

**Caroline Miho Shibuya**

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA PIRUVATO DESIDROGENASE QUINASE 3 (PDK3)  
EM MELANOMA**

Projeto apresentado ao Programa de Pós Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a Banca de Qualificação para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira

Barretos, SP  
2025

**Caroline Miho Shibuya**

**CARACTERIZAÇÃO DO PAPEL DA PROTEÍNA PIRUVATO DESIDROGENASE QUINASE 3 (PDK3)  
EM MELANOMA**

Projeto apresentado ao Programa de Pós Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para a Banca de Qualificação para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Céline Marques Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Renato José da Silva Oliveira

Barretos, SP  
2025

## FICHA CATALOGRÁFICA

S555c Shibuya, Caroline Miho.

Caracterização da proteína piruvato desidrogenase quinase 3 (PDK3) em melanoma. / Caroline Miho Shibuya. - Barretos, SP - 2025.

83 f. : il.

Orientador(a): Céline Marques Pinheiro.

Coorientador(a): Renato José da Silva Oliveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos - 2025.

1. Piruvato desidrogenase quinase 3. 2. Melanoma. 3. Reprogramação metabólica. 4. Resistência. 5. siRNA. 6. Vemurafenibe. I. Autor(a). II. Título.

CDD 572.5

### FICHA CATALOGRÁFICA

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



## FOLHA DE APROVAÇÃO



Nome: **Caroline Miho Shibuya**.

Título: "Caracterização do papel da proteína piruvato desidrogenase quinase 3 (PDK3) em melanoma".

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: 06/02/2024

Banca Examinadora:

Dra. Sandra Martha G. Dias - Membro Externo

Instituição: Unifesp.

Banca Examinadora:

Dr. Wilson Araújo da S. Júnior - Membro Memória

Instituição: USP.

Dra. Céline Marques Pinheiro

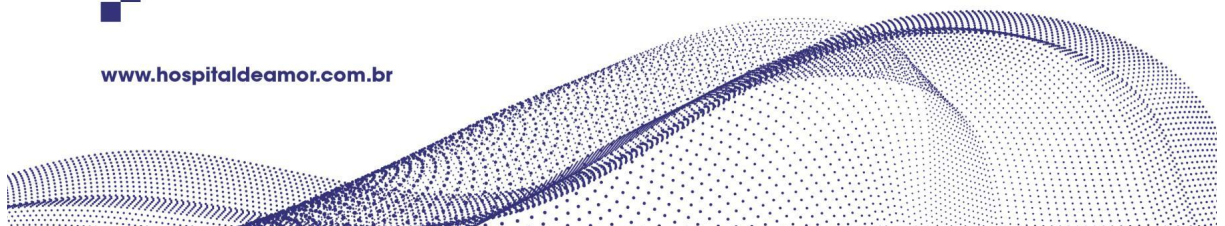
Orientadora.

Dr. Renato José da S. Oliveira

Coorientador.

Dra. Wanessa Fernanda Altei

Presidente da Banca.



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

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através da Bolsa Concedida (processo número 88887.818277/2023-00) com vigência de 01/03/2023 a 30/06/2023 e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Bolsa Concedida (processo número 2022/13443-7) com vigência de 01/07/2023 a 28/02/2025.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da CAPES e/ou 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 os pacientes oncológicos e seus familiares.

## **AGRADECIMENTOS**

**À Dra. Céline Pinheiro**, pela orientação, por ter me confiado este estudo e ter sido a base e o exemplo para o início da minha jornada acadêmica.

**Ao Dr. Renato Oliveira**, pela coorientação, pela alegria nos dias leves e acolhimento nos dias pesados.

**Aos membros do Grupo de Pesquisa em Microambiente e Metabolismo Tumoral**, por me proporcionarem aprendizado em bancada, maturidade na vida acadêmica e conhecimento do significado de parceria e amizade na vida pessoal.

**Aos membros da Banca de Acompanhamento e Qualificação, Dra. Wanessa Altei e Dr. Wilson Araújo**, pela disposição e tempo dedicado a contribuírem de forma significativa na discussão e avaliação de cada etapa e desenvolvimento deste estudo.

**Aos membros da Banca de Defesa, Dr. Wilson Araújo e Dra. Sandra Dias**, pela honra de suas contribuições científicas para a versão final desta dissertação.

**À Dra. Silvy Stuchi**, pela doação de todas as linhagens celulares utilizadas permitindo o desenvolvimento deste estudo.

**Aos pacientes participantes deste estudo**, pelas amostras disponibilizadas permitindo o desenvolvimento deste estudo.

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

**À equipe do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos**, por proporcionarem a integração de um ambiente acolhedor e organizado permitindo o desenvolvimento deste estudo.

**Ao Departamento de Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos e toda equipe**, pelo auxílio na orientação dos regulamentos e questões burocráticas.

**Ao Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica (EPIT) do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial ao **Dorion Denardi** e **Jhessica Martins**, pelo auxílio nas demandas relacionadas a FAPESP, e à **Maria Alice Dias** e **Sérgio Guerra**, no controle de orçamentos e compras deste estudo.

**Ao Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos**, em especial ao **Dr. Eduardo Caetano Albino** pelo auxílio ao nosso estudo, disponibilidade e comprometimento em nos atender quando necessário.

**À minha família e ao meu noivo**, por idealizarem comigo e pelo apoio incondicional e indispensável que tornou possível a concretização dessa etapa.

**E aos meus amigos de Barretos**, que foram acalento nos momentos de conflitos e refúgio para os momentos mais felizes.

Como escreveu Antoine de Saint-Exupéry: “Aqueles que passam por nós não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

**Muito obrigada.**

me levanto  
sobre o sacrifício  
de um milhão de mulheres que vieram antes  
e penso  
*o que é que eu faço*  
*para tornar essa montanha mais alta*  
*para que as mulheres que vierem depois de mim*  
*possam ver além*

**Legado – Rupi Kaur**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Melanoma	1
1.2	Reprogramação metabólica em melanoma	3
1.3	Reprogramação metabólica na resistência ao vemurafenibe	4
1.4	PDK3 e melanoma	5
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
3.1	Objetivo geral	9
3.2	Objetivos específicos	9
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>10</b>
4.1	Estudo com amostras humanas	10
4.1.1	Delineamento do estudo	10
4.1.2	Amostra	10
4.1.3	Amostras biológicas	12
4.1.4	Imunohistoquímica (IHQ)	12
4.2	Ensaio <i>in vitro</i>	13
4.2.1	Linhagens celulares	13
4.2.2	<i>Western blotting</i>	14
4.2.3	<i>Knockdown (KD)</i> do gene <i>PDK3</i>	16
4.2.4	Concentração inibitória média (IC <sub>50</sub> )	16
4.2.5	Caracterização <i>in vitro</i> do efeito do <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	17
4.2.5.1	Viabilidade celular	17

4.2.5.2	Proliferação celular	17
4.2.5.3	Formação de colônias	18
4.2.5.4	Apoptose	18
4.2.5.5	Migração celular	19
4.2.5.6	Invasão celular	19
4.2.5.7	Adesão celular	20
4.2.5.8	Quantificação de glicose extracelular	20
4.2.5.9	Quantificação de lactato extracelular	21
4.2.6	Análise estatística dos resultados	21
5	ASPECTOS ÉTICOS	22
6	RESULTADOS	23
6.1	Amostras humanas	23
6.2	Ensaio <i>in vitro</i>	24
6.2.1	Expressão da PDK3	24
6.2.2	Padronização do <i>KD</i> do gene <i>PDK3</i>	25
6.2.3	Expressão de PDK1 e PDK2 após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	26
6.2.4	Determinação da $IC_{50}$ do vemurafenibe após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	27
6.2.5	Viabilidade celular e apoptose após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	28
6.2.6	Proliferação celular e atividade de AKT fosforilado após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	29
6.2.7	Capacidade de formação de colônias após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	30
6.2.8	Capacidade de migração, invasão e adesão celular após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	31
6.2.9	Influxo de glicose e efluxo de lactato após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	33
6.2.10	Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i>	34

<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>
	<b>ANEXO</b>	<b>50</b>
	Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do CEP	50

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema representativo da ação de terapias-alvo e imunoterapia em melanoma.	2
<b>Figura 2</b> – Representação esquemática da diferença entre a fosforilação oxidativa, a glicólise anaeróbica e a glicólise aeróbica (efeito <i>Warburg</i> ).	3
<b>Figura 3</b> – Esquema representativo da ação das piruvato desidrogenase quinases (PDKs).	4
<b>Figura 4</b> – Diagrama de Venn apresentando os genes diferencialmente expressos únicos e em comum em amostras de pacientes com melanoma pós-tratamento com vemurafenibe e na linhagem celular de melanoma SK-MEL-19 resistente ao vemurafenibe.	8
<b>Figura 5</b> – Ordem cronológica desde a transfecção reversa para o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> , plaqueamento dos ensaios e leitura dos ensaios.	16
<b>Figura 6</b> – Fotomicrografias representativas de expressão positiva da PDK3 avaliada por imunohistoquímica.	23
<b>Figura 7</b> – Expressão das isoformas PDK1, PDK2 e PDK3 avaliada por <i>Western blotting</i> .	25
<b>Figura 8</b> – Expressão de PDK3 após <i>KD</i> de <i>PDK3</i> avaliada por <i>Western blotting</i> .	26
<b>Figura 9</b> – Expressão de PDK1 após <i>KD</i> de <i>PDK3</i> avaliada por <i>Western blotting</i> .	26
<b>Figura 10</b> – Expressão de PDK2 após <i>KD</i> de <i>PDK3</i> avaliada por <i>Western blotting</i> .	27
<b>Figura 11</b> – $IC_{50}$ após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> em linhagens de melanoma expostas a concentrações crescentes de PLX por Sulforodamina B.	27
<b>Figura 12</b> – Viabilidade celular após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> por Sulforodamina B.	28
<b>Figura 13</b> – Apoptose após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> por Anexina V (An) e Iodeto de propídio (IP).	29
<b>Figura 14</b> – Proliferação celular após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> por incorporação de BrdU.	30
<b>Figura 15</b> – Atividade de pAKT (AKT fosforilado) avaliada por <i>Western blotting</i> .	30
<b>Figura 16</b> – Formação de colônias após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> por ensaio clonogênico dependente de ancoragem.	31
<b>Figura 17</b> – Migração celular após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> por <i>transwell</i> .	32
<b>Figura 18</b> – Invasão celular após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> por câmara de invasão.	32
<b>Figura 19</b> – Adesão celular após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> em matrigel.	33
<b>Figura 20</b> – Fluxo de glicose após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> calculado pela diferença da quantificação inicial e final (após 24h) de glicose no meio de cultura.	33
<b>Figura 21</b> – Fluxo de lactato calculado após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> pela diferença da quantificação final (após 24h) e inicial de lactato no meio de cultura.	34

**Figura 22** – Expressão de GLUT1 (transportador de glicose 1), HK2 (hexoquinase 2), ASCT2 (transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio), GLS (glutaminase), MCT1 e 4 (transportador de monocarboxilato 1 e 4) LDHA (lactato desidrogenase A) e CA9 (anidrase carbônica 9) após o *KD* de *PKD3* avaliada por *Western blotting*. 35

**Figura 23** – Visão esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. 37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Dados dos pacientes do Hospital de Amor incluídos no estudo (2016 – 2019) <sup>45</sup> .	11
<b>Tabela 2</b> – Localização tumoral das 18 amostras de pacientes com melanoma incluídos no estudo obtidas pré e pós-tratamento com vemurafenibe.	12
<b>Tabela 3</b> – Origem e perfil mutacional das linhagens celulares utilizadas no estudo.	14
<b>Tabela 4</b> – Anticorpos primários e condições de incubação utilizados no <i>Western blotting</i> .	15
<b>Tabela 5</b> – <i>Score</i> de expressão de PDK3 por amostra de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) tratamento com vemurafenibe.	24
<b>Tabela 6</b> – Comparação da frequência de expressão de PDK3 em amostras de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) tratamento com vemurafenibe. ( $p=1,000$ )	24
<b>Tabela 7</b> – Valores de $IC_{50}$ após o <i>KD</i> de <i>PDK3</i> em linhagens de melanoma expostas a concentrações crescentes de vemurafenibe.	28

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micrômetro
$\mu\text{M}$	Micromolar
ASCT2	Transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio, do inglês <i>alanine, serine, cysteine transporter 2</i>
AKT	Proteína quinase B
pAKT	AKT fosforilado, do inglês <i>phosphorylated AKT</i>
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CA9	Anidrase carbônica 9, do inglês <i>carbonic anhydrase 9</i>
CEP	Comitê de ética em pesquisa
CN	Controle negativo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DCA	Ácido dicloroacético, do inglês <i>dichloroacetic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
DBPS	<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLS	Glutaminase
GLUT1	Transportador de glicose 1, do inglês <i>glucose transporter 1</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HCl	Ácido clorídrico
HIF1A	Fator induzido por hipóxia 1 alfa, do inglês <i>hypoxia inducible factor 1 subunit alpha</i>
HK2	Hexoquinase 2, do inglês <i>hexokinase 2</i>

IF	Imunofluorescência
IHQ	Imunohistoquímica
KD	<i>Knockdown</i>
kDa	Kilodalton
LDHA	Lactato desidrogenase A, do inglês <i>lactate dehydrogenase A</i>
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno, do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCT1	Transportador de monocarboxilato 1, do inglês <i>monocarboxylate transporter 1</i>
MCT4	Transportador de monocarboxilato 4, do inglês <i>monocarboxylate transporter 4</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
PDC	Complexo piruvato desidrogenase, do inglês <i>pyruvate dehydrogenase complex</i>
PDH	Piruvato desidrogenase, do inglês <i>pyruvate dehydrogenase</i>
PDK	Piruvato desidrogenase quinase, do inglês <i>pyruvate dehydrogenase kinase</i>
PDK1	Piruvato desidrogenase quinase 1, do inglês <i>pyruvate dehydrogenase kinase 1</i>
PDK2	Piruvato desidrogenase quinase 2, do inglês <i>pyruvate dehydrogenase kinase 2</i>
PDK3	Piruvato desidrogenase quinase 3, do inglês <i>pyruvate dehydrogenase kinase 3</i>
PLX4032	Vemurafenibe
PLX R	Resistente ao vemurafenibe
PRKAA2	Subunidade catalítica 2-alfa da proteína quinase ativada por AMP, do inglês <i>protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
RPM	Rotações por minuto
RTCA	<i>Real-Time Cell Analysis</i>
SAME	Serviço de arquivo médico e estatística
SEM	Erro padrão, do inglês <i>standard error of the mean</i>
SFB	Soro fetal bovino
siRNA	Pequeno RNA de interferência, do inglês <i>small interfering RNA</i>
SRB	Sulforodamina B

STR	<i>Short tandem repeat</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline Tween</i>
TCA	Ácido tricloroacético, do inglês <i>trichloroacetic acid</i>
UV	Ultra-violeta
WT	Sem mutação, do inglês <i>wild-type</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
≤	Menor ou igual
=	Igual
>	Maior
±	Mais ou menos
β	Beta
°C	Celsius
®	Registro de marca junto ao Instituto Nacional de Patentes (INPI)
™	<i>Trade mark</i>

## RESUMO

Shibuya, CM. Caracterização do papel da proteína piruvato desidrogenase quinase 3 (PDK3) em melanoma. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2024.

**JUSTIFICATIVA:** A piruvato desidrogenase quinase (PDK) apresenta um papel importante na reprogramação metabólica, um dos *hallmarks* do câncer, por sua ação inibitória no complexo piruvato desidrogenase (PDC), desviando o fluxo de piruvato para a produção de lactato mesmo na presença de oxigênio (efeito Warburg), contribuindo para a agressividade tumoral. A PDK3 apresenta maior atividade entre as isoformas da família PDK, estando associada ao aumento da sobrevivência celular e à resistência a quimioterápicos. O melanoma apresenta uma alta taxa de mortalidade, sendo a mutação V600E no gene *BRAF* a alteração mais frequente e o vemurafenibe (PLX4032) a terapia-alvo utilizada no tratamento de melanoma acometidos por esta alteração. Apesar dos avanços terapêuticos, o prognóstico do melanoma continua desfavorável devido aos mecanismos de resistência adquirida aos fármacos e, apesar da PDK3 ter sido observada superexpressa, há poucas evidências na literatura em melanoma.

**OBJETIVOS:** Caracterizar o papel da PDK3 no melanoma e na resistência do melanoma ao vemurafenibe, de forma a explorá-lo como um possível alvo estratégico para o tratamento.

**MATERIAIS E MÉTODOS:** A expressão de PDK3 foi avaliada em amostras humanas de melanoma pré e pós-tratamento com PLX e a expressão de PDK1/2/3 foi avaliada *in vitro* em linhagens de melanoma (A375 e SK-MEL-19) parentais e resistentes ao vemurafenibe. O efeito do *knockdown* (KD) de *PDK3* por siRNA foi avaliado na expressão de PDK1/2, na concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) do PLX, em parâmetros funcionais como viabilidade, proliferação, formação de colônias, apoptose, migração, invasão e adesão celular e em parâmetros metabólicos como níveis de glicose e lactato extracelular e expressão do transportador de glicose 1 (GLUT1), da hexoquinase 2 (HK2), dos transportadores de monocarboxilato 1/4 (MCT1/4), da lactato desidrogenase A (LDHA), do transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio (ASCT2), da glutaminase (GLS), da anidrase carbônica 9 (CA9) e de AKT fosforilado (pAKT). **RESULTADOS:** Apenas a PDK3 está aumentada em linhagens PLX R quando comparado com as linhagens parentais, mas não há diferença na expressão em amostras humanas. O KD de *PDK3* não influenciou a expressão das isoformas PDK1/2 e não re-sensibilizou as células ao PLX. Entretanto, apesar de não influenciar a apoptose, de forma

geral, o KD de *PKD3* diminuiu a viabilidade celular, a formação de colônias, a migração, a invasão e a adesão celular, enquanto a proliferação celular e a expressão de pAKT apenas em linhagens celulares PLX R. Ainda, diminuiu o consumo de glicose, acompanhado por uma diminuição na expressão de GLUT1 e HK2, e diminuiu o efluxo de lactato, acompanhado por uma diminuição na expressão de MCT1/4 e LDHA, com exceção da linhagem SK-MEL-19 PLX R que teve seu efluxo de lactato aumentado. A expressão de ASCT2, GLS e CA9 também diminuiu após o KD de *PKD3*. **CONCLUSÃO:** Os resultados obtidos contribuem para uma melhor compreensão do papel da PKD3 em melanoma, sugerindo-a como um promissor alvo terapêutico, principalmente no contexto da resistência terapêutica ao vemurafenibe.

**PALAVRAS-CHAVE:**

Piruvato desidrogenase quinase 3; Melanoma; Reprogramação metabólica; Resistência; siRNA; Vemurafenibe.

## ABSTRACT

Shibuya, CM. Characterization of the role of the protein pyruvate dehydrogenase kinase 3 (PDK3) in melanoma. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2024.

**BACKGROUND:** The pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) plays a role in metabolic reprogramming, one of the hallmarks of cancer, due to its inhibitory action on the pyruvate dehydrogenase complex (PDC), diverting the pyruvate flow to lactate production (the Warburg effect), contributing for tumor aggressiveness. PDK3 has the major activity between PDK isoforms and is associated with increased cell survival and chemotherapy resistance. Melanoma has a high mortality rate and the most common molecular change is V600E mutation in *BRAF* gene, with vemurafenib (PLX4032) being the targeted therapy used for *BRAF*<sup>V600E</sup>-melanoma treatment. Despite new therapeutic strategies are being used against melanoma, poor prognosis remains in advanced stage due to drug resistance mechanisms and, despite PDK3 being observed as overexpressed, there is a lack of evidence in literature in melanoma. **AIM:** To characterize PDK3 role in melanoma and in the resistance to vemurafenib in order to explore PDK3 as a possible target in melanoma treatment. **MATERIALS AND METHODS:** PDK3 expression was evaluated in pre and post-PLX treatment human samples and PDK1/2/3 were evaluated *in vitro* in parental melanoma cell lines (A375 and SK-MEL-19) and respective vemurafenib-resistant (PLX R) cell lines. The effect of *PDK3* knockdown (KD) using siRNA was evaluated in the expression of PDK1/2, in the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of PLX, in functional parameters such as viability, proliferation, colony formation capacity, apoptosis, migration, invasion and adhesion assays and in metabolic parameters such as glucose and extracellular lactate levels and glucose transporter 1 (GLUT1), hexokinase 2 (HK2), monocarboxylate transporter 1/4 (MCT1/4), lactate dehydrogenase A (LDHA), alanine, serine, cysteine transporter 2 (ASCT2), glutaminase (GLS), carbonic anhydrase 9 (CA9) and phosphorylated AKT (pAKT) expression. **RESULTS:** Only PDK3 expression was elevated in PLX R cell lines compared to their respective parental cell lines, but no difference was observed in human samples. *PDK3* KD did not influence PDK1/2 expression and did not re-sensitize the cells to PLX. However, although it does not affect apoptosis, in general, the *PDK3* KD reduced cell viability, colony formation, cell migration, invasion and adhesion, while

reduced cell proliferation and pAKT expression was only observed in PLX R cell lines. Furthermore, *PDK3* KD reduced glucose consumption, with a decrease in the expression of GLUT1 and HK2, and reduced lactate efflux, with a decrease in MCT1/4 and LDHA, except in the vemurafenib-resistant SK-MEL-19 cell line, in which lactate efflux increased. The expression of ASCT2, GLS and CA9 were also reduced after *PDK3* KD. **CONCLUSION:** The results led to a better understanding of the role of PDK3 in melanoma, suggesting it as a promising therapeutic target, mainly in the context of vemurafenib-resistance.

**KEYWORDS:**

Pyruvate dehydrogenase kinase 3; Melanoma; Metabolic reprogramming; Resistance; siRNA; Vemurafenib.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Melanoma

O melanoma é originado dos melanócitos, células especializadas que produzem a melanina e que derivam de células multipotentes e com alta capacidade migratória da crista neural, sendo essa uma das hipóteses que explica o seu elevado potencial metastático<sup>1</sup>. Ainda, o melanoma é caracterizado pela rápida vascularização peritumoral favorecendo sua nutrição e o desenvolvimento do tumor e, conseqüentemente, aumentando o risco de metástases para outros locais do corpo<sup>2</sup>. Apesar da maior parte das lesões ocorrerem na pele (melanoma cutâneo), o melanoma pode acometer outras partes do corpo como mucosas (melanoma de mucosa), olhos (melanoma uveal) e sistema nervoso<sup>3</sup>.

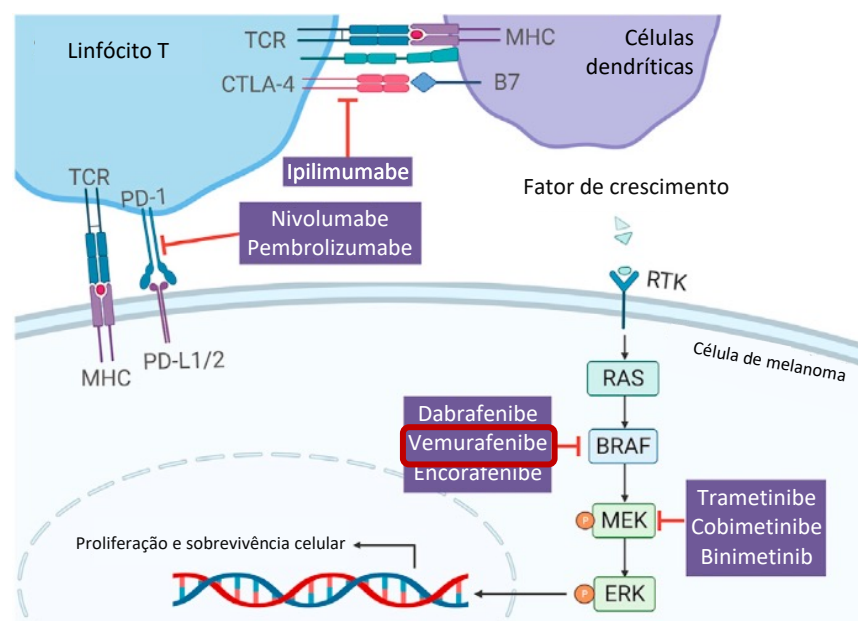
Embora represente apenas 1% dos cânceres de pele, o melanoma é responsável por aproximadamente 80% das mortes por este tipo tumoral<sup>4</sup>. Mundialmente, no ano de 2020, aproximadamente 325 mil novos casos de melanoma foram registrados e cerca 57 mil foram a óbito<sup>5</sup>, enquanto no Brasil a estimativa para 2023 foi de 8980 novos casos<sup>6</sup>. Dados apontam que, enquanto a incidência de alguns tumores decai com o passar dos anos, a incidência do melanoma continua a aumentar de forma rápida, principalmente em países desenvolvidos e em indivíduos de pele clara sob exposição a raios ultravioletas<sup>4</sup>.

Por se tratar de uma doença multifatorial, o melanoma se desenvolve do acúmulo gradativo de fatores de risco como, principalmente, exposição a raios ultravioletas, características fenotípicas individuais como cor de olhos, cabelos e pele clara, quantidade de nevos e mutações genéticas<sup>7</sup>. O gene *BRAF* carregando a mutação *driver* V600E (~90%) é o mais observado nos casos de melanoma e, além de estar associado com 80% dos nevos melanocíticos que progridem pro melanoma, é responsável pela atividade constitutiva da cascata de sinalização intracelular MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) resultando na proliferação celular e conseqüente crescimento tumoral<sup>8</sup>.

Para o melanoma, estratégias cirúrgicas de forma isolada são utilizadas para o alívio de sintomas ou para controle de dor<sup>9</sup>. Em casos mais avançados ou metastáticos, em que o manejo cirúrgico não seja suficiente, o tratamento traz maiores benefícios na sobrevida quando associado à radiação e terapias sistêmicas<sup>10</sup>. Em relação à terapia sistêmica, até o ano de 2011, com a aprovação do vemurafenibe (PLX4032), um inibidor de BRAF<sup>V600E</sup> (Figura 1),

pelo *Food and Drug Administration* (FDA), o quimioterápico dacarbazina foi utilizado como principal tratamento. No entanto, ensaios comparativos demonstraram que, em pacientes com melanoma metastático causado por BRAF<sup>V600E</sup>, a taxa de sobrevida em 6 meses para pacientes tratados com vemurafenibe (84%) foi maior que a de pacientes tratados com dacarbazina (64%), associando o vemurafenibe a uma redução de 63% no risco de morte e de 74% tanto no risco de morte quanto de progressão da doença, além de uma taxa de resposta de 48% ao vemurafenibe contra apenas 5% ao dacarbazina<sup>11</sup>. Ainda, o vemurafenibe demonstrou, após ensaios clínicos baixa toxicidade, rápida resposta clínica e alta taxa de sobrevida em pacientes com melanoma avançado, além de efeitos colaterais relativamente toleráveis como fotossensibilidade, fadiga e artralgia. Entretanto, apesar da eficácia clínica, pacientes demonstraram resistência ao inibidor após, em média, 6 meses do início do tratamento<sup>12</sup>.

Embora recentemente possa se observar um avanço no manejo do melanoma, como outras terapias-alvo, combinação de terapias alvo-dirigidas com inibidores de MEK e inibidores de *checkpoint* imunológicos<sup>13</sup> (Figura 1), tem se mostrado emergente a necessidade por estratégias contra a resistência terapêutica a fim de melhorar o prognóstico em casos de melanoma avançado<sup>9</sup>.

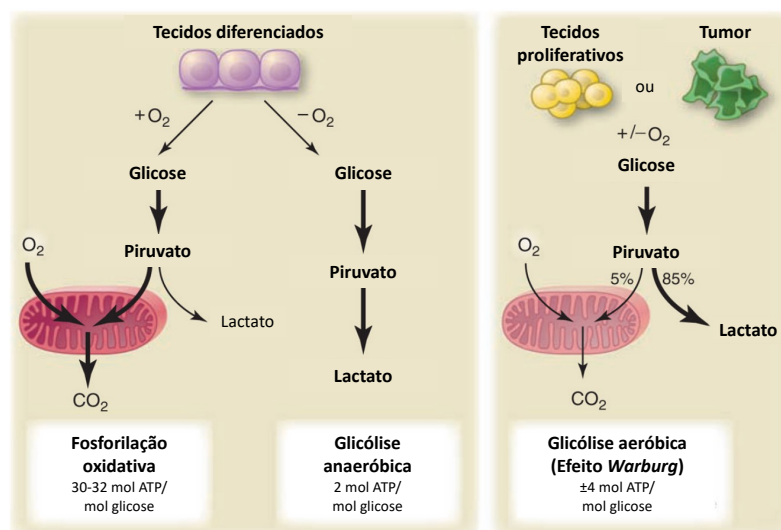


Fonte: Adaptado de Skudalski *et al.*<sup>13</sup>

**Figura 1** – Esquema representativo da ação de terapias-alvo e imunoterapia em melanoma. As terapias alvo-dirigidas atuam na cascata de sinalização intracelular MAPK, enquanto as imunoterapias atuam nas proteínas CTLA-4 e PD-1 encontradas na superfície dos linfócitos T.

## 1.2 Reprogramação metabólica em melanoma

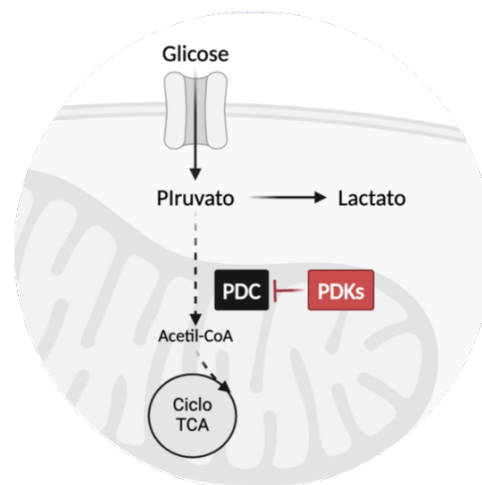
Estudos acerca do metabolismo tumoral revelaram um perfil comum entre a maioria das células tumorais: a substituição da fosforilação oxidativa (OXPHOS), via comum de obtenção de energia, pela glicólise aeróbica (efeito Warburg)<sup>14</sup> (Figura 2). Observado pela primeira vez em 1956 por Otto Warburg<sup>15</sup>, esta reprogramação metabólica é caracterizada pela capacidade das células alteradas em converter a glicose em lactato, mesmo que na presença de oxigênio<sup>16</sup>, caracterizando um fenótipo maligno resultante do aumento do consumo de glicose pelas células tumorais que favorecem a proliferação celular, capacidade de sobrevivência celular em condições hipóxicas, proteção contra danos oxidativos e apoptose<sup>17</sup>. Neste contexto, o fator induzido por hipóxia 1-alfa (HIF1A), que se estabiliza em condições de baixo oxigênio e induz a transcrição de genes responsáveis pela codificação de proteínas participantes da glicólise<sup>18</sup>, tem seu papel relevante na reprogramação metabólica. Em melanoma, estudos demonstraram que a mutação V600E do gene *BRAF* induz o efeito Warburg através da indução da expressão de HIF1A<sup>19</sup>, assim como de diversos genes relacionados ao fenótipo glicolítico<sup>20</sup>, incluindo a lactato desidrogenase A (LDHA)<sup>21</sup>. Entretanto, as células tumorais também podem apresentar uma dependência por outras fontes de carbono como glutamina e ácidos graxos, definindo um fenótipo oxidativo que difere do fenótipo glicolítico<sup>22</sup>.



Fonte: Adaptado de Heiden *et al.*<sup>16</sup>

**Figura 2** – Representação esquemática da diferença entre a fosforilação oxidativa, a glicólise anaeróbica e a glicólise aeróbica (efeito Warburg).

Os mecanismos pelos quais as células tumorais optam pela glicólise aeróbica continuam sendo elucidados e evidenciam uma heterogeneidade nas preferências e dependências metabólicas, além de uma flexibilidade nos fenótipos metabólicos resultado de efeitos combinados de fatores intrínsecos das células tumorais e do microambiente em que se encontram<sup>23</sup>. Os estudos relacionados a esse fenótipo em diversos tipos de câncer demonstraram que sua ocorrência requer o desligamento do complexo piruvato desidrogenase (PDC)<sup>24</sup>, um complexo mitocondrial multienzimático formado pela piruvato desidrogenase (PDH) que regula o metabolismo energético das células convertendo o piruvato, produto da glicólise, em acetil-CoA e permitindo seu uso no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA)<sup>25</sup>. Entretanto, a atividade de PDH pode ser inibida por fosforilação dos seus resíduos de serina específicos por ação da piruvato desidrogenase quinase (PDK), resultando na diminuição da oxidação do piruvato na mitocôndria e consequente aumento da produção do lactato no citoplasma, contribuindo para o fenótipo glicolítico<sup>26</sup> (Figura 3).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 3** – Esquema representativo da ação das piruvato desidrogenase quinases (PDKs). O complexo PDK inibe a atividade do complexo piruvato desidrogenase (PDC), desviando o fluxo de piruvato para a produção de lactato diminuindo a fosforilação oxidativa e favorecendo a glicólise aeróbica. TCA: ácido tricarboxílico.

### 1.3 Reprogramação metabólica na resistência ao vemurafenibe

A reprogramação metabólica pode ser considerada uma das respostas adaptativas ao estresse causado pelos inibidores de *BRAF* mutado<sup>27</sup>. Já foi demonstrado que o vemurafenibe pode diminuir a glicólise em células de melanoma com mutação em *BRAF*, entretanto, o metabolismo da glicose pode ser revertido após o desenvolvimento de resistência ao inibidor

de BRAF através do reestabelecimento da expressão de proteínas associadas à via glicolítica e ao influxo de glicose, aumentando a proliferação celular<sup>28</sup>.

Além da glicólise, a resistência adquirida após exposição contínua ao vemurafenibe pode reprogramar o metabolismo das células de melanoma a serem mais dependentes da glutamina como fonte de carbono, permitindo que as células sobrevivam e proliferem através da atividade mitocondrial, além de favorecer o fenótipo invasivo<sup>29</sup>. De fato, já foi observado que células de melanoma resistentes ao vemurafenibe apresentam biogênese mitocondrial, fator associado ao metabolismo oxidativo aumentado<sup>29</sup>, além do aumento nos níveis basais da respiração mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sugerindo que as células resistentes possuam mecanismos antioxidantes adaptativos para tolerar o excesso de ROS e sobreviver<sup>30</sup>.

A resistência ao vemurafenibe observada em melanomas com mutação em *BRAF* está associada a um perfil metabólico heterogêneo e outras vias metabólicas além da glicólise e glutaminólise podem estar associadas à resistência terapêutica como, por exemplo, a via dos lipídios, tendo sido observada a ressensibilização de células de melanoma resistentes ao vemurafenibe após a depleção de lípido<sup>31</sup>.

#### **1.4 PDK3 e melanoma**

A PDK3 possui a maior atividade observada dentre as 4 isoformas do complexo PDK<sup>32</sup> e a única a não sofrer influência do *feedback* inibitório de piruvato, característica que a torna influente no metabolismo alterado das células durante a progressão tumoral<sup>33</sup>. Seu papel oncogênico no metabolismo tumoral está associado positivamente com a progressão tumoral, metástase e resistência a tratamentos, já observado em câncer de cólon<sup>34</sup>, pulmão<sup>35</sup>, leucemia mieloide aguda<sup>36</sup> e pâncreas<sup>37</sup>.

Um estudo em células tumorais de coloretal, neuroblastoma e endométrio demonstrou a capacidade de estabilização de HIF1A em condições normóxicas como resultado da atividade de vias de sinalização oncogênicas através superexpressão de PDK3, associando-a com o controle da alteração metabólica, o aumento da sobrevivência celular e o aumento à resistência a quimioterápicos<sup>38</sup>. Em melanoma, outro estudo demonstrou a superexpressão de PDK3 em células tumorais, relacionando a progressão do melanoma com as mudanças no metabolismo mitocondrial causadas por HIF1A, uma vez que o silenciamento do gene *HIF1A*

reduziu a expressão de PDK3 tanto em hipóxia quanto em normóxia, sugerindo que este eixo HIF1A/PDK3 possa favorecer a estabilização de HIF1A independentemente da condição de hipóxia, em um mecanismo de auto-amplificação e mantendo, dessa forma, o metabolismo da célula de melanoma em glicólise aeróbica<sup>39</sup>.

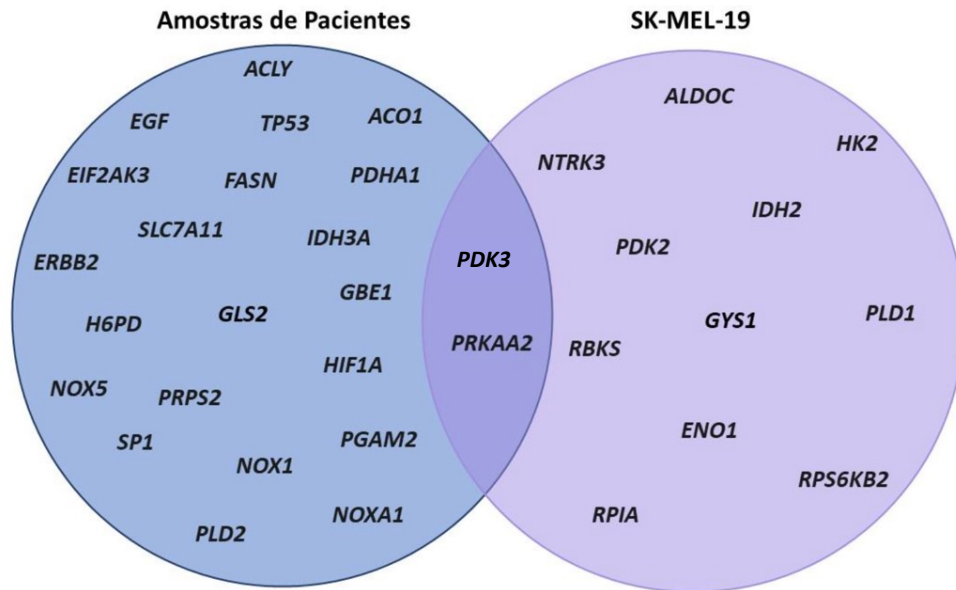
Ainda, dados pré-clínicos utilizando modelos *in vitro* e *in vivo* avaliaram o uso de inibidores de PDK para o tratamento de melanoma, mostrando o efeito sinérgico do ácido dicloroacético (DCA) em combinação com quimioterápicos como a cisplatina<sup>40</sup> e elesclomol<sup>41</sup>, sugerindo o uso deste inibidor para potencializar o efeito desses quimioterápicos reduzindo os seus efeitos colaterais.

## 2 JUSTIFICATIVA

As PDKs apresentam baixa expressão em tecidos normais e os efeitos adversos causados pela inibição de suas isoformas devem ser mínimos, instigando a explorar o PDK3 como alvo terapêutico<sup>42</sup>. Ainda, a PDK3 é pouco inibida pelo piruvato ou seu análogo sintético DCA<sup>43</sup> e já foi também descrita em amostras humanas de melanoma em estudo prévio através da imunohistoquímica<sup>44</sup>.

Entretanto, existe apenas um estudo relacionado à elucidação do papel oncogênico de PDK3 no metabolismo tumoral do melanoma demonstrando que a inativação do eixo HIF1A/PDK3 leva a um metabolismo oxidativo mitocondrial<sup>39</sup>, não existindo neste estudo uma abordagem do papel funcional de PDK3 em células de melanoma.

Um estudo prévio do nosso grupo de pesquisa comparou, utilizando a técnica de *Nanostring*, a expressão gênica entre amostras de pacientes diagnosticados com melanoma obtidas antes e após tratamento com vemurafenibe, assim como entre a linhagem celular de melanoma SK-MEL-19 e sua respectiva linhagem resistente ao vemurafenibe. Diversos genes foram diferencialmente expressos, porém *PDK3* e *PRKAA2* foram os únicos alterados em ambos os tipos de amostra analisados (Figura 4), sendo observado um aumento em amostras humanas após tratamento com vemurafenibe (*fold-change*=1,3; *p*=0,036) e em linhagens resistentes ao vemurafenibe (*fold-change*=2,6; *p*=0,00000045) para *PDK3*<sup>45</sup>. A razão pela escolha da caracterização de PDK3 se dá pelo fato de ser uma enzima metabólica, diferente de *PRKAA2* que é uma proteína sinalizadora, e pelo fato da sua expressão já ter sido descrita em amostras humanas de melanoma em estudo prévio utilizando imunohistoquímica<sup>44</sup>.



Fonte: Dias.<sup>45</sup>

**Figura 4** – Diagrama de Venn apresentando os genes diferencialmente expressos únicos e em comum em amostras de pacientes com melanoma pós-tratamento com vemurafenibe e na linhagem celular de melanoma SK-MEL-19 resistente ao vemurafenibe.

Neste estudo, a hipótese é que a diminuição na expressão de PDK3 em linhagens celulares de melanoma pudesse influenciar em parâmetros de agressividade tumoral, uma vez que esses mecanismos em melanoma não são elucidados na literatura. Desta forma, inibir PDK3 surge como um possível alvo na estratégia de manejo do melanoma frente à resistência terapêutica, na tentativa de reverter a reprogramação metabólica tumoral e, assim, inibir a progressão tumoral.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo é caracterizar o papel da proteína PDK3 em melanoma e na sua resistência ao vemurafenibe.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a expressão de PDK3 em amostras humanas de melanoma pré e pós-tratamento com vemurafenibe através da imunohistoquímica;
- Avaliar a expressão de PDK3 em duas linhagens celulares de melanoma e suas respectivas linhagens resistentes ao vemurafenibe através do *Western blotting*;
- Avaliar, *in vitro*, o efeito funcional do *knockdown* do gene *PDK3* na viabilidade, proliferação, capacidade de formação de colônias, apoptose, migração, invasão e adesão celular de linhagens celulares de melanoma e suas respectivas linhagens resistentes ao vemurafenibe;
- Avaliar, *in vitro*, o efeito do *knockdown* do gene *PDK3* em parâmetros metabólicos como níveis de glicose e lactato extracelulares de linhagens celulares de melanoma e suas respectivas linhagens resistentes ao vemurafenibe.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Estudo com amostras humanas**

#### **4.1.1 Delineamento do estudo**

O estudo utilizando amostras humanas será baseado em um desenho longitudinal de coorte retrospectivo e realizado no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) com a colaboração dos Departamentos de Cirurgia, Oncologia Clínica e Patologia.

#### **4.1.2 Amostra**

A amostra foi definida em um projeto prévio<sup>45</sup>, por conveniência, contendo um total de 9 pacientes com diagnóstico de melanoma com mutação V600E no gene *BRAF*, de ambos os sexos, independentemente da idade e que possuíam amostras pré e pós-tratamento com vemurafenibe em bloco de parafina no serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. Os dados clínicos e patológicos foram obtidos de forma retrospectiva por revisão de prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) do Hospital de Câncer de Barretos/Fundação Pio XII (Tabela 1).

**Tabela 1** – Dados dos pacientes do Hospital de Amor incluídos no estudo (2016 – 2019). Fonte: Dias<sup>45</sup>.

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

(-): sem informação no prontuário. D: direito; E: esquerdo; F: feminino; M: masculino; M: metástase; M0: ausência de metástase; M1: metástase; N: Linfonodos; NA: não se aplica; N0: linfonodos não acometidos; N1: linfonodos acometidos; SNC: sistema nervoso central; T: Tumor primário; TX: não foi possível medir Breslow; T2, T3: tamanho do tumor.

#### 4.1.3 Amostras biológicas

Foram utilizadas amostras parafinadas arquivadas no Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. As amostras dos 9 pacientes incluídos no estudo (Tabela 2) foram classificadas como pré e pós-tratamento com vemurafenibe, sendo as amostras pré obtidas de pacientes com melanoma antes do início do tratamento com vemurafenibe e as amostras pós obtidas de pacientes que apresentaram novas lesões após iniciar o tratamento com vemurafenibe.

**Tabela 2** – Localização tumoral das 18 amostras de pacientes com melanoma incluídos no estudo obtidas pré e pós-tratamento com vemurafenibe.

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

D: direito; E: esquerdo.

#### 4.1.4 Imunohistoquímica (IHQ)

A expressão de PDK3 foi avaliada em cortes parafinados (4 µm) de amostras humanas de melanoma através da técnica de IHQ. As lâminas foram desparafinadas em estufa a 80°C por 10 minutos e submetida três banhos de xilol consecutivos por 5 minutos cada, seguido de hidratação com concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 70% e 50%) e lavadas em água. Foi realizada a recuperação antigênica submergindo as lâminas em recipiente contendo citrato (pH = 6,0) a 98°C por 20 minutos, seguido de 20 minutos de arrefecimento. As lâminas foram lavadas em tampão *Tris buffered saline* (TBS), seguido da inativação de peroxidases endógenas com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em metanol por 10 minutos. Para o sistema de visualização foi utilizado o *LabVision UltraVision Large Volume Detection System: anti-*

*Polyvalent, HRP (Thermo Fisher Scientific)*. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário (E-AB-62859, *Elasbscience*) na diluição 1:500 por 2 horas à temperatura ambiente. Após o período de incubação, as lâminas foram lavadas em tampão TBS e incubadas com *Biotinylated Goat Polyvalent Secondary (LabVision)* por 10 minutos. Após nova lavagem, as lâminas foram incubadas com *Streptavidin Peroxidase (LabVision)* por 10 minutos e lavadas em tampão TBS. Para visualização da reação, foi utilizado o *Liquid DAB+ Substrate Chromogen System (Dako)* como cromógeno, incubando as lâminas por 10 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. Ao final, as lâminas foram lavadas em água, contra-coradas com hematoxilina (*EasyPath*) durante 1 minuto, desidratadas com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 95% e 100%), submetidas a três banhos de xilol consecutivos por 5 minutos cada e, por fim, montadas com meio de montagem *Entellan® (Merck)* e lamínula. Como controle positivo, foi utilizado corte histológico de rim. A expressão proteica foi avaliada por patologistas, semi-quantitativamente e semi-qualitativamente, em células de melanoma, considerando a extensão da coloração (0: sem células imunorreativas; 1: <5% de células imunorreativas; 2: 5-50% de células imunorreativas; e 3: > 50% de células imunorreativas) e a intensidade da coloração (0: negativo; 1: fraco; 2: intermediário; e 3: forte), respectivamente. O escore final foi definido como a soma de ambos os parâmetros (extensão e intensidade) e agrupados como negativos (escore 0 a 2) e positivos (escore 3 a 6).

## **4.2 Ensaios *in vitro***

### **4.2.1 Linhagens celulares**

Foram utilizadas duas linhagens celulares comerciais de melanoma sendo uma de origem primária (A375) e uma de origem metastática (SK-MEL-19) e suas respectivas linhagens resistentes ao vemurafenibe (PLX R), gentilmente cedidas pela Dra. Sylvia Stuchi Maria Engler (Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo – USP).

O cultivo celular foi realizado em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco)* suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Gibco*) e 1% de solução penicilina/estreptomicina (P/S, *Sigma-Aldrich*), assim como com vemurafenibe (*Selleckchem*) 3 ou 4,5 µM diluído em dimetilsulfoxido (DMSO) no caso das linhagens resistentes. As células

foram mantidas em estufa sob condições normais de cultivo (atmosfera controlada a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de umidade).

A autenticação celular foi realizada por meio da análise de *Short Tandem Repeat (STR)* no Hospital de Câncer de Barretos, de acordo com os padrões de referência internacionais de autenticação de linhagens celulares, utilizando um painel de oito *primers* fluorescentes (D5S818, D13S317, D7S820, D16S539, vWA, TH01, TPOX I CSF1P0)<sup>46,47</sup>, além de submetidas ao teste *MycAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit* (Lonza) quinzenalmente. Visando manter os padrões celulares estáveis após o descongelamento, foram utilizadas células em terceira passagem para realização dos experimentos.

**Tabela 3** – Origem e perfil mutacional das linhagens celulares utilizadas no estudo.

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

\* Realizado previamente pelo grupo de pesquisa. PLX R: resistentes ao vemurafenibe; WT: *wild-type*.

#### 4.2.2 Western blotting

As expressões proteicas nas linhagens celulares de melanoma foram avaliadas através da técnica de *Western blotting*. As células foram cultivadas em DMEM 10% SFB sob condições normais de cultivo em placa de 6 poços. Após atingirem cerca de 80% de confluência, as células foram coletadas e submetidas a 15 minutos de lise com tampão de lise (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% NP40) suplementado com coquetel de inibidores de protease (*cOmplete Protease Inhibitor Cocktail, Roche*) em gelo seguido de 15 minutos de centrifugação a 13000 rpm a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações proteicas das amostras foram quantificadas a partir de curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) pelo ensaio Bradford (*Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad*). A partir das concentrações calculadas, alíquotas de 25 µg de proteína total diluídas em tampão de amostra (*Laemmli 2x Concentrate, Sigma-Aldrich*) foram preparadas e submetidas a 5 minutos

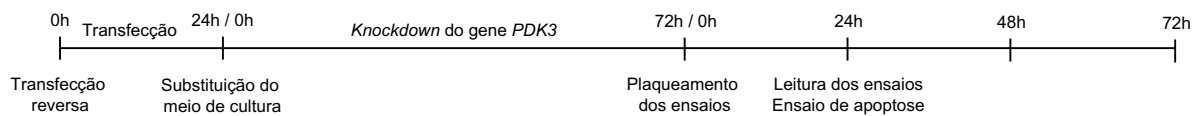
de desnaturação a 95°C. As proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 10%, transferidas para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham Protran, GE Healthcare Life Sciences*) utilizando o equipamento *TransBlot Turbo Transfer (Bio-Rad)* e as membranas pós-transferência submetidas à uma hora de bloqueio com 5% de leite desnatado (Molico) em temperatura ambiente. As membranas pós-bloqueio foram incubadas com os anticorpos primários (Tabela 4) diluído em 5% BSA, *overnight* a 4°C seguido da incubação com o anticorpo secundário anti-*mouse* (7076, *Cell Signaling*) ou anti-*rabbit* (sc-2020, *Santa Cruz Biotechnology*) na diluição de 1:5000 em 5% Molico em temperatura ambiente por uma hora. As membranas foram reveladas por quimioluminescência no equipamento ImageQuant LAS 4000mini (*GE Healthcare Life Sciences*) utilizando o *SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signalling Technology)* e *SuperSignal™ West Atto (Thermo Fisher Scientific)*. Como controle de carregamento foi utilizada a proteína endógena  $\beta$ -actina após a remoção das proteínas da membrana utilizada com o *stripping buffer Restore™ Western blot (Thermo Fisher Scientific)* e a densitometria foi realizada pelo *software ImageJ (National Institutes of Health, versão 1.51)*.

**Tabela 4** – Anticorpos primários e condições de incubação utilizados no *Western blotting*.

Proteína	Anticorpo	Diluição
ACBT	8H10D10, <i>Cell Signaling Technology</i>	1:2000
AKT	4691S, <i>Cell Signaling Technology</i>	1:1000
pAKT (Ser437)	4060s, <i>Cell Signaling Technology</i>	1:1000
ASCT2	ABN73, <i>Millipore</i>	1:1000
CA9	ab15086, <i>Abcam</i>	1:2000
GLS	A83195, <i>Sigma-Aldrich</i>	1:500
GLUT1	ab15309, <i>Abcam</i>	1:1000
HK2	ab104836, <i>Abcam</i>	1:1000
LDHA	ab101562, <i>Abcam</i>	1:3000
MCT1	sc-365501, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:200
MCT4	sc-50329, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:2000
PDK1	sc-28783, <i>Santa Cruz Biotechnology</i>	1:1000
PDK2	E-AB-12618, <i>Elabscience</i>	1:1000
PDK3	E-AB-62859, <i>Elabscience</i>	1:1000

#### 4.2.3 Knockdown (KD) do gene *PDK3*

O gene *PDK3* foi silenciado através da técnica de transfecção reversa. Foram plaqueadas  $1,5 \times 10^5$  células (A375 e A375 PLX R) ou  $3 \times 10^5$  células (SK-MEL-19 e SK-MEL-19 PLX R) em placa de 6 poços, diluídas em 1500  $\mu\text{L}$  de DMEM 10% SFB sem antibióticos e expostas a 15 nM de siRNA para *PDK3* (*Silencer<sup>®</sup> Select, s10260, Invitrogen*) ou siRNA irrelevante como controle negativo (*Silencer Select Negative Control No.1 siRNA, 4390843, Invitrogen*), ambos diluídos em 500  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM I (*Gibco*) com 1,5  $\mu\text{L/mL}$  de *Lipofectamine RNAiMAX Reagent* (*Invitrogen*). Após 24 horas, o meio de cultura utilizado para a transfecção (meio de transfecção) foi substituído por meio DMEM 10% SFB com 1% P/S e 3  $\mu\text{M}$  de PLX (no caso das linhagens resistentes ao vemurafenibe) e as células crescidas sob condições normais cultivo. Após a padronização do KD, as células foram desagregadas com tripsina e plaqueadas de acordo com cada ensaio, com exceção do ensaio de apoptose (item 4.2.5.4) (Figura 5). O KD de *PDK3* foi confirmado por *Western blotting* (item 4.2.2).



**Figura 5** – Ordem cronológica desde a transfecção reversa para o KD de *PDK3*, plaqueamento dos ensaios e leitura dos ensaios.

#### 4.2.4 Concentração inibitória média ( $\text{IC}_{50}$ )

A concentração de PLX capaz de inibir 50% da viabilidade celular após o KD de *PDK3* foi avaliada através da técnica colorimétrica de sulforodamina B (SRB; TOX-6, *Sigma-Aldrich*) quantificada pela biomassa celular. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células silenciadas e respectivos controles em placas de 96 poços em meio de cultura DMEM 10% SFB sob condições normais de cultivo. Após 4 horas de adesão, o meio de plaqueamento foi substituído pelo meio contendo concentrações crescentes de PLX (0, 5, 7,5, 10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{M}$ ). Após 24 horas, as células foram submetidas à lavagem com DPBS e fixação com 100  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético 10% (TCA; *Sigma-Aldrich*) gelado por uma hora a 4°C seguido de lavagem com água destilada e exposição ao ar para secagem. Após secas, as células foram coradas com 50  $\mu\text{L}$  de SRB por 30 minutos e lavadas com ácido acético 1%. Após expostas ao ar para secagem por pelo menos 30 minutos, a coloração das células foi solubilizada com 100  $\mu\text{L}$  de Tris 10 mM

por 5 minutos sob agitação. A absorvância, proporcional à biomassa celular, foi mensurada pelo espectrofotômetro (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*) a 565 nm, utilizando 690 nm como referência, e o valor de IC<sub>50</sub> foi obtido pelo *software GraphPad Prism* (versão 9.0.0) através da análise de regressão não-linear utilizando a equação de dose-resposta sigmoideal (inclinação variável).

#### **4.2.5 Caracterização *in vitro* do efeito do KD de PDK3**

Os parâmetros celulares foram avaliados após o KD de PDK3 nas linhagens A375, A375 PLX R, SK-MEL-19 e SK-MEL-19 PLX R por meio dos ensaios descritos a seguir.

##### **4.2.5.1 Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada através da técnica colorimétrica de SRB (TOX-6, *Sigma-Aldrich*) quantificada pela biomassa celular. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células silenciadas e respectivos controles em placas de 96 poços em meio de cultura DMEM 10% SFB sob condições normais de cultivo. Após 24 horas, as células foram submetidas à lavagem com DPBS e fixação com 100 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA; *Sigma-Aldrich*) gelado por uma hora a 4°C seguido de lavagem com água destilada e exposição ao ar para secagem. Após secas, as células foram coradas com 50 µL de SRB por 30 minutos e lavadas com ácido acético 1%. Após expostas ao ar para secagem por pelo menos 30 minutos, a coloração das células foi solubilizada com 100 µL de Tris 10 mM por 5 minutos sob agitação. A absorvância, proporcional à biomassa celular, foi mensurada pelo espectrofotômetro (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*) a 565 nm, utilizando 690 nm como referência.

##### **4.2.5.2 Proliferação celular**

A proliferação celular foi avaliada através da técnica colorimétrica de incorporação de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; *Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric kit, Roche*), seguindo as recomendações do fabricante. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células silenciadas e respectivos controles em placas de 96 poços em meio de cultura DMEM 10% SFB com 1,0 µL da solução de marcação BrdU sob condições normais de cultivo. Após 24 horas, as células foram fixadas com 200 µL da solução fixadora e desnaturante de DNA por 30 minutos à temperatura ambiente seguido de incubação com 100 µL do anticorpo anti-BrdU por 90 minutos à

temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas com 200 µL de solução de lavagem seguido da adição de 100 µL da solução substrato e incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e protegido da luz. A absorvância, proporcional às células que incorporaram o BrdU, foi mensurada pelo espectrofotômetro (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*) a 370 nm, utilizando 492 nm como referência.

#### 4.2.5.3 Formação de colônias

A capacidade de formação de colônias foi avaliada através do ensaio clonogênico dependente de ancoragem. Foram plaqueadas  $1 \times 10^3$  células silenciadas e respectivos controles em placas de 6 poços com meio de cultura DMEM 10% SFB (3 µM PLX no caso das linhagens resistentes ao vemurafenibe) sob condições normais de cultivo. Após 14 dias, as células foram lavadas com 2,0 mL de DPBS e fixadas com 2,0 mL de metanol gelado por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram coradas com 2,0 mL de cristal violeta 0,5% diluído em 50% DPBS e 50% metanol por 15 minutos à temperatura ambiente e lavadas com água destilada. Após expostas ao ar para secagem, as colônias formadas foram fotografadas utilizando o microscópio Olympus SZX7 (magnificação de 100x) e quantificadas pelo *software* ImageJ (*National Institutes of Health*, versão 1.41). A absorvância resultante da solubilização das colônias coradas utilizando ácido acético 10%, proporcional à capacidade clonogênica das células foi mensurada pelo espectrofotômetro (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*) a 570 nm.

#### 4.2.5.4 Apoptose

A apoptose foi avaliada através do ensaio de Anexina V e Iodeto de Propídio (*Roche*), seguindo as recomendações do fabricante. Noventa e seis horas após a transfecção para *KD* de *PDK3*, o sobrenadante e as células desagregadas com *Accutase™* (*Thermo Fisher Scientific*) foram colhidos em tubos de citometria e lavados com DPBS. Em seguida, as células foram submetidas à solução fixadora e incubadas com anexina V e iodeto de propídio por 15 minutos à temperatura ambiente e protegidas da luz. A porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose foi determinada por citometria de fluxo (*Accuri C6 Plus Flow Cytometer, BD Biosciences*) e os resultados analisados pelo *software* *BD Accuri™ C6* (*BD Biosciences, versão 1.0.264.21*).

#### 4.2.5.5 Migração celular

A migração celular foi avaliada através do ensaio de migração *transwell* utilizando os insertos *Falcon Permeable Support for 24-well Plate with 8.0 µm Transparent PET Membrane* (Corning). Foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células (A375 e A375 PLX R) ou  $4 \times 10^5$  células (SK-MEL-19 e SK-MEL-19 PLX R) silenciadas e respectivos controles no compartimento superior dos insertos, diluídas em 500 µL de meio de cultura DMEM 0% SFB, permitindo a migração das células até o compartimento inferior contendo 750 µL de meio de cultura DMEM 10% SFB, utilizado como quimioatrativo para indução da migração celular. Após 24 horas de incubação sob condições normais de cultivo, os insertos foram lavados com DPBS por 5 minutos e fixados com metanol gelado durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após fixação, as células remanescentes presentes no compartimento superior foram removidas com o auxílio de haste de algodão. Os insertos foram corados com hematoxilina (*Easypath*) por 10 minutos e lavados em água destilada seguindo para coloração em eosina (*Easypath*) por 10 minutos e nova lavagem em água destilada. Após secagem por exposição ao ar por pelo menos 24 horas, as membranas foram retiradas dos insertos e coladas em lâminas com xilol e *Entellan*<sup>®</sup> (Merck). As lâminas foram fotografadas no microscópio Olympus BX43 (magnificação de 20x) e as células capazes de migrar foram quantificadas com o *software* ImageJ (*National Institute of Health*, versão 1.41).

#### 4.2.5.6 Invasão celular

A invasão celular foi avaliada através da técnica da câmara de invasão utilizando as placas de invasão *Corning BioCoat Matrigel Invasion Chamber with BD Matrigel Matrix* (Corning). O matrigel presente nos insertos foi previamente hidratado com 500 µL de DMEM 0% SFB por uma hora. Após a remoção do meio de cultura, foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células (A375 e A375 PLX R) ou  $4 \times 10^5$  células (SK-MEL-19 e SK-MEL-19 PLX R) silenciadas e respectivos controles no compartimento superior dos insertos, diluídas em 500 µL de meio de cultura DMEM 0% SFB, permitindo a invasão das células até o compartimento inferior contendo 750 µL de meio de cultura DMEM 10% SFB, utilizado como quimio-atrativo para indução da invasão celular. Após 24 horas de incubação sob condições normais de cultivo, os insertos foram lavados com DPBS por 5 minutos e fixados com metanol gelado durante 5 minutos à

temperatura ambiente. Após fixação, as células remanescentes presentes no compartimento superior foram removidas com o auxílio de haste de algodão. Os insertos foram corados com hematoxilina (*Easypath*) por 10 minutos e lavados em água destilada seguindo para coloração em eosina (*Easypath*) por 10 minutos e nova lavagem em água destilada. Após secagem por exposição ao ar por pelo menos 24 horas, as membranas foram retiradas dos insertos e coladas em lâminas com xilol e *Entellan*<sup>®</sup> (*Merck*). As lâminas foram fotografadas no microscópio Olympus BX43 (magnificação de 20x) e as células capazes de invadir foram quantificadas com o *software* ImageJ (*National Institute of Health*, versão 1.41).

#### **4.2.5.7 Adesão celular**

A adesão celular foi avaliada através da técnica baseada na interação proteína-proteína. Uma placa de 96 poços foi revestida com 10 µg/mL de BSA (*Sigma Aldrich*) em DPBS e Matrigel<sup>®</sup> [1:10]. Após 24 horas, o excesso de solução foi removido e os poços hidratados com 100 µL de 0,1% BSA por 2 horas, seguido de lavagem com PBS. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células silenciadas e respectivos controles e, após 24 horas, as células não aderentes foram removidas com DPBS enquanto as células aderidas foram fixadas com 10% TCA e coradas com cristal violeta 0,5% diluído em 50% DPBS e 50% metanol. Os poços foram fotografados no microscópio Olympus SZX7 (magnificação de 100x) e as células capazes de aderir foram quantificadas com o *software* ImageJ (*National Institute of Health*, versão 1.41).

#### **4.2.5.8 Quantificação de glicose extracelular**

A quantificação de glicose extracelular foi realizada através do kit comercial *Glucose Colorimetric Assay (SpinReact)*, seguindo as recomendações do fabricante. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células silenciadas e respectivos controles em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM 10% SFB e sob condições normais de cultivo. O meio de cultura utilizado para plaquear o ensaio (T0) e o meio de cultura coletado dos poços após 24 horas (T24) foram centrifugados antes da quantificação. A proteína total (expressa como biomassa total) foi avaliada através do ensaio de SRB para normalização (vide item 4.2.5.1). A absorvância, proporcional à quantidade de glicose extracelular, foi mensurada pelo espectrofotômetro (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*) a 570 nm. O resultado foi expresso como influxo de glicose obtido

através da subtração entre a glicose extracelular quantificada em T0 e a glicose extracelular quantificada em T24.

#### **4.2.5.9 Quantificação de lactato extracelular**

A quantificação de lactato extracelular foi realizada através do kit comercial *Lactate Assay (SpinReact)*, seguindo as recomendações do fabricante. Foram plaqueadas  $5 \times 10^3$  células silenciadas e respectivos controles em placas de 96 poços com meio de cultura DMEM 10% SFB e sob condições normais de cultivo. O meio de cultura utilizado para plaquear o ensaio (T0) e o meio de cultura coletado dos poços após 24 horas (T24) foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  e centrifugados antes da quantificação. A proteína total (expressa como biomassa total) foi avaliada através do ensaio de SRB para normalização (vide item 4.2.5.1). A absorvância, proporcional à quantidade de lactato extracelular em cada poço, foi mensurada pelo espectrofotômetro (*Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific*) a 570 nm. O resultado foi expresso como efluxo de lactato obtido através da subtração entre o lactato extracelular quantificado em T24 e o lactato extracelular quantificado em T0.

#### **4.2.6 Análise estatística dos resultados**

Os resultados obtidos na avaliação da expressão de PDK3 em amostras humanas de melanomas foram analisados utilizando no *software* RStudio (versão 2023). Os grupos foram definidos mediante a graduação final obtida na avaliação das reações de IHQ (negativa e positiva). A comparação entre a frequência de expressão de proteínas nas amostras pareadas (obtidas pré e pós tratamento com vemurafenibe) foi avaliada para significância estatística utilizando o teste de *McNemar*.

Os dados quantitativos foram analisados no *software* *GraphPad Prism* (versão 9.0.0) e apresentados como a média e o erro padrão de triplicatas biológicas e experimentais. Para variáveis quantitativas que apresentarem distribuição normal, a análise estatística foi realizada utilizando o teste *t-Student* ou ANOVA seguida de análise *post hoc*. Para variáveis quantitativas que não apresentarem distribuição normal, a análise estatística foi realizada utilizando teste de *Mann-Whitney* e *Kruskall Wallis*.

Para todos os testes será considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

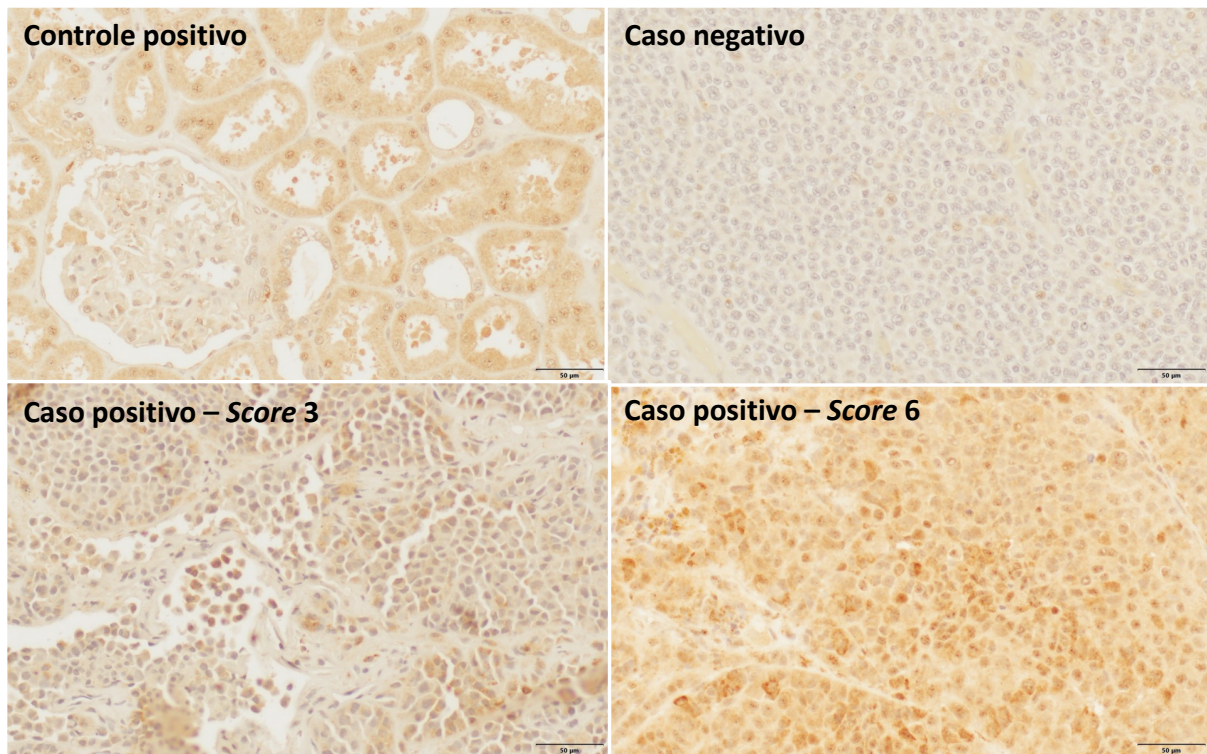
## **5 ASPECTOS ÉTICOS**

O uso de amostras humanas neste projeto encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos com parecer 7.319.662 e registro na Plataforma Brasil com número CAAE 74071317.0.0000.5437. Os dados dos pacientes foram obtidos exclusivamente de forma retrospectiva em prontuários arquivados no SAME e de análises do material biológico humano em blocos de parafina. Todas as informações referentes aos participantes serão mantidas em sigilo sob a responsabilidade do investigador principal (orientador) não havendo divulgação pública do nome ou de qualquer informação que possa identificar o participante. Devido à necessidade de garantir material estocado no Departamento de Patologia para possíveis testes de diagnósticos futuros, os blocos de parafina não serão esgotados ou prejudicados. Assim, trata-se de um estudo com risco mínimo ao participante da pesquisa caracterizado apenas pela eventual quebra de sigilo. Foi solicitada dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido a qual foi aprovada pelo CEP. Os participantes da pesquisa não terão benefício direto, no entanto, futuros pacientes diagnosticados com melanoma poderão se beneficiar do conhecimento gerado.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Amostras humanas

A expressão da proteína PDK3 foi avaliada por IHQ em amostras de tecidos parafinados de 9 pacientes com melanoma mutados em BRAF<sup>V600E</sup> antes e após o tratamento com vemurafenibe. A PDK3 foi localizada predominantemente no citoplasma (Figura 6).



**Figura 6** – Fotomicrografias representativas de expressão positiva da PDK3 avaliada por imunohistoquímica. Amplificação 40x.

Entretanto, não se observou diferença na frequência de expressão da PDK3 quando comparado as amostras pré e pós-tratamento com vemurafenibe (Tabela 5 e 6).

**Tabela 5** – Score de expressão de PDK3 por amostra de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) tratamento com vemurafenibe.

ID	Amostra	
	Pré-PLX	Pós-PLX
01	3	5
02	6	6
03	5	5
04	0	5
05	5	0
06	5	4
07	5	6
08	0	0
09	0	0

PLX: vemurafenibe.

**Tabela 6** – Comparação da frequência de expressão de PDK3 em amostras de melanoma humano antes (pré-PLX) e após (pós-PLX) tratamento com vemurafenibe ( $p=1,000$ ).

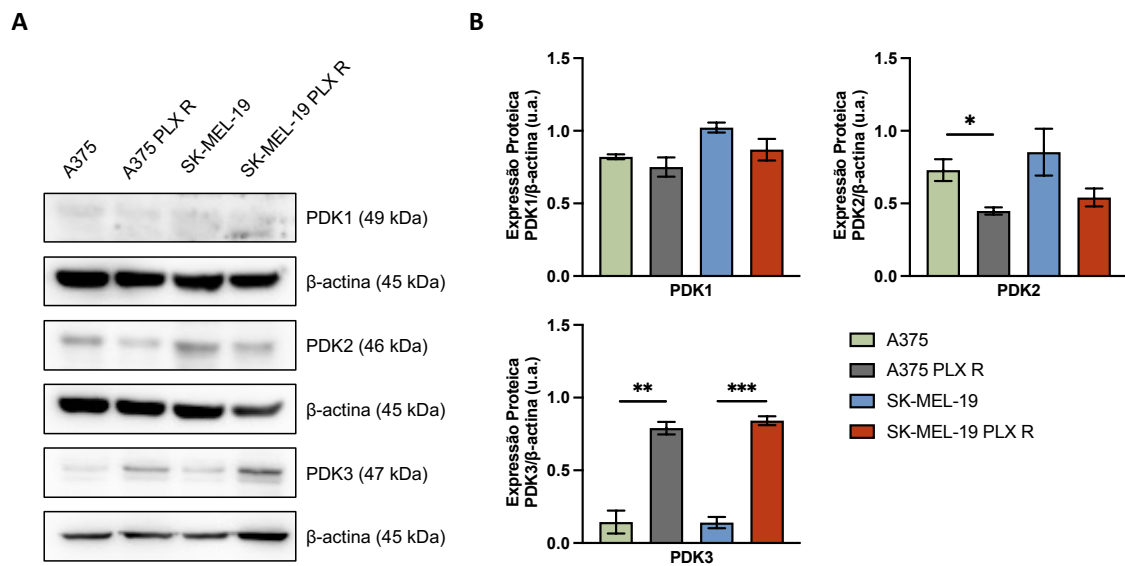
Expressão	Amostra	
	Pré-PLX	Pós-PLX
PDK3	n (%)	n (%)
Negativo	3 (33,33)	3 (33,33)
Positivo	6 (66,66)	6 (66,66)

PLX: vemurafenibe.

## 6.2 Ensaio *in vitro*

### 6.2.1 Expressão da PDK3

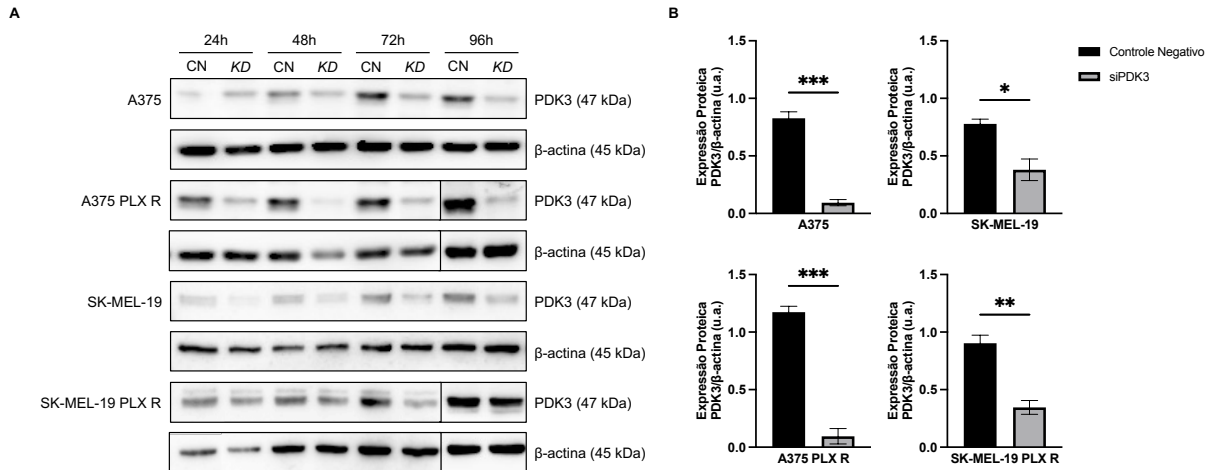
De acordo com a Figura 7, pode-se observar a expressão aumentada da isoforma PDK3 nas linhagens PLX R, mas não das outras isoformas (PDK1 e PDK2) quando comparadas com as respectivas linhagens parentais.



**Figura 7** – Expressão das isoformas PDK1, PDK2 e PDK3 avaliada por *Western blotting*. **(A)** Imagem representativa. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe; u.a., unidade arbitrária; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

### 6.2.2 Padronização do *KD* do gene *PDK3*

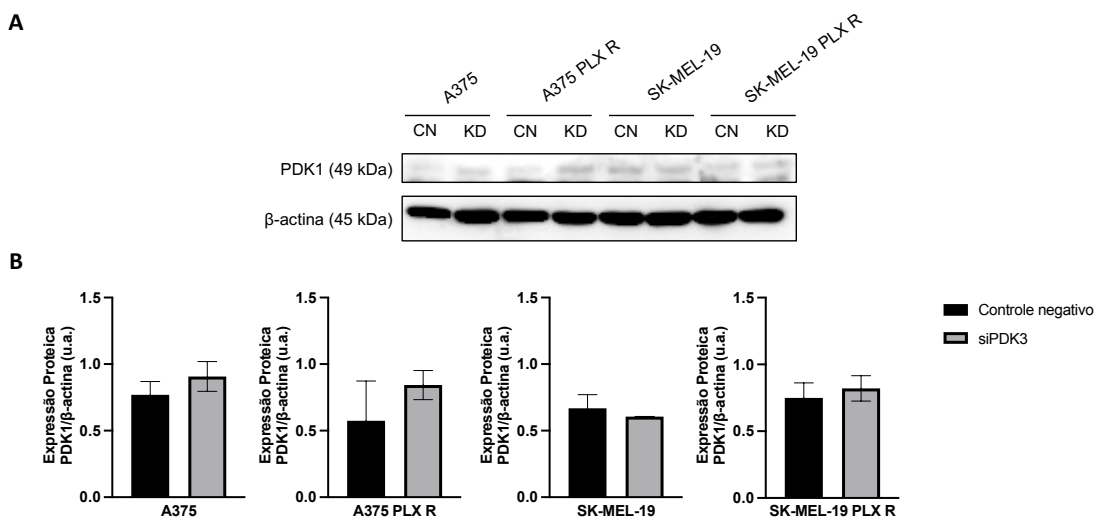
O *KD* de *PDK3* foi avaliado em quatro tempos diferentes (24, 48, 72 e 96 horas) após a substituição do meio de transfecção. Observou-se observar por *Western blotting* que, para a linhagem SK-MEL-19 PLX R, o *KD* do gene *PDK3* se torna evidente nas 72 horas após a substituição do meio de transfecção, sendo esse o único tempo em que a célula se mantém silenciada (Figura 8A). Dessa forma, com a finalidade de obter um resultado comparável, o tempo de 72 horas após a substituição do meio de transfecção, ou seja, o tempo após o *KD* de *PDK3*, foi padronizado para todas as linhagens celulares, observando uma diminuição significativa na expressão da proteína PDK3 nas células em estudo (Figura 8B). Sendo assim, os ensaios funcionais e de parâmetros metabólicos foram plaqueados 72 horas após a substituição do meio de transfecção e analisados 24 horas após o plaqueamento, com exceção do ensaio de apoptose (item 4.2.5.4) (Figura 5).



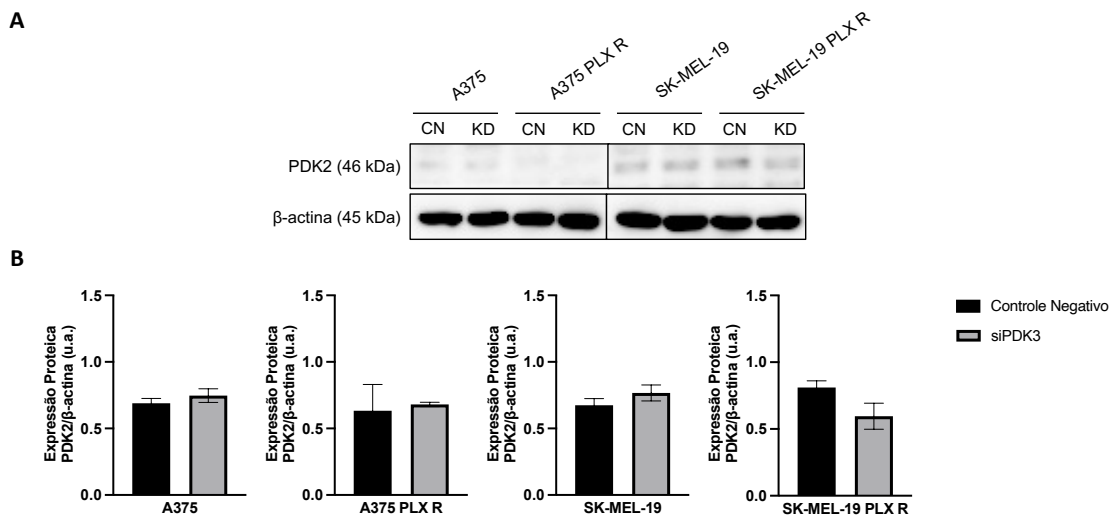
**Figura 8** – Expressão de PDK3 após *KD* de *PDK3* avaliada por *Western blotting*. **(A)** Imagem representativa em quatro tempos distintos (24, 48, 72 e 96 horas) após a substituição do meio de transfecção. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes 72 horas após o *KD* de *PDK3*. CN: controle negativo; *KD*: *knockdown*; PLX R: resistente ao vemurafenibe; u.a., unidade arbitrária; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

### 6.2.3 Expressão de PDK1 e PDK2 após o *KD* de *PDK3*

Buscando observar a presença de um possível mecanismo compensatório de atividade entre as isoformas do complexo PDK quando silenciada a *PDK3*, foi avaliada a expressão de *PDK1* e *PDK2* após o *KD* de *PDK3*. Entretanto, não se observou diferença nas expressões de nenhuma das isoformas após o *KD* de *PDK3* (Figura 9 e 10).



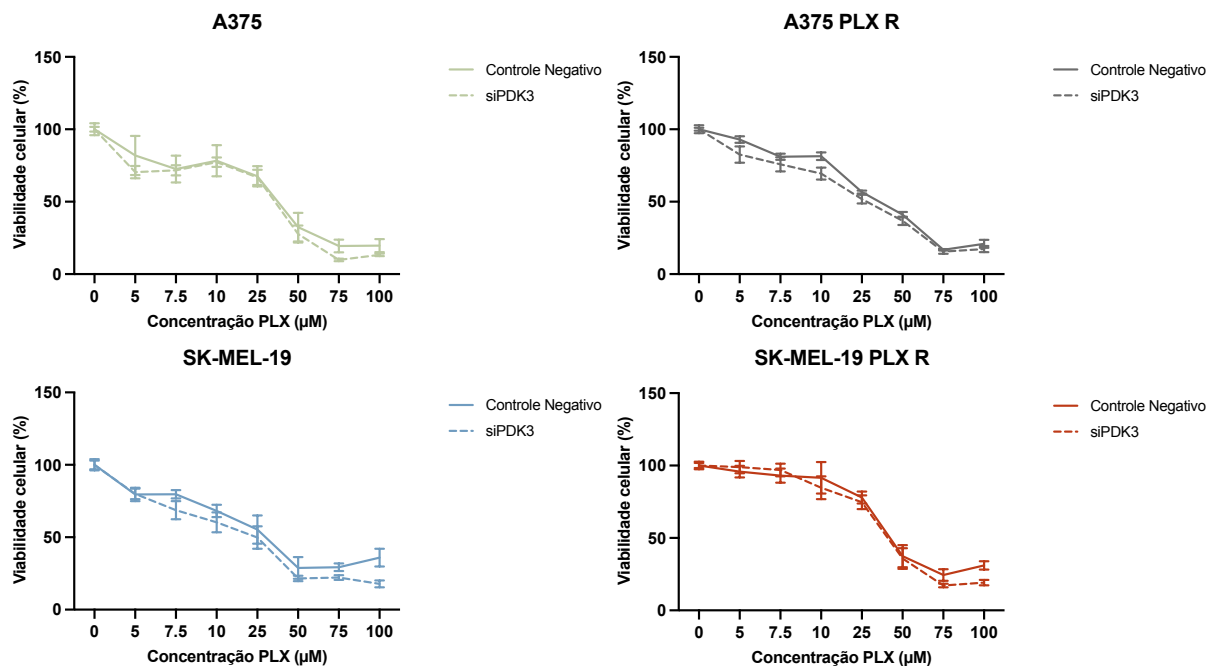
**Figura 9** – Expressão de *PDK1* após *KD* de *PDK3* avaliada por *Western blotting*. **(A)** Imagem representativa. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de dois experimentos. CN: controle negativo; *KD*: *knockdown*; PLX R: resistente ao vemurafenibe; u.a., unidade arbitrária.



**Figura 10** – Expressão de PDK2 após *KD* de *PDK3* avaliada por *Western blotting*. **(A)** Imagem representativa. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de três experimentos. CN: controle negativo; KD: *knockdown*; PLX R: resistente ao vemurafenibe; u.a., unidade arbitrária.

#### 6.2.4 Determinação da $IC_{50}$ do vemurafenibe após o *KD* de *PDK3*

Foi avaliado se o *KD* de *PDK3* influenciava na  $IC_{50}$  de vemurafenibe (PLX) nas linhagens em estudo. Entretanto, não se observou diferença na sensibilização das células de melanoma após o *KD* de *PDK3* (Figura 11, Tabela 7).



**Figura 11** –  $IC_{50}$  após o *KD* de *PDK3* em linhagens de melanoma expostas a concentrações crescentes de PLX por Sulforodamina B. Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de triplicatas de dois experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe.

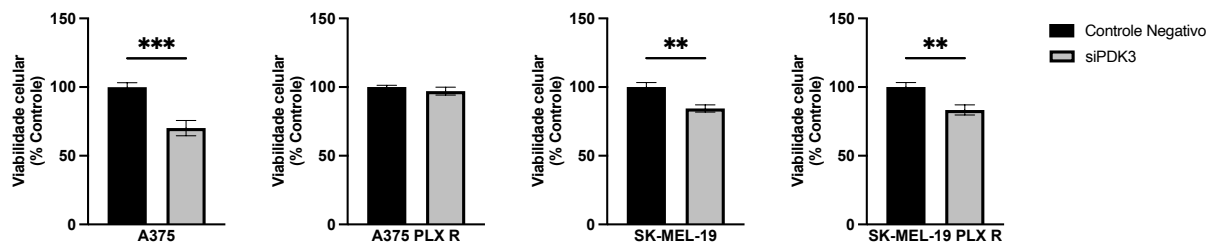
**Tabela 7** – Valores de IC<sub>50</sub> após o *KD* de *PDK3* em linhagens de melanoma expostas a concentrações crescentes de vemurafenibe. Dados apresentados como média ± erro padrão com intervalo de confiança de 95%.

Linhagens	IC <sub>50</sub> PLX (μM)	
	Controle Negativo	siPDK3
A375	28,66 ± 4,83	23,08 ± 2,43
A375 PLX R	31,12 ± 1,83	23,69 ± 1,73
SK-MEL-19	28,39 ± 3,46	18,82 ± 1,80
SK-MEL-19 PLX R	45,98 ± 5,74	38,45 ± 4,41

PLX: vemurafenibe; PLX R: resistente ao vemurafenibe.

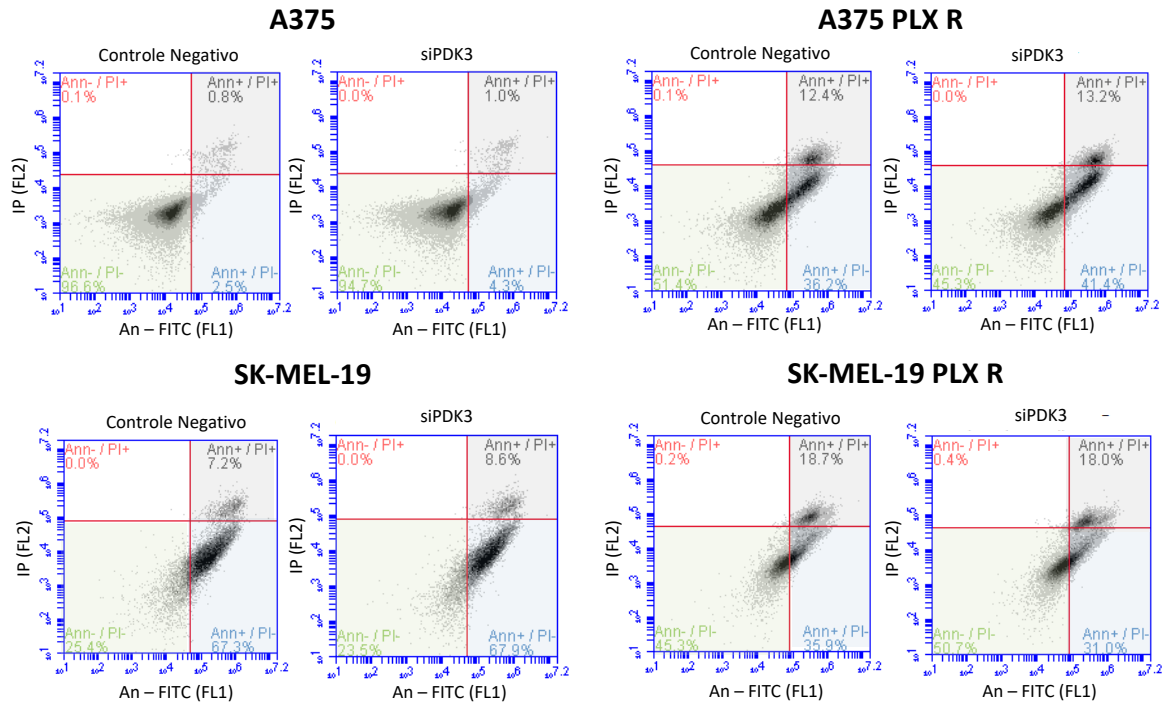
### 6.2.5 Viabilidade celular e apoptose após o *KD* de *PDK3*

Após o *KD* de *PDK3*, buscou-se avaliar *in vitro* a influência da *PDK3* sobre parâmetros de agressividade tumoral. Observou-se a diminuição da viabilidade celular nas linhagens em estudo, com exceção da linhagem A375 PLX R (Figura 12). Entretanto, não se observou influência significativa do *KD* de *PDK3* na apoptose dessas linhagens celulares (Figura 13).

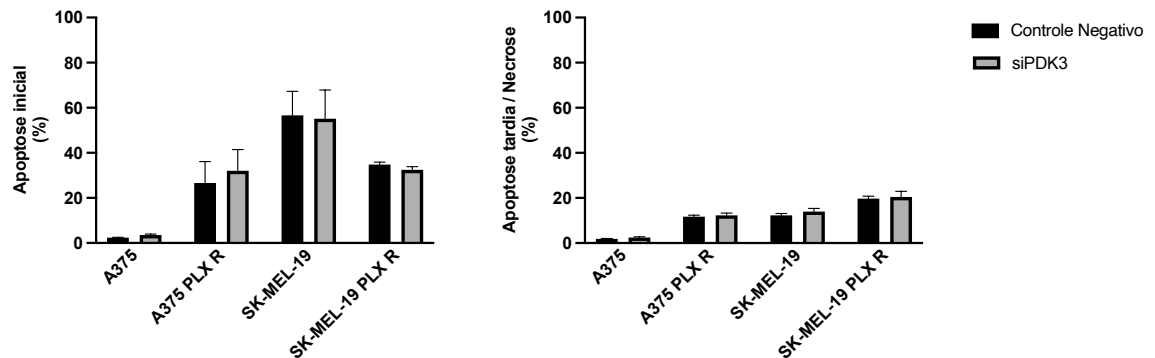


**Figura 12** – Viabilidade celular após o *KD* de *PDK3* por Sulforodamina B. Valores normalizados e expressos pela média ± SEM de triplicatas de três experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe; \*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

A



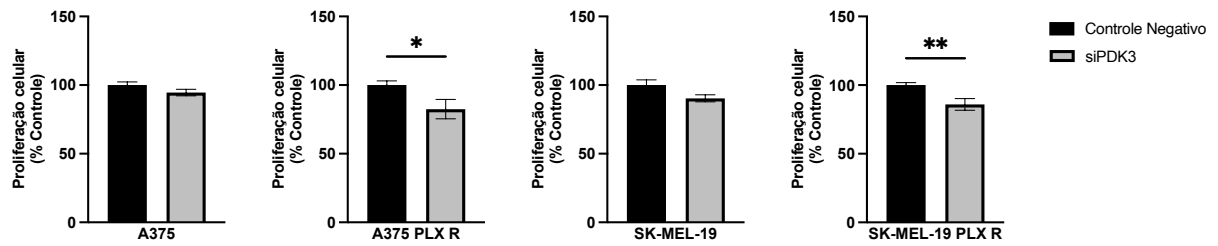
B



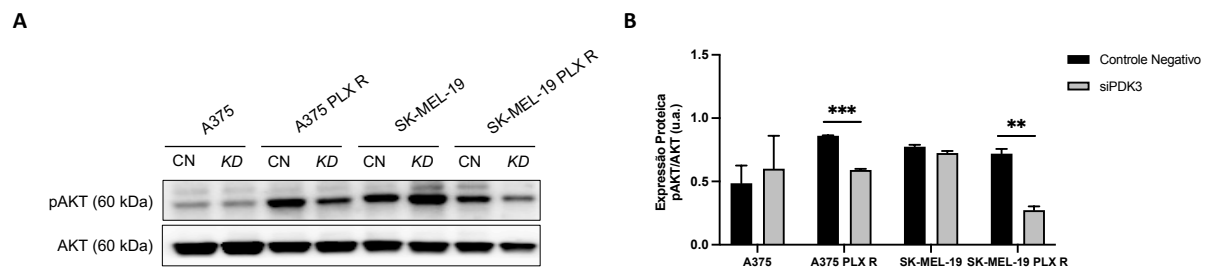
**Figura 13** – Apoptose após o *KD* de *PDK3* por Anexina V (An) e Iodeto de propídio (IP). **(A)** Imagem representativa da distribuição das células entre vivas (An- e IP-), em apoptose inicial (An+ e IP-) e em apoptose tardia ou necrose (An+ e IP+). **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de três experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe.

### 6.2.6 Proliferação celular e expressão de AKT fosforilado após o *KD* de *PDK3*

Diante da diminuição na viabilidade celular após o *KD* de *PDK3* e a não influência na apoptose, foram realizados ensaios para análise de proliferação celular a fim de investigar se a diminuição na viabilidade celular das linhagens em estudo estaria relacionada com a influência do *KD* de *PDK3* na divisão celular. Os resultados obtidos do ensaio por incorporação por BrdU demonstraram que o *KD* de *PDK3* diminuiu a proliferação celular (Figura 14) e a expressão de AKT fosforilado (Figura 15) apenas em linhagens PLX R.



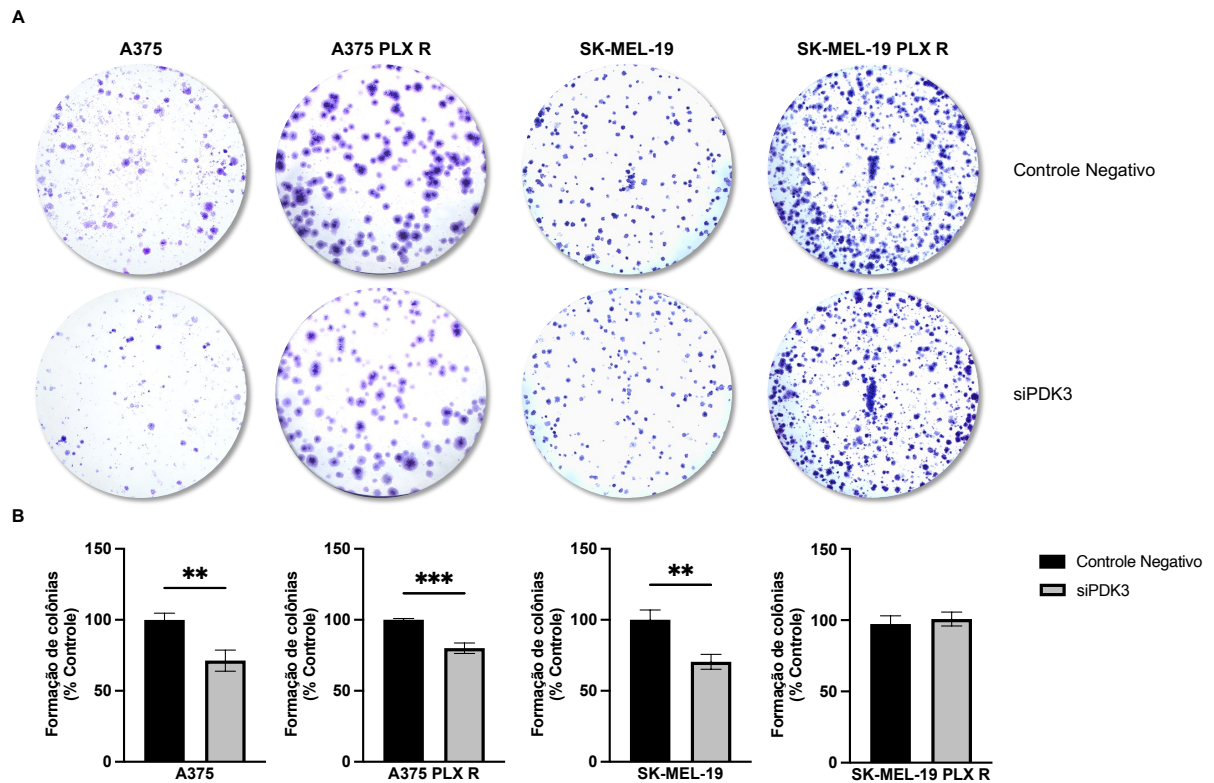
**Figura 14** – Proliferação celular após o KD de *PDK3* por incorporação de BrdU. Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de triplicatas de três experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe.



**Figura 15** – Expressão de pAKT (AKT fosforilado) avaliada *por Western blotting*. **(A)** Imagem representativa. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de dois experimentos independentes. AKT: proteína quinase B; CN: controle negativo; *KD*: *knockdown*; PLX R: resistente ao vemurafenibe; u.a., unidade arbitrária. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 6.2.7 Capacidade de formação de colônias após o KD de *PDK3*

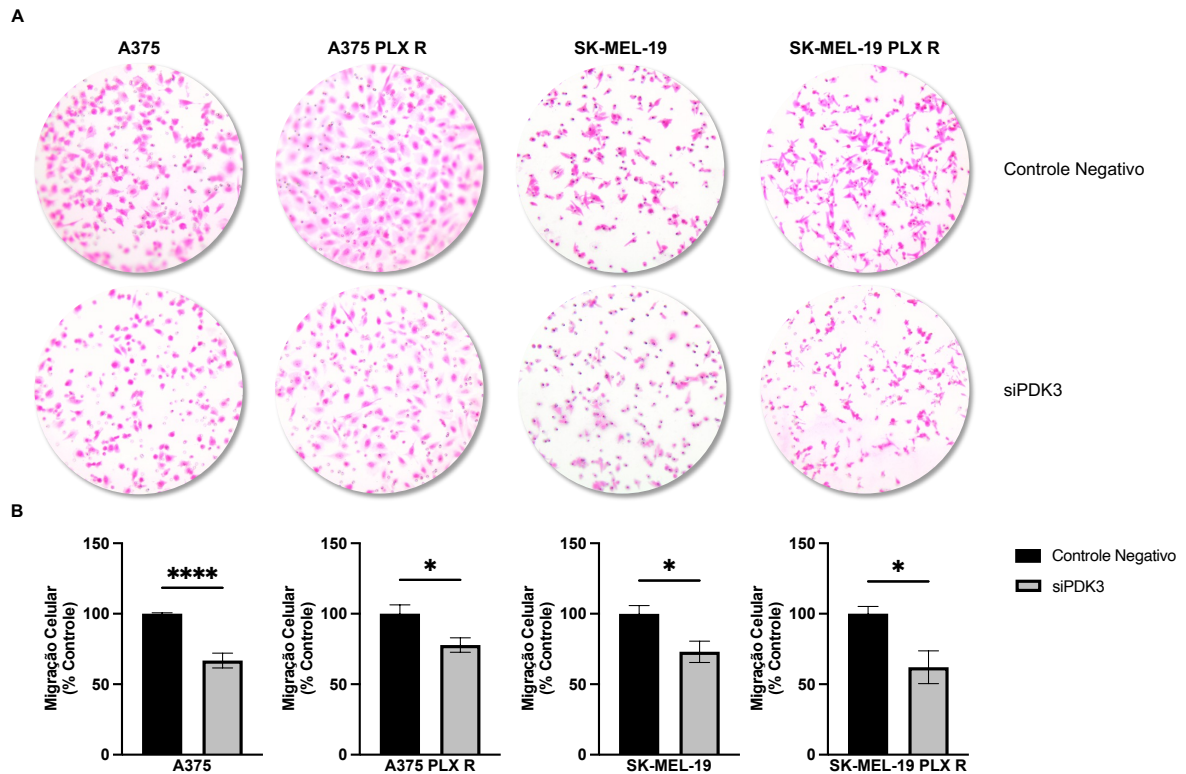
Em relação à capacidade de formação de colônias, o KD de *PDK3* demonstrou diminuir a capacidade clonogênica nas linhagens em estudo após 14 dias em cultura, com exceção da linhagem SK-MEL-19 PLX R (Figura 16).



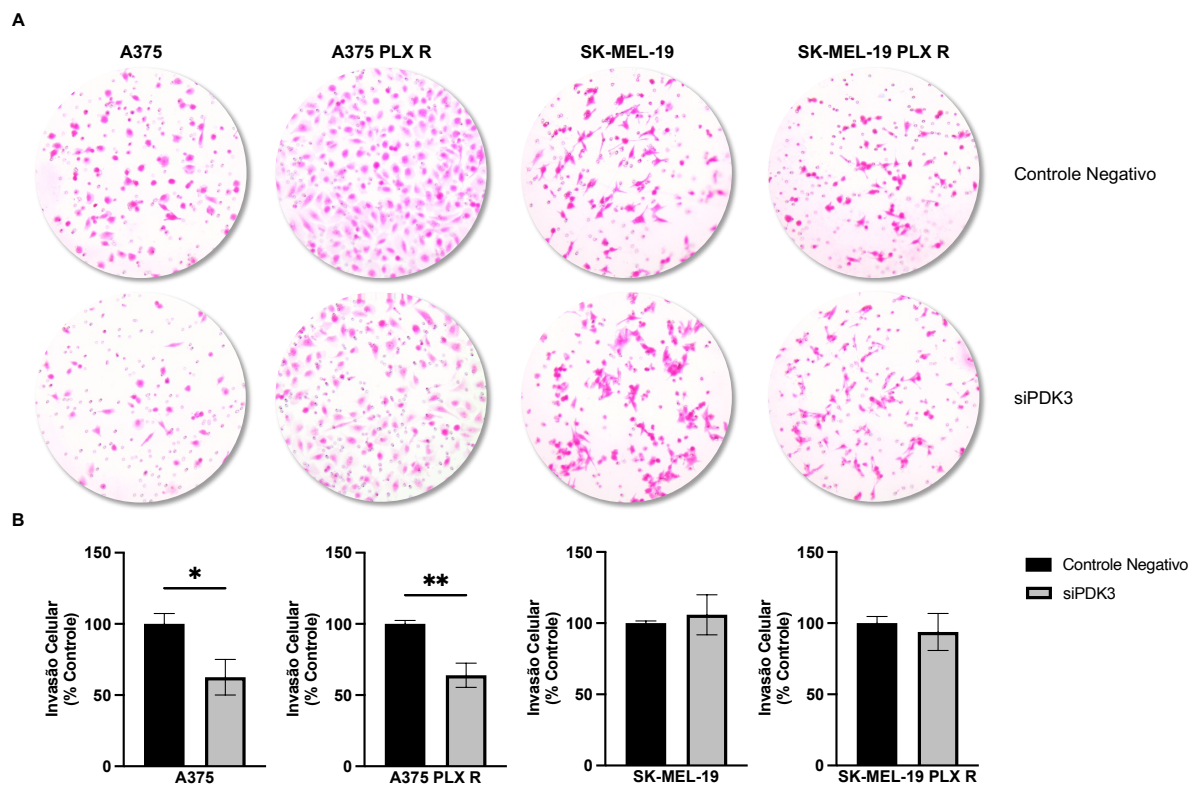
**Figura 16** – Formação de colônias após o *KD* de *PDK3* por ensaio clonogênico dependente de ancoragem. (A) Imagem representativa da formação de colônias após 14 dias em cultura. (B) Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de duplicatas de três experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe; \*\*  $p \leq 0,001$ ; \*\*\*  $p \leq 0,0001$ .

### 6.2.8 Capacidade de migração, invasão e adesão celular após o *KD* de *PDK3*

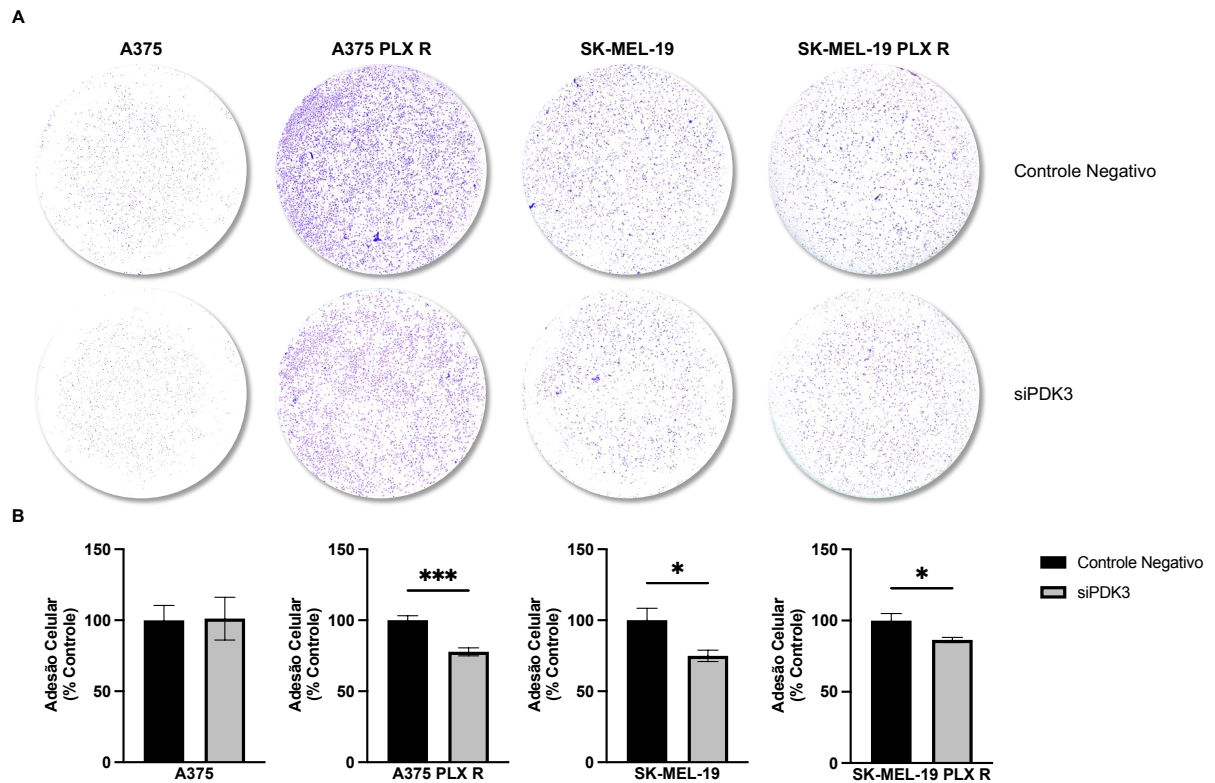
Buscando caracterizar e compreender a influência da *PDK3* nas alterações fenotípicas das células de melanoma, foram realizados os ensaios de migração, invasão e adesão celular após o *KD* de *PDK3*. Pôde se observar a diminuição na capacidade migratória em todas as linhagens em estudo (Figura 17), a diminuição na capacidade de invasão apenas nas linhagens A375 e A375 PLX R (Figura 18) e a diminuição na capacidade de adesão celular nas linhagens celulares com exceção da linhagem A375 (Figura 19).



**Figura 17** – Migração celular após o KD de PDK3 por *transwell*. **(A)** Imagem representativa das células com capacidade de migração, aderidas à membrana. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de duplicatas de três experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*\*  $p \leq 0,00001$ .



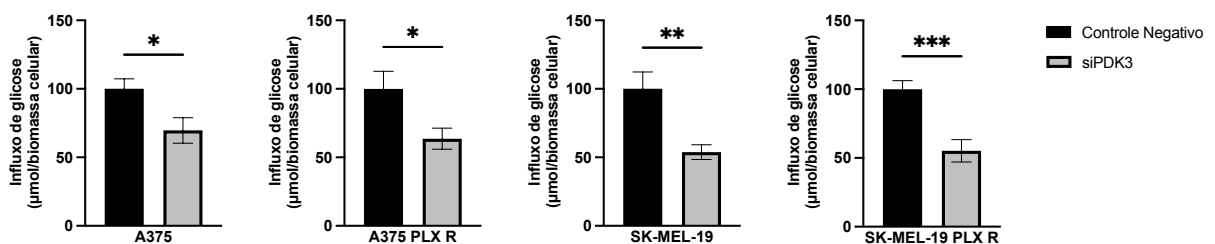
**Figura 18** – Invasão celular após o KD de PDK3 por câmara de invasão. **(A)** Imagem representativa das células com capacidade de invasão, aderidas à membrana. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de duplicatas de três experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe; \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,001$ .



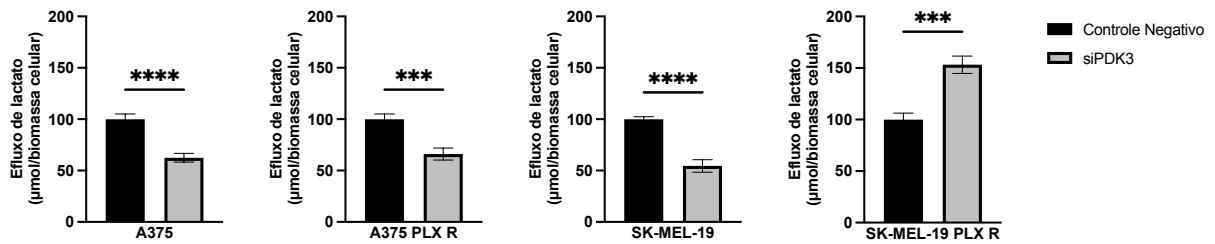
**Figura 19** – Adesão celular após o *KD* de *PDK3* em matrigel. **(A)** Imagem representativa das células com capacidade de adesão, aderidas ao matrigel. **(B)** Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de triplicatas de dois experimentos independentes. PLX R: resistente ao vemurafenibe; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 6.2.9 Influxo de glicose e efluxo de lactato após o *KD* de *PDK3*

Levando em consideração o principal papel da *PDK3* na glicólise aeróbica, os parâmetros metabólicos como influxo de glicose e efluxo de lactato foram analisadas. Após o *KD* de *PDK3*, pôde se observar um aumento nos níveis de glicose extracelular nas linhagens em estudo (Figura 20), e uma diminuição nos níveis de lactato extracelular nas linhagens em estudo, com exceção na linhagem SK-MEL-19 PLX R, a qual teve o nível de lactato extracelular aumentado após o *KD* de *PDK3* (Figura 21).



**Figura 20** – Influxo de glicose após o *KD* de *PDK3* calculado pela diferença da quantificação inicial e final (após 24h) de glicose no meio de cultura. Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de triplicatas de três experimentos independentes. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

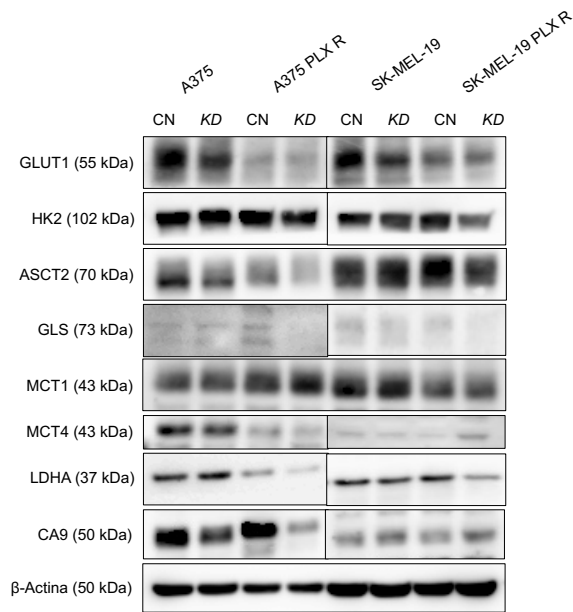


**Figura 21** – Efluxo de lactato calculado após o *KD* de *PDK3* pela diferença da quantificação final (após 24h) e inicial de lactato no meio de cultura. Valores normalizados e expressos pela média  $\pm$  SEM de triplicatas de três experimentos independentes. \*\*\*  $p < 0,0001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,00001$ .

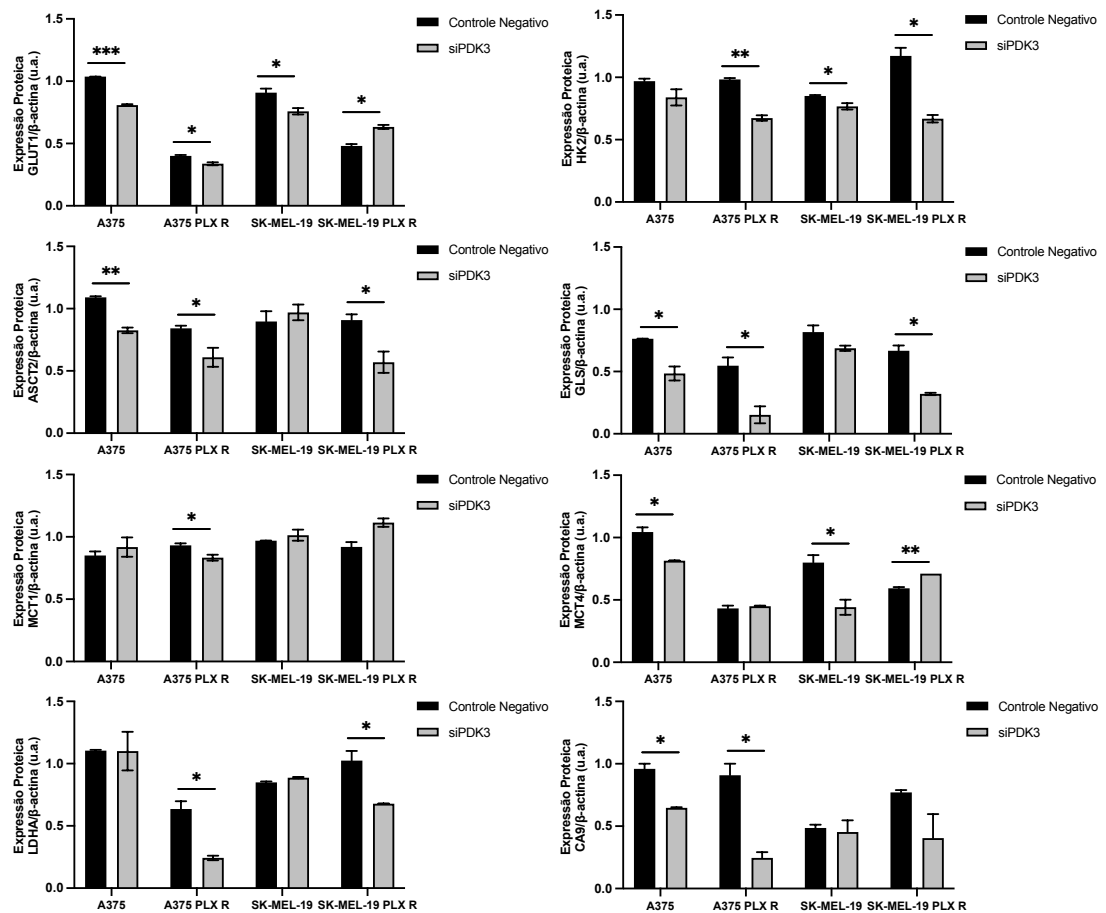
### 6.2.10 Expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo após o *KD* de *PDK3*

Buscando compreender o perfil metabólico das células de melanoma parentais e PLX R após o *KD* de *PDK3*, foram avaliadas as proteínas GLUT1 (transportador de glicose 1) e HK2 (hexoquinase 2) da via da glicose, as proteínas ASCT2 (transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio) e GLS (glutaminase) da via da glutamina, as proteínas MCT1/4 (transportadores de monocarboxilato 1 e 4) e LDHA (lactato desidrogenase A) da via do lactato e CA9 (anidrase carbônica 9) (Figura 22). Após o *KD* de *PDK3*, pôde se observar uma diminuição na expressão de GLUT1 nas linhagens celulares, com exceção da linhagem SK-MEL-19 PLX R que aumentou, uma diminuição na expressão de HK2, com exceção da linhagem A375, uma diminuição na expressão de ASCT2, com exceção da linhagem SK-MEL-19, e uma diminuição na expressão de GLS nas linhagens celulares, com exceção da linhagem SK-MEL-19. Ainda, pôde se observar uma diminuição na expressão de MCT1 na linhagem A375 PLX R, uma diminuição na expressão de MCT4 na linhagem A375 e SK-MEL-19 e aumento na linhagem SK-MEL-19 PLX R, uma diminuição na expressão de LDHA nas linhagens PLX R e uma diminuição na expressão de CA9 nas linhagens A375 e A375 PLX R.

A



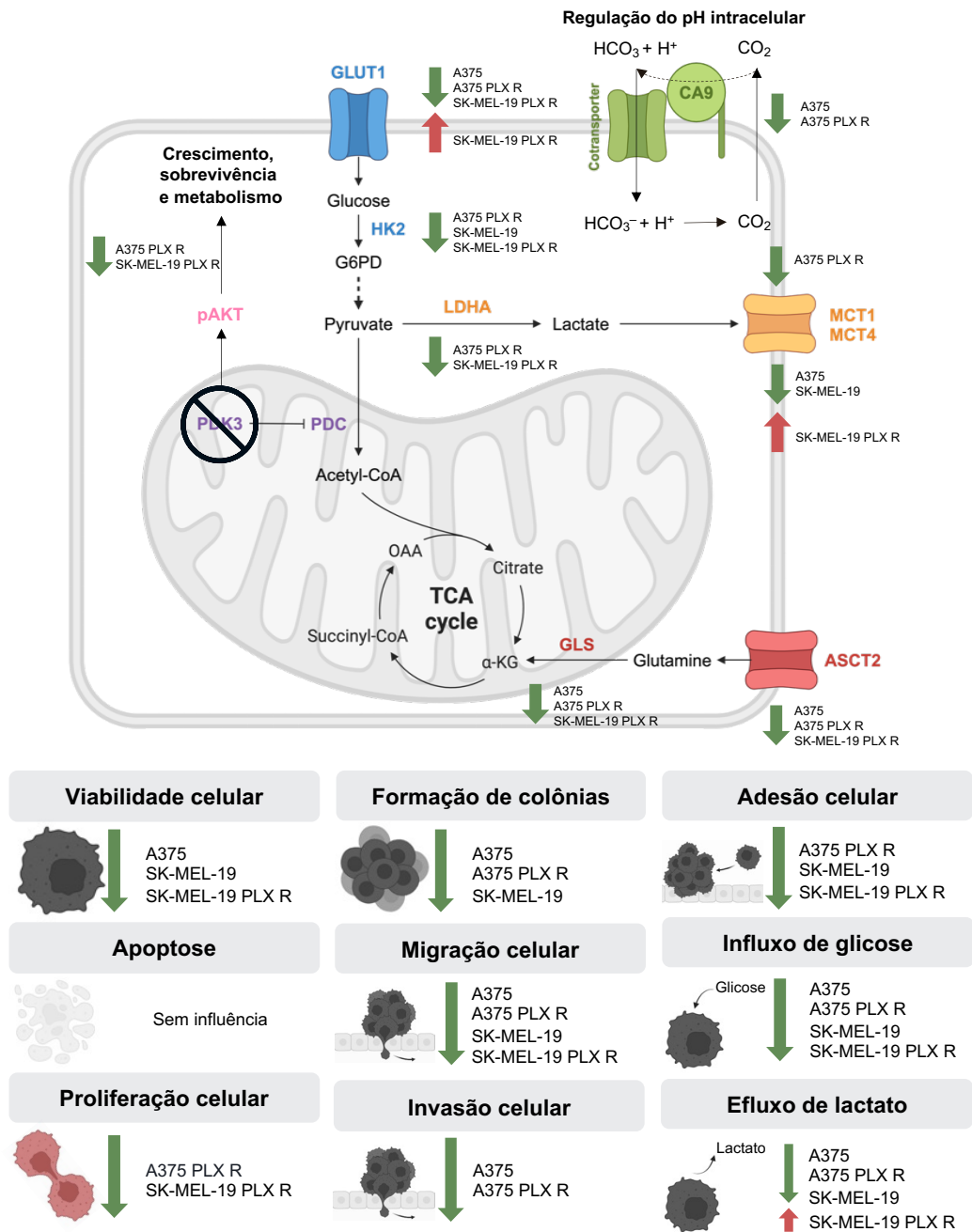
B



**Figura 22** – Expressão de GLUT1 (transportador de glicose 1), HK2 (hexoquinase 2), ASCT2 (transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio), GLS (glutaminase), MCT1 e 4 (transportador de monocarboxilato 1 e 4) LDHA (lactato desidrogenase A) e CA9 (anidrase carbônica 9) após o KD de *PDK3* avaliada por *Western blotting*. (A) Imagem representativa. (B) Valores normalizados e expressos pela média ± SEM de dois ou três experimentos independentes. CN: controle negativo; KD: *knockdown*; PLX R: resistente ao vemurafenibe; u.a., unidade arbitrária. \* p<0,05; \*\* p<0,001; \*\*\* p<0,0001.

## 7 DISCUSSÃO

A reprogramação metabólica, considerada um dos *hallmarks* do câncer, permite que as células tumorais adaptem suas necessidades metabólicas ao microambiente tumoral hipóxico favorecendo a iniciação, a manutenção e a progressão dos tumores<sup>48</sup>. Entretanto, essa flexibilidade metabólica não está limitada à condição hipóxica, mas a diversas estratégias de regulação como, por exemplo, as sinalizações oncológicas que favorecem a glicólise e/ou desfavorecem a OXPHOS<sup>27</sup>. Dentre essas sinalizações oncogênicas, a ativação da via MAPK pode levar à transcrição de HIF1A resultando na ativação da PDK3, uma das isoformas do complexo PDK que tem papel fundamental na reprogramação metabólica e está associada à progressão tumoral e à resistência terapêutica<sup>49</sup>. No presente trabalho, apesar da expressão da PDK3 em amostras humanas antes e após o tratamento com vemurafenibe não ter demonstrado diferença, *in vitro*, a depleção do gene *PDK3* atenuou a agressividade tumoral pela diminuição na viabilidade, na proliferação, na capacidade clonogênica, na migração, na invasão e na adesão das células de melanoma, principalmente as resistentes ao vemurafenibe, além de ser observada uma diminuição no fenótipo glicolítico com a diminuição do influxo de glicose e efluxo de lactato mediados pela diminuição de proteínas relacionadas como GLUT1, HK2, MCT1/4, LDHA, ASCT2, GLS e CA9 (Figura 23).



**Figura 23** – Visão esquemática dos resultados obtidos no presente estudo. As setas em verde indicam diminuição e as setas em vermelho indicam aumento após o *KD* de *PDK3*.  $\alpha$ -KG: alfa-cetoglutarato; pAKT: AKT fosforilado; ASCT2: transportador de aminoácidos neutros dependente de sódio; CA9: anidrase carbônica 9; CO<sub>2</sub>: dióxido de carbono; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: íon bicarbonato; G6PD: glicose-6-fosfato desidrogenase; GLS: glutaminase; GLUT1: transportador de glicose 1; H<sup>+</sup>: hidrogênio; HK2: hexoquinase 2; LDHA: lactato desidrogenase A; MCT1/4: transportador de monocarboxilato 1/4; OAA: oxaloacetato; PDC: complexo piruvato desidrogenase; PDK3: piruvato desidrogenase quinase 3; PLX R: resistente ao vemurafenibe; TCA: ácido tricarbílico.

Uma análise realizada *in silico*, utilizando bancos de dados TCGA e GTEx, demonstrou um aumento na expressão do gene *PDK3* em diversos tecidos tumorais quando comparados com tecidos normais adjacentes, incluindo o câncer de pele melanoma<sup>50</sup>. Essa expressão diferenciada demonstrou estar associada a parâmetros de agressividade tumoral como alto

estadiamento em câncer de cólon<sup>34</sup> e pior prognóstico em colangiocarcinoma<sup>51</sup>, leucemia mieloide aguda<sup>36</sup>, carcinoma urotelial<sup>52</sup> e coloretal<sup>53</sup>. Ainda, no contexto da resistência terapêutica, foi observado em células de glioma resistentes ao tozasertibe, um inibidor de aurora quinases, a associação da resistência com o aumento da expressão de PDKs, incluindo a PDK3, que, quando tratadas com DCA, um inibidor geral de PDKs, demonstraram diminuição na viabilidade celular<sup>54</sup>. Outros estudos descreveram também a inibição da PDK3 pelo HSF1 sendo capaz de reverter a glicólise aeróbica e a resistência à cisplatina em tumores de pulmão<sup>55</sup> e gástrico<sup>56</sup>, sugerindo que sua modulação possa ser uma possível estratégia terapêutica.

Entretanto, apesar das características que lhe conferem vantagens no contexto tumoral, como ser a isoforma com maior afinidade ao PDC e ser pouco inibida tanto pelo piruvato quanto pelo DCA, a regulação da PDK3 é pouco estudada como estratégia terapêutica<sup>33</sup>. Em melanoma, foi observada a inibição da proliferação de células de melanoma pelo DCA, além de ser observado efeito semelhante do silenciamento do gene PDK3 e do DCA na diminuição da fosforilação do PDC e no aumento da taxa OCR:ECAR (OCR, taxa de consumo de oxigênio; ECAR, taxa de acidificação extracelular), refletindo o fenótipo oxidativo<sup>57</sup>. Apesar de já ter sido descrito o aumento de mRNA de PDK3 após o tratamento com vemurafenibe<sup>58</sup>, pela primeira vez, o presente estudo demonstrou o aumento da expressão da proteína PDK3 em linhagens celulares de melanoma resistentes ao vemurafenibe, quando comparadas com as respectivas linhagens parentais, embora não observada a diferença na frequência de expressão em amostras parafinadas de paciente com melanoma após o tratamento com vemurafenibe. Em carcinoma urotelial, uma análise de co-expressão de genes demonstrou a superexpressão de PDK3 associada a genes envolvidos na replicação de DNA e, em contraste, a baixa regulação de PDK3 associada ao fator de alongamento de tradução eucariótica 1 alfa 1 (EEF1A1), um fator pro-apoptótico<sup>52</sup>. Ainda, o aumento de PDK3 reverteu o aumento da taxa de apoptose causada pelo silenciamento de POT1-AS1, um RNA longo não codificante<sup>59</sup>, enquanto a inibição genética de *PDK3* diminuiu a viabilidade celular em células tumorais gástricas<sup>60</sup> e a inibição farmacológica de PDK3 em células de glioblastoma facilitou a morte celular<sup>61</sup>, reforçando a hipótese de influência da PDK3 em mecanismos de apoptose.

No presente estudo, embora observada diminuição da biomassa celular das linhagens de melanoma após o *KD* de *PDK3*, não foi observado efeito na apoptose, e a proliferação

celular diminuiu apenas nas linhagens resistentes ao vemurafenibe. Considerando que o *KD* de *PKD3* pode reativar o PDC, a diminuição de biomassa celular pode ser explicada pelo possível reestabelecimento da fosforilação oxidativa e consequente redução na disponibilidade de intermediários metabólicos para biossíntese de macromoléculas observada na glicólise aeróbica, fundamental para a proliferação celular. Ainda, um estudo *in silico* demonstrou a correlação positiva da *PKD3* com a via *PI3K/AKT* em carcinomas renais de células claras<sup>62</sup> e outro estudo sugeriu que a superexpressão da *PKD3* em células de câncer colorretal favorece a proliferação tumoral ao ativar esta via que está relacionada com o crescimento, sobrevivência e metabolismo das células tumorais<sup>54</sup>. Em melanoma, a ativação da via *PI3K/AKT/mTOR* promove a glicólise através da transcrição e ativação de *HIF1A* que, por sua vez, codifica genes associados à glicólise<sup>41</sup>. Ainda, em melanoma, a *PKD3* é induzida por *HIF1A* favorecendo sua estabilização mesmo em condições de normóxia através de um mecanismo de auto-amplificação, uma vez que a *PKD3* é pouco inibida pela alta concentração de piruvato que resulta em alta concentração lactato, estabilizando *HIF1A*<sup>41</sup>. A *PKD3* também foi descrita estar positivamente correlacionada com a expressão de *AKT*, *mTOR* e *4EBP1* em melanoma, todos relacionados com a via *PI3K/AKT/mTOR*<sup>44</sup> e, em concordância com os achados descritos na literatura, avaliámos a expressão de *pAKT*, que se apresentou diminuída após o *KD* de *PKD3* nas linhagens resistentes ao vemurafenibe, linhagens que apresentaram uma maior expressão da *PKD3* e que tiveram a proliferação diminuída. Uma das limitações do presente estudo pode estar relacionada ao tempo em que foram realizados os ensaios (24 horas após o *KD*), que pôde não ser suficiente para observar influência do *KD* de *PKD3* na divisão celular das linhagens parentais e na apoptose das linhagens em estudo. Em contrapartida, na formação de colônia (14 dias após o *KD*), foi observada a diminuição da capacidade clonogênica das linhagens após o *KD* de *PKD3*, com exceção da linhagem SK-MEL-19 PLX R. É importante ressaltar que, apesar do silenciamento ser transiente, o *KD* de *PKD3* durante os primeiros dias do ensaio foram suficientes para levar à diminuição na capacidade clonogênica, um ensaio de longa duração. A reexpressão de *PKD3* para a linhagem SK-MEL-19 PLX R foi observada 96 horas após o *KD* de *PKD3*, conforme observado na linha do tempo, ou seja, esta linhagem volta a expressar a *PKD3* mais rápido que as demais linhagens, sugerindo que a *PKD3* tem um papel mais relevante nesta linhagem que apresenta resistência, uma vez que existe uma produção contínua devido à necessidade por essa proteína. Esta observação

pode explicar a diminuição da proliferação celular 72 horas pós-*KD* da linhagem SK-MEL-19 PLX R mas a ausência de efeito em ensaios com maior duração, como a formação de colônias.

No presente estudo, a migração celular diminuiu em todas as linhagens após o *KD* de *PDK3*, assim como a capacidade de adesão celular, com exceção da linhagem A375. Já a capacidade de invasão diminuiu apenas nas linhagens A375 e A375 PLX R, originadas de tumores primários. Uma das hipóteses é que o *KD* de *PDK3* não tenha sido suficiente para influenciar no fenótipo metastático das linhagens SK-MEL-19 e SK-MEL-19 PLX R, uma vez que são originadas de tumor metastático. Um estudo em linhagens celulares de próstata demonstrou que a transcrição da *PDK3* é induzida pelo gene *KDM4A*<sup>63</sup>, um gene que, quando suprimido, resulta na parada no ciclo celular e diminuição da migração e invasão celular de linhagens tumorais de mama<sup>64</sup>. Já em células de tumor pancreático, o *KD* de *PDK3* por siRNA diminuiu a capacidade de formação de colônias e a migração e invasão celular<sup>65</sup>.

O melanoma já foi descrito como sendo altamente glicolítico devido ao aumento da expressão de transportadores de glicose e da enzima LDHA<sup>66</sup>. Os principais facilitadores do transporte de glicose GLUT1/3 encontram-se constitutivamente expressos na membrana plasmática, fazendo com que o influxo de glicose dependa do seu nível de expressão, geralmente aumentado em células tumorais<sup>67</sup>. No presente estudo, o *KD* de *PDK3* resultou na diminuição do influxo de glicose nas linhagens de melanoma associada à diminuição na expressão do GLUT1, com exceção da linhagem SK-MEL-19 PLX R. Entretanto, o *KD* de *PDK3* nas linhagens em estudo, incluindo a SK-MEL-19 PLX R, também resultou na diminuição da HK2, uma enzima importante no aumento da captação de glicose pelas células tumorais devido à sua função de catalisar o primeiro passo do metabolismo da glicose, controlar o gradiente de concentração intracelular e, conseqüentemente, o influxo celular dessa molécula<sup>68</sup>. Dessa forma, a expressão de HK2 diminuída na linhagem SK-MEL-19 PLX R pode, em parte, explicar o aumento da expressão de GLUT1 em uma tentativa de aumentar o influxo de glicose para atender às demandas celulares.

Uma vez que o influxo e o metabolismo da glicose como principal fonte de carbono para as células de melanoma diminuíram após o *KD* de *PDK3*, concomitantemente, foi observada a diminuição do efluxo de lactato, com exceção da linhagem SK-MEL-19 PLX R, que teve o efluxo de lactato aumentado. O lactato é o produto final do metabolismo da glicose e da glutamina e um dos principais responsáveis pela acidificação do microambiente tumoral, contribuindo

para a metástase tumoral e resistência terapêutica<sup>69</sup>. Curiosamente, nas linhagens resistentes ao vemurafenibe, em que o aumento da expressão de PDK3 é maior, a diminuição no efluxo de lactato foi acompanhada pela diminuição na expressão da enzima LDHA, enzima responsável pela conversão de piruvato em lactato<sup>69</sup>. Ainda, como forma de evitar a acidificação do meio intracelular e consequente morte, as células tumorais têm o aumento da expressão de transportadores de prótons como transportadores de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (NHEs), anidrases carbônicas (CAs) e transportadores de monocarboxilato (MCTs)<sup>70</sup>. No presente estudo, os principais transportadores de monocarboxilato no contexto tumoral, MCT1 e MCT4<sup>70</sup>, tiveram a expressão diminuída após o *KD* de *PDK3* na linhagem A375 (MCT4), A375 PLX R (MCT1) e SK-MEL-19 (MCT4) enquanto na linhagem SK-MEL-19 PLX R, que teve o efluxo de lactato aumentado, observou-se também o aumento da expressão de MCT4, ainda que diminuída a expressão de LDHA. Em relação à CA9, uma das principais CAs responsáveis por regular o pH tumoral acidificando o microambiente tumoral e alcalinizando o citoplasma<sup>71</sup>, o *KD* de *PDK3* resultou na diminuição da expressão dessa proteína nas linhagens A375 e A375 PLX R, reforçando a hipótese de reestabelecimento do fenótipo oxidativo, resultando na não necessidade de exportação de prótons resultantes da glicólise aeróbica para fora da célula tumoral. A diminuição da expressão de GLUT1, HK2, MCT1/4 e LDHA nas células de melanoma após o *KD* de *PDK3* sugerem o reestabelecimento do fluxo de piruvato para produção de acetil-CoA, que irá alimentar o ciclo TCA, ao invés da produção do lactato, com diminuição do fluxo glicolítico. Em células de câncer de próstata, por exemplo, o silenciamento de *PDK3* estimulou o metabolismo mitocondrial com aumento da atividade de PDH, diminuição da glicólise e acúmulo de ROS, resultando na diminuição da proliferação celular e formação de colônia, além do aumento da atividade das caspases 3/7<sup>63</sup>. Em melanoma, um estudo sugeriu a ativação de PDKs por ROS, altamente produzido em células tumorais pela influência da reprogramação metabólica e do microambiente tumoral, levando à diminuição da atividade de PDC<sup>58</sup>. De fato, a PDK3 está associada à diminuição do metabolismo mitocondrial surgindo como uma estratégia metabólica permitindo a sobrevivência das células tumorais pela redução na dependência pela respiração mitocondrial<sup>72</sup>. Dessa forma, o silenciamento de *PDK3* pode resultar na ativação do PDC, reestabelecendo a atividade mitocondrial, aumentando a oxidação do piruvato e a produção de ROS, favorecendo a apoptose, assim

como reduzindo o desvio dos metabólitos intermediários da via glicolítica para a biossíntese e desfavorecendo a proliferação celular<sup>73</sup>.

As células de melanoma resistentes ao vemurafenibe podem adquirir outras estratégias adaptativas reprogramando o metabolismo para uma maior dependência pela glutamina<sup>29</sup> ou à serina<sup>74</sup> como fonte de carbono, ao invés da glicose. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, a linhagem SK-MEL-19 PLX R apresentou um perfil preferencialmente oxidativo<sup>45</sup> com aumento da expressão de GLS, uma enzima responsável pela conversão da glutamina em glutamato e amônia que favorecem o metabolismo da glutamina pela mitocôndria<sup>75</sup>, o que poderia, em parte, explicar o aumento do efluxo de lactato nessa linhagem. Entretanto, o *KD* de *PDK3* levou à diminuição da expressão de ASCT2, um transportador de aminoácidos com ampla especificidade de substrato incluindo a glutamina<sup>75</sup>, nas linhagens em estudo levando também à diminuição da GLS, com exceção da linhagem SK-MEL-19 em ambas as proteínas. O *KD* de *PDK3* não só não foi capaz de reduzir o efluxo de lactato, como aumentou o efluxo de lactato, apesar da diminuição no consumo de glicose na linhagem SK-MEL-19 PLX R e da diminuição na expressão de LDHA, o que pode indicar alterações em genes que diferenciam o fenótipo metabólico desta linhagem celular.

Apesar de trazer vários resultados que contribuem para o avanço do conhecimento na área, o presente estudo apresenta algumas limitações. O resultado em amostras humanas foi limitado pelo número de amostras e a inclusão de novas amostras poderá contribuir para uma melhor análise da expressão de *PDK3* e comparação pré e pós-tratamento com vemurafenibe. Ainda, os resultados *in vitro* demonstram um comportamento diferente entre as linhagens A375 (parental e PLX R) e SK-MEL-19 (parental e PLX R) que, em parte, também pode estar relacionado ao diferente perfil mutacional (Tabela 3) exibidos pelas linhagens, principalmente nos genes *KIT* e *TERT*. Em melanoma, apesar de o piruvato, produto da glicólise, ser majoritariamente convertido em lactato, uma parcela pode entrar no ciclo TCA na forma acetil-CoA, gerando citrato, o qual é utilizado no citoplasma para a biossíntese de ácidos graxos e nucleotídeos<sup>45</sup>. Neste contexto, o presente estudo não explorou outras vias metabólicas que possam estar compensadas pelo *KD* de *PDK3*, como por exemplo a via dos lipídios e dos nucleotídeos. Ainda, considerando a importância da relação do *PDK3* com HIF1A, a caracterização do efeito do silenciamento de *PDK3* em condições de hipóxia, assim como o uso de cultura celular em modelo 3D, são abordagens metodológicas adicionais que poderão

complementar os achados do presente estudo. O tempo em que foram realizados os ensaios pode não ter sido suficiente para observar influência do *KD* de *PDK3* em alguns ensaios como, por exemplo, na avaliação da apoptose, sendo que o uso do método de silenciamento gênico estável seria uma alternativa para ultrapassar esta limitação. Ainda, a comparação da inibição gênica com a inibição farmacológica da *PDK3* levaria a uma complementação da caracterização da proteína, entretanto, não existe um inibidor específico para *PDK3*, apenas inibidores gerais de *PDK*, como o *DCA*. Outra complementação ao estudo atual inclui o modelo *in vivo* que poderá contribuir para uma melhor compreensão do papel da *PDK3* no melanoma.

## 8 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos a partir dos objetivos propostos no presente estudo, conclui-se que o silenciamento da *PDK3* influenciou o fenótipo maligno das células de melanoma, por meio da diminuição de características funcionais primordiais para a sobrevivência celular, progressão e disseminação tumoral, principalmente em células resistentes ao vemurafenibe. Ainda, dada a influência do silenciamento do gene *PDK3* na diminuição dos parâmetros relacionados ao perfil glicolítico e possível reestabelecimento de um fenótipo oxidativo, pôde ser observada a diminuição indireta de outras vias metabólicas, como a da glutamina, que está fortemente associada com a resistência ao vemurafenibe. Entretanto, deve ser levada em consideração a atividade compensatória a partir do silenciamento de *PDK3* ou a influência de outras vias metabólicas que possam atuar na agressividade do melanoma. Os achados deste estudo contribuíram para uma melhor compreensão do papel da *PDK3* no melanoma, sugerindo seu potencial como alvo terapêutico; entretanto, estudos adicionais são necessários a fim de aprofundar o entendimento sobre as suas implicações biológicas e clínicas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. 2015;142:1387. doi:10.1242/dev.123729
2. 2006 Melanoma.
3. Rabbie R, Ferguson P, Molina-Aguilar C, Adams DJ, Robles-Espinoza CD. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *Journal of Pathology*. 2019;247(5):539-551. doi:10.1002/PATH.5213
4. Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Barsouk A. Epidemiology of Melanoma. *Med Sci (Basel)*. 2021;9(4). doi:10.3390/MEDSCI9040063
5. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249. doi:10.3322/CAAC.21660
6. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Published online 2019.
7. Long G V., Swetter SM, Menzies AM, Gershenwald JE, Scolyer RA. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2023;402(10400):485-502. doi:10.1016/S0140-6736(23)00821-8
8. Sun J, Carr MJ, Khushalani NI. Principles of Targeted Therapy for Melanoma. *Surg Clin North Am*. 2020;100(1):175-188. doi:10.1016/J.SUC.2019.09.013
9. Mason R, Au L, Ingles Garces A, Larkin J. Current and emerging systemic therapies for cutaneous metastatic melanoma. *Expert Opin Pharmacother*. 2019;20(9):1135-1152. doi:10.1080/14656566.2019.1601700
10. Michielin O, Van Akkooi ACJ, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 2019;30(12):1884-1901. doi:10.1093/ANNONC/MDZ411
11. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011;364(26):2507-2516. doi:10.1056/NEJMOMA1103782
12. Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med*. 2012;366(8):707-714. doi:10.1056/NEJMOMA1112302
13. Skudalski L, Waldman R, Kerr PE, Grant-Kels JM. Melanoma: An update on systemic therapies. *J Am Acad Dermatol*. 2022;86(3):515-524. doi:10.1016/J.JAAD.2021.09.075
14. Kim JW, Dang C V. Cancer's molecular sweet tooth and the warburg effect. *Cancer Res*. 2006;66(18):8927-8930. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1501
15. Warburg O. *SCIENCE Injuring of Respiration On the Origin of Cancer Cells*. Vol 123.; 1956. <http://science.sciencemag.org/>
16. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*. 2009;324(5930):1029. doi:10.1126/SCIENCE.1160809
17. Anwar S, Shamsi A, Mohammad T, Islam A, Imtaiyaz Hassan M. Targeting pyruvate dehydrogenase kinase signaling in the development of effective cancer therapy. *BBA-Reviews on Cancer*. 2021;1876:304-419. doi:10.1016/j.bbcan.2021.188568
18. Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev*. 2010;20(1):51-56. doi:10.1016/J.GDE.2009.10.009
19. Kumar SM, Yu H, Edwards R, et al. Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1alpha expression in melanoma. *Cancer Res*. 2007;67(7):3177-3184. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3312

20. Marchetti P, Guerreschi P, Kluza J, Mortier L. Metabolic features of melanoma: a gold mine of new therapeutic targets? *Curr Cancer Drug Targets*. 2014;14(4):357-370. doi:10.2174/1568009614666140407113124
21. Hall A, Meyle KD, Lange MK, et al. Dysfunctional oxidative phosphorylation makes malignant melanoma cells addicted to glycolysis driven by the (V600E)BRAF oncogene. *Oncotarget*. 2013;4(4):584-599. doi:10.18632/ONCOTARGET.965
22. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The Biology of Cancer: Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab*. 2008;7(1):11-20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002
23. Kim J, DeBerardinis RJ. Mechanisms and Implications of Metabolic Heterogeneity in Cancer. *Cell Metab*. 2019;30(3):434-446. doi:10.1016/J.CMET.2019.08.013
24. Roche TE, Hiromasa Y. Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2007;64(7-8):830-849. doi:10.1007/S00018-007-6380-Z/METRICS
25. Gudi R, Bowker-Kinley MM, Kedishvili NY, Zhao Y, Popov KM. Diversity of the pyruvate dehydrogenase kinase gene family in humans. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(48):28989-28994. doi:10.1074/jbc.270.48.28989
26. McFate T, Mohyeldin A, Lu H, et al. Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(33):22700-22708. doi:10.1074/JBC.M801765200
27. Fischer GM, Vashisht Gopal YN, McQuade JL, Peng W, DeBerardinis RJ, Davies MA. Metabolic Strategies of Melanoma Cells: Mechanisms, Interactions with the Tumor Microenvironment, and Therapeutic Implications. *Pigment cell & melanoma research*. 2017;31(1):11. doi:10.1111/PCMR.12661
28. Parmenter TJ, Kleinschmidt M, Kinross KM, et al. Response of BRAF mutant melanoma to BRAF inhibition is mediated by a network of transcriptional regulators of glycolysis. *Cancer discovery*. 2014;4(4):423. doi:10.1158/2159-8290.CD-13-0440
29. Baenke F, Chaneton B, Smith M, et al. Resistance to BRAF inhibitors induces glutamine dependency in melanoma cells. *Molecular oncology*. 2016;10(1):73-84. doi:10.1016/J.MOLONC.2015.08.003
30. Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, et al. Mitochondrial oxidative stress is the achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget*. 2013;4(11):1986. doi:10.18632/ONCOTARGET.1420
31. Delgado-Goñi T, Galobart TC, Wantuch S, et al. Increased inflammatory lipid metabolism and anaplerotic mitochondrial activation follow acquired resistance to vemurafenib in BRAF-mutant melanoma cells. *British Journal of Cancer*. 2019;122(1):72. doi:10.1038/S41416-019-0628-X
32. Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Journal*. 1998;329(Pt 1):191. doi:10.1042/BJ3290191
33. Baker JC, Yan X, Peng T, Kasten S, Roche TE. Marked Differences between Two Isoforms of Human Pyruvate Dehydrogenase Kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(21):15773-15781. doi:10.1074/JBC.M909488199
34. Lu CW, Lin SC, Chien CW, et al. Overexpression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 3 Increases Drug Resistance and Early Recurrence in Colon Cancer. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1405. doi:10.1016/J.AJPAT.2011.05.050

35. Yang R, Guo C. Discovery of potent pyruvate dehydrogenase kinase inhibitors and evaluation of their anti-lung cancer activity under hypoxia. *Medchemcomm*. 2018;9(11):1843-1849. doi:10.1039/C8MD00453F
36. Cui L, Cheng Z, Liu Y, et al. Overexpression of PDK2 and PDK3 reflects poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Cancer Gene Ther*. 2020;27(1-2):15-21. doi:10.1038/s41417-018-0071-9
37. Zhao Q, Zhu Z, Xiao W, et al. Hypoxia-induced circRNF13 promotes the progression and glycolysis of pancreatic cancer. *Exp Mol Med*. 2022;54(11):1940-1954. doi:10.1038/S12276-022-00877-Y
38. Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ. Induction of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-3 by Hypoxia-inducible Factor-1 Promotes Metabolic Switch and Drug Resistance. *J Biol Chem*. 2008;283(42):28106. doi:10.1074/JBC.M803508200
39. Kluza J, Corazao-Rozas P, Touil Y, et al. Inactivation of the HIF-1 $\alpha$ /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer Res*. 2012;72(19):5035-5047. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0979
40. Rivera AL, 1# L, Zugasti A, et al. Synergistic cytotoxic effect of sodium dichloroacetate combined with chemotherapeutic drugs on B16F10 murine melanoma cell line. Accessed December 5, 2022. www.biomedres.info
41. Kluza J, Corazao-Rozas P, Touil Y, et al. Inactivation of the HIF-1 $\alpha$ /PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer Research*. 2012;72(19):5035-5047. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-0979
42. Zhang W, Zhang SL, Hu X, Yip Tam K. Targeting Tumor Metabolism for Cancer Treatment: Is Pyruvate Dehydrogenase Kinases (PDKs) a Viable Anticancer Target? *Int J Biol Sci*. 2015;11(12):1390-1400. doi:10.7150/ijbs.13325
43. Dahiya R, Mohammad T, Gupta P, et al. Molecular interaction studies on ellagic acid for its anticancer potential targeting pyruvate dehydrogenase kinase 3. *RSC Adv*. 2019;9(40):23302-23315. doi:10.1039/C9RA02864A
44. Pópulo H, Caldas R, Lopes JM, Pardal J, Máximo V, Soares P. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase supports dichloroacetate as a candidate for cutaneous melanoma therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(6):733-745. doi:10.1517/14728222.2015.1045416
45. Marina Pereira Dias. *Caracterização Do Papel Do Metabolismo Tumoral Na Resistência Do Melanoma Humano Ao Vemurafenibe*. Hospital de Amor; 2022.
46. Silva-Oliveira RJ, Silva VAO, Martinho O, 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*. 2016;39(3):253-263. doi:10.1007/s13402-016-0270-z
47. Dirks WG, Faehnrich S, Estella IAJ, Drexler HG. Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. *ALTEX*. 2005;22(2):103-109.
48. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/J.CELL.2011.02.013
49. Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ. Induction of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-3 by Hypoxia-inducible Factor-1 Promotes Metabolic Switch and Drug Resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(42):28106-28114. doi:10.1074/JBC.M803508200

50. Tao S, Tao K, Cai X. Pan-cancer analysis reveals PDK family as potential indicators related to prognosis and immune infiltration. *Sci Rep.* 2024;14(1). doi:10.1038/S41598-024-55455-1
51. Sanmai S, Prongvitaya T, Limpaboon T, et al. Serum pyruvate dehydrogenase kinase as a prognostic marker for cholangiocarcinoma. *Oncol Lett.* 2019;17(6):5275. doi:10.3892/OL.2019.10185
52. Kuo YH, Chan TC, Lai HY, et al. Overexpression of Pyruvate Dehydrogenase Kinase-3 Predicts Poor Prognosis in Urothelial Carcinoma. *Front Oncol.* 2021;11. doi:10.3389/FONC.2021.749142
53. Z L, L L, L L, et al. PDK3 drives colorectal carcinogenesis and immune evasion and is a therapeutic target for boosting immunotherapy. *Am J Cancer Res.* 2024;14(6):3117-3129. doi:10.62347/QWKZ3078
54. Jane EP, Premkumar DR, Rajasundaram D, et al. Reversing tozasertib resistance in glioma through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinases. *Mol Oncol.* 2022;16(1):219-249. doi:10.1002/1878-0261.13025
55. Wang Y, Yuan J, Liu J, et al. Melittin suppresses aerobic glycolysis by regulating HSF1/PDK3 to increase chemosensitivity of NSCLC. *Eur J Pharmacol.* 2025;986:177084. doi:10.1016/J.EJPHAR.2024.177084
56. Xu J, Shi Q, Xu W, et al. Metabolic enzyme PDK3 forms a positive feedback loop with transcription factor HSF1 to drive chemoresistance. *Theranostics.* 2019;9:10. doi:10.7150/thno.31301
57. Tiersma JF, Evers B, Bakker BM, Jalving M, de Jong S. Pyruvate Dehydrogenase Kinase Inhibition by Dichloroacetate in Melanoma Cells Unveils Metabolic Vulnerabilities. *Int J Mol Sci.* 2022;23(7):3745. doi:10.3390/IJMS23073745/S1
58. Cesi G, Walbrecq G, Zimmer A, Kreis S, Haan C. ROS production induced by BRAF inhibitor treatment rewires metabolic processes affecting cell growth of melanoma cells. *Mol Cancer.* 2017;16(1):102. doi:10.1186/S12943-017-0667-Y
59. Chen WM, Chen YM, Jiang SY, et al. LncRNA POT1-AS1 accelerates the progression of gastric cancer by serving as a competing endogenous RNA of microRNA-497-5p to increase PDK3 expression. *Journal of gastrointestinal oncology.* 2021;12(6):2728-2742. doi:10.21037/JGO-21-709
60. Feng L, Cheng K, Zang R, Wang Q, Wang J. miR-497-5p inhibits gastric cancer cell proliferation and growth through targeting PDK3. *Bioscience Reports.* Published online 2019. doi:10.1042/BSR20190654
61. Han JE, Lim PW, Na CM, et al. Inhibition of HIF1 $\alpha$  and PDK Induces Cell Death of Glioblastoma Multiforme. *Exp Neurobiol.* 2017;26(5):295. doi:10.5607/EN.2017.26.5.295
62. Nunes-Xavier CE, Emaldi M, Mingo J, et al. The expression pattern of pyruvate dehydrogenase kinases predicts prognosis and correlates with immune exhaustion in clear cell renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2023;13(1). doi:10.1038/S41598-023-34087-X
63. Wang LY, Hung CL, Chen YR, et al. KDM4A Coactivates E2F1 to Regulate the PDK-Dependent Metabolic Switch between Mitochondrial Oxidation and Glycolysis. *Cell Rep.* 2016;16(11):3016-3027. doi:10.1016/J.CELREP.2016.08.018
64. Li BX, Zhang MC, Luo CL, et al. Effects of RNA interference-mediated gene silencing of JMJD2A on human breast cancer cell line MDA-MB-231 in vitro. *J Exp Clin Cancer Res.* 2011;30(1). doi:10.1186/1756-9966-30-90

65. Zhao Q, Zhu Z, Xiao W, et al. Hypoxia-induced circRNF13 promotes the progression and glycolysis of pancreatic cancer. doi:10.1038/s12276-022-00877-y
66. Scott DA, Richardson AD, Filipp F V., et al. Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *J Biol Chem.* 2011;286(49):42626-42634. doi:10.1074/JBC.M111.282046
67. Berardi MJ, Fantin VR. Survival of the fittest: metabolic adaptations in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2011;21(1):59-66. doi:10.1016/J.GDE.2010.10.001
68. Mathupala SP, Rempel A, Pedersen PL. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J Biol Chem.* 2001;276(46):43407-43412. doi:10.1074/JBC.M108181200
69. Pérez-Tomás R, Pérez-Guillén I. Lactate in the Tumor Microenvironment: An Essential Molecule in Cancer Progression and Treatment. *Cancers (Basel).* 2020;12(11):3244. doi:10.3390/CANCERS12113244
70. Chiche J, Brahim-Horn MC, Pouyssegur J. Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: a common feature in cancer. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2010;14(4):771-794. doi:10.1111/J.1582-4934.2009.00994.X
71. Becker HM. Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *British Journal of Cancer* 2019 122:2. 2019;122(2):157-167. doi:10.1038/s41416-019-0642-z
72. Atas E, Oberhuber M, Kenner L. The Implications of PDK1–4 on Tumor Energy Metabolism, Aggressiveness and Therapy Resistance. *Front Oncol.* 2020;10. doi:10.3389/fonc.2020.583217
73. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009;324(5930):1029. doi:10.1126/SCIENCE.1160809
74. Ross KC, Andrews AJ, Marion CD, Yen TJ, Bhattacharjee V. Identification of the serine biosynthesis pathway as a critical component of BRAF inhibitor resistance of melanoma, pancreatic, and non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(8):1596. doi:10.1158/1535-7163.MCT-16-0798
75. Jin L, Alesi GN, Kang S. Glutaminolysis as a target for cancer therapy. *Oncogene* 2016 35:28. 2015;35(28):3619-3625. doi:10.1038/onc.2015.447

## ANEXO

### Anexo 1 – Parecer Consubstanciado do CEP.



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DA EMENDA

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

**Pesquisador:** Celine Marques Pinheiro

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 74071317.0.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

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

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 7.319.662

##### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do documento Informações Básicas da Pesquisa (Inserir texto do último parecer pendente do CEP).

##### INTRODUÇÃO:

O câncer de pele configura-se como um dos mais frequentes em todas as populações e se apresenta principalmente sob duas formas: o melanoma e o não melanoma. A última estimativa mundial revelou que, em 2012, 232 mil casos novos de melanoma seriam diagnosticados, dentre estes 55 mil viriam a óbito em todo o mundo. As mais altas taxas de incidência de câncer de pele, melanoma e não melanoma foram observadas em países com população caucasiana. Mais de 80% dos diagnósticos de melanomas e 65% dos óbitos por esse câncer foram verificados na Oceania, Europa e América do Norte (1). Segundo a Organização Mundial de Saúde, 2 a 3 milhões de casos de câncer de pele não-melanoma e 132.000 casos de câncer de pele melanoma ocorrem globalmente a cada ano (World Health Organization). Nos Estados Unidos da América, a estimativa para o ano de 2017 é de 87.110 novos casos de

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hcancerbarretos.com.br

## HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

melanoma diagnosticados, sendo 52.170 homens e 34.940 mulheres. Além disso, estima-se 9.730 mortes por melanoma, entre homens e mulheres (2). No Brasil, em 2016, a estimativa foi de 80.850 casos novos de câncer de pele não melanoma nos homens e 94.910 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 81,66 casos novos de câncer de pele a cada 100 mil homens e 91,98 para cada 100 mil mulheres. Quanto ao melanoma, a sua letalidade é elevada, porém, a sua incidência é baixa (3 mil casos novos em homens e

2.670 casos novos em mulheres). As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na região Sul (1). O melanoma se origina a partir de células chamadas melanócitos, responsáveis pela produção do pigmento melanina. Geralmente, começa com o surgimento de uma pinta (nevo benigno) e está fortemente associado à exposição à radiação solar UVA e UVB. A transformação de células de melanócitos é uma das várias etapas do processo, que se inicia com a fase de crescimento horizontal ou radial, progredindo então para o fenótipo invasivo (3). De fato, o desenvolvimento do melanoma a partir de melanócitos ocorre por meio de um mecanismo gradual que envolve a sucessão clonal e aquisição de alterações genéticas deletérias (4). Após a fase de crescimento vertical, as células do tumor podem invadir profundamente a derme/hipoderme e, eventualmente, penetrar o endotélio de capilares e entrar na corrente sanguínea, o que lhes permite formar metástases em órgãos distantes (3). A progressão para melanoma metastático depende de uma série complexa de acontecimentos moleculares que incluem mutações que resultam num fenótipo invasivo (5). A forte agressividade deste câncer deve-se principalmente à rápida disseminação sistêmica, à alta capacidade metastática e ao seu potencial refratário aos tratamentos antineoplásicos convencionais, que são provocados por alterações genéticas que envolvem mutações associadas ao ganho-de-função, amplificação e/ou superexpressão de oncogenes, juntamente com mutações associadas à perda-de-função, deleção e/ou silenciamento epigenético de genes supressores de tumor. Entre as alterações genéticas mais frequentes em melanoma encontram-se mutações em B-RAF (50-70% dos casos, sendo a mutação V600E a mais frequente), que codifica a proteína Serina/Treonina quinase B-RAF envolvida na transdução de sinais mitogênicos da membrana celular para o núcleo por meio da via de sinalização MAPK/ERK (Proteína quinase ativada por mitógeno/Quinases extracelular-reguladas por sinais) (6) e mutações em N-RAS (20% dos casos), que codifica a proteína G monomérica N-RAS (neuroblastoma RAS), responsável pela ativação das vias MAPK/ERK e PI3K/AKT (Fosfatidilinositol-3 quinase/Proteína quinase B) (7). Além disso, mutações no gene CDKN2A (40% dos casos) (8) e no gene PTEN (15% dos melanomas metastáticos) também são

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hccancerbarretos.com.br

HOSPITAL DE CÂNCER DE  
BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO  
XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

frequentes e estão fortemente associadas à progressão do melanoma (9). Em diversos tipos de tumores cancerígenos, o microambiente tumoral é pouco vascularizado, o que submete as células cancerígenas à privação de oxigênio e nutrientes, provocando alterações metabólicas para promover a sua sobrevivência e crescimento sob tais condições. A rápida proliferação aumenta a procura por energia necessária para a biossíntese de macromoléculas, bem como para os precursores de aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos. Como resultado, o metabolismo central de carbono é frequentemente alterado em células tumorais (10-13). Assim, a reprogramação metabólica surge como uma das características fundamentais das células tumorais (14-17). No caso do melanoma, além das alterações genéticas associadas com a agressividade e capacidade invasiva, o microambiente em que o tumor está inserido também contribui para o fenótipo invasivo. O melanoma é o tipo de tumor no qual a estratificação do microambiente tumoral tem sido melhor caracterizada (18-19). Os fenótipos altamente proliferativos exibidos pelas células tumorais são apoiados,

em parte, pela glicólise aeróbica, ou efeito Warburg (13), que fornece energia e intermediários para a biossíntese de macromoléculas (20-21). Em normoxia, as células de melanoma, como outras células tumorais, apresentam frequentemente fenótipos altamente glicolíticos em que 60-80% da glicose é convertida em lactato, uma atividade aumentada para 90% ou mais em condições de hipóxia (22). Sob baixos níveis de oxigênio, os fatores

induzíveis por hipóxia (HIFs) induzem um adaptação da célula ao estresse hipóxico, o que tem um profundo impacto no metabolismo central do carbono (23). O acúmulo de HIF-1 $\alpha$ , induzido por hipóxia, leva a um aumento das taxas glicolíticas, acompanhado pela perda da utilização do carbono da glicose no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) devido à expressão mediada por HIF de piruvato quinase desidrogenase 1 (PK1) (24), diminuindo assim a respiração mitocondrial (25). As células de melanoma mantêm mitocôndrias inteiramente funcionais que podem metabolizar carbonos derivados de glutamina e da glicose para fins anabólicos (22). Notavelmente, sob hipóxia, a biossíntese de ácidos graxos é parcialmente suportada pelo carbono da glutamina através da carboxilação do  $\alpha$ -cetogluturato devido à inversão do segmento  $\alpha$ -cetogluturato-citrato do ciclo TCA (26-22). O aumento da geração de ROS (espécies reativas de oxigênio), devido à atividade metabólica alta ou desregulada, é um fator de estresse que desempenha um papel significativo na tumorigênese (27). Dependendo do contexto, a geração de ROS pode aumentar (28) ou bloquear a progressão do tumor (29-30), promovendo a instabilidade genômica e estimulando a proliferação celular ou induzindo toxicidade celular, respectivamente. O PGC1 $\alpha$  (co-ativador-1 alfa do receptor ativado por

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hcancerbarretos.com.br

HOSPITAL DE CÂNCER DE  
BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO  
XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

proliferador de peroxissoma) atua no controle da geração de ROS mitocondrial (31) e a sua expressão aumenta em resposta à atividade metabólica aumentada, à indução da biogênese mitocondrial e capacidade oxidativa. As células de melanoma que exibem altos níveis de PGC1 $\alpha$  provavelmente dependem da sua expressão para sobrevivência e tumorigênese (32) e a inibição de PGC1 $\alpha$  nestas células ativa a via apoptótica intrínseca, além de promover a diminuição do potencial de membrana mitocondrial, acompanhada de aumento em ROS e baixos níveis de glutatona (32). A dependência de glutamina é uma marca registrada de transformações oncogênicas, incluindo o melanoma (26), e a sua ausência induz apoptose em células tumorais (33-34). A glutamina demonstrou ser um fornecedor essencial de nitrogênio na síntese de nucleotídeos e proteínas e afeta um regulador crítico da tradução de proteínas, o complexo mTORC 1 (35). Estudos também apontaram para alterações oncogênicas que permitem a regulação do metabolismo da glutamina em células tumorais. Por exemplo, o oncogene C-MYC está relacionado com a regulação da transcrição de transportadores de glutamina com alta afinidade na promoção da glutaminólise e a sua expressão está aumentada em melanoma (36-35). O MYC é um oncogene que contribui para muitas malignidades humanas, afetando diretamente o metabolismo central de carbono (37). A reprogramação metabólica no melanoma ocorre em resposta aos estímulos oncogênicos e como uma adaptação ao estresse dependente do microambiente tumoral. Compartimentos citosólicos e mitocondriais muitas vezes mostram padrões de adaptação recíproca para acomodar mudanças em ambos. A inibição do metabolismo do carbono já é uma estratégia terapêutica em câncer (38) e combinada com outros agentes pode ser útil no combate ao melanoma (39). Estudos mostram que o oncogene B-RAF regula a reprogramação metabólica em melanoma (40-41), e foi demonstrado que células de melanoma com a mutação BRAFV600E se tornam energeticamente dependentes do efeito de Warburg (42). Ainda, foi demonstrado que o transportador de glutamina ASCT2 tem sua expressão aumentada em células de melanoma com mutação B-RAFV600E e desempenha um papel crítico na captação de glutamina e proliferação celular (43). O vemurafenibe é um inibidor seletivo de B-RAF (44), apresentando eficácia em pacientes com melanoma com a mutação V600E (bem como a mutação menos comum V600K). Em pacientes sem estas mutações, o vemurafenibe pode ativar B-RAF normal e promover o crescimento tumoral (45). Em um ensaio de fase III que definiu aleatoriamente 675 pacientes com melanoma metastático previamente não tratados e com a mutação B-RAFV600E para receber

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hccancerbarretos.com.br

## HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

tratamento com vemurafenibe ou dacarbazina (agente alquilante), a sobrevida global, em 6 meses, foi de 84% (Intervalo de Confiança (IC) 95% = 78-89%) em pacientes tratados com vemurafenibe e de 64% (95% IC = 56-73%) em pacientes tratados com dacarbazina. A taxa de resposta para o vemurafenibe foi de 48% e de 5% para a dacarbazina. Contudo, é importante notar que 18% dos pacientes tratados com vemurafenibe desenvolveram um carcinoma cutâneo de células escamosas ou um queratoacantoma ou ambos, todos os quais foram tratados por simples excisão (46). Dados da literatura reportam ainda a capacidade do vemurafenibe em reduzir a expressão de MMPs (metaloproteinases), o que poderia levar a uma inibição parcial do processo de invasão celular. Por outro lado, durante e após a aquisição de resistência ao vemurafenibe, as células passam a apresentar um ciclo celular lento, maior expressão de MMP-2, altos níveis de proteína RECK, apresentando capacidade invasiva (47). Um fator limitante para a utilização de inibidores de B-RAF como o vemurafenibe é o desenvolvimento de resistência, ocorrendo, frequentemente, 6 meses após o início do tratamento. A resistência celular aos inibidores de B-RAF está relacionada a um padrão molecular distinto para as diferentes células de melanoma. Relatos na literatura reportam que respostas tumorais adaptativas a fármacos direcionados a B-RAF conduzem, eventualmente, ao início da resistência, incluindo aumento da expressão de vários receptores tirosina quinases, tais como receptor beta ativado por fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRB), receptor de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1R), receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), MET e fatores derivados de tumores tais como neuregulina-1 (NRG) (48-51). O desenvolvimento de resistência, também se dá pela capacidade das células tumorais em ativar a via de sinalização MAPK/ERK, apesar da inibição de B-RAF, através da regulação positiva e da expressão aumentada da isoforma C-RAF (52). Em células resistentes aos inibidores de B-RAF, também tem se observado uma ativação na sinalização de PI3K/AKT, indicando um papel na resistência tumoral, (50). A caracterização da resistência ao vemurafenibe tem sido essencial para a eficácia das estratégias terapêuticas da próxima geração (47). De notar, um estudo de 2017 mostrou que células de melanoma mutadas em B-RAF que apresentam maior taxa glicolítica são mais sensíveis ao tratamento com o inibidor de BRAF PL4720 e que tornar estas células dependentes da via glicolítica para obtenção de energia torna as células ainda mais sensíveis ao tratamento (53). Ainda, o tratamento de células B-RAFFV600E com vemurafenibe resulta no aumento da expressão de vários genes que atuam no ciclo de TCA, assim como dos genes associados com a fosforilação oxidativa e síntese de ATP, efeitos não observado em

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hcancerbarretos.com.br

## HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

células de melanoma B-RAF de tipo

selvagem (39). O tratamento com inibidor também é capaz de induzir uma dependência da glutamina que se correlaciona com a resistência ao fármaco (54-55), sendo a glutamina a principal fonte de carbono para células com resistência adquirida (54). As células de melanoma resistentes a inibidores de B-RAF são também mais sensíveis à inibição da glutaminase, o que torna a glutaminase um potencial alvo terapêutico nos tumores resistentes (54-53).

### HIPÓTESE:

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

### METODOLOGIA:

Imunohistoquímica (IHQ): Cortes parafinados das amostras humanas de melanoma serão submetidos à técnica de IHQ anti-GLUT1, anti-HKII, anti- PDK, anti-MCT1, anti-MCT4, anti-CAIX, anti-ASCT2, anti-GLS e anti-GHD1, utilizando anticorpos primários específicos, conforme instruções do fabricante e de acordo com trabalhos desenvolvidos previamente pelo grupo (31). As reações serão reveladas utilizando o Sistema ADVANCETM/HRP (Dako) e serão utilizados controlos positivos e negativos (Dako) adequados. As lâminas serão contra-coradas com Hematoxilina Mayer's (Dako) e montadas com meio de montagem Entellan. Finalmente,

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hccancerbarretos.com.br

HOSPITAL DE CÂNCER DE  
BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO  
XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

as reações serão sujeitas a avaliação semi-quantitativa, por dois observadores em estudo duplo-cego. Será utilizada a seguinte graduação semi-quantitativa de células positivas: 0: 0%; 1: <5%; 2: 5-50%; 3: >50%. A intensidade da marcação será graduada como 0: negativa; 1: fraca; 2: intermediária; 3: intensa. A graduação final será obtida pela soma dos parâmetros extensão e intensidade, e agrupada em negativa (0-2) e positiva (4-6), tal como previamente descrito pelo grupo (31). Linhagens celulares: serão utilizadas linhagens resistentes ao vemurafenibe, desenvolvidas no laboratório da Profa. Silvyia Stuchi Maria-Engler, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, assim como as respectivas linhagens parentais: A375, SK-MEL-19, SK-MEL-28, SK-MEL-29, UACC62 e WM164). As células serão crescidas em condições normais de crescimento (meio de cultura adequado, incluindo vemurafenibe no caso das linhagens resistentes, em incubadora com atmosfera húmida, a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>), bem como em condições de hipóxia. Para melhor mimetizar o microambiente tumoral, as células serão incubadas em uma câmara de hipóxia (Billups- Rothenberg Inc.), em uma atmosfera de 95% de nitrogênio e 5% de CO<sub>2</sub>. Os níveis de oxigênio serão monitorados utilizando um sensor de oxigênio (PAC 3500, Dräger) e nunca excederão 1% no final do experimento. Caracterização do perfil metabólico das linhagens celulares: Para caracterização da expressão proteica, as linhagens serão crescidas em condições normais de crescimento e será efetuada extração proteica, em tampão de lise adequado, seguida de avaliação da expressão proteica utilizando a técnica de Western blotting. Adicionalmente, pellets celulares serão fixados e processados em parafina, originando cytoblocks, sendo que cortes citológicos destes cytoblocks serão sujeitos à técnica de imunocitoquímica, de uma forma semelhante à técnica de IHQ utilizada nas amostras tumorais. As proteínas a caracterizar serão as mesmas descritas para a imunohistoquímica. Outras proteínas poderão ser adicionadas ao painel caso se justifique. Ainda, será caracterizado o consumo de glicose e glutamina e a produção de lactato, medindo as quantidades de glicose, glutamina e lactato presentes em amostras de meio de cultura, colhidas ao longo do tempo, em condições normais de crescimento. A quantificação será realizada utilizando kits comerciais de quantificação (Cayman Chemical), seguindo as instruções dos fabricantes. Inibidores: Os tratamentos nas linhagens celulares serão realizados utilizando vemurafenibe, em combinação com inibidores de metabolismo que se mostrem adequados de acordo com os resultados obtidos nas tarefas anteriores. Dentre os inibidores, poderão ser utilizados: 2-DG, 3-BP, DCA, ácido oxâmico, quercetina, BPTES, GPNA, entre outros. Caracterização do efeito do tratamento in vitro: Os parâmetros celulares a avaliar

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hcancerbarretos.com.br

HOSPITAL DE CÂNCER DE  
BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO  
XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

após tratamento combinado de vemurafenibe com inibidores do metabolismo, nas linhagens de melanoma resistentes ao vemurafenibe e respectivas linhagens parentais, encontram-se brevemente descritos a seguir e otimizados pelo grupo (32)... (maiores informações, vide Projeto de Pesquisa original anexo).

**CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:**

A amostragem será realizada por conveniência e irá incluir todos os pacientes com diagnóstico de melanoma, de ambos os sexos, independente da idade, que possuam amostras pré e pós-tratamento com vemurafenibe em bloco de parafina no serviço de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos.

**CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:**

Serão excluídos do estudo casos que não apresentem material (bloco de parafina) suficiente para a análise de imunohistoquímica.

**Objetivo da Pesquisa:**

**OBJETIVO PRIMÁRIO**

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

**OBJETIVO SECUNDÁRIO**

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

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hcancerbarretos.com.br

HOSPITAL DE CÂNCER DE  
BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO  
XII



Continuação do Parecer: 7.319.662

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo o(a) pesquisador(a):

**Riscos:**

Todas as informações referentes aos participantes serão mantidas em sigilo, sob a responsabilidade do investigador principal (orientador), não havendo divulgação pública do nome ou de qualquer informação que possa identificar o participante. Devido à necessidade de garantir material estocado no Departamento de Patologia, para possíveis testes de diagnósticos futuros, os blocos de parafina não serão esgotados ou prejudicados.

Assim, trata-se de um projeto com risco mínimo ao participante da pesquisa, caracterizado apenas pela eventual quebra de sigilo, sendo que será solicitada dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido.

**Benefícios:**

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

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

¿Vide campo ¿Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações¿.

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

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

**Recomendações:**

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

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

Trata-se de uma resposta ao parecer consubstanciado CEP n.º 1435/2017 datado em 23/11/2024.

1. Item de Pendência (com número da pendência do parecer): 1. Nos documentos:

"Projeto\_CEP\_Emenda e PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2417094\_E2", tópico "Plano de Trabalho e Cronograma de Execução", consta início da nova técnica inserida no projeto em setembro. O cronograma do estudo não está adequado, pois informa que ele já teria iniciado. Sendo assim, solicitam-se esclarecimentos e, caso necessário, a adequação do cronograma em relação à

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, n° 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hccancerbarretos.com.br

**HOSPITAL DE CÂNCER DE  
BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO  
XII**



Continuação do Parecer: 7.319.662

data de início do estudo, dado que este encontra-se em análise no Sistema CEP/Conep até a presente data. Ressalta-se, ainda, a necessidade de adequação do cronograma de forma a descrever a duração das diferentes etapas da pesquisa, com o compromisso explícito do pesquisador de que o estudo será iniciado somente a partir da aprovação pelo Sistema CEP/Conep (Norma Operacional CNS n.º 001, de 2013, item 3.3.f).

Resposta Pesquisador: O cronograma foi corrigido conforme solicitado e orientado no documento [¿PB\\_PARECER\\_CONSUBSTANCIADO\\_CEP\\_7217574\\_E2.pdf¿](#).

Qual documento e item/página é possível localizar as alterações/correções realizadas:

- No item 4. Plano de Trabalho e Cronograma de Execução, sub item 4.2 2024 e 2025, Documento Projeto\_CEP\_Emenda.pdf, página 20, e no documento PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_2417094\_E2.

ANÁLISE: pendência aprovada.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa ¿ CEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS n.º 466, de 2012, e na Norma Operacional n.º 001, de 2013, do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta para o projeto de pesquisa. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1435/2017.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2417094_E2.pdf	23/11/2024 19:45:06		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Emenda_2_Correcao_Pendencias.pdf	23/11/2024 19:44:11	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	Carta_de_Resposta_Pendencias_PIO_XII.pdf	23/11/2024 19:41:24	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	Formulario_Emenda_PDK3_corrigido.pdf	03/10/2024 10:13:36	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, n.º 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hccancerbarretos.com.br

**HOSPITAL DE CÂNCER DE  
BARRETOS - FUNDAÇÃO PIO  
XII**



Continuação do Parecer: 7.319.662

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Emenda_2.pdf	14/09/2024 13:20:43	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	Formulario_Emenda_PDK3.pdf	14/09/2024 13:03:32	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	Formulario_Emenda.docx	01/10/2018 10:18:48	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	Formulario_Emenda.pdf	28/09/2018 13:30:20	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_Emenda.pdf	24/09/2018 15:44:42	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	Cadastro_do_Projeto_de_Pesquisa.pdf	21/08/2017 09:25:06	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	15/08/2017 11:56:53	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Corresponsabilidade_de Estudo.pdf	08/08/2017 18:38:50	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	31/07/2017 18:47:22	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Outros	MABIN.pdf	31/07/2017 18:41:40	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Ciencia_Autorizacao.pdf	31/07/2017 18:35:34	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Orçamento	Declaracao_Fonte_de_Financiamento.p df	19/07/2017 18:39:32	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_de_Responsabilidade_do_p esquisador.pdf	19/07/2017 18:38:33	MARINA PEREIRA DIAS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BARRETOS, 27 de Dezembro de 2024

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Wilson Eduardo Furlan Matos Alves**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, nº 1331 - Pavilhão Jorge & Mateus, Sala: CEP - IEP  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep.hcb@hcancerbarretos.com.br