



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 - Fluxo Contínuo (processo número 2015/25351-6) e Mestrado - Fluxo Contínuo (2019/14189-4).

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

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

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

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

*Dedico este trabalho a todos em que sobre os ombros me apoiei,
e àqueles que constroem o alicerce para quem um dia me tornarei...*

AGRADECIMENTOS

À **Profª. Drª. Céline Marques Pinheiro** por ter me acolhido durante estes dois anos de mestrado. Aos poucos que conhecem as minúcias desta jornada, sabem que não foram momentos fáceis. Mas, ainda assim, dada a simpatia e companheirismo desta pessoa, tudo ficou bem mais leve. É difícil encontrar quem saiba mensurar quando ser rígido ou flexível. Posso dizer com confiança que a Drª Céline sabe fazer isso. Passei por momentos de gargalhadas até lutas para entregar relatórios dentro do prazo, discussões ferrenhas até momentos de descontração... Tudo com a mais absoluta certeza que não estava sozinho, mesmo trabalhando em *home-office* em meio à pandemia que assolava o mundo. Cresci bastante nesse curto tempo. Se hoje posso me considerar alguém ao menos um pouco mais autônomo, crítico e determinado, devo tudo isso à Drª Céline.

A todos os **membros do Grupo de Pesquisa em Metabolismo e Microambiente Tumoral**. Às vezes penso que pessoas como a **Ayra Quinelato, Dr. Murilo Bonatelli, e Marina Pereira** foram simplesmente escolhidas a dedo para fazer tudo para que todo o “sistema” funcionasse. Com eles aprendi muito mais do que poderia imaginar. Passei por crises, frustrações e cansaço o qual me ajudaram a passar com a maestria de quem que sabe falar a coisa certa na hora certa. Claramente, como toda boa aventura, bons momentos escutando música, rindo dos outros (e de nós mesmos), jogando *Candy Crush Saga* e prosando sobre assuntos aleatórios serviram bem a contrabalancear toda a trama e fornecer boas recordações.

Aos membros das **minhas bancas de acompanhamento, qualificação e defesa, Profª. Drª Alisson Colquhoun, Profª. Drª. Maria de Fátima Monginho Baltazar e Prof. Dr. Vinicius de Lima Vazquez** por terem se disposto a doar um pouco do seu requisitado tempo para compartilhar de suas experiências. Sou bastante grato por todas sugestões de melhorias para este trabalho que, com a mais absoluta certeza, ganhou muito mais robustez baseado em suas preciosas críticas. Também agradeço pela paciência e determinação em ajudar em todo o meu desenvolvimento como aluno e com este projeto desde sua concepção.

A toda a equipe do **Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP)**, os quais incluem o **Dr. Rui Manuel Vieira Reis**, pela oportunidade e por disponibilizar todos os recursos necessários para que pudesse realizar tudo o que fosse proposto; **Dorion Denardi, Laura Cardoso, Ludimilla da Silva e Maria A. Dias** e toda a equipe do **Escritório de projetos e inovação tecnológica (EPIT)**, por toda a alegria, paciência para prover orientações e disposição em ajudar nos temas burocráticos que tive que enfrentar; os pesquisadores **Dr. Lídia Rebolho, Dr^a Mariana Tomazini, Dr. Renato Oliveira, Dr^a Silvia Teixeira**, pelo companheirismo, dicas, ensinamentos e parcerias construídas no decorrer desta jornada; e, em especial os atuais biólogos, **Karina Mello, Dr^a Carolina Laus, Dr^a Izabela Faria, Letícia Braga e Dr^a Marcela Nunes**, bem como ao **André Lengert** por sempre estarem dispostos a ajudar, oferecendo suporte, orientação, e me dando preciosas lições de vida que vou carregar comigo para todo o sempre.

A todos os amigos que passaram pelo CPOM **Adeylson Ribeiro, Aline Larissa, Aline Lourenço, Aline Rocha, Ana Laura Alves, Ana Rúbia, Ângela Neves, Ariane Pereira, Bruna Duarte, Bruna Sorroche, Cíntia Niederauer, Daniel Aquilino, Daniel Moreno, Diego Luis, Eduardo Cabral, Elisa Messias, Flávia Nascimento, Giovanna Casagrande, Giovanna Zanata, Helder Freitas, Guilherme Datorre, Janaína Galvão, Kercy de Sena, Keila Miranda, Lorryne Ramos, Lucas Bravo, Luciane Sussuchi, Luisa Santos, Luiza Veiga, Rhafaela Causin, Renan Teixeira, Talita Pereira, Thais Couto e Valdeci Júnior** por todos os momentos indescritíveis que passamos juntos, na festa do peão, Bloquim, festa de final de ano do hospital, festa junina, cuidando de quem cuida, noites no Raimundinho, noites no bar da Brahma, noites em lugar nenhum, churrasquinhos, noite do cinema, etc... e por dividir o mesmo ambiente de trabalho que o meu. Obrigado por me fazerem me sentir em casa e por me tolerarem em meus dias bons e nos meus dias não tão bons assim. Obrigado por escutarem minhas bobagens. Obrigado pelo respeito. Obrigado pelos consolos, zoeiras, choros e dança.

Aos alunos intercambistas **Cristian Luna, Ivanna, Javier Ramos, Juan Carlos, Martin Lopez, Pedro Fernández e Vitória Zanluchi** que enriqueceram meu mestrado com momentos

incríveis (os quais ainda me recordo vivamente), pelas boas risadas, pela troca de conhecimento e pela visão de mundo que me proporcionaram no período que estiveram aqui.

Ao meu pai (Claudinei Antônio Vital), minha mãe (Neli Maria da Silva) e minha irmã (Patrícia da Silva Vital), pessoas que admiro e tenho como exemplo de vida. Durante o período em que estava longe da minha terra natal, eles me entenderam e me deram todo apoio do mundo que me motivou a levantar todo dia buscando algo melhor para mim e para eles. Quando uma pessoa tem uma boa estrutura, não há nada que a derrube. Sou muito grato por cada gota de suor que eles derramaram para fazer de mim quem eu sou hoje. Aprecio cada atitude que tomaram (algumas até comoventes) para me proteger e me permitir *vingar na vida*. Aprecio a cultura, valores e respeito que me deram e que me permitiram fazer coisas que achava que não era possível. Agradeço, por fim, por terem acreditado em mim, me permitindo ter autoconfiança para fazer coisas muito além do senso comum.

Por fim, gostaria de agradecer todos meus amigos que não estão presentes fisicamente, mas provaram que amizade verdadeira supera qualquer distância. Obrigado **Ademar Júnior, Bárbara Almeida, Ellen Del Puerto, Flávia Medeiros, Giovanna Carvalho, João Pedro Pacheco, Leonardo de Brito, Letícia Botelho, Lucas Azevedo, Marcelo Henrique, Matheus Nogueira, Priscilla Gil, Vinícius Tarabal e Thiago Araújo** por me receberem de braços abertos quando voltei para Divinópolis, por escutarem meus desabafos por telefone, por me suprirem com memes que me fizeram esquecer (ao menos momentaneamente) os meus problemas... Enfim, obrigado por serem meus amigos e por estarem presentes, mesmo que não presencialmente. Agradeço por serem meu porto seguro.

De maneira geral, gostaria de dizer que nada se constrói sozinho. No enredo que molda a personalidade e a carreira de um homem, grandes histórias ficam nos bastidores não aparecendo à público para serem aclamadas. Somente quem vivenciou momentos como os que vivi podem dizer o quão grato sou por estas e por tantas outras pessoas que melhoraram meu dia somente por me oferecerem um belo “bom dia” com um sorriso no rosto. Graças a estas pessoas que eu nunca esqueci que existe uma luz no fim do túnel, mesmo quando todos

pareciam dizer o contrário. Por estas pessoas que eu luto para dar o meu melhor todos os dias, mesmo quando parece que não existe mais força para isto...

Obrigado a **todos** por fazerem parte da minha história...

それがキャプテンだろ
That's your burden as Captain.

迷うな
Don't lose yourself!

お前がフラフラしてやがったら俺たちは誰を信じりゃいいんだよ
If you waver, then who are we supposed to believe in?

Eiichiro Oda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Melanoma	1
1.2	Metabolismo tumoral	3
1.3	3-Bromopiruvato	5
2	JUSTIFICATIVA	8
3	OBJETIVOS	9
3.1	Objetivo geral	9
3.2	Objetivos específicos	9
4	METODOLOGIA	10
4.1	Linhagens Celulares	10
4.2	Inibidores	10
4.3	Determinação da IC ₅₀ e IC ₂₅	11
4.4	Ensaio funcionais	11
4.4.1	Viabilidade celular	11
4.4.2	Proliferação celular	12
4.4.3	Morte celular	12
4.4.4	Migração celular	13

4.4.5 Invasão celular	13
4.4.6 Expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal	13
4.4.7 Formação de colônias	15
4.4.8 Quantificação de espécies reativas de oxigênio	16
4.5 Perfil metabólico	16
4.5.2 Quantificação da captação de glicose	17
4.5.3 Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo	17
4.6 Análise estatística	19
5 RESULTADOS	20
5.1 A375R e SKMEL28R apresentam perfis metabólicos distintos com diferentes sensibilidades ao 3BP	20
5.2 O 3BP reduz a divisão celular e induz a morte de linhagens de melanoma resistentes ao PLX	22
5.3 O 3BP diminui a migração/invasão de linhagens de melanoma resistentes ao PLX e inibe a expressão de marcadores de EMT	25
5.4 O 3BP modula o perfil metabólico e estimula a liberação de ROS em linhagens de melanoma resistentes ao PLX	29
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	41

REFERÊNCIAS

43

ANEXOS

53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Comparativo entre a via de sinalização MAPK/ERK com proteína BRAF normal e mutada.	2
Figura 2 -	Principais mecanismos de ação do 3BP sobre células tumorais.	6
Figura 3 -	Avaliação da expressão basal de proteínas relacionadas ao metabolismo tumoral nas linhagens A375R e SKMEL28R.	20
Figura 4 -	Avaliação do efeito do 3BP sobre a viabilidade das linhagens A375R e SKMEL28R.	21
Figura 5 -	Avaliação do efeito do 3BP sobre a proliferação das linhagens A375R e SKMEL28R.	22
Figura 6 -	Avaliação do efeito do 3BP sobre a capacidade de formação de colônias das linhagens A375R e SKMEL28R.	23
Figura 7 -	Avaliação do efeito do 3BP sobre a morte celular da linhagem A375R corada com anexina V e iodeto de propídio.	24
Figura 8 -	Avaliação do efeito do 3BP sobre a morte celular da linhagem SKMEL28R corada com anexina V e iodeto de propídio.	25
Figura 9 -	Avaliação do efeito do 3BP sobre a migração das linhagens A375R e SKMEL28R usando sistema <i>transwell</i> .	26
Figura 10 -	Avaliação do efeito do 3BP sobre a invasão das linhagens A375R e SKMEL28R usando sistema <i>transwell</i> .	27

Figura 11 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal na linhagem A375R.	28
Figura 12 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal na linhagem SKMEL28R.	29
Figura 13 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo tumoral na linhagem SKMEL28R.	30
Figura 14 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo tumoral na linhagem SKMEL28R.	30
Figura 15 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a variação de glicose extracelular nas linhagens A375R e SKMEL28R.	31
Figura 16 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a variação de lactato extracelular nas linhagens A375R e SKMEL28R.	32
Figura 17 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a captação de glicose nas linhagens A375R e SKMEL28R por meio da técnica de incorporação de 2NBDG.	33
Figura 18 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a liberação de espécies reativas de oxigênio nas linhagens A375R e SKMEL28R por meio da técnica de DHE.	34
Figura 19 - Esquema dos diferentes possíveis mecanismos de ação do 3BP sobre as linhagens A375R e SKMEL28R.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições e anticorpos utilizados no <i>western blot</i> de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal.	15
Tabela 2 - Condições e anticorpos utilizados no <i>western blot</i> de proteínas relacionadas ao metabolismo.	18
Tabela 3 - Valores de IC ₅₀ e IC ₂₅ das linhagens A375R e SKMEL28R após 24h e 48h tratamento com 3BP, na ausência e na presença de PLX.	21

LISTA DE ABREVIATURAS

α -KD	<i>α-ketoglutarate dehydrogenase</i>
2NBDG	2-(n-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)2-deoxiglicose
7AAD	7-Aminoactinomicina D
3BP	3-bromopiruvato
3PGK	<i>3-phosphoglycerate kinase</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACTB	Actina beta
AMPK	<i>Adenosine monophosphate - activated protein kinase</i>
ASCT2	<i>Alanine-serine-cysteine transporter 2</i>
ASMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CA9	<i>Carbonic anhydrase 9</i>
CD147	<i>Cluster of differentiation 147</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4</i>
DHE	Dihidroetídio
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>

EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ECAD	<i>E-caderina</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EMT	<i>Epithelial–mesenchymal transition</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G2/M	<i>Second growth / mitosis phase</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GLS	<i>Glutaminase</i>
GSH	<i>Glutathione + Hidrogen</i>
GLUD1/2	<i>Glutamate dehydrogenase 1/2</i>
GLUT1	<i>Glucose transporter 1</i>
HIF1A	<i>Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha</i>
HK2	<i>Hexokinase 2</i>
IC ₅₀	<i>Half-maximal inhibitory concentration</i>
IC ₂₅	<i>Quarter-maximal inhibitory concentration</i>
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LDH	<i>Lactate dehydrogenase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCT	<i>Monocarboxylate transporter</i>
MEK	<i>MAPK/ERK kinase</i>

NAD ⁺	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide + Hidrogen</i>
NCAD	<i>N-caderina</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
P/S	<i>Penicillin-streptomycin</i>
PD1	<i>Programmed cell death 1</i>
PDH	<i>Pyruvate dehydrogenase</i>
PDK	<i>Pyruvate dehydrogenase kinase</i>
PET	<i>Positron emission tomography</i>
PI	<i>Propidium iodide</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase</i>
SDH	<i>Succinate dehydrogenase</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SRB	<i>Sulforodamina B</i>
STR	<i>Short tandem repeat</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline tween</i>
TCA	<i>Tricarboxylic acid</i>
TGFB	<i>Transforming growth factor beta</i>
VIM	<i>Vimentina</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
λ_{ref}	Comprimento de onda de referência
C	Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
H	Hora
M	Molar
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
NaCl	Cloreto de sódio
O ₂ ⁻	Superóxido
n	Nano
m	Metro
RPM	Rotações por minuto
T ₀	Tempo 0 horas
T ₂₄	Tempo 24 horas
v	Volume
vs.	Versus
°	Graus
+	Adição, positivo
-	Subtração, negativo

x	Multiplicação
/	Razão
±	Erro padrão
≤	Menor ou igual a
%	Porcentagem
*	Nível de significância

RESUMO

Vital PS. Efeito do 3-bromopiruvato em células de melanoma resistentes ao vemurafenibe. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2022.

JUSTIFICATIVA: O manejo dos pacientes com melanoma tem evoluído graças ao melhor entendimento da heterogeneidade molecular destes tumores. Neste contexto, mutações em BRAF, frequentemente associadas à alta mortalidade, são um fator substancial para decisões terapêuticas. Terapias-alvo contra tumores BRAF-mutados, tais como o vemurafenibe (PLX), resultaram em uma melhora considerável na sobrevida geral de pacientes com melanoma. Entretanto, recidiva tumoral e baixas taxas de resposta ainda são um grande desafio mesmo para as alternativas terapêuticas atuais. Tumores altamente proliferativos frequentemente dependem da glicólise para sustentar o seu crescimento e divisão celular. O 3-bromopiruvato (3BP) é um inibidor glicolítico promissor contra tumores quimiorresistentes. **OBJETIVO:** Este projeto tem como objetivo avaliar o potencial do 3BP como agente antineoplásico em linhagens de melanoma resistentes ao PLX. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O efeito do 3BP, sozinho ou combinado com PLX, sobre a viabilidade, proliferação, formação de colônias, morte celular, migração, invasão, expressão de marcadores de transição epitélio mesenquimal e proteínas metabólicas, quantidade de glicose e lactato extracelular, e espécies reativas foi avaliado em duas linhagens de melanoma resistentes ao PLX. **RESULTADOS:** O tratamento com 3BP, mais eficaz em monoterapia do que em combinação com PLX, perturba metabolicamente as linhagens A375R e SKMEL28R, inibindo o seu potencial migratório e invasivo através da inibição de marcadores epitélio mesenquimal, prejudicando sua proliferação e desencadeando morte celular através de necrose e estresse oxidativo. **CONCLUSÃO:** Estes resultados apresentam a monoterapia com 3BP como uma forte perturbadora metabólica e agente oxidante em linhagens de melanomas resistentes à terapia anti-BRAF, contribuindo para a supressão deste tipo de neoplasia.

PALAVRAS-CHAVE: Efeito Warburg em oncologia; Melanoma; Metabolismo; Proteínas proto-oncogênicas B-raf; Radicais livres; Resistência a medicamentos; Vemurafenibe.

ABSTRACT

Vital PS. 3-bromopyruvate effect in vemurafenib-resistant melanoma cells. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2022.

BACKGROUND: The management of melanoma patients has evolved due to the better understanding of the molecular heterogeneity of these tumors. In this context, BRAF mutations are associated with high mortality and are a substantial factor for therapeutic decisions. Therapies targeting BRAF-mutated tumors, such as PLX, provided a considerable improvement in the overall survival of melanoma patients. However, patients' relapse and low response rates are still challenging even on contemporary therapeutic alternatives. Highly proliferative tumors often rely on glycolysis to sustain their proliferation and growth. 3BP is a glycolysis inhibitor promising against chemoresistant tumors. **AIM:** This project aimed to evaluate the potential of 3BP as an antineoplastic agent in PLX-resistant melanomas treatment. **MATERIAL AND METHODS:** 3BP effect, either alone or combined with PLX, on the viability, proliferation, colony formation potential, cell death, migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition markers and metabolic proteins expression, extracellular glucose and lactate, and reactive species was evaluated in two melanomas resistant to PLX. **RESULTS:** 3BP treatment, more effective as monotherapy than in combination with PLX, metabolically disturbs the A375R and SKMEL28R cell lines, inhibiting their migratory and invasive potential through epithelial-mesenchymal transition markers inhibition, impairing their proliferation, and triggering cell death through necrosis and oxidative stress. **CONCLUSION:** These results point at 3BP monotherapy as a potent metabolic disturbing and oxidative agent against anti-BRAF-resistant melanoma cell lines, contributing to the suppression of this type of neoplasia.

KEYWORDS: Drug resistance; Free radicals; Melanoma; Metabolism; Proto-oncogene proteins B-raf; Vemurafenib; Warburg effect, oncologic

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

O melanoma é a forma mais agressiva dentre os tipos de câncer de pele. Este tipo de neoplasia, que se desenvolve a partir dos melanócitos, pode ser encontrado na epiderme, mucosas, olhos ou sistema nervoso, e apresenta crescente incidência ao redor do globo^{1,2}. Mundialmente, foram registrados cerca de 350 mil novos casos, 54 mil deles culminando em morte, sendo mais afetados os países com alto índice de desenvolvimento humano, tais como Austrália, Nova Zelândia, América do Norte e países da Europa Ocidental^{3,4}. No Brasil, é estimado que, somente no ano de 2020, tenham sido registrados cerca de 8450 novos casos⁵, com aproximadamente 2250 mortes originadas por esta doença³.

Ainda que a identificação da lesão e sua ressecção cirúrgica sejam práticas mandatórias e sem intercorrências em estágios iniciais do melanoma, o diagnóstico em estágios avançados da doença frequentemente resulta em um prognóstico desfavorável que requer opções mais dispendiosas e complexas⁶. O diagnóstico detalhado com caracterização de possíveis variantes em genes *drivers* é uma etapa fundamental para decisões terapêuticas nestes casos⁷. Dentre os possíveis genes rastreados para tipificação de melanomas encontra-se o *BRAF* (*V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*). Variações neste gene são estimadas em aproximadamente metade dos pacientes de melanoma metastático, tornando-as dominantes no cenário mutacional para esta doença⁸. Similarmente, em amostras de melanoma exclusivamente brasileiras, *BRAF* também é um dos genes *drivers* mais frequentemente mutados, com 34,1% dos pacientes apresentando variações dos tipos V600E (89,7%), V600K (8,3%), V600M (1%), ou T599I (1%)⁹.

O produto da codificação de *BRAF*, a proteína BRAF serina/treonina quinase, desempenha seu papel primordialmente na via de sinalização MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*). Em decorrência disso, mutações em *BRAF*, que frequentemente resultam em uma maior atividade desta proteína, são capazes de gerar uma maior sobrevivência celular e taxa proliferativa, mesmo em ambientes carentes de fatores de crescimento (Figura 1)¹⁰. Por este motivo, pacientes *BRAF*-mutados geralmente apresentam pior prognóstico do que pacientes selvagens para este gene¹¹.

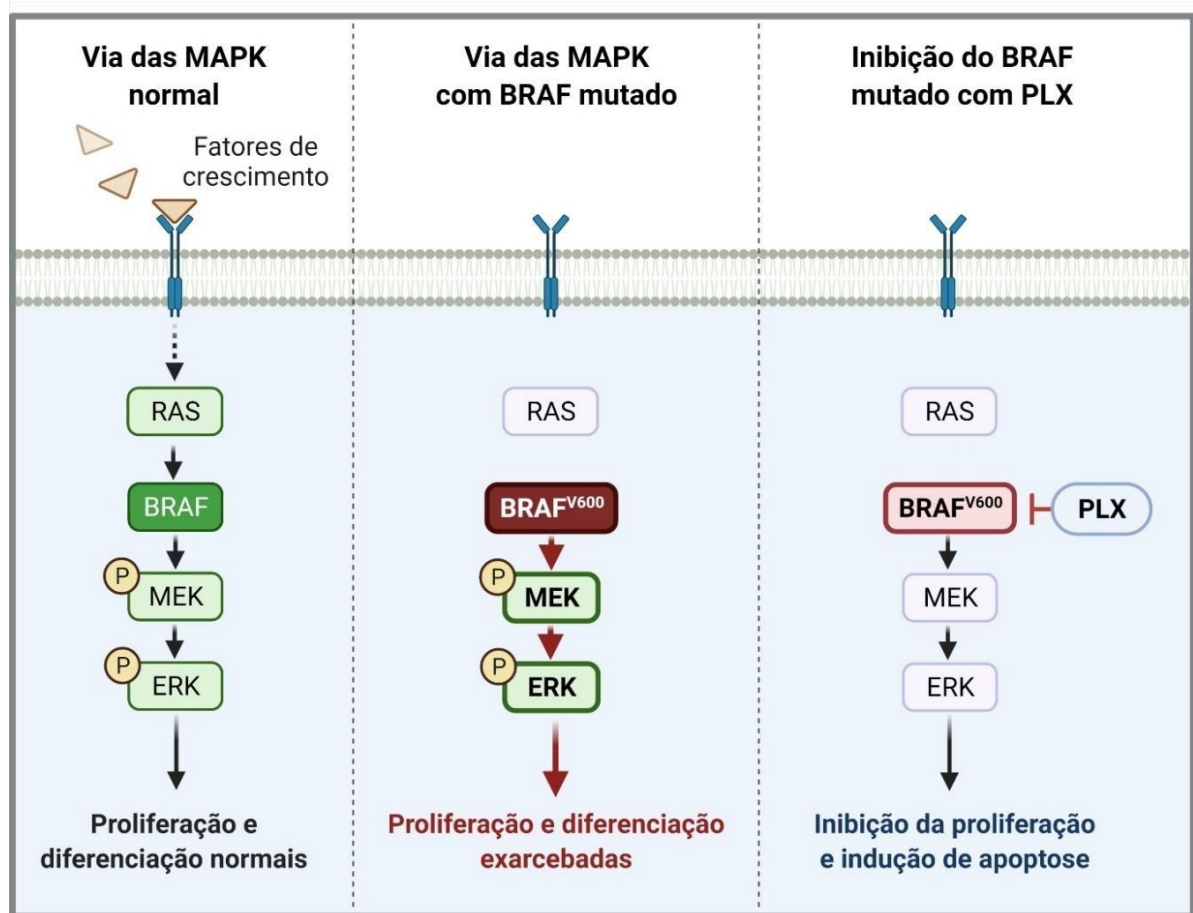


Figura 1 - Comparativo entre a via de sinalização MAPK/ERK com proteína BRAF normal e mutada. Em células normais, a proteína RAS se liga à BRAF, levando à cadeia de fosforilação das proteínas MEK e ERK que, por fim, resultam na proliferação e diferenciação equilibradas da célula. Quando mutada, a proteína BRAF está constitutivamente ativa, não necessitando da ativação por RAS, o que resulta em uma proliferação e diferenciação excessiva. O PLX inibe a proteína BRAFV600E impedindo toda a fosforilação subsequente da via e, conseqüentemente, prejudica o crescimento tumoral, além de induzir à apoptose.

Em 2011, no entanto, a aprovação do vemurafenibe, também designado por PLX, pela agência *Food and Drug Administration* (FDA) mudou bastante este cenário. Sendo a primeira terapia-alvo aprovada para tumores BRAF-mutados, tal fármaco inibe a atividade de BRAF, bloqueando consigo a fosforilação de MEK (do inglês, *MAPK/ERK kinase*) e ERK (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*)¹². Por consequência, o PLX é capaz de inibir a proliferação, além de induzir a morte celular em melanomas BRAF-mutados¹³. No ensaio clínico que culminou em sua aprovação, foi observado um aumento na taxa de resposta (64% vs. 5%) e sobrevida geral (84% vs. 48%) dos pacientes tratados com PLX, quando comparado

à dacabarmizina¹⁴. Entretanto, embora se observem benefícios notáveis no curto prazo, a sobrevida livre de progressão de apenas 5,3 meses persiste como sendo um grave problema para estes pacientes¹⁵. Os fatores específicos sugeridos para este fenômeno variam de mutações secundárias em *NRAS* (do inglês, *neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), *KRAS* (do inglês, *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) ou *MEK1/2*, desenvolvimento de variantes de *splicing* e amplificação do gene *BRAF*, amplificação de receptores tirosina quinase, mutações em vias não MAPK, dentre outros^{16–20}.

Como forma de ultrapassar este obstáculo, novas terapias para melanomas não ressecáveis seguem em constante desenvolvimento. Atualmente, o tratamento para este tipo de neoplasia se baseia principalmente em dois pilares: a inibição conjunta de BRAF e MEK^{21–23}; bem como a inibição de *checkpoints* imunológicos – terapias anti-PD1 (do inglês, *programmed cell death 1*), como o pembrolizumabe e o nivolumabe^{24,25}, e terapias anti-CTLA4 (do inglês, *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), como o ipilimumabe²⁶. Avanços importantes na sobrevida geral e sobrevida livre de progressão de pacientes vêm sendo obtidos mesmo no cenário neoadjuvante²⁷ e adjuvante²⁸, após implementação destas novas opções de tratamento. No entanto, estudos apontam que a terapia combinada BRAF/MEK também gera padrões de resistência similares à monoterapia com inibidores de BRAF^{29,30}. Ademais, a resposta lenta ao tratamento e as baixas taxas de resposta persistem sendo também um problema quando utilizadas imunoterapias, com 40-65% dos pacientes não podendo se beneficiar dos efeitos desta opção de tratamento^{26,31}.

1.2 Metabolismo tumoral

Em paralelo à proliferação desregulada, células neoplásicas necessitam ajustar o seu metabolismo para suprir as demandas necessárias para o seu crescimento e divisão³². Dada a sua natureza agressiva, melanomas BRAF-mutados são especialmente dependentes destas transformações³³, superexpressando proteínas relacionadas ao metabolismo glicolítico, a depender de sua malignidade³⁴. De fato, ainda que condições hipóxicas intensifiquem ainda mais este processo, melanomas metabolizam mais do que 80% da glicólise em lactato mesmo em condições normóxicas, um fenômeno conhecido como efeito Warburg³². Tal característica, já discutida no contexto dos *Hallmarks of Cancer*³⁵, atualmente é inclusive explorada clinicamente em melanoma para a identificação de metástases, através da técnica PET-scan

(do inglês, *positron emission tomography*)³⁶, e como preditor prognóstico, pela quantificação da expressão de LDH5 (do inglês, *lactate dehydrogenase 5*) no soro ou seções histológicas de pacientes com melanoma³⁷, sugerindo a possibilidade de a glicólise ser usada como uma estratégia em benefício a portadores desta doença^{38,39}.

Interessantemente, diversas vias metabólicas têm relação direta ou indireta, com mecanismos de resistência e sensibilidade a terapias. Exemplos vão desde enzimas glicolíticas como a LDH, que contribui para a resistência ao paclitaxel/trastuzumabe em câncer de cólon, e a PDK (do inglês, *pyruvate dehydrogenase kinase*), que contribui para a resistência induzida por hipóxia em câncer cervical e mama, até à via da glutamina, relacionada com resistência à cisplatina em câncer gástrico⁴⁰. Em melanomas, foi encontrado que a estimulação da glicólise tem relação inversa com a sensibilidade a inibidores BRAF⁴¹. De fato, similar a outros tumores, melanomas resistentes à terapia anti-BRAF também são dependentes da via da glutamina⁴², além de apresentarem crescente fosforilação oxidativa⁴³ e biogênese mitocondrial⁴⁴. Em concordância com estes dados, foi visto que a fosforilação oxidativa em melanomas com resistência adquirida a inibidores anti-BRAF está associada com a mudança do metabolismo glicolítico para o glutaminolítico⁴⁵. Por fim, um estudo descreveu que, no contexto da resistência à terapia anti-BRAF, a glicólise está associada com a sobrevivência e a respiração mitocondrial com a adaptação e desenvolvimento de resistência destes tumores⁴⁶, sugerindo que a inibição destas vias pode resultar em estratégias interessantes contra este tipo de neoplasia.

Neste contexto, várias moléculas já se mostraram importantes e com potencial de exploração como alvo terapêutico. Dentre elas, destacam-se os MCTs (do inglês, *monocarboxylate transporters*), proteínas responsáveis, entre outros processos, pelo transporte de lactato através de membranas⁴⁷. Tais transportadores, bem como a chaperona CD147 (do inglês, *cluster of differentiation 147*) – proteína necessária para o enovelamento correto dos MCTs e sua consequente expressão membranar – já se mostraram superexpressos em vários tipos tumorais⁴⁸, além de estarem associados com um pior prognóstico⁴⁹. Em virtude disso, estudos já apontam os MCTs como alvos terapêuticos em pacientes com tumores sólidos avançados como câncer de cabeça e pescoço, pulmão e melanoma, por exemplo⁵⁰⁻⁵³.

A família dos MCTs inclui diversos membros, sendo as isoformas MCT1 e MCT4 aquelas com mais interesse do ponto de vista do metabolismo tumoral, uma vez que são responsáveis

pelo simporte de moléculas de lactato e prótons H^+ para fora do ambiente celular⁴⁸. Tais atividades favorecem a manutenção do alto volume intracelular de precursores de macromoléculas necessários para a divisão celular, tais como aminoácidos não-essenciais, nucleotídeos e ácidos graxos; ajudam a regular a razão $NADH/NAD^+$, contribuindo para a manutenção da homeostase redox⁵⁴; e levam a uma acidificação⁵⁵, assim como a um aumento de lactato no microambiente tumoral⁵⁵, cooperando para um aumento na angiogênese, evasão ao sistema imune, invasão e metastatização⁵⁶. De salientar, um ensaio clínico de fase I/II utilizando um inibidor específico das isoformas MCT1/2 (AZD-3965) encontra-se atualmente em andamento para o tratamento de câncer de próstata e gástrico avançados, bem como para linfomas (NCT01791595)⁵⁷.

1.3 3-Bromopiruvato

Além do seu potencial como alvo terapêutico em câncer⁵⁸, o MCT1 tem sido descrito como um possível biomarcador para células tumorais sensíveis ao 3BP (3-bromopiruvato), uma vez que este transportador foi recentemente identificado como o principal responsável por promover o seu transporte para o interior das células⁵⁹. Este análogo halogenado do piruvato é capaz de inibir várias enzimas importantes no metabolismo glicolítico, tais como a HK2 (do inglês, *hexokinase 2*), a 3-PGK (do inglês, *3-phosphoglycerate kinase*), a LDH e, mais especificamente, a GAPDH (do inglês, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)⁶⁰⁻⁶². Além disso, este composto tem efeito sobre o metabolismo mitocondrial, inibindo proteínas como a PDH (do inglês, *pyruvate dehydrogenase*), além de proteínas importantes para o ciclo dos TCA (do inglês, *tricarboxylic acid*) e a glutaminólise, como a IDH (do inglês, *isocitrate dehydrogenase*), a α -KD (do inglês, *α -ketoglutarate dehydrogenase*) e a SDH (do inglês, *succinate dehydrogenase*)^{63,64}. Pelo fato da proteína SDH também participar na cadeia de transporte de elétrons, como parte do complexo II, a sua inibição pelo 3BP também é capaz de contribuir para a geração de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*). Na verdade, o 3BP é capaz de depletar GSH (do inglês, *glutathione + hidrogen*) livre através, por um lado, da saturação de GSH livre devido aos elevados níveis de ROS gerados, e, por outro lado, através da formação de um S-conjugado com GSH, fazendo da geração de um ambiente oxidativo um de seus principais mecanismos de ação⁶⁵⁻⁷⁰(Figura 2).

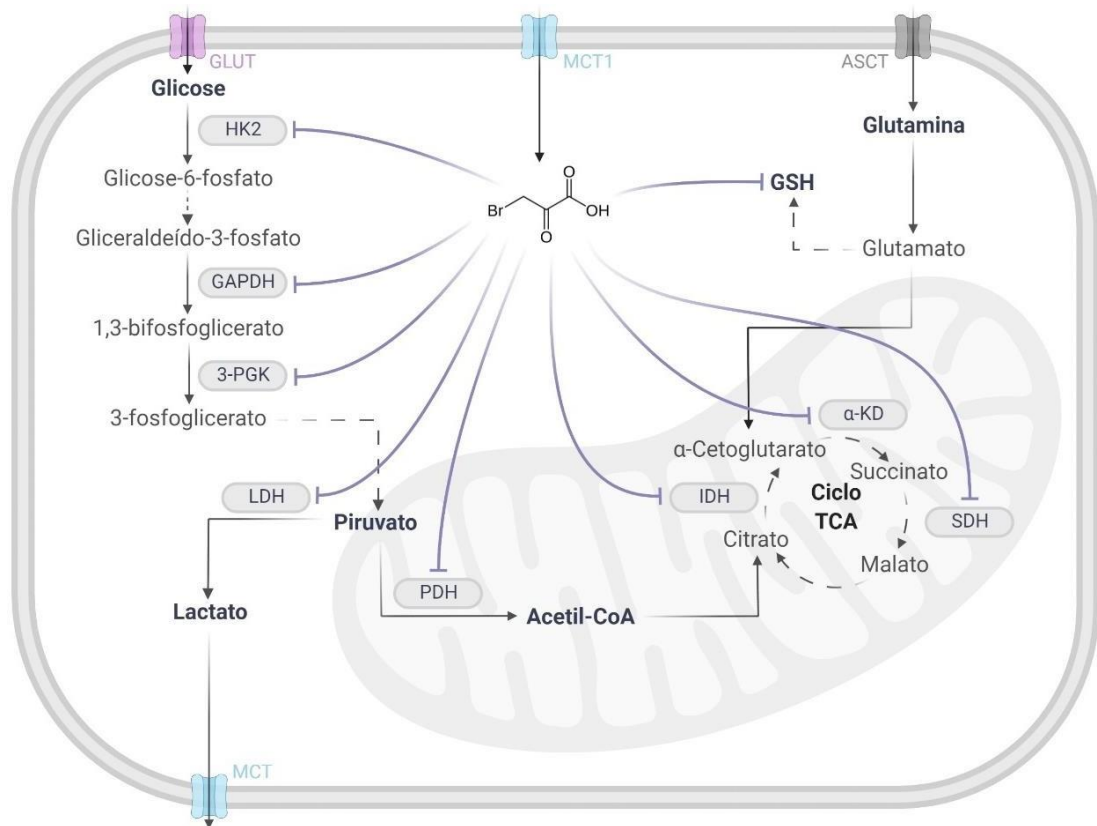


Figura 2 - Principais mecanismos de ação do 3BP sobre células tumorais. O 3BP é captado por meio do MCT1 e age sobre o metabolismo glicolítico, inibindo HK2 (*hexokinase 2*), GAPDH (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), 3-PGK (*3-phosphoglycerate kinase*) e LDH (*lactate dehydrogenase*); metabolismo mitocondrial, inibindo PDH (*pyruvate dehydrogenase*), IDH (*isocitrate dehydrogenase*), α-KD (*α-ketoglutarate dehydrogenase*) e SDH; e glutaminólise, inibindo IDH e α-KD; além de aumentar o estresse oxidativo celular, depletando a GSH (*glutathione + hidrogen*) livre. Deste modo, o 3BP desestabiliza metabolicamente a célula rica em MCT1 induzindo apoptose ou necrose através da depleção de ATP e aumento de ROS.

No entanto, apesar de sua ação ampla, várias propriedades específicas fazem do 3BP uma droga promissora sob o ponto de vista terapêutico contra o câncer. Por exemplo, dada a estabilidade do 3BP em ambientes com baixo pH, tal composto poderia apresentar um meia-vida maior, bem como ser mais eficientemente captado pelo MCT1, no microambiente tumoral^{59,71,72}. Além disso, o 3BP é capaz de inibir isoformas tumor-específicas, como é o caso da enzima hexoquinase 2⁷³, proporcionando uma maior especificidade ao tratamento e reduzindo significativamente os seus efeitos colaterais³⁸. Ainda, considerando que antioxidantes já foram vistos promover a iniciação e progressão do tumor⁷⁴⁻⁷⁸, terapias pró-oxidantes, tais como o tratamento com 3BP visando o impedimento da reciclagem de GSH⁶⁵⁻

⁷⁰, poderiam servir como forte aliadas no combate a certos tipos de neoplasias⁷⁹. Ademais, sob a perspectiva de tumores quimiorresistentes, o tratamento com 3BP também pode ser eficaz uma vez que este atua depletando os níveis de ATP (do inglês, *adenosine triphosphate*), essenciais para vários processos celulares^{80,81}, dentre os quais a atividade de transportadores ABC (do inglês, *ATP-binding cassette*), fundamentais para a excreção de toxinas intracelulares, incluindo quimioterápicos, e, portanto, para o fenótipo de quimiorresistência destas células⁸²⁻⁸⁵.

No entanto, apesar dos resultados promissores obtidos em ensaios tanto *in vitro*, como *in vivo* utilizando 3BP^{60,72}, ainda não existem ensaios clínicos organizados para este inibidor. Em 2012, um estudo de caso descreveu que um paciente jovem apresentando carcinoma hepatocelular fibrolamelar melhorou a sua qualidade de vida, bem como teve a sua sobrevida aumentada, ao ser tratado com o 3BP⁸⁶, o que amplia ainda mais as expectativas sobre este composto.

2 JUSTIFICATIVA

O melanoma é o tipo tumoral mais agressivo dentre os cânceres de pele e com crescente incidência ao redor do mundo². Uma de suas características mais marcantes é a mutação no gene *BRAF*, encontrada em aproximadamente metade destes tumores¹¹. O antineoplásico PLX atua inibindo especificamente *BRAF* mutado, aumentando a taxa de resposta e melhorando a qualidade de vida dos pacientes com esta neoplasia¹⁴. No entanto, a baixa sobrevida livre de progressão, ocasionada por diversos mecanismos já descritos¹⁶⁻¹⁹, é um problema neste tipo de terapia¹⁵. Alternativas de tratamento hoje disponíveis apresentam problemas relacionados a padrões de resistência similares à monoterapia anti-*BRAF*, têm resposta lenta ou geram baixas taxas de resposta^{26,29,31}.

Além do fato de melanomas *BRAF*-mutados dependerem do chamado efeito Warburg³³, diversos mecanismos de resistência à terapia anti-*BRAF* tem associação com a dependência à via metabólicas, como a fosforilação oxidativa⁴³ e glicólise⁴⁶, fenômenos relacionados a uma elevada expressão do transportador MCT1⁴⁸. O composto 3BP, um inibidor do metabolismo celular, foi visto ser particularmente potente em células com alta expressão de MCT1 devido ao seu acesso facilitado ao interior da célula⁵⁹. Dentre seus vários efeitos, tal molécula é capaz de restaurar a sensibilidade a fármacos em células tumorais^{82-85,87}.

Assim, a inibição conjunta do metabolismo tumoral, utilizando o composto 3BP, e da via das MAPK, realizada com o antineoplásico vemurafenibe, possa resultar em uma nova alternativa terapêutica em melanomas cutâneos humanos resistentes à terapia alvo anti-*BRAF*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente projeto de mestrado tem como objetivo geral avaliar o efeito do tratamento com 3BP como agente antineoplásico para o tratamento de melanomas resistentes ao vemurafenibe.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com 3BP, sozinho ou combinado com vemurafenibe, no perfil metabólico de células de melanoma resistentes ao vemurafenibe;
- Avaliar o efeito do tratamento com 3BP, sozinho ou combinado com vemurafenibe, em parâmetros de agressividade tumoral de células de melanoma resistentes ao vemurafenibe.

4 METODOLOGIA

4.1 Linhagens Celulares

Para o estudo em questão, foram utilizadas as linhagens celulares de melanoma A375R e SKMEL28R, gentilmente cedidas pela Dra. Silvy Stuchi Maria Engler, do Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo. Estas linhagens foram obtidas a partir das linhagens A375 e SKMEL28, nas quais foi desenvolvida resistência ao PLX de acordo com as técnicas já anteriormente descritas⁸⁸⁻⁹⁰.

Para o cultivo celular, foi utilizado meio de cultura DMEM (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Gibco) contendo 4500mg/L de glicose e 4 mM de L-glutamina, suplementado com 10% de FBS (do inglês, *fetal bovine serum*; Thermo Fisher Scientific) e 1% de solução P/S (do inglês, *penicillin-streptomycin*; Sigma Aldrich). Também foi adicionado ao meio de cultura o antineoplásico PLX na concentração 4,5 μ M para a linhagem A375R e 6,0 μ M para a linhagem SKMEL28R - valores utilizados para desenvolvimento da resistência das linhagens A375 e SKMEL28 parentais, bem como para a manutenção das linhagens resistentes. Todas as células foram mantidas em estufa com umidade controlada a 37°C e 5% de CO₂. As células foram autenticadas por meio da análise de STR (do inglês, *Short Tandem Repeat*) no Hospital de Câncer de Barretos, de acordo com os padrões internacionais de autenticação de linhagens celulares^{91,92}. Para tal, foi utilizado um painel de oito primers fluorescentes (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX e CSF1P0). Também foram realizados testes de micoplasma quinzenais para garantir a ausência de contaminação durante o cultivo celular. Visando manter os padrões celulares estáveis após o descongelamento, foram utilizadas células em 3ª passagem nos ensaios.

4.2 Inibidores

O composto 3BP (*Sigma Aldrich*) foi diluído em DPBS (do inglês, *Dulbecco's phosphate-buffered saline*) à temperatura ambiente imediatamente antes de sua utilização. O antineoplásico vemurafenibe (*Selleck Chem*) foi diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) em alíquotas contendo as respectivas concentrações de tratamento e foi armazenado a 4°C, até o seu uso.

4.3 Determinação da IC₅₀ e IC₂₅

Seguindo as instruções dadas pelos fabricantes, a técnica de SRB (sulforodamina B; TOX6 *Sigma*) foi utilizada para a determinação da concentração de 3BP capaz de reduzir 50% (IC₅₀) e 25% (IC₂₅) da viabilidade celular. Em resumo, 5x10³ células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas em condições normais para adesão. Posteriormente, as células foram tratadas com concentrações crescentes de 3BP (0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 µM), sozinho ou combinado com PLX (em concentração fixa de 4,5 µM, para a linhagem A375R, e 6,0 µM, para a linhagem SKMEL28R), e mantidas nestas condições, por 24 ou 48 horas. Passado este período, as células foram então fixadas com ácido tricloroacético 50% peso/volume, incubadas por 1 hora a 4°C e então lavadas com água para retirada do *debris*. Subsequentemente, as placas foram secas e, a cada poço, foi adicionado 0,4% de SRB, até completa submersão das células. Passados 30 minutos de coloração, os poços foram lavados com ácido acético 1% até à remoção do corante e novamente as placas foram secas. Após a secagem, o corante incorporado foi solubilizado em solução contendo 10 mM Tris e a solução resultante foi estabilizada por 5 minutos em temperatura ambiente. A absorvância foi então lida em espectrofotômetro (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*) a 565nm ($\lambda_{ref}=690$ nm). O ensaio foi realizado em triplicatas experimental e biológica. Os valores de IC₅₀ e IC₂₅ foram obtidos pelo software *GraphPad Prism* 8.0.1 através da análise de regressão não-linear utilizando a equação de dose-resposta sigmoidal (inclinação variável).

4.4 Ensaios funcionais

Em seguida, segue uma breve descrição dos parâmetros celulares avaliados após o tratamento das linhagens com o valor de IC_{50/25} do 3BP (descrito no item 4.5) por 24 horas, sozinho ou em combinação com o antineoplásico PLX. Com exceção do ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), todos os demais procedimentos foram previamente otimizados pelo grupo de pesquisa^{93,94}.

4.4.1 Viabilidade celular

Para assegurar que o valor do IC₅₀ calculado, realmente refletia a concentração de composto capaz de reduzir a viabilidade em 50% um novo ensaio de viabilidade foi realizado utilizando a técnica de SRB (TOX6 *Sigma*), em concordância com o item 2.5. O tratamento das

linhagens com 3BP foi feito utilizando os valores de IC₅₀, sozinho ou em combinação com o PLX, obtidos no mesmo item.

4.4.2 Proliferação celular

Para avaliar o efeito do 3BP sobre a proliferação celular, foi utilizada a técnica colorimétrica de incorporação de BrdU (*Cell Proliferation ELISA*, Roche), seguindo as especificações do fabricante. Brevemente, 5×10^3 células foram cultivadas em placas de 96 poços e, após aderidas, foram mantidas em condições de tratamento ou controle, por 24 horas em meio contendo solução de BrdU (bromodesoxiuridina) 10% v/v. Passado o período, o sobrenadante foi retirado dos poços e as células foram reincubadas em desnaturante de DNA (*FixDenat*) por mais 30 minutos, a 25°C. Subsequentemente, o anticorpo anti-BrdU conjugado com a peroxidase foi adicionado à solução e deixado agir por cerca de 90 minutos, a 25°C. Após esta etapa, o sobrenadante foi mais uma vez removido e as células lavadas em PBS 1x para remoção de *debris*. Finalmente, foi adicionada a solução substrato, que foi deixada a incubar por cerca de 30 minutos, a 25°C, para então ser lida em espectrofotômetro (*Varioskan Flash*, Thermo Fisher Scientific), a 370nm ($\lambda_{ref} = 492\text{nm}$). O ensaio foi realizado em triplicatas experimental e biológica.

4.4.3 Morte celular

Para avaliar o efeito do 3BP sobre a morte celular das linhagens em estudo, foi realizado o ensaio de anexina V e iodeto de propídio (*Roche*), de acordo com as especificações do fabricante. Em síntese, 6×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem cerca de 80% de confluência. Passado este período, estas foram tratadas por 24 horas (em condições normais de tratamento ou controle). Posteriormente, o sobrenadante foi colhido e unido às células, que foram centrifugadas. Subsequentemente, estas foram lavadas com DPBS e incubadas com anexina V conjuntamente com iodeto de propídio por 15 minutos, à temperatura ambiente, em sala escura. A determinação da porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial ou em apoptose tardia/necrose, foi avaliada por citometria de fluxo (*Accuri C6 Plus Flow Cytometer – BD Biosciences*), com um total de 50.000 eventos coletados para cada condição analisada. Os resultados foram analisados através do software *BD CSampler* (*BD Biosciences 1.0*). O ensaio foi realizado em triplicata biológica.

4.4.4 Migração celular

Para avaliar o efeito do 3BP sobre a migração celular, foi utilizado o ensaio de migração *transwell* (*Cell Culture Inserts - Corning*), de acordo com as especificações do fabricante. Em tal metodologia, 5×10^4 células foram cultivadas (em condições de tratamento ou controle) em meio DMEM 0% FBS no compartimento superior dos insertos por 24 horas. Durante este tempo, as células foram quimioatraídas pelo meio DMEM 10% FBS contido no compartimento inferior. Subsequentemente, as células que migraram durante este intervalo foram fixadas com metanol e coradas com hematoxilina e eosina. A membrana foi então fotografada em microscópio *Olympus BX43* (aumento de 10x) e as células contidas nela foram contadas utilizando o software *OpenCFU* 3.8. O ensaio foi realizado em duplicata experimental e triplicata biológica.

4.4.5 Invasão celular

A determinação do efeito do 3BP sobre a invasão celular foi realizada utilizando a técnica da câmara de invasão (*Biocoat Matrigel Invasion Chambers, BD*), de acordo com as especificações do fabricante. Para tal, 1×10^6 células SKMEL28R e 5×10^5 células A375R foram cultivadas (em condições de tratamento ou controle) em meio DMEM 0% FBS sobre uma matriz de matrigel previamente reidratada e contida em placas de invasão. Durante este tempo, as células foram quimioatraídas pelo meio DMEM 10% FBS contido no compartimento inferior. Passado o período de invasão (24 horas), as células não invasivas foram removidas e aquelas que invadiram foram fixadas com metanol, coradas com hematoxilina e eosina, e fotografadas em microscópio *Olympus BX43* (aumento de 10x). A contagem das mesmas foi realizada com o auxílio do software *OpenCFU* 3.8. O ensaio foi realizado em duplicata experimental e triplicata biológica.

4.4.6 Expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal

Para analisar o efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal (EMT, do inglês *epithelial-mesenchymal transition*) das linhagens de melanoma, foi utilizado o ensaio de *western blot* examinando as seguintes proteínas: ASMA (do inglês, *α -Smooth Muscle Actin*), ECAD (E-caderina), NCAD (n-caderina), SLUG, SNAIL, TGFB (*Transforming growth factor beta*) e VIM (Vimentina). Em resumo, as linhagens de melanoma foram cultivadas em placas de 6 poços em condições de tratamento ou controle, durante 24

horas. Posteriormente, foram lavadas com 5 mL de DPBS e homogeneizadas em tampão de lise contendo 50 mM Tris (pH= 7,5), 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA (do inglês, *ethylenediaminetetraacetic acid*), 1% Triton X-100, 1% NP40, suplementado com coquetel de inibidores de protease (*Complete Protease Inhibitor Cocktail, Roche*), de acordo com as recomendações do fabricante. Os lisados celulares obtidos foram então incubados por 15 minutos em gelo e, subsequentemente, centrifugados a 13.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações foram aferidas por curva padrão (albumina de soro bovino) utilizando o ensaio de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay; Bio-Rad*), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, as proteínas foram diluídas em tampão de amostra (*Laemmli 2x Concentrate; Sigma Aldrich*) e desnaturadas a 95°C, por 5 minutos. Alíquotas de 20 µg de proteína total foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10% (do inglês, *sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis 10%*) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences*). A transferência foi realizada por 30 minutos no equipamento *TransBlot Turbo Transfer* (Bio-Rad). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado [Molico, diluído em TBS (do inglês, *tris-buffered saline*) 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 (do inglês, *bovine serum albumin*). A Tabela 1 descreve os anticorpos primários utilizados, suas respectivas clonalidades, bem como as condições de incubação e diluição que foram aplicadas. Após incubação com os anticorpos primários, as membranas foram lavadas por três vezes em TBS-T (5+3+3 minutos) e, então, foram incubadas por uma hora, à temperatura ambiente, em anticorpo secundário. Os anticorpos secundários utilizados - *anti-rabbit* (sc-2020, Santa Cruz Biotechnology) ou *anti-mouse* (sc-2031, Santa Cruz Biotechnology) - foram diluídos 1:5000 em TBS-T, 5% leite desnatado (Molico). Subsequentemente, 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 4000mini* (GE Healthcare Life Sciences). Os anticorpos ligados foram visualizados por quimioluminescência através do kit *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo Fisher Scientific). A ACTB (Actina beta) foi utilizada como proteína endógena normalizadora. O experimento foi realizado em duplicatas experimental e biológica.

Tabela 1 - Condições e anticorpos utilizados no *western blot* de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal.

Proteínas	Anticorpo	Clonalidade	Diluição, tempo e temperatura de incubação
ACTB	#3700 <i>Cell Signaling Technology</i>	Monoclonal (8H10D10)	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C
ASMA	#14968 <i>Cell Signaling Technology</i>	Policlonal	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
ECAD	#3195S <i>Cell Signaling Technology</i>	Monoclonal (24E10)	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
NCAD	#4061S <i>Cell Signaling Technology</i>	Policlonal	1:250, <i>overnight</i> , 4°C
SLUG	#9585 <i>Cell Signaling Technology</i>	Monoclonal (C19G7)	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
SNAIL	#3879 <i>Cell Signaling Technology</i>	Monoclonal (C15D3)	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
TGFB	#3711 <i>Cell Signaling Technology</i>	Policlonal	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
VIM	#5741S <i>Cell Signaling Technology</i>	Policlonal	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C

4.4.7 Formação de colônias

Para analisar o efeito do 3BP sobre o potencial de formação de colônias, foi utilizado o ensaio clonogênico. Neste ensaio, 5×10^3 células foram cultivadas em placas de 6 poços, por 20 dias, em meio DMEM 10% FBS, em condição de tratamento ou em condição controle. Decorrido este prazo, as colônias geradas foram coradas com cristal violeta e fotografadas em microscópio. A capacidade de formar colônias foi quantificada através da solubilização das células coradas em ácido acético e análise em espectrofotômetro (*Varioskan Flash - Thermo Fisher Scientific*), a 570 nm. O ensaio foi realizado em duplicata experimental e triplicata biológica.

4.4.8 Quantificação de espécies reativas de oxigênio

Para analisar o efeito do 3BP sobre a produção de ROS, foi realizado o ensaio com o agente fluorimétrico DHE (dihidroetídio; *Thermo Fisher Scientific*), uma sonda fluorescente para detecção de ROS gerado. Em resumo, 6×10^5 células foram plaqueadas em placas de 6 poços, em condição de tratamento, por 24 horas. Decorrido este tempo, o sobrenadante foi coletado e adicionado às células, que foram centrifugadas, lavadas com DPBS e expostas a 5 μM de DHE por 1 hora e 30 minutos, em ambiente escuro, a 37°C. Concomitante à exposição ao DHE, o grupo referente ao controle negativo foi tratado com 20 mM do antioxidante, e precursor da glutathiona, NAC (N-acetilcisteína; *Sigma Aldrich*) que, por sua vez, foi diluído em DPBS à temperatura ambiente e descartado imediatamente após uso. Uma hora após o início da exposição ao DHE, o grupo referente ao controle positivo foi tratado com 10 μM de AA (Antimicina A; *Sigma Aldrich*), um inibidor do complexo III da cadeia de transporte de elétrons. A amostra mãe da AA foi diluída em etanol e mantida à -20°C. A solução de trabalho foi feita diluindo-se a amostra mãe de antimicina A em DPBS no momento de sua utilização. Passado o período de incubação, as células foram centrifugadas, solubilizadas em DPBS e lidas em citometria de fluxo (*Accuri C6 Plus Flow Cytometer – BD Biosciences*). Um total de 50.000 eventos para cada condição foi analisado pelo software *BD CSampler (BD Biosciences 1.0)*. O ensaio foi realizado em triplicata biológica.

4.5 Perfil metabólico

Visando a avaliar o perfil metabólico das células, as quantidades de glicose e lactato foram mensuradas em amostras de meio de cultura e foi avaliada, através de *western blot*, a expressão das seguintes proteínas relacionadas ao metabolismo: ASCT2 (do inglês, *alanine-serine-cysteine transporter 2*), CA9 (do inglês, *carbonic anhydrase 9*), CD147, GLS (do inglês, *glutaminase*), GLUD1/2 (do inglês, *glutamate dehydrogenase 1/2*), GLUT1 (do inglês, *glucose transporter 1*), HK2, LDH5, MCT1, MCT4 e PDK.

4.5.1 Quantificação dos níveis de glicose e lactato extracelulares

Para quantificação dos níveis de glicose e lactato extracelulares, foram utilizados os kits *Glucose Colorimetric Assay* e *Lactate Colorimetric Assay (Spinreact)*, seguindo as instruções do fabricante. Para tal, um total de 5×10^3 células foram semeadas em placas de 96 poços e mantidas sob condições de tratamento ou controle. Após um período de 24 horas

(T₂₄), o meio de cultura foi retirado e mantido em -20°C até à análise. Como branco (T₀), foi utilizado o meio de cultura livre de células, mantido sob as mesmas condições. Para o cálculo da variação de glicose, foi utilizada a fórmula T₀-T₂₄ e, para a variação de lactato, foi utilizada a fórmula. O ensaio de SRB (*Sigma Aldrich*) foi utilizado para normalizar os resultados, por quantificação da proteína total presente nas amostras, seguindo as instruções do fabricante (maiores detalhes em 4.3). O experimento foi realizado em triplicatas experimental e biológica.

4.5.2 Quantificação da captação de glicose

Para avaliar o efeito do 3BP sobre a captação das linhagens de melanoma estudadas, foi realizado o ensaio de 2NBDG (2-(n-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-il)amino)2-deoxiglicose; *Thermo Fisher Scientific*), de acordo com as especificações do fabricante. Em resumo, 6x10⁵ células foram cultivadas em placas de 6 poços até atingirem cerca de 80% de confluência. Posteriormente, estas foram tratadas por 4 horas (em condições normais de tratamento ou controle) em meio sem glicose contendo 10 µM de 2NBDG. Como controle positivo, as células foram tratadas com 5 µM de apigenina (*Sigma Aldrich*), um inibidor de GLUT1, que foi diluído em DMSO e mantido a -20°C até o momento de utilização. Decorrido o período de tratamento, o sobrenadante foi coletado e adicionado às células ressuspensas, que, posteriormente foram centrifugadas. Em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em DPBS contendo 5 µM de 7AAD (7-aminoactinomicina D), seguido de incubação por 15 minutos, à temperatura ambiente, em sala escura. A determinação da porcentagem de células viáveis e de células que captaram o 2NBDG foi realizada por citometria de fluxo (*Accuri C6 Plus Flow Cytometer – BD Biosciences*), com um total de 50.000 eventos coletados para cada condição analisada. Os resultados foram avaliados através do *software* *BD CSampler* (*BD Biosciences* 1.0). O ensaio foi realizado em triplicata biológica.

4.5.3 Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo

Visando a avaliar o efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas metabólicas, foi feito um ensaio de *western blot* de acordo com o item 4.4.4, utilizando os anticorpos descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Condições e anticorpos utilizados no *western blot* de proteínas relacionadas ao metabolismo.

Proteínas	Anticorpo	Clonalidade	Diluição, tempo e temperatura de incubação
ACTB	#3700 <i>Cell Signaling Technology</i>	Monoclonal (8H10D10)	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C
ASCT2	abn73 <i>Merck Milipore</i>	Policlonal	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
CA9	ab15086 <i>Abcam</i>	Policlonal	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C
CD147	sc-71038 <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Monoclonal (1.BB.218)	1:250, <i>overnight</i> , 4°C
GLS	A83195 <i>Atlas Antibodies</i>	Polyclonal	1:125, <i>overnight</i> , 4°C
GLUD1/2	#12793 <i>Cell Signaling Technology</i>	Monoclonal (D9F7P)	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
GLUT1	ab15086 <i>Abcam</i>	Policlonal	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
HK2	ab104836 <i>Abcam</i>	Monoclonal (3D3)	1:1000, <i>overnight</i> , 4°C
LDH5	ab101562 <i>Abcam</i>	Monoclonal (EPR1564)	1:3000, <i>overnight</i> , 4°C
MCT1	sc-365501 <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Monoclonal (H-1)	1:200, <i>overnight</i> , 4°C
MCT4	sc-50329 <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Policlonal	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C
PDK	sc-28783 <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	Policlonal	1:2000, <i>overnight</i> , 4°C

4.6 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram armazenados e processados no *software GraphPad Prism 8.0.1*. Diferenças estatísticas entre os grupos tratados com DPBS vs. 3BP e DPBS+PLX vs. 3BP+PLX, bem como as diferenças entre linhagens celulares foram calculadas utilizando o teste T de *Student*. O nível de significância considerado nos testes realizados foi de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 A375R e SKMEL28R apresentam perfis metabólicos distintos com diferentes sensibilidades ao 3BP

A fim de investigar possíveis diferenças no perfil metabólico das linhagens de melanoma estudadas, a expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica e à via da glutamina, através da técnica de *western blot*, foi realizada (Figura 3). Foi visto que ambas as células possuem alta expressão de HK2 e MCT1. A análise comparativa também indicou que a linhagem A375R tem uma expressão aumentada de GLUD1/2, GLUT1 e PDK, enquanto a linhagem SKMEL28R teve expressão aumentada de GLS, LDH5 e MCT4. Em geral, estes resultados sugerem que a linhagem SKMEL28R possui um perfil metabólico mais diversificado, sem predominância da via glicolítica ou da via glutaminolítica, quando comparada à linhagem A375R, que, dada sua expressão notavelmente baixa de GLS, aparentemente apresenta uma baixa atividade da via da glutamina.

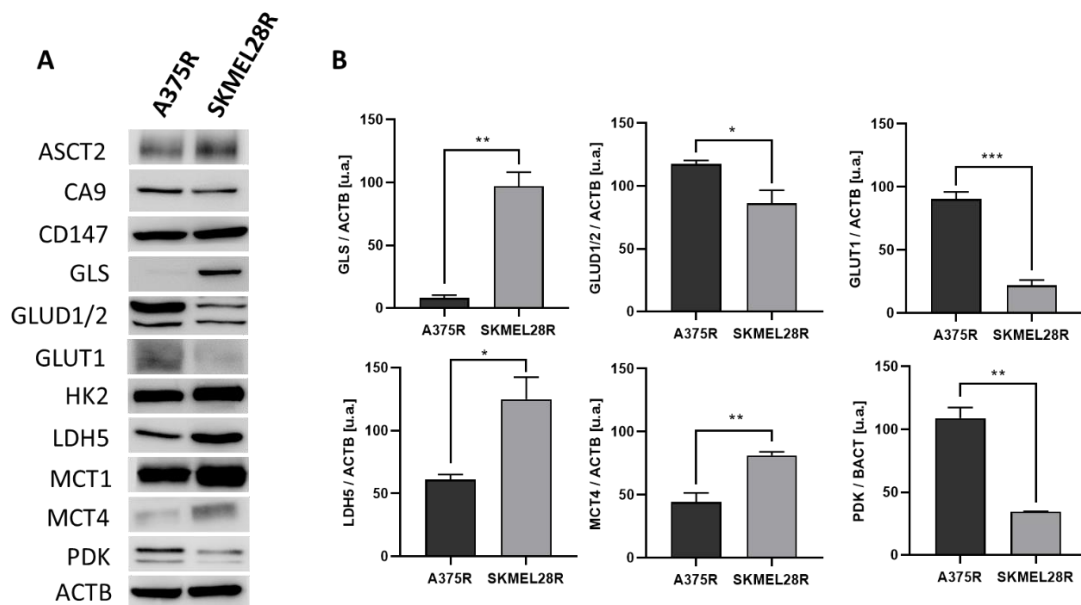


Figura 3 - Avaliação da expressão basal de proteínas relacionadas ao metabolismo tumoral nas linhagens A375R e SKMEL28R. A. Ensaio de *western blot*. B. Quantificação dos *immunoblots* normalizados pelos níveis de actina beta. O eixo y representado como unidades arbitrárias [u.a.]. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimentais. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

De forma a calcular o IC₅₀ de ambas linhagens para o 3BP (na presença ou ausência de PLX no meio de cultura), bem como averiguar a possível interferência do tempo de exposição na resposta ao tratamento, foram realizadas duas curvas de viabilidade após exposição a concentrações crescentes de 3BP para cada tempo estudado (24 e 48 horas), uma em mono tratamento e outra em tratamento combinado com PLX (Figura 4 e Tabela 2).

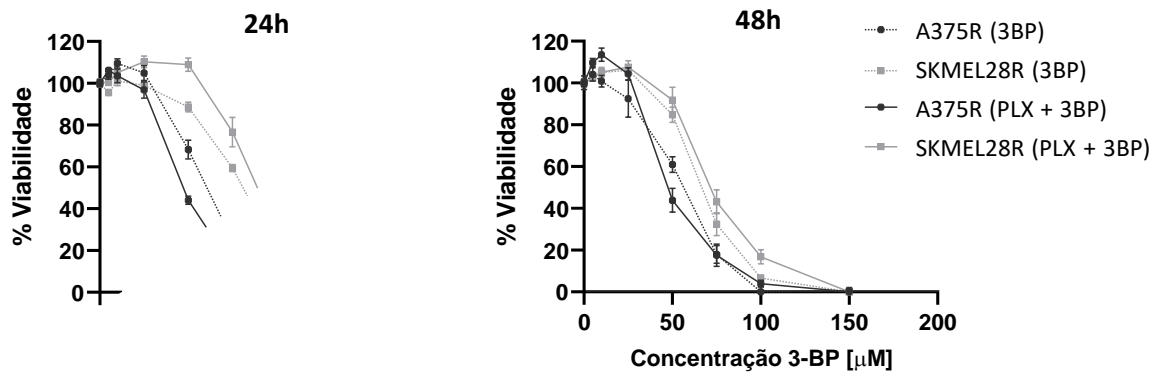


Figura 4 – Avaliação do efeito do 3BP sobre a viabilidade das linhagens A375R e SKMEL28R. Resultados obtidos após 24h e 48h de exposição a diferentes concentrações de 3BP (0 -150 μM), na presença e ausência de PLX (4,5 μM para A375R e 6,0 μM para SKMEL28R), avaliada por meio do ensaio de sulforodamina B. Ensaio normalizado pela concentração mínima de 3BP (0 μM). Dados apresentados como média ± erro padrão das triplicatas experimental e biológica.

Tabela 3 - Valores de IC₅₀ e IC₂₅ das linhagens A375R e SKMEL28R após 24h e 48h tratamento com 3BP, na ausência e na presença de PLX. Dados apresentados como média ± erro padrão para 95% da média.

Linhagem celular	Tratamento	IC ₅₀ (μM)		IC ₂₅ (μM)	
		24h	48h	24h	48h
A375R	3BP	59,01 ± 2,86	54,32 ± 3,18	47,65 ± 3,38	43,74 ± 3,71
	3BP + PLX	47,90 ± 2,33	48,89 ± 3,06	38,25 ± 3,07	38,37 ± 4,27
SKMEL28R	3BP	80,87 ± 3,73	66,40 ± 2,47	64,81 ± 2,35	55,65 ± 3,00
	3BP + PLX	88,66 ± 3,35	72,80 ± 3,13	76,78 ± 3,98	59,96 ± 4,09

Foi observada uma diferença no padrão de sensibilidade entre ambas as linhagens estudadas, sendo a A375R a que se apresentou mais sensível, tanto no tratamento com o 3BP sozinho (59,01 ± 2,86 μM vs. 80,87 ± 3,73 μM), quanto quando combinado com PLX (47,90 ± 2,33 μM vs. 88,66 ± 3,35 μM), após 24 horas de exposição. Resultado similar foi observado após 48 horas de tratamento. Portanto, foi proposto seguir com o IC₅₀ de 24 horas de

exposição para os demais testes funcionais, concentração esta que foi aferida em ensaio funcional isolado a fim de confirmar os cálculos obtidos (Figura suplementar 1, ANEXO).

5.2 O 3BP reduz a divisão celular e induz a morte de linhagens de melanoma resistentes ao PLX

Uma vez que o teste de SRB quantifica proteínas de células aderidas aos poços de cultura, dando informações acerca da quantidade de biomassa existente, foi realizado um ensaio de proliferação para verificar se a redução da biomassa após tratamento com 3BP poderia ser decorrente da redução da divisão celular. Os resultados obtidos confirmaram que o tratamento com 3BP reduziu a proliferação celular de maneira significativa, independentemente da presença de PLX no meio de cultura, em ambas linhagens estudadas (Figura 5). Confirmando este achado, também foi observado que o 3BP foi capaz de reduzir a quantidade de colônias de maneira significativa e independente de PLX (Figura 6).

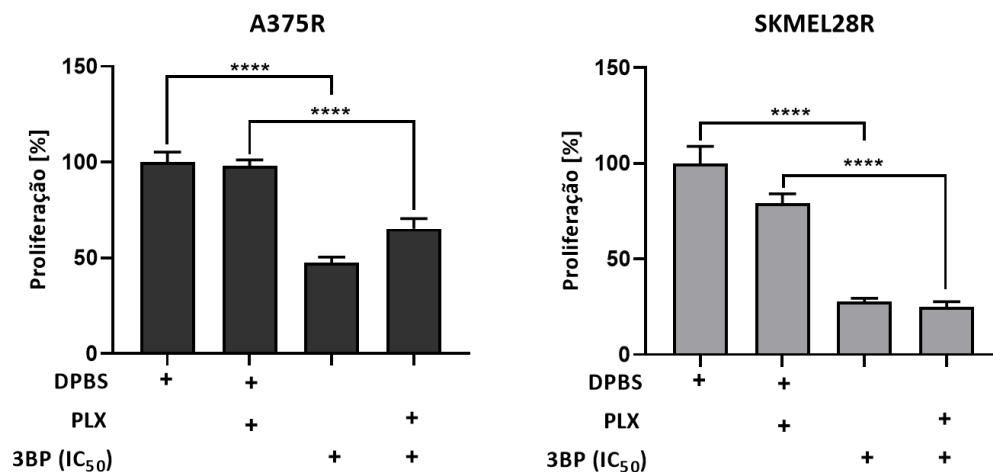


Figura 5 – Avaliação do efeito do 3BP sobre a proliferação das linhagens A375R e SKMEL28R. Resultados obtidos após exposição 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M em monoterapia e 45 μ M em terapia combinada com PLX, para A375R, e 80 μ M em monoterapia e 90 μ M em terapia combinada com PLX, para SKMEL28R), na presença e ausência de PLX (concentração fixa de 4,5 μ M para A375R e 6,0 μ M para SKMEL28R), avaliada por meio da técnica colorimétrica de incorporação de BrdU. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimental e biológica. **** p \leq 0,0001.

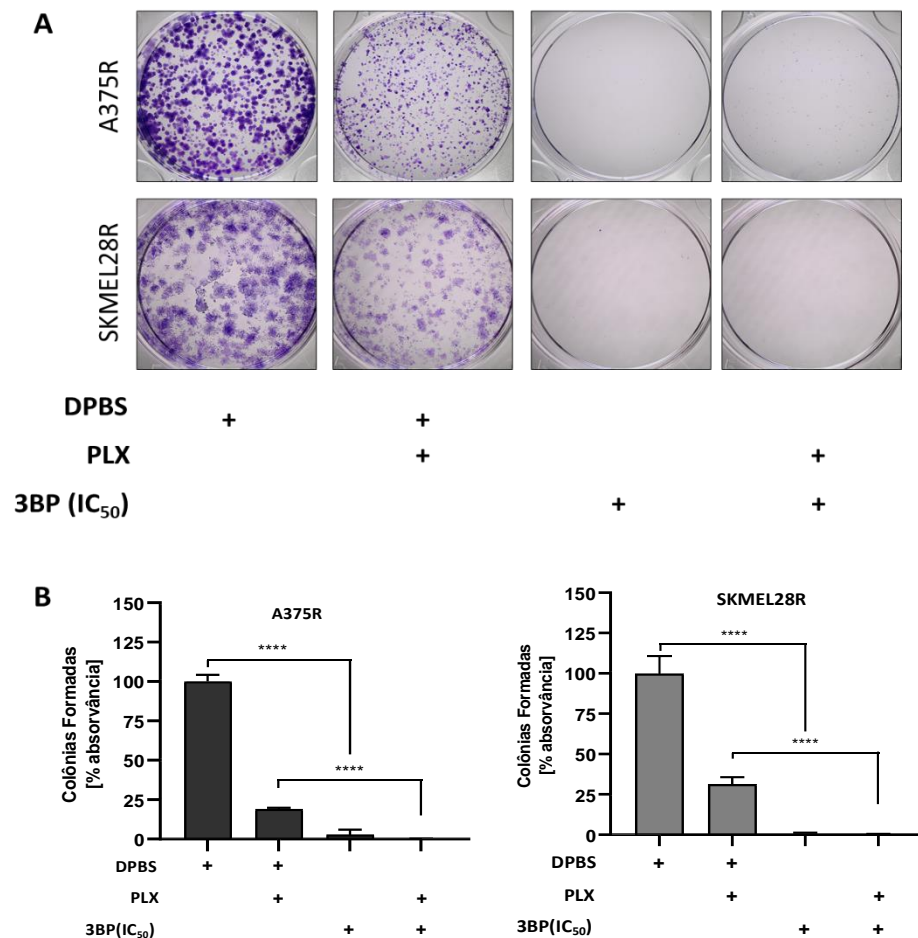


Figura 6 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a capacidade de formação de colônias das linhagens A375R e SKMEL28R. Resultados obtidos após exposição 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M em monoterapia e 45 μ M em terapia combinada com PLX, para A375R, e 80 μ M em monoterapia e 90 μ M em terapia combinada com PLX, para SKMEL28R), na presença e ausência de PLX (concentração fixa de 4,5 μ M para A375R e 6,0 μ M para SKMEL28R). A. Colônias formadas após coloração com cristal violeta. B. Quantificação da absorvância após solubilização das colônias formadas em ácido acético. Dados apresentados como média \pm erro padrão da duplicata experimental e triplicata biológica. **** $p \leq 0,0001$.

O efeito do 3BP sobre a morte celular também foi determinado, por meio da coloração com anexina V e iodeto de propídio (Figuras 7 e 8). Em tal ensaio, foi observado que o 3BP levou a um aumento significativo da quantidade de células mortas. Tal resultado foi independente da presença de PLX no meio de cultura. De fato, na linhagem A375R, a presença de PLX parece ter tido um efeito antagônico ao efeito do 3BP, tendo reduzido a porcentagem de células mortas no grupo 3BP+PLX, quando comparado ao grupo 3BP. O mesmo resultado não foi observado na linhagem SKMEL28R que, além de apresentar uma menor porcentagem

de morte celular após tratamento com 3BP, quando comparado à linhagem A375R, também apresentou apoptose tardia/necrose nesta condição.

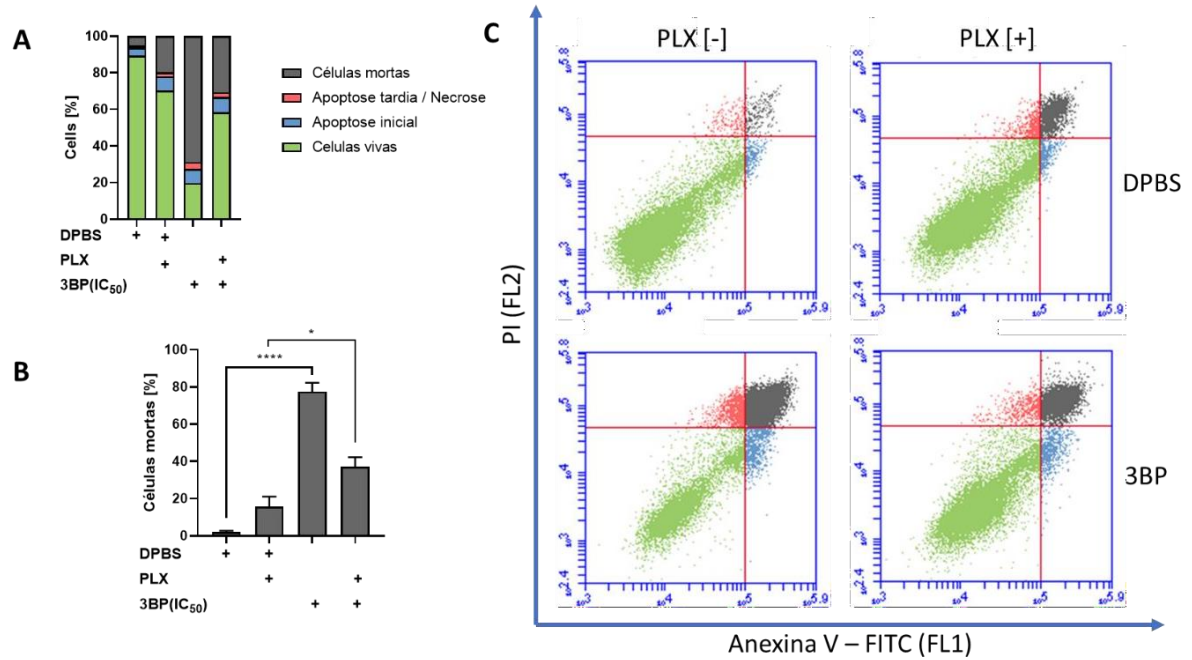


Figura 7 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a morte celular da linhagem A375R corada com anexina V e iodeto de propídio. A. Gráfico representando a distribuição entre os tipos de apoptose da linhagem A375R após exposição por 24 horas ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M com 3BP em monoterapia, e 45 μ M com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (4,5 μ M). B. Representação gráfica dos resultados significativos resultantes da coloração com anexina V/iodeto de propídio. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimental e biológica. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$. C. *Dot plot* da linhagem A375R corada com anexina V/iodeto de propídio.

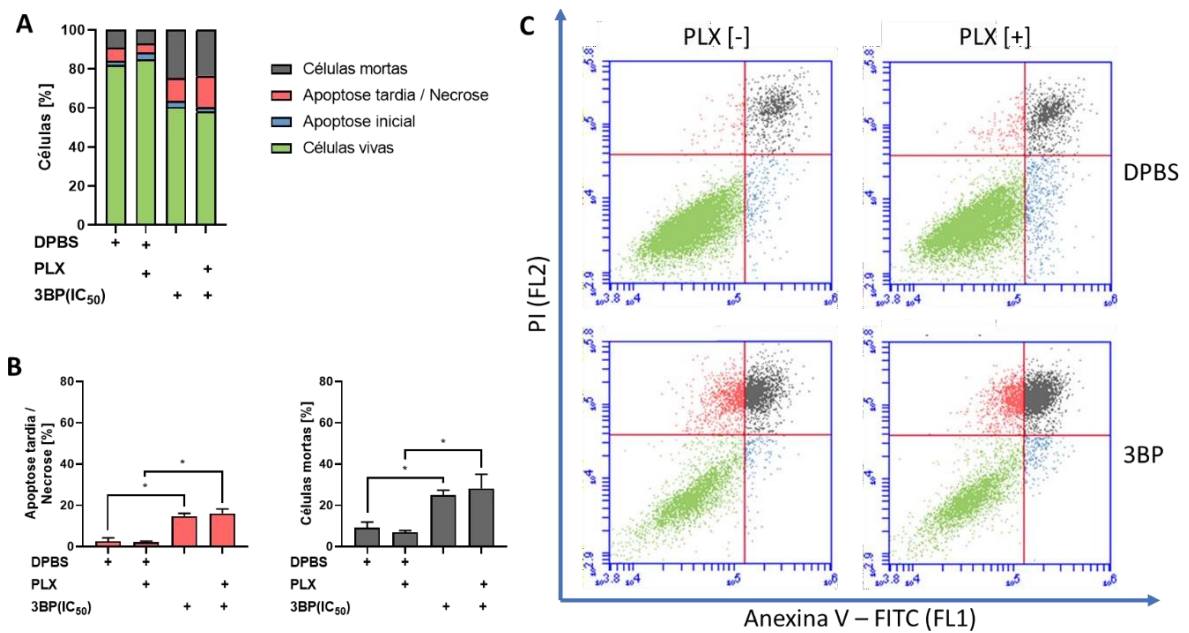


Figura 8 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a morte celular da linhagem SKMEL28R corada com anexina V e iodeto de propídio. A. Gráfico representando a distribuição entre os tipos de apoptose da linhagem SKMEL28R após exposição por 24 horas ao IC₅₀ de 3BP (80 μ M com 3BP em monoterapia, e 90 μ M com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (6,0 μ M). B. Representação gráfica dos resultados significativos resultantes da coloração com anexina V/iodeto de propídio. Dados apresentados como média \pm erro padrão da triplicata biológica. * $p < 0,05$. C. *Dot plot* da linhagem SKMEL28R corada com anexina V/iodeto de propídio.

5.3 O 3BP diminui a migração/invasão de linhagens de melanoma resistentes ao PLX e inibe a expressão de marcadores de EMT

De forma a avaliar de forma mais completa uma possível mudança no fenótipo agressivo das células de melanoma tratadas com 3BP, também foram realizados testes de migração e invasão (Figuras 9 e 10, respectivamente). Em ambos os ensaios, as linhagens A375R e SKMEL28R regrediram sua agressividade após o tratamento com 3BP, como pode ser observado na redução no número de células migratórias/invasivas decorridas 24 horas de exposição à droga. De fato, mesmo se tratando do IC₅₀, foi observada uma inibição completa na migração e invasão desta linhagem após o tratamento com 3BP sozinho. Tal resultado foi reafirmado pelo tratamento com o IC₂₅ que reproduziu o mesmo resultado, tanto para migração, quanto para invasão celular, na linhagem A375R. No entanto, corroborando com o resultado encontrado no ensaio de apoptose, o tratamento conjunto de 3BP+PLX na linhagem A375R, curiosamente, também provocou uma reversão do efeito inibitório sobre a migração

celular encontrado no grupo 3BP em mono tratamento, ainda que o mesmo não tenha sido encontrado no ensaio de invasão.

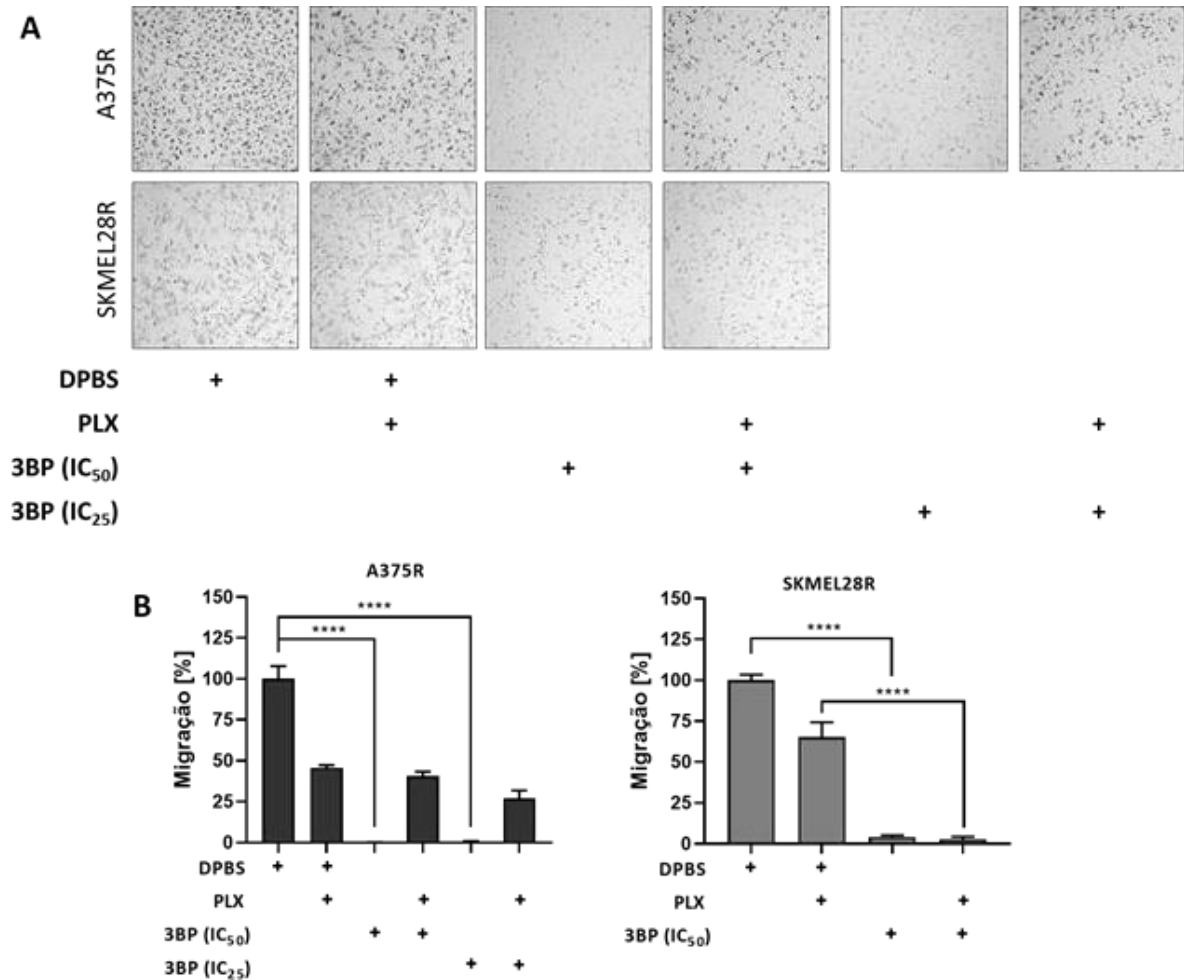


Figura 9 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a migração das linhagens A375R e SK MEL28R usando sistema *transwell*. A. Células migratórias coradas com hematoxilina e eosina após exposição de 24 horas ao IC₂₅ (45 μ M para A375R e 65 μ M para SKMEL28R com 3BP em monoterapia, e 35 μ M para A375R e 80 μ M para SKMEL28R com 3BP em terapia combinada com PLX) e IC₅₀ de 3BP (60 μ M para A375R e 80 μ M para SKMEL28R com 3BP em monoterapia, e 45 μ M para A375R e 90 μ M para SKMEL28R com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (4,5 μ M para A375R e 6,0 μ M para SKMEL28R). B. Representação gráfica da contagem de células migratórias. Dados normalizados pelo grupo DPBS. Dados apresentados como média \pm erro padrão da duplicata experimental e triplicata biológica. **** p \leq 0,0001.

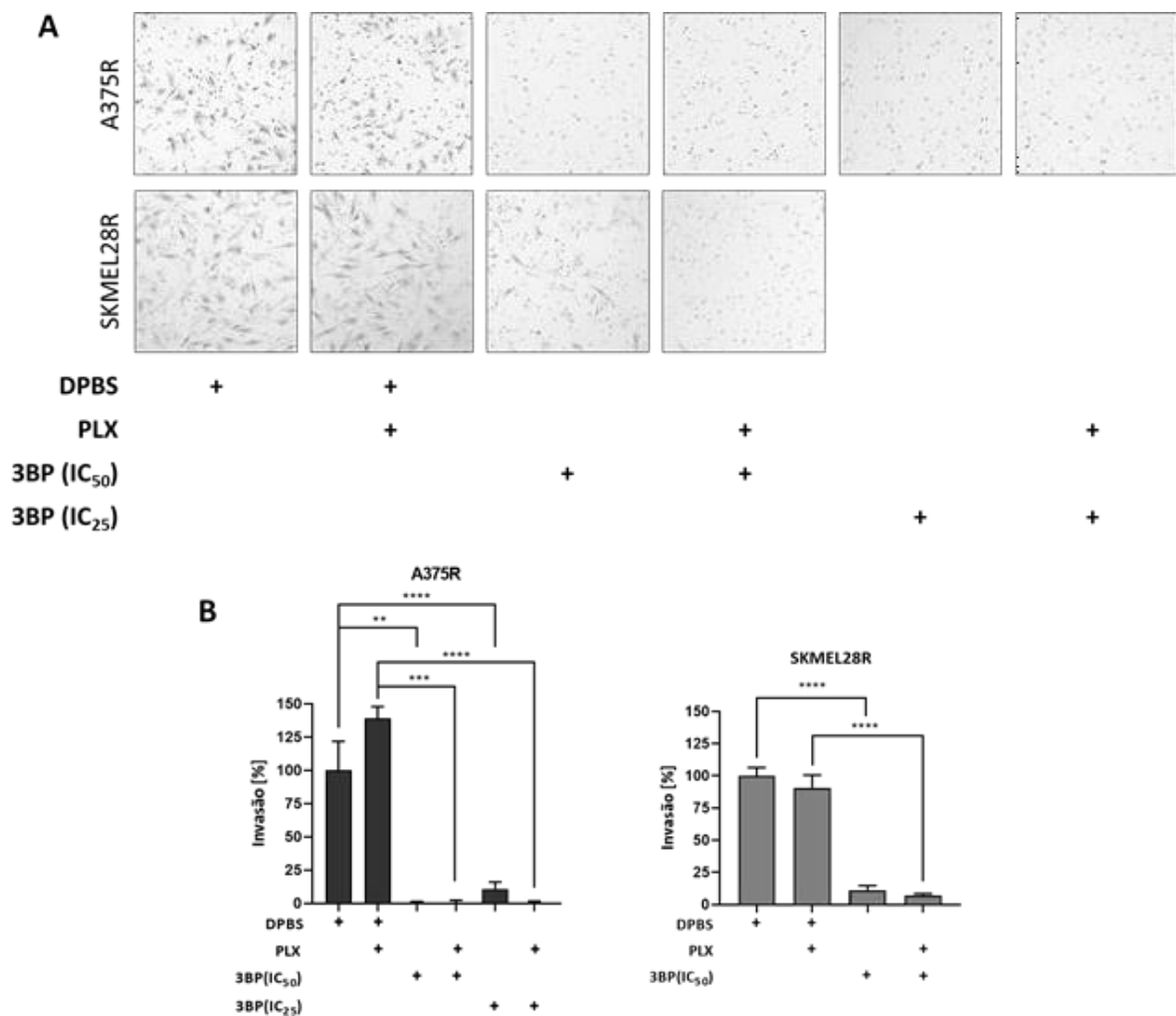


Figura 10 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a invasão das linhagens A375R e SKMEL28R usando sistema *transwell*. A. Células invasivas coradas com hematoxilina e eosina após exposição de 24 horas ao IC₂₅ (45 μ M para A375R e 65 μ M para SKMEL28R com 3BP em monoterapia, e 35 μ M para A375R e 80 μ M para SKMEL28R com 3BP em terapia combinada com PLX) e IC₅₀ de 3BP (60 μ M para A375R e 80 μ M para SKMEL28R com 3BP em monoterapia, e 45 μ M para A375R e 90 μ M para SKMEL28R com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (4,5 μ M para A375R e 6,0 μ M para SKMEL28R). B. Re apresentação gráfica da contagem de células invasivas. Dados normalizados pelo grupo DPBS. Dados apresentados como média \pm erro padrão da duplicata experimental e triplicata biológica. ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Uma vez o que 3BP foi capaz de inibir a invasão e migração das linhagens de melanoma, também foi avaliado o efeito do 3BP sobre a expressão de marcadores de EMT (do inglês, *epithelial–mesenchymal transition*) nas linhagens estudadas (Figuras 11 e 12). Como resultado, o 3BP, em monoterapia, foi capaz de regular negativamente a expressão de ASMA, ECAD, NCAD e SLUG, na linhagem A375R, bem como a expressão de TGFB, na linhagem

SKMEL28R. Também foi vista uma diminuição na expressão de NCAD, na linhagem A375R, bem como de SLUG, TGFB e VIM, na linhagem SKMEL28R, após terapia combinada 3BP + PLX. Em contrapartida, a monoterapia com 3BP foi capaz de induzir um aumento de SNAIL, na linhagem SKMEL28R, enquanto a terapia combinada 3BP + PLX também aumentou a expressão de VIM, na linhagem A375R.

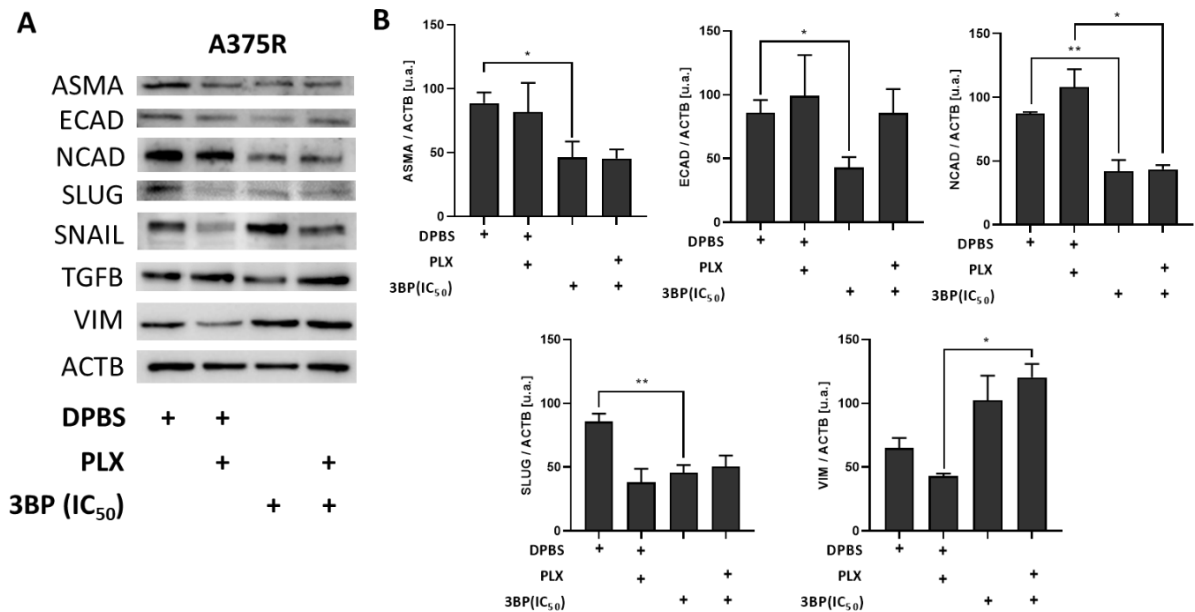


Figura 11 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal na linhagem A375R. Resultados obtidos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M com 3BP em monoterapia, e 45 μ M com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (4,5 μ M). A. Ensaio de *western blot*. B. Quantificação dos *immunoblots* normalizados pelos níveis de actina beta (ACTB). O eixo y representado como unidades arbitrárias [u.a.]. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimentais. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

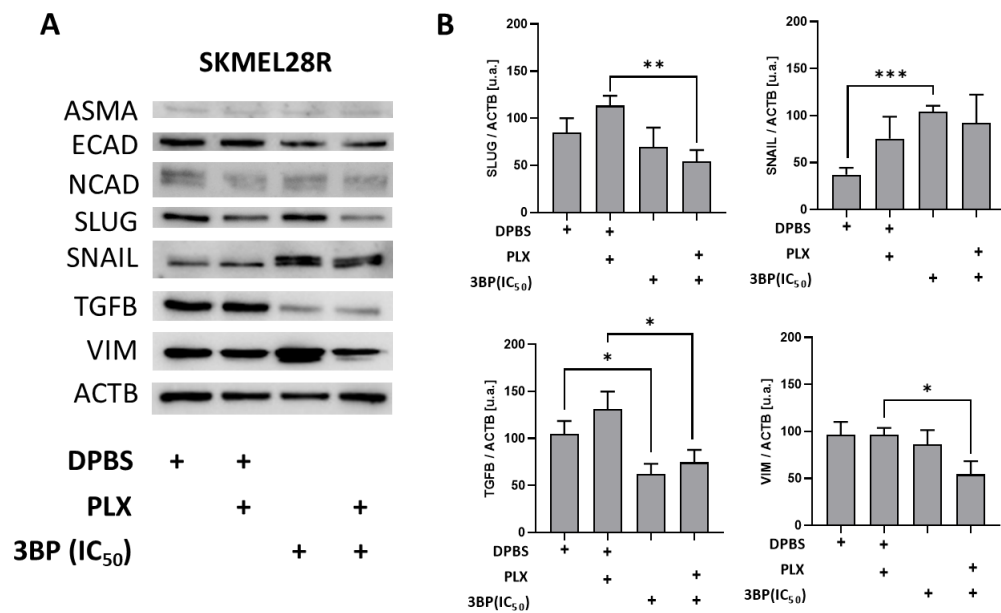


Figura 12 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas à transição epitélio mesenquimal na linhagem SKMEL28R. Resultados obtidos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (80 μ M com 3BP em monoterapia, e 90 μ M com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (6,0 μ M). A. Ensaio de *western blot*. B. Quantificação dos *immunoblots* normalizados pelos níveis de actina beta (ACTB). O eixo y representado como unidades arbitrárias [u.a.]. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimentais. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$.

5.4 O 3BP modula o perfil metabólico e estimula a liberação de ROS em linhagens de melanoma resistentes ao PLX

A fim de determinar possíveis mudanças no perfil metabólico das linhagens celulares após o tratamento com 3BP, foi realizado o ensaio de *western blot* com as células submetidas a tratamento durante 24 horas (Figura 13 e 14). Como resultado, o 3BP, em monoterapia, foi capaz de inibir a expressão da LDH5 em ambas linhagens (com maior efeito na linhagem A375R), bem como aumentar significativamente a expressão de MCT1 na linhagem A375R e a expressão de HK2 na linhagem SKMEL28R. Também foi observado que o tratamento com 3BP foi capaz de aumentar significativamente a expressão de CA9, de maneira independente de PLX. Ainda, o tratamento combinado de 3BP e PLX induziu um aumento na expressão de diversas proteínas metabólicas na linhagem SKMEL28R, entre as quais incluem GLS, GLUT1 e MCT4. Por fim, também foi observado que a retirada de PLX do meio de cultura aumentou a expressão de GLUT1 e MCT4, em ambas linhagens, além de CA9, LDH5 e MCT4, somente na linhagem A375R (Figura suplementar 2 e 3, ANEXO).

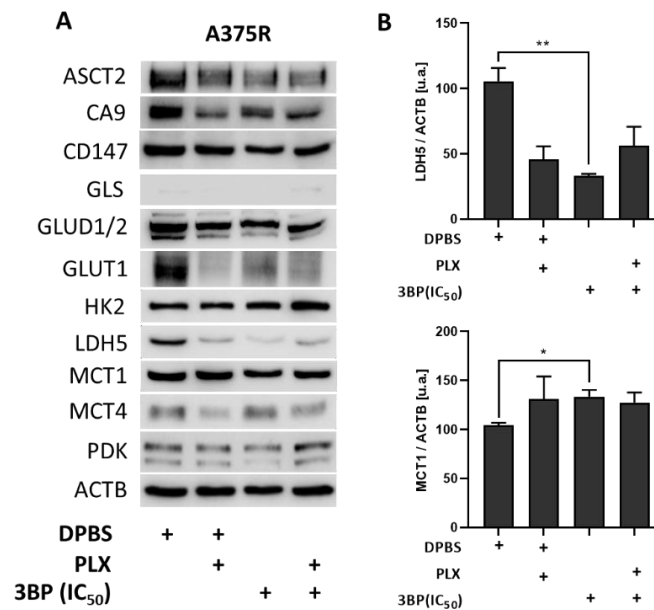


Figura 13 – Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo tumoral na linhagem A375R. Resultados obtidos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M com 3BP em monoterapia, e 45 μ M com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (4,5 μ M). A. Ensaio de *western blot*. B. Quantificação dos *immunoblots* normalizados pelos níveis de actina beta (ACTB). O eixo y representado como unidades arbitrárias [u.a.]. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimentais. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

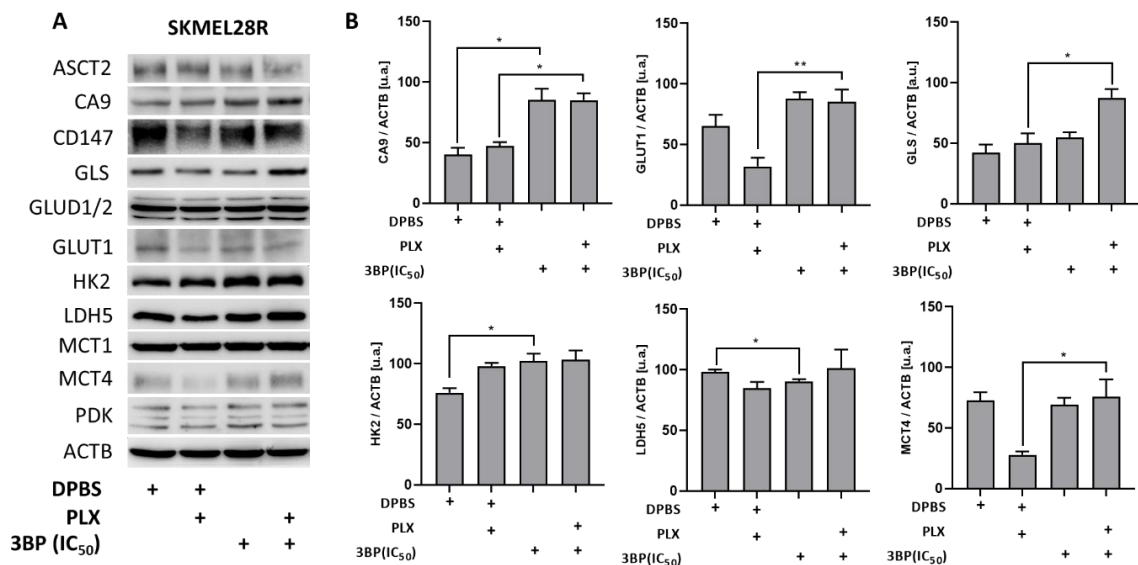


Figura 14 – Avaliação do efeito do 3BP sobre a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo tumoral na linhagem SKMEL28R. Resultados obtidos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (80 μ M com 3BP em monoterapia, e 90 μ M com 3BP em terapia combinada com PLX). Concentração fixa de PLX (6,0 μ M). A. Ensaio de *western blot*. B. Quantificação dos *immunoblots* normalizados pelos níveis de actina beta (ACTB). O eixo y representado como unidades arbitrárias [u.a.]. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimentais. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

A fim de avaliar se as mudanças na expressão de proteínas metabólicas após o tratamento com 3BP refletiam em mudanças no consumo ou produção de glicose e lactato, os níveis extracelulares destes metabólitos foram quantificados. Como resultado, foi visto que o tratamento com 3BP foi capaz de estimular o aumento do influxo de glicose de forma significativa em ambas linhagens, A375R e SKMEL28R (Figura 15). Porém, enquanto a linhagem A375R manteve os seus níveis de lactato extracelular constantes após o tratamento com 3BP, este composto foi capaz de reduzir os níveis deste metabólito de maneira significativa na linhagem SKMEL28R, de maneira independente da presença de PLX (Figura 16).

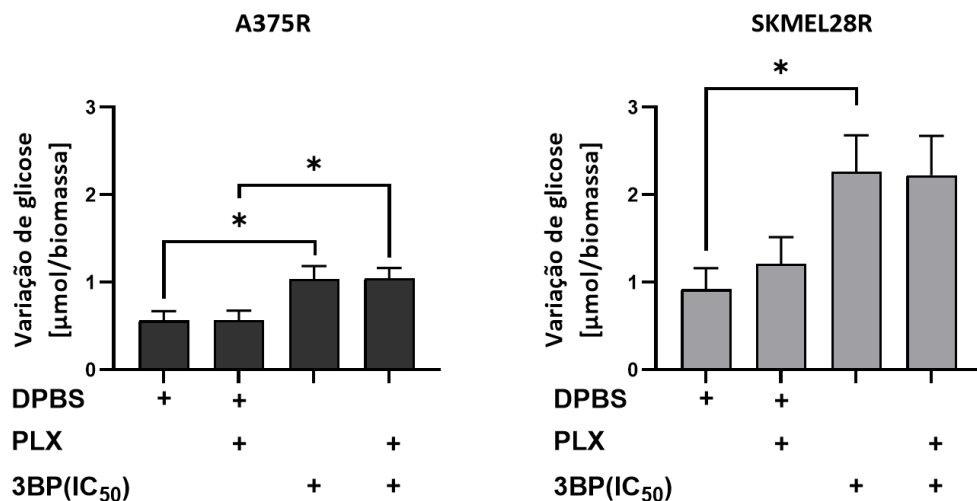


Figura 15 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a variação de glicose extracelular nas linhagens A375R e SKMEL28R. Resultados obtidos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μM em monoterapia e 45 μM em terapia combinada com PLX, para A375R, e 80 μM em monoterapia e 90 μM em terapia combinada com PLX, para SKMEL28R), na presença e ausência de PLX (concentração fixa de 4,5 μM para A375R e 6,0 μM para SKMEL28R). Valores obtidos pela diferença entre a quantidade de glicose inicial e a quantidade de glicose final. Dados apresentados como média ± erro padrão das triplicatas experimental e biológica. * p≤0,05; ** p≤0,01.

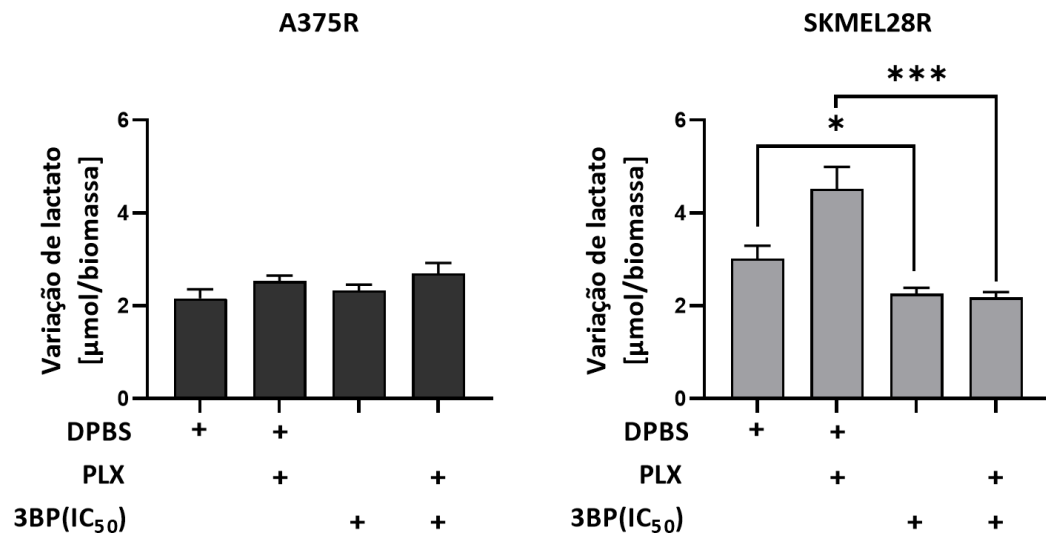


Figura 16 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a variação de lactato extracelular nas linhagens A375R e SKMEL28R. Resultados obtidos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 µM em monoterapia e 45 µM em terapia combinada com PLX, para A375R, e 80 µM em monoterapia e 90 µM em terapia combinada com PLX, para SKMEL28R), na presença e ausência de PLX (concentração fixa de 4,5 µM para A375R e 6,0 µM para SKMEL28R). Valores obtidos pela diferença entre a quantidade de lactato final e quantidade de lactato inicial. Dados apresentados como média ± erro padrão das triplicatas experimental e biológica. * p ≤ 0,05.

Com o objetivo de validar que a variação de glicose extracelular observada após a exposição ao 3BP reflete o aumento no consumo deste metabólito nas linhagens de melanoma estudadas, foi realizado um teste de captação do análogo fluorescente da glicose, 2NBDG (Figura 17). Como resultado, foi observado que, de forma similar ao teste realizado com o kit colorimétrico de quantificação de glicose, ambas as linhagens aumentaram a captação de 2NBDG após exposição ao 3BP. Interessantemente, consoante com os resultados obtidos previamente, a exposição ao 3BP produziu um efeito mais pronunciado na linhagem SKMEL28R do que na linhagem A375R.

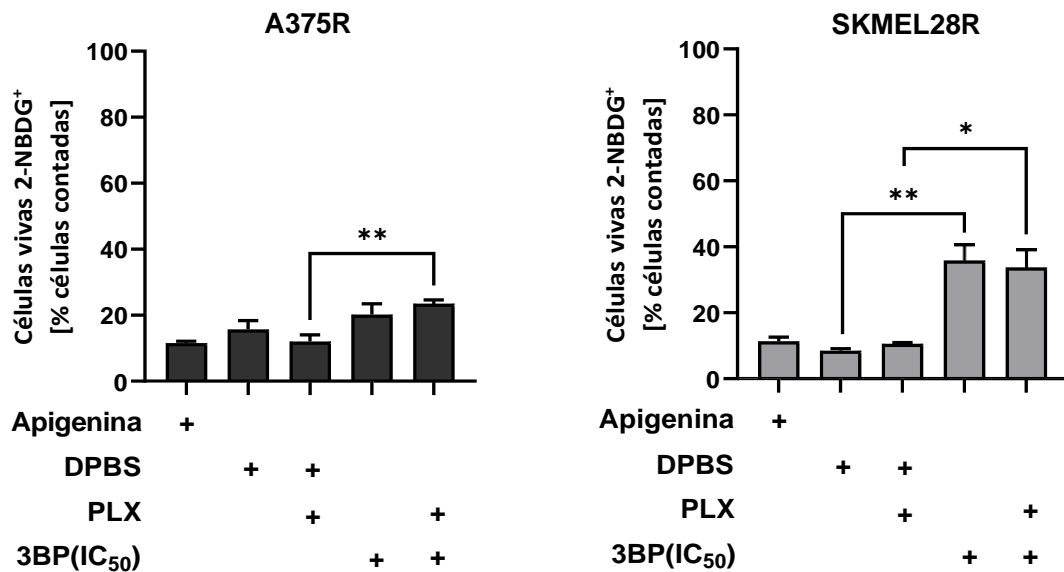


Figura 17 – Avaliação do efeito do 3BP sobre a captação de glicose nas linhagens A375R e SKMEL28R por meio da técnica de incorporação de 2NBDG. Resultados obtidos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M em monoterapia e 45 μ M em terapia combinada com PLX, para A375R, e 80 μ M em monoterapia e 90 μ M em terapia combinada com PLX, para SKMEL28R), na presença e ausência de PLX (concentração fixa de 4,5 μ M para A375R e 6,0 μ M para SKMEL28R). Gráfico representando a porcentagem de células negativamente marcadas para 7AAD (células vivas) e positivamente marcadas com 2NBDG. Controle negativo (apigenina). Dados apresentados como média \pm erro padrão da triplicata biológica. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

Foi realizado um teste com o fluoróforo DHE, a fim de observar o efeito do 3BP sobre a produção de radicais livres nas linhagens de melanoma estudadas (Figura 18). Em tal ensaio, foi visto que a exposição a este composto teve forte influência na produção de ROS na linhagem A375R, sendo este efeito, de maneira similar aos testes de apoptose e migração celular, mais intensos em monoterapia do que em terapia combinada com PLX. Em contrapartida, a linhagem SKMEL28R apresentou forte resistência em produzir ROS após o tratamento com 3BP. De fato, mesmo com o dobro da concentração de antimicina A utilizada na linhagem A375R, somente cerca de 10% das células SKMEL28R tiveram ROS mensurável no controle positivo.

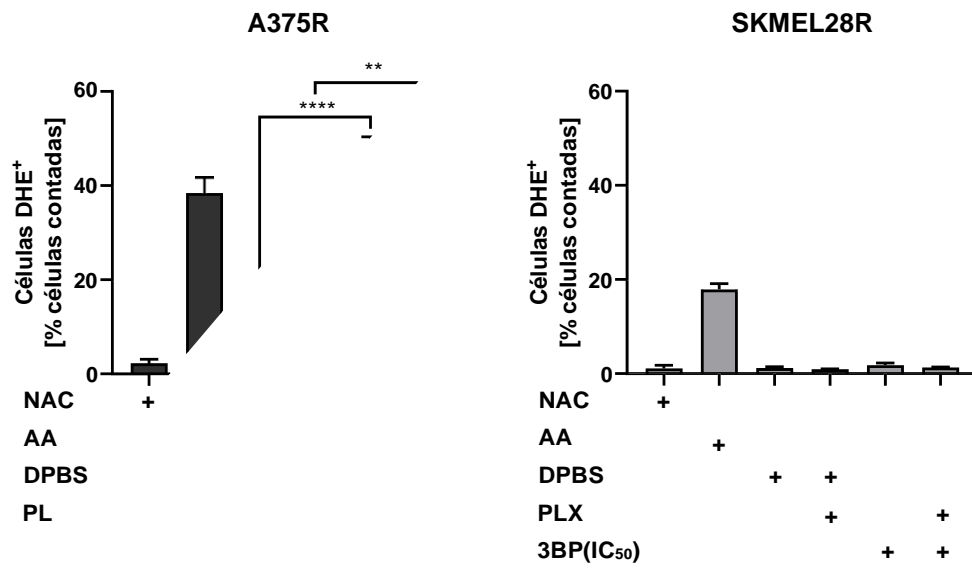


Figura 18 - Avaliação do efeito do 3BP sobre a liberação de espécies reativas de oxigênio nas linhagens A375R e SKMEL28R por meio da técnica de DHE. Gráfico representando a porcentagem de células marcadas positivamente com o marcador DHE após 24 horas de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M em monoterapia e 45 μ M em terapia combinada com PLX, para A375R, e 80 μ M em monoterapia e 90 μ M em terapia combinada com PLX, para SKMEL28R), na presença e ausência de PLX (concentração fixa de 4,5 μ M para A375R e 6,0 μ M para SKMEL28R). Controle negativo NAC (N-acetilcisteína) e controle positivo AA (antimicina A). Dados apresentados como média \pm erro padrão da triplicata biológica. * $p \leq 0,05$; **** $p \leq 0,0001$.

6 DISCUSSÃO

Tumores possuem alta demanda bioenergética e biossintética e, por este motivo, dependem fortemente de vias metabólicas como a glicólise⁹⁵ e a glutaminólise⁹⁶. Tal necessidade é ainda mais pronunciada em tumores quimiorresistentes, uma vez que necessitam de energia para realizar funções dependentes de ATP essenciais para lidar com o estresse na quimioterapia, tais como: aumento do efluxo de toxinas, inativação de moléculas, reparo de DNA, expressão de moléculas anti-apoptóticas, ativação de vias de sobrevivência, ou desregulação de vias de sinalização de fatores de crescimento^{80,81}. Tanto o PLX, fármaco capaz de reduzir a proliferação celular, como o 3BP, um potente inibidor metabólico, agem em vias distintas dos chamados *hallmarks of cancer*³⁵. Para tanto, aproveitando-se da interação já descrita entre vias oncogênicas e metabólicas⁹⁷, neste projeto, foi testada a hipótese de que a combinação de PLX e 3BP pode ser uma estratégia anticâncer relevante no contexto da resistência do melanoma ao PLX. Ao nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo avaliando funcionalmente o efeito da combinação destes dois fármacos em linhagens de melanomas resistentes ao PLX.

A alta carga mutacional é uma característica especialmente presente em melanomas⁹⁸. Esta propriedade, diretamente relacionada à diversidade metabólica, pode impactar na resposta clínica e gerar resistência a fármacos⁹⁹. Para tanto, visando extrapolar os resultados obtidos para tumores com perfis metabólicos distintos, uma caracterização metabólica foi realizada com o objetivo de garantir a diversidade celular. Comparativamente, a linhagem A375R possui uma expressão notavelmente baixa de GLS, sugerindo baixa atividade da via glutaminolítica, enquanto regula positivamente proteínas relacionadas à via glicolítica, tais como GLUT1 e PDK. Em contraste, a linhagem SKMEL28R exibiu um perfil metabólico mais heterogêneo, sem predominância entre estas vias metabólicas, ainda que apresentando, comparativamente, alta expressão de LDH5 e MCT4. Esta distinção parece ter contribuído para uma sensibilidade distinta ao 3BP em monoterapia, em que a diferença de IC₅₀ entre a linhagem SKMEL28R e A375R foi de 1,37x, e em terapia combinada com PLX, em que a diferença foi de 1,85x, após 24 horas de tratamento.

Interessantemente, o efeito do 3BP sobre a viabilidade celular aparenta ocorrer de maneira independente de PLX, uma vez que este composto foi visto inibir a divisão (confirmada pelo ensaio de proliferação e formação de colônias) e incitar a morte celular tanto

quando exposto de maneira isolada ou conjunta ao PLX. De notar, já foi mostrado que o tratamento com esse composto é capaz de induzir a parada do ciclo celular na fase G2/M (do inglês, *second growth / mitosis phase*), em gliomas¹⁰⁰, além de induzir necrose de maneira independente de caspases em células de melanoma⁶⁶. A valer, dado que a apoptose é um processo que demanda energia, concentrações superiores a 60 µM de 3BP foram vistas gerar exclusivamente necrose, devido à depleção completa do ATP celular⁶⁵, corroborando com os resultados descritos.

Importantemente, embora a linhagem A375R tenha mostrado um IC₅₀ inferior em relação à linhagem SKMEL28R, de maneira geral, ambas se mostraram significativamente responsivas ao tratamento com 3BP nos ensaios funcionais realizados. Estes resultados corroboram com os dados de caracterização de expressão proteica que mostrou que as linhagens estudadas apresentam uma alta expressão de MCT1. Esta proteína, bem como sua chaperona (CD147), já provaram ser mecanismos importantes de captação de 3BP, e, portanto, modelam a sensibilidade de células tumorais para esta droga^{59,101}. A alta expressão de MCT1 também foi associada com o aumento do potencial metastático de melanomas, além de uma pior sobrevida geral de pacientes, sugerindo fortemente que este transportador possa ser um biomarcador de agressividade tumoral importante¹⁰², o que, portanto, justifica o uso de 3BP neste tipo de neoplasia.

Diversas vias metabólicas têm correlação intrínseca com a sustentação da EMT em células epiteliais¹⁰³, fenômeno que contribui para um fenótipo mais invasivo e é influenciado diretamente pela via das MAPK¹⁰⁴. Como um inibidor glicolítico, o 3BP é considerado um potencial inibidor de EMT¹⁰⁵, além de inibir proteínas relevantes para o fenótipo invasivo de tumores, como as MMPs (do inglês, *matrix metalloproteinases*)¹⁰⁶. Suportando esta ideia, o tratamento com 3BP reduziu drasticamente o potencial migratório e invasivo das linhagens resistentes ao PLX. No entanto, similar aos ensaios de proliferação e morte celular, a monoterapia com 3BP foi mais efetiva em limitar a migração da linhagem A375R do que sua combinação com PLX. De fato, em contraste com o 3BP como monoterapia, que impediu completamente a migração, mesmo em concentrações menores, a adição de 3BP na presença de PLX não produziu resultados significativos. Interessantemente, o mesmo não foi observado na linhagem SKMEL28R, sugerindo que diferenças metabólicas podem estar envolvidas neste efeito.

Ainda que melanomas BRAF-mutados tenham metabolismo preponderantemente glicolítico, sua exposição a inibidores BRAF/MEK reduzem a glicólise, fazendo-os depender do metabolismo mitocondrial¹⁰⁷. Este efeito foi observado após a remoção do PLX do meio de cultura que gerou um aumento na expressão de proteínas relacionadas à via glicolítica, tais como GLUT1, e MCT4, em ambas linhagens, além de CA9 e LDH5, somente para a linhagem A375R. Dado que o efeito inibitório do 3BP é preponderantemente sobre a glicólise⁷², sugere-se que esta tenha sido a causa para que a monoterapia tenha sido mais efetiva em alguns ensaios, do que a sua combinação com PLX. De fato, condizente com o número de proteínas glicolíticas superexpressas após a retirada do PLX do meio, a linhagem A375R foi a linhagem que mais sofreu com o 3BP em monoterapia. No entanto, interações metabólicas/proliferativas mais complexas podem estar envolvidas na terapia combinada 3BP/PLX, requerendo estudos adicionais para serem melhor compreendidas.

Concordante com os ensaios de migração e invasão, foi observado que o tratamento com o 3BP gerou uma mudança expressiva no perfil de marcadores de EMT nas linhagens estudadas, reduzindo a expressão de fatores pró-mesenquimais, tais como, ASMA, NCAD e SLUG, na linhagem A375R, bem como SLUG, TGFB e VIM, na linhagem SKMEL28R. Contudo, contrapondo a inibição destes fatores, o tratamento com 3BP também foi capaz de superexpressar VIM e regular negativamente ECAD, na linhagem A375R, bem como aumentar a expressão de SNAIL, na linhagem SKMEL28R, eventos associados com a redução da adesão célula-célula e com um fenótipo mais mesenquimal¹⁰⁸. Isto indica que, ainda que o 3BP possa suprimir a agressividade tumoral por meio da inibição de EMT, mecanismos compensatórios podem existir neste processo. A valer, estudos também apontam que a expressão positiva de ECAD pode ativar EGFR (do inglês, *epidermal growth factor receptor*), estimulando as vias de sinalização PI3K (do inglês, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*) e MAPK¹⁰⁹⁻¹¹¹, sugerindo que sua inibição após o tratamento com 3BP possa ser um fator positivo contra a progressão tumoral, bem como que outros fatores possam estar envolvidos neste contexto.

Notavelmente, o tratamento com 3BP induziu um aumento no consumo de glicose em ambas linhagens estudadas. Tal resultado, avaliado por duas metodologias distintas, a princípio, vai de encontro à atividade inibitória já descrita para este composto sobre a HK2⁷², enzima que facilita a metabolização da glicose no interior da célula¹¹². No entanto, estudos apontam que, apesar do aumento da expressão desta enzima potencializar o efeito do 3BP em linhagens tumorais, o seu silenciamento não é suficiente para alterar a sensibilidade para

este fármaco¹¹³. Além disso, um não consenso quanto à inibição da HK2 causada pelo 3BP¹¹⁴, bem como a existência de outras isoformas compensatórias¹¹⁵ pode indicar que fatores adicionais podem estar envolvidos na atividade do 3BP sobre esta enzima. De fato, no presente estudo, a linhagem SKMEL28R apresentou um aumento na expressão de HK2 após o tratamento com 3BP, corroborando com seu consumo de glicose elevado após exposição a este composto. Neste sentido, similar a estudos já desenvolvidos com metformina (um inibidor metabólico do complexo mitocondrial I)^{116,117}, sugere-se que a perturbação metabólica ocasionada pelo tratamento com 3BP possa aumentar a produção de fatores como o AMPK (do inglês, *adenosine monophosphate - activated protein kinase*), o que foi visto desencadear o aumento no consumo de glicose, bem como a redução da proliferação, resultados também encontrados no presente trabalho¹¹⁸.

Também foi visto que o tratamento com 3BP induziu uma redução na quantidade de lactato extracelular na linhagem SKMEL28R. Este resultado, já descrito anteriormente para este composto¹¹⁹, está de acordo com a redução da expressão de LDH5 também observada nas duas linhagens estudadas, indicando que o 3BP foi capaz de reduzir a produção de lactato nesta célula. No entanto, estudos apontam que, ainda que o exporte de lactato seja prejudicado pelo 3BP, um aumento na quantidade de lactato intracelular foi encontrado após o tratamento com este composto, indicando um possível prejuízo no transporte deste metabólito através das membranas¹¹⁴. De fato, mesmo que o exporte de lactato tenha sido prejudicado nesta mesma linhagem, no presente estudo foi observado um aumento na expressão de várias enzimas glicolíticas após sua exposição ao 3BP. Interessantemente, todas enzimas reguladas positivamente na linhagem SKMEL28R são estimuladas por HIF1A (do inglês, *hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*)¹²⁰, um regulador de vários genes relacionados à hipóxia e glicólise em melanomas⁴⁴. O HIF1A, já reportado ser constitutivamente ativo em melanomas^{121,122}, apresenta um mecanismo de ação altamente complexo⁹, podendo ser inclusive expresso pela ativação aberrante da via das MAPK¹²². Na verdade, ROS também são capazes de ativar e controlar a ação de HIF1A¹²⁰, apontando o 3BP como um potencial ativador deste regulador transcricional. Neste sentido, dada a capacidade de HIF1A em reprogramar o metabolismo tumoral, também por interação com AMPK¹²³, sugere-se que a superexpressão da via glicolítica, combinada ao menor exporte de lactato na linhagem SKMEL28R, seja um mecanismo compensatório ocasionado pelo dano do 3BP à mitocôndria (processo mimético ao efeito Pasteur¹²⁴) concomitante à inibição da LDH5. Corroborando com esta ideia, foi visto

que o 3BP aumentou a expressão de CA9 de maneira independente de PLX, uma enzima que, além de sofrer ação direta pela HIF1A, também é considerada um marcador de hipóxia importante em tumores^{125,126}.

Outro mecanismo de ação do 3BP é a produção de ROS através da inibição da SDH/complexo II¹²⁷ e depleção de GSH livre⁶⁵⁻⁷⁰. Espécies reativas são um fator essencial de sinalização celular, permitindo desde o aumento da sobrevivência e proliferação tumoral, através da ativação de vias como das MAPK, até a morte celular, por meio da oxidação de macromoléculas e ativação de vias apoptóticas, a depender da concentração, tempo de exposição, tipo e contexto celular¹¹⁹. A linhagem SKMEL28R encontra vantagem em relação à A375R nesse contexto, dada sua expressão aumentada de GLS. Esta enzima, associada à resistência a quimioterápicos^{128,129}, é limitante no processo da glutaminólise e é essencial para a produção de GSH¹³⁰. Por sua vez, níveis de GSH livre são essenciais para proteger as organelas celulares contra ROS excessivo e estão associadas com resistência ao 3BP⁶⁶. Corroborando com estes fatos, foi observado que a linhagem A375R produziu níveis significativos de espécies reativas após a exposição ao 3BP de maneira independente de PLX, o que indica que o principal mecanismo deste composto sobre esta linhagem possivelmente esteja baseado na geração de estresse oxidativo. Em contrapartida, a linhagem SKMEL28R não produziu nenhuma mudança em seus níveis de ROS nas mesmas condições, indicando que, como discutido anteriormente, necrose por depleção energética possivelmente seja o principal mecanismo de ação do 3BP nesta linhagem.

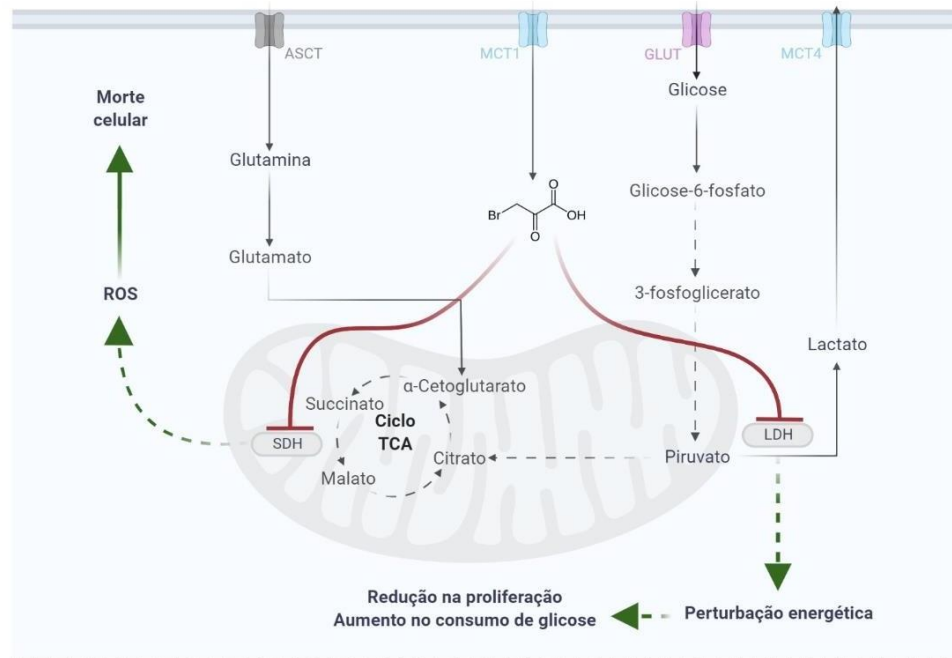
Como limitação deste estudo, é importante destacar que, apesar do foco do estudo ser o contexto da resistência ao PLX, devido à presença de micoplasma em uma das linhagens parentais originárias e dada a possibilidade deste contaminante interferir no perfil metabólico das mesmas, foi decidido não realizar estudos comparativos entre os pares resistentes/parentais. Além disso, é de fundamental importância destacar que ambas as linhagens estudadas não foram obtidas de amostras de melanomas resistentes ao PLX. Como a resistência a esta droga foi alcançada pela contínua exposição de linhagens estabelecidas ao PLX, este antineoplásico foi mantido em meio de cultura durante todo o período de cultivo celular a fim de evitar a perda de seu fenótipo de resistência. Esta exposição contínua parece ter contribuído para um fenótipo mais agressivo após um período de 24 horas na ausência de PLX (grupo controle - DPBS). Tal efeito, caracterizado por um aumento da viabilidade, proliferação, formação de colônias e migração celular, indica que a presença de PLX restringiu

a agressividade tumoral destas células, além de sugerir que estas não se tornaram dependentes desta droga. Este achado vai de encontro à literatura que destaca o papel de pausas no tratamento com PLX em melanomas com resistência adquirida como uma ferramenta para reduzir o crescimento tumoral devido à dependência desses tumores do PLX¹³¹⁻¹³³. Assim, de maneira geral, os resultados obtidos no presente estudo apontam que o uso de células primárias, bem como um período prolongado de incubação na ausência de PLX podem ser fatores relevantes na construção de um modelo de estudo viável sobre a dependência de melanomas ao PLX. De notar, embora a ressensibilização à droga após a interrupção do tratamento seja encontrada *in vitro*, os mesmos resultados são dificilmente reproduzíveis *in vivo*¹³⁴, demonstrando que mais investigações são necessárias para desvendar aspectos relevantes para este tópico.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo traz esclarecimentos sobre possíveis mecanismos de ação de um agente antimetabólico em linhagens de melanoma resistentes ao PLX (Figura 19). Dado o potencial do 3BP em depletar energeticamente a célula, respostas como redução da capacidade proliferativa, indução de necrose e desregulação de enzimas referentes a EMT, fator que certamente contribui para o seu potencial em impedir a agressividade tumoral, foram encontrados após o tratamento com esta droga. Além disso, os resultados obtidos mostram que uma caracterização metabólica é um passo primordial no rastreamento de pacientes que se beneficiem do uso do 3BP. Fatores como a atividade glutaminolítica e presença de antioxidantes demonstraram ser fatores associados à resistência ao tratamento com este composto devido ao alto potencial do 3BP em gerar estresse oxidativo, podendo servir como potenciais marcadores na determinação da responsividade em melanomas resistentes ao PLX. No entanto, de maneira geral, a monoterapia com 3BP se mostrou similar, se não mais eficaz, que a terapia combinada com PLX. Tais resultados, atribuídos à potencialização do metabolismo glicolítico ocasionada pela ausência do PLX e consequente sensibilização destas células ao 3BP, a depender da linhagem estudada, mostram como a monoterapia com 3BP pode ser uma alternativa promissora contra melanomas altamente agressivos resistentes ao PLX, porém existe a necessidade de mais estudos a fim de otimizar todo o potencial desta droga.

Linhagem A375R



Linhagem SKMEL28R

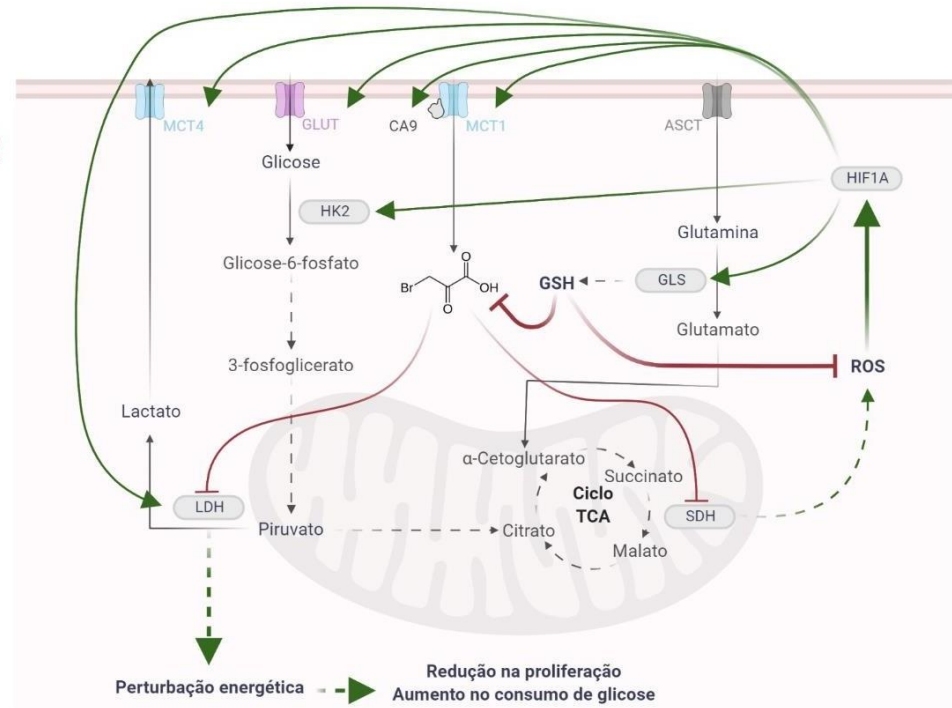


Figura 19 - Esquema dos diferentes possíveis mecanismos de ação do 3BP sobre as linhagens A375R e SKMEL28R. Dada a possível redução na atividade glutaminolítica na linhagem A375R, o 3BP é captado por meio do MCT1 e age livremente inibindo a expressão de LDH (*lactate dehydrogenase*), consequentemente inibindo a sua proliferação, e gerando morte celular, devido à grande quantidade de ROS produzida. A linhagem SKMEL28R, em contrapartida, dada sua expressão normalizada de GLS (*glutaminase*), possivelmente possui uma síntese normalizada de GSH (*glutathione + hidrogen*) que, por consequência, inibe a ação de 3BP. Com sua ação reduzida, o 3BP também é capaz de reduzir expressão de LDH, inibindo a proliferação da linhagem SKMEL28R, no entanto, produz menor quantidade de ROS induzindo uma série de mecanismos compensatórios, tais como o aumento na expressão de proteínas glicolíticas e glutaminolíticas.

REFERÊNCIAS

1. Tyrrell, H. and Payne, M. Combatting mucosal melanoma: recent advances and future perspectives. **Melanoma Management**. vol. 5, no. 3. p. MMT11. Sep. 2018. doi: 10.2217/mmt-2018-0003.
2. Erdmann, F. *et al.* International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008-are recent generations at higher or lower risk? **International Journal of Cancer**. vol. 132, no. 2. pp. 385–400. Jan. 2013. doi: 10.1002/ijc.27616.
3. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**. vol. 71, no. 3. pp. 209–249. May 2021. doi: 10.3322/caac.21660.
4. IARC Publications Website - Cancer Today (powered by GLOBOCAN 2018). <https://publications.iarc.fr/Databases/Iarc-Cancerbases/Cancer-Today-Powered-By-GLOBOCAN-2018--2018> (accessed Jun. 16, 2021).
5. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer. <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil> (accessed Jun. 16, 2021).
6. B, D., JM, L., P, S., and H, P. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and therapy**. vol. 7. pp. 35–49. Jun. 2018. doi: 10.2147/ITT.S134842.
7. R, D., A, H., N, L., G, P., and U, K. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**. vol. 26 Suppl 5. pp. v126–v132. Sep. 2015. doi: 10.1093/ANNONC/MDV297.
8. Guan, J., Gupta, R., and Filipp, F. V. Cancer systems biology of TCGA SKCM: Efficient detection of genomic drivers in melanoma. **Scientific Reports 2015 5:1**. vol. 5, no. 1. pp. 1–10. Jan. 2015. doi: 10.1038/srep07857.
9. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer 2003 3:10**. vol. 3, no. 10. pp. 721–732. 2003. doi: 10.1038/nrc1187.
10. Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**. vol. 417, no. 6892. pp. 949–954. Jun. 2002.
11. Holderfield, M., Deuker, M. M., McCormick, F., and McMahon, M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond, **Nature Reviews Cancer**, vol. 14, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 455–467, 2014, doi: 10.1038/nrc3760.
12. Bollag, G. *et al.* Vemurafenib: The first drug approved for BRAF-mutant cancer, **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 11, no. 11. Nature Publishing Group, pp. 873–886, Nov. 12, 2012, doi: 10.1038/nrd3847.
13. Bollag, G. *et al.* Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. **Nature**. vol. 467, no. 7315. pp. 596–599. Sep. 2010. doi: 10.1038/nature09454.

14. Chapman, P. B. *et al.* Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. **New England Journal of Medicine**. vol. 364, no. 26. pp. 2507–2516. Jun. 2011. doi: 10.1056/NEJMoa1103782.
15. Luebker, S. A. and Koepsell, S. A. Diverse Mechanisms of BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma Identified in Clinical and Preclinical Studies. **Frontiers in Oncology**. vol. 9, no. MAR. p. 268. Apr. 2019. doi: 10.3389/fonc.2019.00268.
16. Nazarian, R. *et al.* Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. **Nature**. vol. 468, no. 7326. pp. 973–977. Dec. 2010. doi: 10.1038/nature09626.
17. Montagut, C. *et al.* Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. **Cancer Research**. vol. 68, no. 12. pp. 4853–4861. Jun. 2008. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6787.
18. Johannessen, C. M. *et al.* COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. **Nature**. vol. 468, no. 7326. pp. 968–972. Dec. 2010. doi: 10.1038/nature09627.
19. Villanueva, J. *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**. vol. 18, no. 6. pp. 683–695. Dec. 2010. doi: 10.1016/j.ccr.2010.11.023.
20. Johnson, D. B. *et al.* Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. **European Journal of Cancer**. vol. 51, no. 18. pp. 2792–2799. Dec. 2015. doi: 10.1016/j.ejca.2015.08.022.
21. Long, G. V. *et al.* Combined BRAF and MEK Inhibition versus BRAF Inhibition Alone in Melanoma. **New England Journal of Medicine**. vol. 371, no. 20. pp. 1877–1888. Nov. 2014. doi: 10.1056/NEJMoa1406037.
22. Robert, C. *et al.* Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**. vol. 381, no. 7. pp. 626–636. Aug. 2019. doi: 10.1056/NEJMoa1904059.
23. Larkin, J. *et al.* Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutated Melanoma. **New England Journal of Medicine**. vol. 371, no. 20. pp. 1867–1876. Nov. 2014. doi: 10.1056/NEJMoa1408868.
24. Weber, J. *et al.* Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. **New England Journal of Medicine**. vol. 377, no. 19. pp. 1824–1835. Nov. 2017. doi: 10.1056/NEJMoa1709030.
25. Robert, C. *et al.* Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. **New England Journal of Medicine**. vol. 372, no. 26. pp. 2521–2532. Jun. 2015. doi: 10.1056/NEJMoa1503093.
26. Hodi, F. S. *et al.* Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. **New England Journal of Medicine**. vol. 363, no. 8. pp. 711–723. Aug. 2010. doi: 10.1056/NEJMoa1003466.
27. Menzies, A. M. *et al.* Pathological response and survival with neoadjuvant therapy in melanoma: a pooled analysis from the International Neoadjuvant Melanoma Consortium (INMC). **Nature Medicine** 2021 27:2. vol. 27, no. 2. pp. 301–309. Feb. 2021. doi: 10.1038/s41591-020-01188-3.

28. Seth, R. *et al.* Systemic Therapy for Melanoma: ASCO Guideline. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00198>. vol. 38, no. 33. pp. 3947–3970. Mar. 2020. doi: 10.1200/JCO.20.00198.
29. Gowrishankar, K. *et al.* Acquired resistance to BRAF inhibition can confer cross-resistance to combined BRAF/MEK inhibition. **Journal of Investigative Dermatology**. vol. 132, no. 7. pp. 1850–1859. Jul. 2012. doi: 10.1038/jid.2012.63.
30. Long, G. V. *et al.* Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. **Nature Communications**. vol. 5. 2014. doi: 10.1038/ncomms6694.
31. Larkin, J. *et al.* Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. **New England Journal of Medicine**. vol. 373, no. 1. pp. 23–34. Jul. 2015. doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
32. Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. Why do cancers have high aerobic glycolysis?, **Nature Reviews Cancer**, vol. 4, no. 11. Nat Rev Cancer, pp. 891–899, Nov. 2004, doi: 10.1038/nrc1478.
33. Hall, A. *et al.* Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the V600EBRAF oncogene. **Oncotarget**. vol. 4, no. 4. pp. 584–599. 2013. doi: 10.18632/oncotarget.965.
34. Pinheiro, C. *et al.* The metabolic microenvironment of melanomas: Prognostic value of MCT1 and MCT4. **Cell Cycle**. vol. 15, no. 11. pp. 1462–1470. Jun. 2016. doi: 10.1080/15384101.2016.1175258.
35. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation, **Cell**, vol. 144, no. 5. Elsevier, pp. 646–674, Mar. 04, 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
36. Almuhaideb, A., Papathanasiou, N., and Bomanji, J. 18F-FDG PET/CT Imaging In Oncology. **Annals of Saudi Medicine**. vol. 31, no. 1. pp. 3–13. Jan. 2011. doi: 10.4103/0256-4947.75771.
37. Hersey, P., Watts, R. N., Zhang, X. D., and Hackett, J. Metabolic Approaches to Treatment of Melanoma. **Clinical Cancer Research**. vol. 15, no. 21. pp. 6490–6494. Nov. 2009. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0251.
38. Vander Heiden, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nature reviews. Drug discovery**. vol. 10, no. 9. pp. 671–84. Aug. 2011. doi: 10.1038/nrd3504.
39. Hersey, P., Watts, R. N., Xu, D. Z., and Hackett, J. Metabolic approaches to treatment of melanoma, **Clinical Cancer Research**, vol. 15, no. 21. Clin Cancer Res, pp. 6490–6494, Nov. 01, 2009, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0251.
40. Y, Z., EB, B., and M, T. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. **Cell death & disease**. vol. 4, no. 3. Mar. 2013. doi: 10.1038/CDDIS.2013.60.
41. Hardeman, K. N. *et al.* Dependence on Glycolysis Sensitizes BRAF-mutated Melanomas for Increased Response to Targeted BRAF Inhibition. **Scientific Reports**. vol. 7. Feb. 2017. doi: 10.1038/srep42604.
42. Hernandez-Davies, J. E. *et al.* Vemurafenib resistance reprograms melanoma cells towards glutamine dependence. **Journal of Translational Medicine** 2015 13:1. vol. 13, no. 1. pp. 1–11. Jul. 2015. doi: 10.1186/S12967-015-0581-2.

43. P, C.-R. *et al.* Mitochondrial oxidative stress is the Achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. **Oncotarget**. vol. 4, no. 11. pp. 1986–1998. 2013. doi: 10.18632/ONCOTARGET.1420.
44. Avagliano, A. *et al.* Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment. **Frontiers in Oncology**. vol. 0. p. 722. May 2020. doi: 10.3389/FONC.2020.00722.
45. Baenke, F. *et al.* Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. **Molecular Oncology**. vol. 10, no. 1. pp. 73–84. Jan. 2016. doi: 10.1016/j.molonc.2015.08.003.
46. Parmenter, T. J. *et al.* Response of BRAF-mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. **Cancer Discovery**. vol. 4, no. 4. pp. 423–433. 2014. doi: 10.1158/2159-8290.CD-13-0440.
47. Halestrap, A. P. The SLC16 gene family-Structure, role and regulation in health and disease, **Molecular Aspects of Medicine**, vol. 34, no. 2–3. Mol Aspects Med, pp. 337–349, Apr. 2013, doi: 10.1016/j.mam.2012.05.003.
48. Baltazar, F. *et al.* Monocarboxylate transporters as targets and mediators in cancer therapy response, **Histology and Histopathology**, vol. 29, no. 12. Histology and Histopathology, pp. 1511–1524, Dec.01, 2014, doi: 10.14670/HH-29.1511.
49. Baltazar, F., Afonso, J., Costa, M., and Granja, S. Lactate Beyond a Waste Metabolite: Metabolic Affairs and Signaling in Malignancy, **Frontiers in Oncology**, vol. 10. Frontiers Media S.A., p. 231, Mar. 18, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00231.
50. Leu, M. *et al.* Monocarboxylate transporter-1 (MCT1) protein expression in head and neck cancer affects clinical outcome. **Scientific Reports**. vol. 11, no. 1. p. 4578. Dec. 2021. doi: 10.1038/s41598-021-84019-w.
51. Polanski, R. *et al.* Activity of the monocarboxylate transporter 1 inhibitor azd3965 in small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**. vol. 20, no. 4. pp. 926–937. 2014. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2270.
52. McNeillis, R. *et al.* A case of malignant hyperlactaemic acidosis appearing upon treatment with the mono-carboxylase transporter 1 inhibitor AZD3965. **British Journal of Cancer**. vol. 122, no. 8. pp. 1141–1145. Apr. 2020. doi: 10.1038/s41416-020-0727-8.
53. Plummer, R. *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. **Annals of Oncology**. vol. 29. p. iii9. Mar. 2018. doi: 10.1093/annonc/mdy048.008.
54. Zhu, J. and Thompson, C. B. Metabolic regulation of cell growth and proliferation, **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 20, no. 7. Nature Publishing Group, pp. 436–450, Jul. 01, 2019, doi: 10.1038/s41580-019-0123-5.
55. Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., and Pouyssegur, J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: A common feature in cancer. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. vol. 14, no. 4. pp. 771–794. Apr. 2010. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00994.x.

56. Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A., and Mueller-Klieser, W. Lactate: A metabolic key player in cancer, **Cancer Research**, vol. 71, no. 22. American Association for Cancer Research, pp. 6921–6925, Nov. 15, 2011, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.
57. Granja, S., Pinheiro, C., Reis, R., Martinho, O., and Baltazar, F. Glucose addiction in cancer therapy: advances and drawbacks. **Current Drug Metabolism**. vol. 16, no. 3. pp. 221–242. Aug. 2015. doi: 10.2174/1389200216666150602145145.
58. Puri, S. and Juvele, K. Monocarboxylate transporter 1 and 4 inhibitors as potential therapeutics for treating solid tumours: A review with structure-activity relationship insights, **European journal of medicinal chemistry**, vol. 199. NLM (Medline), p. 112393, Aug. 01, 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112393.
59. Birsoy, K. *et al.* MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors. **Nature Genetics**. vol. 45, no. 1. pp. 104–108. Jan. 2013. doi: 10.1038/ng.2471.
60. Shoshan, M. C. 3-bromopyruvate: Targets and outcomes, **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, vol. 44, no. 1. J Bioenerg Biomembr, pp. 7–15, Feb. 2012, doi: 10.1007/s10863-012-9419-2.
61. Ganapathy-Kanniappan, S., Kunjithapatham, R., and Geschwind, J. F. Anticancer efficacy of the metabolic blocker 3-bromopyruvate: Specific molecular targeting. **Anticancer Research**. vol. 33, no. 1. pp. 13–20. Jan. 2013.
62. AP, P. da S. *et al.* Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. **The Biochemical journal**. vol. 417, no. 3. pp. 717–726. Feb. 2009. doi: 10.1042/BJ20080805.
63. Korotchkina, L. G., Showkat Ali, M., and Patel, M. S. Involvement of α -cysteine-62 and β -tryptophan-135 in human pyruvate dehydrogenase catalysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. vol. 369, no. 2. pp. 277–287. Sep. 1999. doi: 10.1006/abbi.1999.1364.
64. Jardim-Messeder, D. and Moreira-Pacheco, F. 3-Bromopyruvic Acid Inhibits Tricarboxylic Acid Cycle and Glutaminolysis in HepG2 Cells. **Anticancer research**. vol. 36, no. 5. pp. 2233–2241. May 2016.
65. Calviño, E. *et al.* Regulation of death induction and chemosensitizing action of 3-bromopyruvate in myeloid leukemia cells: Energy depletion, oxidative stress, and protein kinase activity modulations. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. vol. 348, no. 2. pp. 324–335. Feb. 2014. doi: 10.1124/jpet.113.206714.
66. Qin, J. Z., Xin, H., and Nickoloff, B. J. 3-Bromopyruvate induces necrotic cell death in sensitive melanoma cell lines. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. vol. 396, no. 2. pp. 495–500. May 2010. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.04.126.
67. Kwiatkowska, E. *et al.* Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. vol. 48, no. 1. pp. 23–32. Feb. 2016. doi: 10.1007/s10863-015-9637-5.
68. Valenti, D., Vacca, R. A., and de Bari, L. 3-Bromopyruvate induces rapid human prostate cancer cell death by affecting cell energy metabolism, GSH pool and the glyoxalase system. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. vol. 47, no. 6. pp. 493–506. Dec. 2015. doi: 10.1007/s10863-015-9631-y.

69. Attia, Y. M., EL-Abhar, H. S., Al Marzabani, M. M., and Shouman, S. A. Targeting glycolysis by 3-bromopyruvate improves tamoxifen cytotoxicity of breast cancer cell lines. **BMC Cancer**. vol. 15, no. 1. Nov. 2015. doi: 10.1186/s12885-015-1850-4.
70. Yadav, S. *et al.* Antitumor and chemosensitizing action of 3-bromopyruvate: Implication of deregulated metabolism. **Chemico-Biological Interactions**. vol. 270. pp. 73–89. May 2017. doi: 10.1016/j.cbi.2017.04.015.
71. J, A.-S. *et al.* The anticancer agent 3-bromopyruvate: a simple but powerful molecule taken from the lab to the bedside. **Journal of bioenergetics and biomembranes**. vol. 48, no. 4. pp. 349–362. Aug. 2016. doi: 10.1007/S10863-016-9670-Z.
72. Fan, T. *et al.* Tumor energy metabolism and potential of 3-bromopyruvate as an inhibitor of aerobic Glycolysis: Implications in tumor treatment, **Cancers**, vol. 11, no. 3. MDPI AG, Mar. 01, 2019, doi: 10.3390/cancers11030317.
73. Mathupala, S. P., Ko, Y. H., and Pedersen, P. L. Hexokinase-2 bound to mitochondria: Cancer’s stygian link to the “Warburg effect” and a pivotal target for effective therapy, **Seminars in Cancer Biology**, vol. 19, no. 1. NIH Public Access, pp. 17–24, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.semcancer.2008.11.006.
74. Schafer, Z. T. *et al.* Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. **Nature**. vol. 461, no. 7260. pp. 109–113. Sep. 2009. doi: 10.1038/nature08268.
75. Denicola, G. M. *et al.* Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. **Nature**. vol. 475, no. 7354. pp. 106–110. Jul. 2011. doi: 10.1038/nature10189.
76. Sayin, V. I. *et al.* Cancer: Antioxidants accelerate lung cancer progression in mice. **Science Translational Medicine**. vol. 6, no. 221. Jan. 2014. doi: 10.1126/scitranslmed.3007653.
77. Harris, I. S. *et al.* Glutathione and Thioredoxin Antioxidant Pathways Synergize to Drive Cancer Initiation and Progression. **Cancer Cell**. vol. 27, no. 2. pp. 211–222. Feb. 2015. doi: 10.1016/j.ccell.2014.11.019.
78. Piskounova, E. *et al.* Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. **Nature**. vol. 527, no. 7577. pp. 186–191. Nov. 2015. doi: 10.1038/nature15726.
79. Reczek, C. R. and Chandel, N. S. The two faces of reactive oxygen species in cancer. **Annual Review of Cancer Biology**. vol. 1. pp. 79–98. Mar. 2017. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808.
80. Longley, D. B. and Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance, **Journal of Pathology**, vol. 205, no. 2. J Pathol, pp. 275–292, Jan. 2005, doi: 10.1002/path.1706.
81. Wilson, T. R., Longley, D. B., and Johnston, P. G. Chemoresistance in solid tumours. **Annals of Oncology**. vol. 17, no. SUPPL. 10. Sep. 2006. doi: 10.1093/annonc/mdl280.
82. Nakano, A. *et al.* Glycolysis inhibition inactivates ABC transporters to restore drug sensitivity in malignant cells. **PLoS ONE**. vol. 6, no. 11. Nov. 2011. doi: 10.1371/journal.pone.0027222.
83. Xu, R. H. *et al.* Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. **Cancer Research**. vol. 65, no. 2. pp. 613–621. Jan. 2005.

84. Cao, X. *et al.* Synergistic antipancreatic tumor effect by simultaneously targeting hypoxic cancer cells with HSP90 inhibitor and glycolysis inhibitor. **Clinical Cancer Research**. vol. 14, no. 6. pp. 1831–1839. Mar. 2008. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1607.
85. Zhou, Y. *et al.* Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells. **Cancer Research**. vol. 72, no. 1. pp. 304–314. Jan. 2012. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1674.
86. Ko, Y. H. *et al.* A translational study “case report” on the small molecule “energy blocker” 3-bromopyruvate (3BP) as a potent anticancer agent: From bench side to bedside. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. vol. 44, no. 1. pp. 163–170. Feb. 2012. doi: 10.1007/s10863-012-9417-4.
87. Ko, Y. H. *et al.* Advanced cancers: Eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. vol. 324, no. 1. pp. 269–275. Nov. 2004. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.09.047.
88. Sandri, S. *et al.* Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. **Pharmacological Research**. vol. 111. pp. 523–533. Sep. 2016. doi: 10.1016/j.phrs.2016.07.017.
89. Faião-Flores, F. *et al.* Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. **Oncogene**. vol. 36, no. 13. pp. 1849–1861. Mar. 2017. doi: 10.1038/onc.2016.348.
90. Sandri, S. *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase in melanoma progression and BRAF inhibitor resistance. **Pharmacological Research**. vol. 159. p. 104998. Sep. 2020. doi: 10.1016/J.PHRS.2020.104998.
91. Dirks, W. G., Faehnrich, S., Estella, I. A. J., and Drexler, H. G. Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. **ALTEX**. vol. 22, no. 2. pp. 103–109. 2005.
92. Silva-Oliveira, R. J. *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. **Cellular Oncology**. vol. 39, no. 3. pp. 253–263. Jun. 2016. doi: 10.1007/s13402-016-0270-z.
93. Miranda-Gonçalves, V. *et al.* Monocarboxylate transporters (MCTs) in gliomas: expression and exploitation as therapeutic targets. **Neuro-Oncology**. vol. 15, no. 2. pp. 172–188. Dec. 2012. doi: 10.1093/neuonc/nos298.
94. Morais-Santos, F. *et al.* Differential sensitivities to lactate transport inhibitors of breast cancer cell lines. **Endocrine-Related Cancer**. vol. 21, no. 1. pp. 27–38. Feb. 2014. doi: 10.1530/ERC-13-0132.
95. Ganapathy-Kanniappan, S. and Geschwind, J. F. H. Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: Progress and prospects, **Molecular Cancer**, vol. 12, no. 1. BioMed Central, pp. 1–11, Dec. 03, 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-152.
96. Wang, Z. *et al.* Targeting Glutaminolysis: New Perspectives to Understand Cancer Development and Novel Strategies for Potential Target Therapies, **Frontiers in Oncology**, vol. 10. Frontiers Media S.A., p. 2321, Oct. 26, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.589508.

97. Papa, S., Choy, P. M., and Bubici, C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming, **Oncogene**, vol. 38, no. 13. Nature Publishing Group, pp. 2223–2240, Mar. 28, 2019, doi: 10.1038/s41388-018-0582-8.
98. Lawrence, M. S. *et al.* Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. **Nature**. vol. 499, no. 7457. pp. 214–218. Jun. 2013. doi: 10.1038/nature12213.
99. Sinkala, M., Mulder, N., and Patrick Martin, D. Metabolic gene alterations impact the clinical aggressiveness and drug responses of 32 human cancers. **Communications Biology**. vol. 2, no. 1. pp. 1–14. Dec. 2019. doi: 10.1038/s42003-019-0666-1.
100. Xu, D. Q. *et al.* 3-Bromopyruvate inhibits cell proliferation and induces apoptosis in CD133+ population in human glioma. **Tumor Biology**. vol. 37, no. 3. pp. 3543–3548. Mar. 2016. doi: 10.1007/s13277-015-3884-2.
101. Azevedo-Silva, J. Ã. *et al.* The cytotoxicity of 3-bromopyruvate in breast cancer cells depends on extracellular pH. **Biochemical Journal**. vol. 467, no. 2. pp. 247–258. Apr. 2015. doi: 10.1042/BJ20140921.
102. Tasdogan, A. *et al.* Metabolic heterogeneity confers differences in melanoma metastatic potential. **Nature**. vol. 577, no. 7788. pp. 115–120. Jan. 2020. doi: 10.1038/s41586-019-184 7-2.
103. Morandi, A., Taddei, M. L., Chiarugi, P., and Giannoni, E. Targeting the metabolic reprogramming that controls epithelial-to-mesenchymal transition in aggressive tumors, **Frontiers in Oncology**, vol. 7, no. MAR. Frontiers Media S.A., p. 1, Mar. 14, 2017, doi: 10.3389/fonc.2017.00040.
104. S, L., J, X., and R, D. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. **Nature reviews. Molecular cell biology**. vol. 15, no. 3. pp. 178–196. Mar. 2014. doi: 10.1038/NRM3758.
105. Georgakopoulos-Soares, I., Chartoumpakis, D. V., Kyriazopoulou, V., and Zaravinos, A. EMT Factors and Metabolic Pathways in Cancer, **Frontiers in Oncology**, vol. 10. Frontiers Media S.A., p. 499, Apr. 07, 2020, doi: 10.3389/fonc.2020.00499.
106. Li, L. K., Zhang, X. J., Wang, L. M., Hu, J. Y., and Cao, F. H. Inhibitory effect of 3-bromopyruvate on the proliferation, migration and invasive ability of prostate cancer PC-3 cells. **Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology**. vol. 26, no. 1. pp. 17–23. Jan. 2020.
107. Audrito, V., Managò, A., Gaudino, F., and Deaglio, S. Targeting metabolic reprogramming in metastatic melanoma: The key role of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). **Seminars in Cell & Developmental Biology**. vol. 98. pp. 192–201. Feb. 2020. doi: 10.1016/J.SEMCDB.2019.05.001.
108. Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. **Nature Reviews Molecular Cell Biology 2014 15:3**. vol. 15, no. 3. pp. 178–196. Feb. 2014. doi: 10.1038/nrm3758.
109. Reddy, P. *et al.* Formation of E-Cadherin-Mediated Cell-Cell Adhesion Activates Akt and Mitogen Activated Protein Kinase via Phosphatidylinositol 3 Kinase and Ligand-Independent Activation of Epidermal Growth Factor Receptor in Ovarian Cancer Cells. **Molecular Endocrinology**. vol. 19, no. 10. pp. 2564–2578. Oct. 2005. doi: 10.1210/ME.2004-0342.

110. Bussink, J., Kaanders, J. H. A. M., and van der Kogel, A. J. Microenvironmental transformations by VEGF- and EGF-receptor inhibition and potential implications for responsiveness to radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**. vol. 82, no. 1. pp. 10–17. Jan. 2007. doi: 10.1016/J.RADONC.2006.10.022.
111. Shen, X. and Kramer, R. H. Adhesion-Mediated Squamous Cell Carcinoma Survival through Ligand-Independent Activation of Epidermal Growth Factor Receptor. **The American Journal of Pathology**. vol. 165, no. 4. pp. 1315–1329. Oct. 2004. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63390-1.
112. Patra, K. C. *et al.* Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. **Cancer Cell**. vol. 24, no. 2. pp. 213–228. Aug. 2013. doi: 10.1016/j.ccr.2013.06.014.
113. Ho, N., Morrison, J., Silva, A., and Coomber, B. L. The effect of 3-bromopyruvate on human colorectal cancer cells is dependent on glucose concentration but not hexokinase II expression. **Bioscience Reports**. vol. 36, no. 1. Feb. 2016. doi: 10.1042/BSR20150267.
114. AP, P. da S. *et al.* Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. **The Biochemical journal**. vol. 417, no. 3. pp. 717–726. Feb. 2009. doi: 10.1042/BJ20080805.
115. Kudryavtseva, A. V. *et al.* Effect of lentivirus-mediated shRNA inactivation of HK1, HK2, and HK3 genes in colorectal cancer and melanoma cells. **BMC Genetics**. vol. 17, no. 3. pp. 117–125. Dec. 2016. doi: 10.1186/s12863-016-0459-1.
116. Buzzai, M. *et al.* Systemic treatment with the antidiabetic drug metformin selectively impairs p53-deficient tumor cell growth. **Cancer Research**. vol. 67, no. 14. pp. 6745–6752. Jul. 2007. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4447.
117. Mashhedi, H. *et al.* Cell Cycle Metformin abolishes increased tumor 18 F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake associated with a high energy diet. 2011. doi: 10.4161/cc.10.16.16219.
118. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: A cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. in *Biochemical Society Transactions*. Feb. 2011. vol. 39, no. 1. pp. 1–13. doi: 10.1042/BST0390001.
119. Son, Y., Kim, S., Chung, H. T., and Pae, H. O. Reactive Oxygen Species in the Activation of MAP Kinases. **Methods in Enzymology**. vol. 528. pp. 27–48. Jan. 2013. doi: 10.1016/B978-0-12-405881-1.00002-1.
120. Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., and Terentiev, A. A. Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. **Cancers 2020, Vol. 12, Page 862**. vol. 12, no. 4. p. 862. Apr. 2020. doi: 10.3390/CANCERS12040862.
121. Mills, C. N., Joshi, S. S., and Nilas, R. M. Expression and function of hypoxia inducible factor-1 alpha in human melanoma under non-hypoxic conditions. **Molecular Cancer 2009 8:1**. vol. 8, no. 1. pp. 1–12. Nov. 2009. doi: 10.1186/1476-4598-8-104.
122. Kuphal, S., Winklmeier, A., Warnecke, C., and Bosserhoff, A. K. Constitutive HIF-1 activity in malignant melanoma. **European Journal of Cancer**. vol. 46, no. 6. pp. 1159–1169. Apr. 2010. doi: 10.1016/J.EJCA.2010.01.031.
123. L, Y. *et al.* Modeling the Genetic Regulation of Cancer Metabolism: Interplay between Glycolysis and Oxidative Phosphorylation. **Cancer research**. vol. 77, no. 7. pp. 1564–1574. 2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2074.

124. Merlo-Pich, M., Deleonardi, G., Biondi, A., and Lenaz, G. Methods to detect mitochondrial function. **Experimental Gerontology**. vol. 39, no. 3. pp. 277–281. Mar. 2004. doi: 10.1016/J.EXGER.2003.11.014.
125. P, S., S, W., CT, S., AL, H., and RD, V.-J. Cancer-associated, hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX facilitates CO₂ diffusion. **BJU international**. vol. 101 Suppl 4, no. SUPPL.4. pp. 22–24. 2008. doi: 10.1111/J.1464-410X.2008.07644.X.
126. DE, S. *et al.* Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**. vol. 21, no. 3. pp. 473–482. Feb. 2003. doi: 10.1200/JCO.2003.11.132.
127. KR, M. and JA, I. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide formation by fumarate reductase, succinate dehydrogenase, and aspartate oxidase. **The Journal of biological chemistry**. vol. 277, no. 45. pp. 42563–42571. Nov. 2002. doi: 10.1074/JBC.M204958200.
128. Luan, W. *et al.* miR-137 inhibits glutamine catabolism and growth of malignant melanoma by targeting glutaminase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. vol. 495, no. 1. pp. 46–52. Jan. 2018. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.152.
129. Chang, X., Zhu, W., Zhang, H., and Lian, S. Sensitization of melanoma cells to temozolomide by overexpression of microRNA 203 through direct targeting of glutaminase-mediated glutamine metabolism. **Clinical and Experimental Dermatology**. vol. 42, no. 6. pp. 614–621. Aug. 2017. doi: 10.1111/ced.13119.
130. Choi, Y. K. and Park, K. G. Targeting glutamine metabolism for cancer treatment, **Biomolecules and Therapeutics**, vol. 26, no. 1. Korean Society of Applied Pharmacology, pp. 19–28, Jan. 01, 2018, doi: 10.4062/biomolther.2017.178.
131. Das Thakur, M. *et al.* Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance. **Nature**. vol. 494, no. 7436. pp. 251–255. Feb. 2013. doi: 10.1038/nature11814.
132. Valpione, S. *et al.* Rechallenge with BRAF-directed treatment in metastatic melanoma: A multi-institutional retrospective study. **European Journal of Cancer**. vol. 91. pp. 116–124. Mar. 2018. doi: 10.1016/j.ejca.2017.12.007.
133. Seghers, A. C., Wilgenhof, S., Lebbé, C., and Neyns, B. Successful rechallenge in two patients with BRAF-V600-mutant melanoma who experienced previous progression during treatment with a selective BRAF inhibitor. **Melanoma Research**. vol. 22, no. 6. pp. 466–472. Dec. 2012. doi: 10.1097/CMR.0b013e3283541541.
134. Kuczynski, E. A., Sargent, D. J., Grothey, A., and Kerbel, R. S. Drug rechallenge and treatment beyond progression-implications for drug resistance, **Nature Reviews Clinical Oncology**, vol. 10, no. 10. NIH Public Access, pp. 571–587, Oct. 2013, doi: 10.1038/nrclinonc.2013.158.

ANEXOS

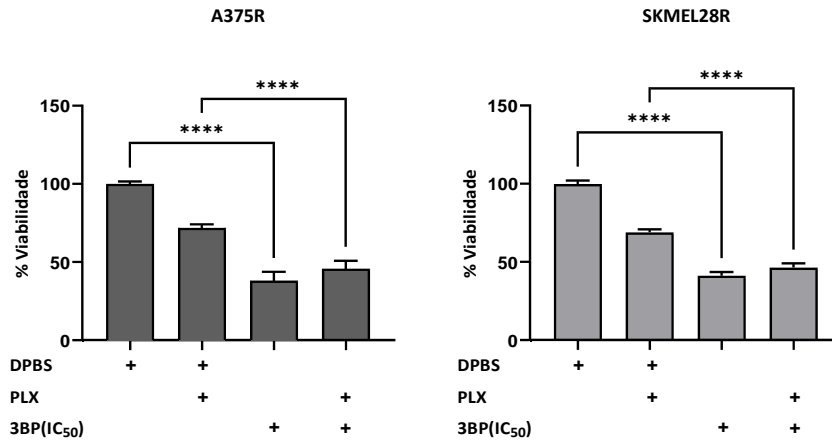


Figura suplementar 1 – Avaliação do efeito do 3BP sobre a viabilidade das linhagens A375R e SKMEL28R. Resultados obtidos por meio do ensaio de sulforodamina B após 24h de exposição ao IC₅₀ de 3BP (60 μ M em monoterapia e 45 μ M em terapia combinada com PLX, para A375R, e 80 μ M em monoterapia e 90 μ M em terapia combinada com PLX, para SKMEL28R), na presença e ausência de PLX (concentração fixa de 4,5 μ M para A375R e 6,0 μ M para SKMEL28R). Ensaio normalizado pela viabilidade do grupo DPBS. Dados apresentados como média \pm erro padrão das triplicatas experimental e biológica. **** $p < 0,0001$.

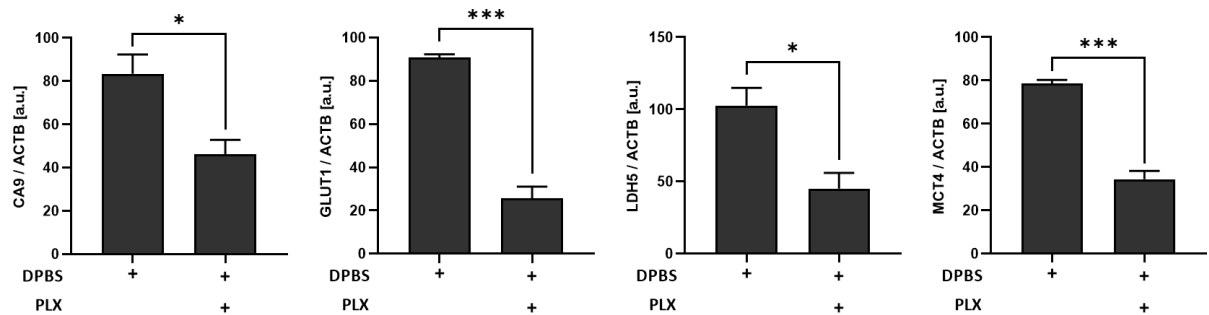


Figura suplementar 2 – Quantificação do ensaio de *western blot* comparando a expressão de proteínas da linhagem A375R tratada com DPBS e DPBS+PLX. Ensaio realizado após 24 horas de exposição ao tratamento. Concentração fixa de PLX (4,5 μ M). Quantificação dos *immunoblots* normalizados pelos níveis de actina beta. O eixo y representado como unidades arbitrárias [u.a.]. Dados apresentados como média \pm erro padrão da triplicata biológica. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

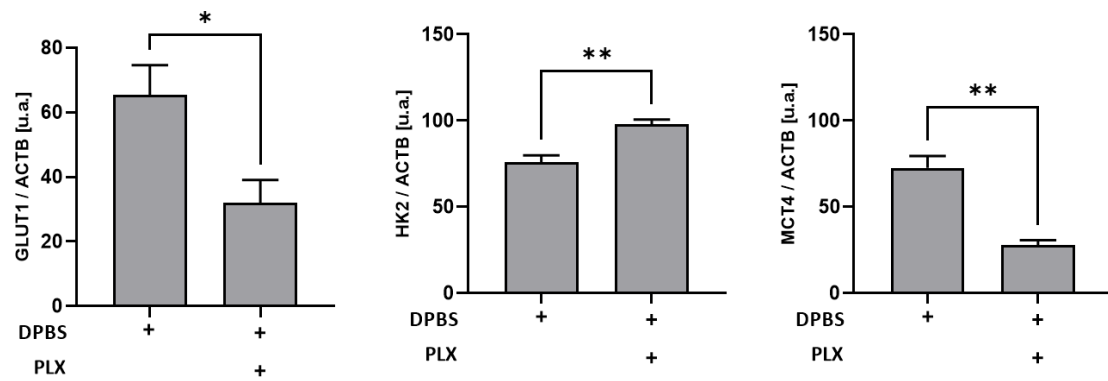


Figura suplementar 3 – Quantificação do ensaio de *western blot* comparando a expressão de proteínas da linhagem SKMEL28R tratada com DPBS e DPBS+PLX. Ensaio realizado após 24 horas de exposição ao tratamento. Concentração fixa de PLX (6,0 μM). Quantificação dos *immunoblots* normalizados pelos níveis de actina beta. O eixo y representado como unidades arbitrárias [u.a.]. Dados apresentados como média ± erro padrão da triplicata biológica. * p<0,05; ** p<0,01.

Comitê de Ética em Pesquisa
Parecer Ad Referendum

Para: Celine Marques Pinheiro

De: Thiago Buosi
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 17/05/2022 – 2ª Via

Projeto de pesquisa: 1776/2019

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Amor de Barretos recebeu o projeto no ano de 2019 sem o envolvimento de seres humanos, de forma direta ou indireta, intitulado “Efeito do 3-Bromopiruvato em células de melanoma resistentes ao Vemurafenibe”, a qual foi cadastrado sob o número 1776/2019.

Entretanto, o pesquisador Patrik da Silva Vital nos solicitou a segunda via deste documento e por este motivo declaramos estar cientes da realização do estudo desde 2019, e pelo fato do mesmo não envolver seres humanos de forma direta e indireta, não há necessidade de análise e aprovação pelo CEP.

Atenciosamente,



Thiago Buosi
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Pio XII - Hospital de Amor de Barretos

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to

Molecular Oncology

Manuscript ID

MOLONC-22-0415

Title

3-BROMOPYRUVATE SUPPRESSES THE MALIGNANT PHENOTYPE OF VEMURAFENIB-RESISTANT MELANOMA CELLS

Authors

da Silva Vital, Patrik
Bonatelli, Murilo
Dias, Marina
Tomazini, Mariana
de Salis, Larissa
Baltazar, Fátima
Maria-Engler, Silvy
Pinheiro, Céline

Date Submitted

24-May-2022