

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

TESE DE DOUTORADO

Adaptação metabólica em melanomas: revisão de literatura, caracterização de um modelo celular pré-clínico e validação clínica do fenótipo *slow-cycling*

Ivi Juliana Bristot

Porto Alegre

2023

Adaptação metabólica em melanomas: revisão de literatura, caracterização de um modelo celular pré-clínico e validação clínica do fenótipo *slow-cycling*

Ivi Juliana Bristot

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Klamt

Porto Alegre
2023

CIP - Catalogação na Publicação

Bristot, Ivi Juliana
Adaptação metabólica em melanomas: revisão de literatura, caracterização de um modelo celular pré-clínico e validação clínica do fenótipo *slow-cycling* / Ivi Juliana Bristot. -- 2023. 169 f.
Orientador: Fábio Klamt.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Porto Alegre, BR-RS, 2023.

1. Melanoma. 2. *slow-cycling* phenotype. 3. aggressiveness behavior. 4. mitochondrial dynamics. 5. oxidative phosphorylation . I. Klamt, Fábio, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Sobre os ombros de gigantes”
Bernardo de Chartres

AGRADECIMENTOS

Enquanto lia uma parte da minha tese, ainda na fase de elaboração, minha cunhada me indagou o porquê de eu estava escrevendo “nós encontramos” em vez de “eu encontrei”. E olhando por um aspecto leigo, teoricamente, a tese foi escrita por quem a apresenta e esses dados a pertence. Contudo, a ciência não funciona assim. Os dados aqui apresentados não são meus, são da sociedade, e só foi possível de serem alcançados por todas as pessoas que colaboraram de alguma para a aquisição desse conhecimento.

Toda dissertação/tese começa com uma criança curiosa, tentando descobrir o mundo, e todo cientista é um adulto que não deixou a sede de curiosidade da infância morrer. E, a primeira fonte de conhecimento de todos é a família^{1,2}. Nesse sentido, agradeço imensamente a minha família por me obrigar a fazer as listas de operações matemáticas no ensino fundamental, por acordar no meio da noite para ver se eu estava precisando de alguma coisa enquanto eu tentava decorar as diferenças do ciclo de vida de uma briófitas e pteridófitas ou compreender uma integral, por me acolher nos dias em que estava frustrada com os experimentos e por comemorar quando eles davam certo. Mas acima de tudo, obrigada por todo o amar.

Muitas pessoas acreditam que a ciência é realizada apenas nos laboratórios. Realmente, experimentos realizados nos laboratórios são extremamente importantes para comprovar uma hipótese. No entanto, a ciência é feita a partir de perguntas, de troca de conhecimento. Você até pode achar estranho, mas boa parte do conhecimento científico que temos hoje começou em um bate-papo nos corredores de uma universidade, uma conversa de bar depois de um seminário, um café entre um experimento e outro na companhia de colegas de laboratório³. Entretanto, todas as ideias que surgem precisam ser lapidadas e direcionadas. Assim, o orientador é peça fundamental no processo científico. Durante muito tempo eu pensei que orientadores eram grandes portadores das verdades. Mas a ciência, a ciência não é feita de verdades. Hoje eu entendo que um orientador te dá ferramentas para o desenvolvimento de uma hipótese, um bom orientador te guia a ficar independente no aprendizado científico e um ótimo orientador te motiva a prosseguir. Por isso, eu agradeço ao meu orientador por ter acreditado em mim e me guiado durante esses anos⁴.

Na academia, a maioria dos alunos de mestrado e doutorado aprendem a orientar, na forma de co-orientação, alunos de iniciação científica. Nesse sentido, a academia ensina que ensinar dá trabalho, e que muito tempo é requerido para auxiliar na formação científica de outro aluno. Sobretudo, essa co-orientação mostra que muito se tem a ser aprendido com aprendizes⁵.

O cientista é muitas vezes caracterizado como um ser de pouca fé. E, por muitas vezes, assim não tem uma religião. No entanto, todas as pessoas que fazem ciência têm uma pessoa que reza por elas. Assim, meu muito obrigada por rezarem por mim e por nunca me sentir sozinha, já que tenho vocês na minha vida⁶. As pessoas que estudam demais também são

¹ À minha mãe Claudete Knak Bristot e ao meu pai Lavino Bristot. Vocês são a minha alma, minha base, minha inspiração.

² Aos meus familiares Dáfini, Ledi, Marieta, Ioni, Jéssica, Telma, Diego, Cleidi por todo o apoio e carinho. Também gostaria de agradecer a minha prima Grasielle por ser uma mulher incrível e trazer para o mundo a Rafa, minha afilhada.

³ Às pessoas que tive o prazer de conhecer no laboratório 24 e no Programa de Bioquímicas UFRGS Liana, Paty, Carol, Gi, Camila, Henrique, Lucia, Daiana, Mery, Jéssica, Marco Antônio, Bobs, Sara, Lia, Cassio, Rodrigo, Fernanda, Roche, Lucas, Florência, Robertinha e Carol. Agradeço também aos professores Fábio Klamt, José Cláudio, Fátima, Ângela, Ana Battastini, Fabrício, Clovis, Diogo, Rosca, Lisiane e Professor Renato que, de alguma forma, participaram diretamente ou foram inspiração durante esses anos. Deixo aqui também meus agradecimentos a Cleia, Claudia, Giordano e Silvana, entre vários outros funcionários que movem a universidade.

⁴ Ao professor Fábio Klamt por ter acreditado em mim, por lutar pelos seus alunos e por ser essa pessoa incrível.

⁵ A Camila, Gi e Rodrigo, que me ensinaram muito durante esses anos.

⁶ Às pessoas que dedicaram seu tempo rezam por mim, mesmo quando eu não fui capaz de fazer, minha mãe Claudete, meu pai Lavino, minha prima Dáfini Knak, minha dinda Ledi, minhas amigas Ane, Mari e Taila.

descritas, em filmes e livros, como loucos. Nas últimas etapas do meu doutorado, eu reconheço que realmente somos peculiares. Produzir conhecimento é lidar com o fracasso. Para cada resultado positivo, o silêncio dos muitos resultados que deram errado reverberam internamente em quem faz ciência. Isso se acentua no Brasil, onde fazer ciência é um ato de resistência.

Ah, a ciência. A ciência também é um ato político. A Lei de Cotas garantiu o acesso a institutos e universidades federais por ex-alunos da rede pública, permitindo que uma aluna da rede estadual construísse uma história acadêmica. Políticas públicas também são responsáveis por manter as universidades públicas que correspondem a 95% da produção científica brasileira. Esse investimento é retribuído de várias formas para a sociedade. Como, por exemplo, na pandemia do Coronavírus, onde a UFRGS, assim como outras universidades, não apenas produziu conhecimento, mas também cedeu seu espaço, equipamentos e alunos para a realização de testes do tipo RT-PCR. Demonstrando que quando o mundo inteiro entra em quarentena, a ciência não para.

No tempo que resta entre um seminário, um experimento, a escrita de um artigo e algumas vidrarias lavadas, as pessoas que produzem conhecimento científico tentam se encaixar na sociedade. Contudo, na grande maioria das vezes, um estudante de doutorado esquece uma data importante, some para finalizar uma colaboração ou não pode ir a um churrasco no domingo porque tem que fazer a passagem das células. Assim, gostaria de agradecer a minha família, aos meus familiares, amigos de infância⁷, da faculdade⁸, do trabalho⁹ e aqueles que simplesmente surgiram na vida¹⁰, por todas as risadas, conversas e rissacas, gostaria de agradecer especialmente por não desistirem de mim quando eu sumia. Mas não pense você que amigos e familiares são as únicas pessoas que um estudante de doutorado decepciona. Do mesmo modo, gostaria de agradecer ao meu parceiro de vida¹¹ por todos os abraços, pelos incontáveis momentos felizes, por todas as conversas, por compreender que eu não faço parte do modelo padrão (nenhum estudante de doutorado faz), e por trazer para a minha vida amigos e uma nova família¹².

Família, familiares, amigos, namorado, colegas do laboratório, funcionários do Programa de Pós-graduação de Bioquímica da UFRGS, e todos aqueles que estão guardados na lembrança¹³, todas essas pessoas possibilitaram que essa tese se concretiza de alguma forma. Muitas dessas pessoas não têm faculdade, algumas não têm nem o ensino médio, mas todas elas são parte ativa dos resultados aqui descritos. Um estudante de doutorado não é uma pessoa, é um conjunto de histórias movimentando a busca do saber sobre uma pequena parte do que ainda não sabemos e agregando valor ao que um dia vamos compreender.

⁷ Aos amigos de infância que confirmam aquela frase de camiseta de oitava série “amigos de verdade nunca se separam apenas seguem caminhos diferentes”, Beenenmann, Carol, Marcel e Mateus. Aos queridos amigos Diego e Anelise, por todas as risadas e apoio durante esses anos.

⁸ À “Manolada da Bio”, Arthur, Curi, Rodrigo, Martinelli, Liana (sim você de novo), Ana Crestani, Alice Gabriel, Eliza, Paula. Muitas lembranças foram construídas nas noites viradas estudando/fazendo trabalhos infinitos.

⁹ Às pessoas maravilhosas que se apoiam num ambiente competitivo e fazem a vida ser melhor, Mi, Odair, Karina, Laura, Will, Fernanda, Fe, Mari, Cori, Bianca e Carlos.

¹⁰ Aos amigos que surgiram sem avisar e são parte permanente na minha vida, Igor, Tajh, Isa, Bolson, Mari, Derson, Lucas, Deh, Mari, Alex, Taila, Marcelinho, Debora, Garcia, Gustavo, Mari(sim, são muitas Maris), Felipe, Adreissa, Maicon e Lili.

¹¹ Ao meu companheiro de vida, que escolheu ficar com uma pessoa que sempre tinha experimentos para fazer ou um artigo pra escrever. Obrigada por me apoiar nos dias difíceis, sorrir comigo nos dias calmos, e me abraçar nas quartas-feiras chuvosas. Obrigada também por escutar incansavelmente sobre a tal da glicólise e um tal de piruvato.

¹² À família que ganhei ao conhecer o Joao. Muito obrigada Isabel, Bira e Bruna por me acolherem na sua família. Um agradecimento especial por compreenderem que os últimos meses foram bem pesados e um muito obrigada por alimentarem meu espírito com a presença de vocês na minha vida e minha barriga com a quantidade de comida gostosa.

¹³ As pessoas que permaneceram vivas dentro de mim, minha vó Margarida, tio Claudio e prima Giseli, vocês sempre foram e sempre serão minha inspiração

APRESENTAÇÃO

Essa tese está dividida em três partes, contendo os seguintes itens:

Parte I: Resumo, Resumo em inglês (Abstract), Lista de abreviaturas, Introdução e Objetivos;

Parte II: Resultados, divididos em três capítulos, e apresentados na forma de artigos científicos.

Parte III: Discussão, e Referências bibliográficas, citadas na Introdução (parte I) e Discussão.

Essa tese contém ainda a seção Anexos composta por dois capítulos de livro publicados durante o período de doutorado e lista de artigos publicados em colaboração. Em anexo, também se encontra, dois certificados demonstrando que, durante a execução dessa tese, a candidata foi responsável pela implementação e treinamento de recursos humanos em técnicas de oximetria de alta resolução regionalmente (pela oficina realizada na UNIPAMPA de São Gabriel-RS) e internacionalmente (por um seminário ministrado no Instituto de Nanociencia y Nanotecnología (INN) - Nodo Centro Atómico Constituyentes (CAC), Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), Argentina).

Os estudos realizados nesta tese, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio Klamt, foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica Celular no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), e no INN- Nodo CAC, CNEA, Argentina. Essa tese foi financiada pelos fundos brasileiros MCTI/CNPq INCT-TM/CAPES/FAPESP (465458/20149), MCTI/CNPQ/CBAB Cooperação Internacional em Biotecnologia, Brasil (465113/2014-1) e pela Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina (Cooperación Internacional PICT-CABBIO 2014-0818 e PICT 2014-1557) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	VI
PARTE I	1
RESUMO.....	2
ABSTRACT.....	3
INTRODUÇÃO	5
Dados Epidemiológicos do Câncer.....	5
Dados Epidemiológicos do Melanoma	7
Origem, Fatores e Prevenção do Melanoma	8
Prognóstico e Tratamento do Melanoma	10
Célula de Ciclagem Lenta na Resistência e Relapso no Melanoma	12
Metabolismo energético no desenvolvimento do melanoma e na resistência	14
A Linhagem de Melanoma Humano A347 e seus Clones A7 e G10.....	19
OBJETIVOS	22
Objetivos específicos	22
PARTE II.....	23
CAPÍTULO I.....	24
CAPÍTULO II	40
CAPÍTULO III.....	82
PARTE III	110
DISCUSSÃO	111
CONCLUSÃO	122
PERSPECTIVAS.....	123
REFERÊNCIAS.....	124
ANEXO I	136
ANEXO II.....	153
ANEXO III	159
ANEXO IV.....	160
ANEXO V	161

PARTE I

RESUMO

O melanoma é um câncer de pele causado pelo crescimento anormal de células pigmentares (melanócitos), principalmente na pele e nas mucosas. É um dos tipos mais graves de câncer de pele, pois tem alto potencial metastático. Em casos avançados, a doença é difícil de ser controlada, resultando em uma baixa expectativa de vida. Estudos recentes indicam que fatores não genéticos influenciam a heterogeneidade do melanoma, sendo um subgrupo celular principalmente responsável pela recidiva. Contudo, não existe um consenso na literatura sobre esse perfil celular, comumente chamado de ciclagem lenta (do inglês, *slow-cycling*), ou modelos celulares com características inerentes desse fenótipo. Levando isso em consideração, escolhemos o modelo celular desenvolvido pela transfecção do gene da catalase na linhagem A375, originando os clones A375-G10 (G10) e A375-A7 (A7) que demonstram padrões de diferenciação e agressividade complementares. Assim, o objetivo dessa tese foi revisar a literatura na busca de marcadores e características para definir o fenótipo de ciclagem lenta para, então, verificar o potencial das células A7 e G10 como modelo de estudo desse fenótipo, e, finalmente, validar seu poder prognóstico e preditivo em amostras clínicas. Tanto a superexpressão quanto a diminuição do nível de expressão do fator de transcrição associado à microftalmia (*MITF*) demonstraram desempenhar um papel no desenvolvimento de ciclagem lenta no melanoma. A superexpressão e a baixa expressão desses genes estão envolvidas na regulação da diferenciação e resistência aos tratamentos. A alta expressão de *MITF* promove um fenótipo diferenciado devido à regulação positiva dos genes *MITF*, *MLANA*, *TYR*. No entanto, as células de ciclagem lenta com baixa expressão de *MITF*, também conhecido como *MITF*^{low}, apresenta enriquecimento de genes relacionados a transição epitelial-mesenquimal (EMT), sinalização TGF β , assim como alta expressão de expressão da *JUN*, *BRN2* e *AXL*. Independente da expressão de *MITF*, o fenótipo de ciclagem lenta apresenta um estado quiescente, sendo seu metabolismo dependente de respiração mitocondrial. Ao investigar essas características no modelo celular composto por A7 e G10, observamos que a linhagem G10 apresenta aumento da parada do ciclo celular G₀/G₁, e maior atividade de β -galactosidase lisossômicas, assim como aumento na expressão de genes relacionados ao as células ciclagem lenta *MITF*^{low}. Além disso, demonstramos que G10 apresentam elevado consumo de oxigênio, aumento no número de mitocôndrias, e maior imunoconteúdo de proteínas da fusão mitocondrial em comparação a célula A7. Dessa forma, observamos que a linhagem G10 apresenta enriquecimento de características do fenótipo de ciclagem lenta. Posteriormente, analisamos a expressão diferencial de genes relacionados a esse perfil celular em banco de dados de pacientes com melanoma. Para nossa surpresa, dos seis bancos analisados, apenas dois demonstraram diferença estatística. Além disso, a análise mostrou que a maioria desses genes apresentam expressão reduzida. Ao estratificar os dados do banco GSE65185 entre a alta ou baixa resposta (maior ou menor que a média) das amostras de pacientes, antes da intervenção terapêutica, e analisar a expressão dos genes *MITF*, notamos que a maioria de pacientes com baixa resposta terapêutica apresenta baixa expressão de *MITF*. Nesse sentido, trazemos à tona a discussão sobre a dificuldade de encontrar na clínica um fenótipo celular descrito extensivamente *in vitro* como principal fator na agressividade do melanoma.

ABSTRACT

Melanoma is a type of skin cancer caused by the abnormal growth of pigment cells (melanocytes) mainly in the skin and mucous membranes. It is one of the most serious types of skin cancer and has a high metastatic potential. In advanced cases, the disease is difficult to control, resulting in a low life expectancy. Recent studies indicate that non-genetic factors influence the heterogeneity of melanoma, being a subgroup of cells responsible for recurrence. Conversely, there is no consensus in the literature about this cellular profile, commonly called *slow-cycling*, or cellular models with inherent characteristics of that phenotype. Taking this into account, we chose the cell model developed by transfecting the catalase gene into A375 cell line, originating the clones A375-G10 (G10) and A375-A7 (A7) which demonstrate patterns of differentiation and aggressiveness complementary. Thus, the objective of this thesis was to determinate markers and characteristics to define the *slow-cycling*, and then verify the potential of the model composed of A7 and G10 as a study model of this phenotype, validating it in patient data. Both overexpression and decreased expression level of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) have been shown to play a key role in the development of melanoma. The hyperactivation or low expression of this gene is involved in the regulation of differentiation and resistance to treatments. The high expression of MITF promotes a differentiated phenotype due to the upregulation of the *MITF*, *MLANA*, *TYR* genes. However, *slow-cycling* cells with low expression of MITF, also known as MITF^{low}, show enrichment of genes related to epithelial-mesenchymal transition (EMT), TGFB signaling, as well as upregulation of JUN, BRN2 and AXL. Regardless of MITF expression, the *slow-cycling* phenotype presents a quiescent state, and its metabolism dependeds on mitochondrial respiration. When investigating these characteristics in the cell model composed of A7 and G10, we observed that the G10 cell line shows an increase in the G₀/G₁ cell cycle arrest, and greater activity of lysosomal β-galactosides, as well as an increase in the expression of genes related to MITF^{low}. In addition, G10 shown increased oxygen consumption, higher mitochondria numbers per cell, and greater immunocontent of mitochondrial fusion proteins compared to cell A7. Hence, we observed that the G10 lineage presents enrichment of *slow-cycling* phenotype characteristics. Subsequently, we analyzed the differential expression of genes related to this cell profile in a database of patients with melanoma. To our surprise, of the six database analyzed, only one showed a statistical difference. Furthermore, the analysis showed that most of these genes have reduced expression. By stratifying the data from this GSE65185 database between high or low response (greater or less than the mean) of the patient samples before the therapeutic intervention, we analyzed the expression of the *MITF*. In this sense, the majority of patients with low response therapy has low expression of MITF. In this sense, we bring up the discussion about the difficulty of finding in the clinic the cellular phenotype extensively described *in vitro* as the main factor in the aggressiveness of melanoma.

LISTA DE ABREVIACÕES

ABC: *ATP-Binding Cassette*
BRAF: *B-Raf proto- oncogene*
BRAFi: inibidores de BRAF
CDK4: *Cyclin dependent kinase 4*
CDKN1A/2A: *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A/2A*
CTLA-4: *immune checkpoints T- lymphocyte- associated protein 4*
DCT: *dual- clutch transmission*
DRP1: *dynammin-related protein 1*
ERO: espécie(s) reativa(s) de oxigênio
FDA: *Food and Drug Administration*
FDG: fluoro-deoxiglicose
PET/CT: Tomografia por emissão de pósitron / tomografia computadorizada
HIF1 α : *Hypoxia inducible fator-1 alpha*
IDH: *Isocitrate dehydrogenase*
INCA: Instituto Nacional de Câncer
JARID1B: *Jumonji, AT Rich Interactive Domain 1B*
MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*
MEKi: inibidores de MEK
Mfn2: Mitofusina 2
MHC: *major histocompatibility complex*
MITF: *microphthalmia-associated transcription factor*
OPA1: *Optic atrophy protein 1*
OXPHOS: *Oxidative phosphorylation*
PD-1: *Programmed Cell Death Protein 1*
PGC1 α : *Peroxisome proliferator--activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
PK: Piruvato cinase
SA- β -gal: β -galactosidase lisossômica
SUS: Sistema Único de Saúde
TCA: *Tricarboxylic acid cycle*
TGF- β : *Transforming growth factor beta*
TYR: Tyrosinase
TYRP1: Tyrosinase related protein 1
UV: *Ultraviolet light*

INTRODUÇÃO

Dados Epidemiológicos do Câncer

O câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, sendo ainda doenças cardiovasculares a principal (Ritchie and Roser, 2018). No entanto, no ranking de óbitos em faixa etária abaixo de 70 anos, o câncer aparece em primeiro lugar (**Fig.1a**) (Bray et al., 2018). Em 2020, a pandemia da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) causou um efeito negativo no diagnóstico do câncer, que resultará num decréscimo artificial dos números de casos identificados, para, então, em seguida ocorrer um aumento no número de casos identificados em estágio avançado e morte (Siegel et al., 2022).

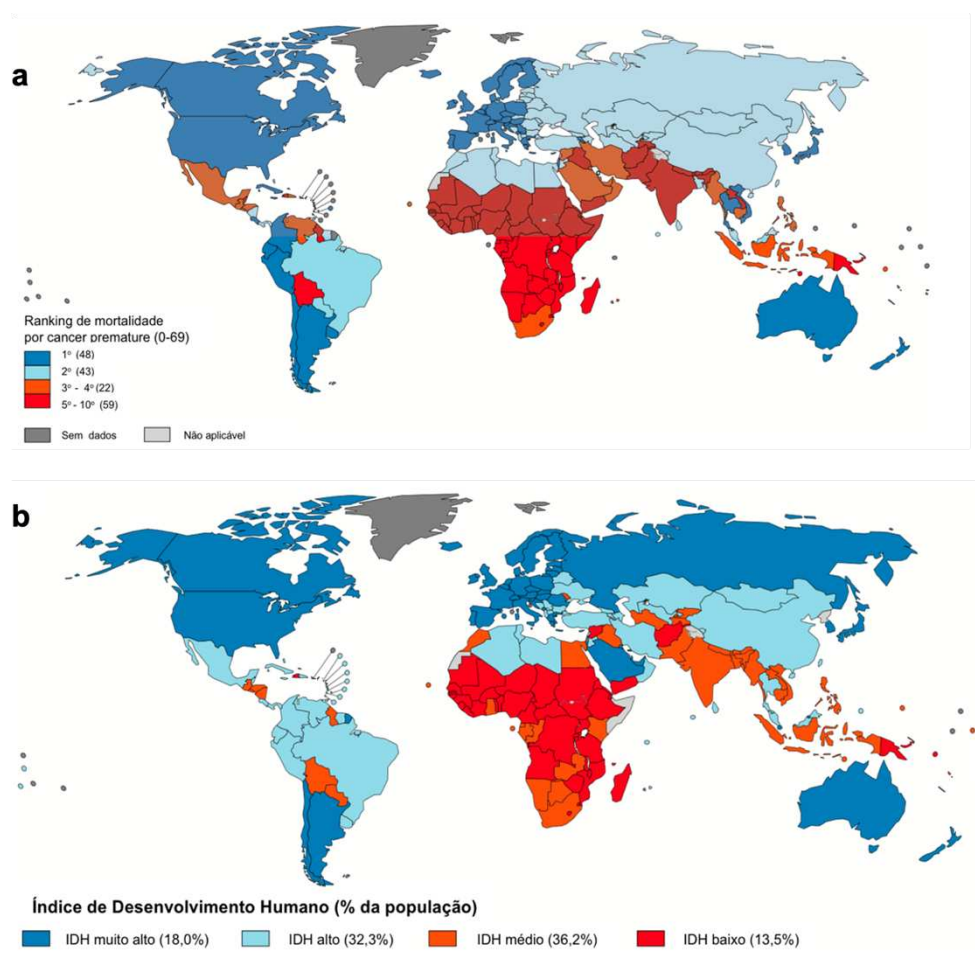


Figura 1: Representação espacial do ranking de mortalidade por câncer prematuro (a) e índice de desenvolvimento humano (b) globais. Adaptado de Bray et al (2018).

Resultados do Observatório Global do Câncer (do inglês: *Global Cancer Observatory*) estimam que haverá 11,4 milhões de novos casos de câncer e 6,83 milhões de mortes até 2040 (Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, 2020). Apesar disso, a taxa de sobrevida relativa em 5 anos para todos os cânceres diagnosticados em 2004-2010 foi de 68%, contra 49% em 1975-1977 (American Cancer Society, 2015). A melhora na sobrevida reflete tanto o diagnóstico precoce de certas malignidades e mudanças de hábitos, quanto a melhorias no tratamento. Assim, o avanço tecnológico também influencia nas taxas e incidências de mortalidade. Por exemplo, países com índice de desenvolvimento humano mais altos apresentam altos índices, pois fornecem os melhores serviços de detecção, diagnóstico, tratamento, interferindo, positivamente, nos dados de sobrevivência e mortalidade (**Fig.1b**) (Stewart and Wild, 2014). Em contrapartida, nos países de índice de desenvolvimento humano médio e baixo, um terço das mortes por câncer poderiam ser evitadas com medidas que reduzissem a exposição da população a carcinogênicos, impulsionar a vacinação contra infecções com potencial de originar células cancerosas, assim como o incentivo a uma vida mais saudável (Bender, 2014).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o Brasil apresentará 704.080 mil novos casos de câncer a cada ano (sem contabilizar o câncer de pele não melanoma), quantitativo condizente com o de países em desenvolvimento e apresentando taxas elevadas de tumores associados à pobreza – colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral (**Fig. 1b**) (INCA, 2022). Excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma, os tipos mais frequentes em homem são próstata, cólon e reto, pulmão, estômago e cavidade oral; enquanto nas mulheres destacam-se mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e tireoide (**Fig. 2**).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e Reto	21.970	9,2%			Cólon e Reto	23.660	9,7%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	14.540	6,0%
Cavidade Oral	10.900	4,6%			Glândula Tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 2: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma. Adaptado de INCA (2022).

A ocorrência de neoplasias varia também geograficamente em proporção e em tipos de câncer, de forma que as regiões sul e sudeste são responsáveis por 70% das ocorrências. As taxas estimadas no Rio Grande do Sul, exceto pele não melanoma, para 2023 são de 277.73 novos casos para cada 100 mil homens e 239.65 casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

Dados Epidemiológicos do Melanoma

O melanoma apresenta aproximadamente 28% das incidências, no cenário mundial, dos cânceres de pele (Bray et al., 2018). Contudo, essa relação não é precisa devido ao baixo registro de casos de câncer de pele não melanoma em muitos países (Siegel and Miller, 2020). Embora apresente baixa ocorrência, a razão incidência / mortalidade é quase duas vezes menor no melanoma quando comparado ao câncer de pele não melanoma, indicando sua alta letalidade (INCA, 2022). Globalmente, a incidência de novos casos de melanoma parece ter se estabilizado nos últimos anos em adultos com menos de 50 anos, especialmente em homens (Siegel et al., 2022). Contudo, é esperado um aumento no número de novos casos de melanoma no Brasil devido ao aumento na expectativa de vida (INCA, 2022).

Nos Estados Unidos, entre 2016 e 2018, por exemplo, foi observado que a probabilidade de desenvolver câncer melanoma invasivo do nascimento aos 49 anos de idade é de 1 em 233 homens e 1 em 157 mulheres, mas esse dado sobe para 1 em cada 37 e 1 em cada 84 após os 70 anos para homens e mulheres, respectivamente (Siegel et al., 2022). No Brasil, o número de novos casos previstos para 2023 será de aproximadamente 4.640 em homens e 4.340 em mulheres (**Fig. 3**) (INCA, 2022).

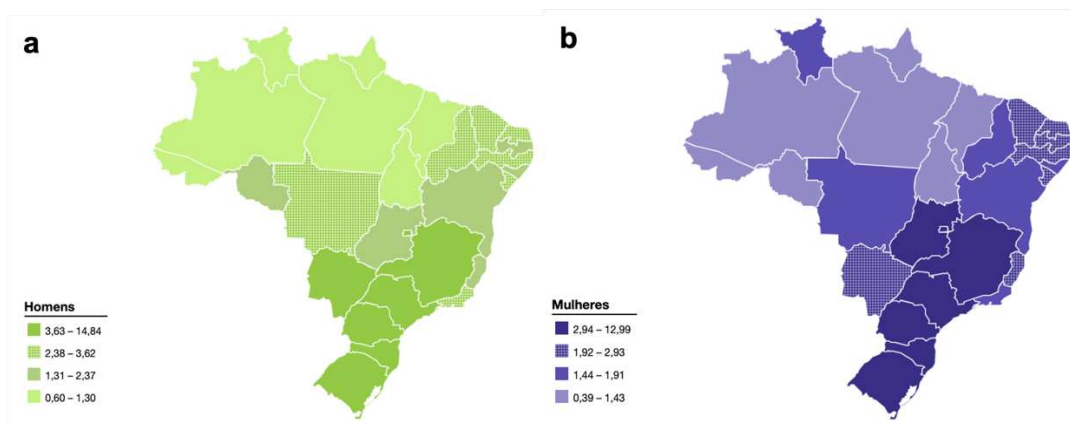


Figura 3: Representação espacial das taxas ajustadas por 100 mil (a) homens e (b) 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2023, segundo a Unidade de Federação para melanoma maligno de pele. Adaptado de INCA (2022).

Origem, Fatores e Prevenção do Melanoma

Esta neoplasia origina-se nos melanócitos, células encontradas predominantemente na camada basal da epiderme da pele e dos olhos, onde produzem melanina, o pigmento responsável pela cor da pele e do cabelo. Os melanócitos cutâneos se originam de progenitores altamente móveis da crista neural que migram para a pele durante o desenvolvimento embrionário (Leonardi et al., 2018). Em resposta aos raios solares ultravioleta (UV, do inglês *ultraviolet light*), essas células produzem, através de uma série de reações químicas chamadas conjuntamente de melanogênese, a melanina, um pigmento que diminui a absorção desses raios, funcionando como um escudo a radiação UV, que pode causar alterações no DNA diretamente através da formação de fotoprodutos e indiretamente através do dano oxidativo induzido pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) (Grimaldi et al., 2014). Assim, o risco de

desenvolvimento do melanoma é predominantemente ambiental e relacionado a exposição crônica ao UV e histórico de queimaduras solares (INCA, 2022; Leonardi et al., 2018). Consequentemente, existe uma correlação entre exposição solar a uma maior carga mutacional, sendo que as mutações mais frequentes levam à hiperativação da cascata de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (também conhecida como via da MAPK, do inglês: *mitogen-activated protein kinase*), sendo que aproximadamente 50% dos melanomas possuem mutações de ativação no gene *BRAF* (do inglês: *B-Raf proto-oncogene*), onde 90% delas dão origem à proteína BRAFV600E (Leonardi et al., 2018).

Além disso, o nível de pigmentação da pele também afeta a predisposição a essa neoplasia; assim, os caucasianos têm aproximadamente 10 vezes mais risco de desenvolver melanoma em comparação com indivíduos afro-americanos (Bolick and Geller, 2021). Dessa forma, o INCA prevê uma maior incidência nas regiões sul e sudeste, onde existe uma maior concentração de brasileiros que se declaram como brancos (INCA, 2022; IBGE, 2022). Apesar do ambiente ter grande influência no melanoma, o desenvolvimento subsequente após o diagnóstico de um primeiro melanoma é mais afetado por variantes genéticas, histórico familiar, bem como número de nevos (pequenas lesões cutâneas, geralmente escuras) (Bolick and Geller, 2021).

Como o melanoma apresenta alta habilidade metastática, medidas primárias, como a utilização de protetor solar, quanto secundárias, como protocolos de triagem para detectar lesões pré-malignas precocemente, são fundamentais para a prevenção e eficácia dos tratamentos disponíveis (Grimaldi et al., 2014). Por exemplo, um estudo de caso-controle realizado na Austrália descobriu que, quando comparado com pacientes não rastreados, a triagem clínica de cuidados primários diminuiu em 14% o risco de detectar melanoma com mais de 0,75 mm de espessura (Bolick and Geller, 2021). Estima-se que um programa abrangente de prevenção de melanoma nos Estados Unidos reduza 20% os casos projetados,

ocasionando uma redução de US\$ 2,7 bilhões no tratamento dessa neoplasia (Bolick and Geller, 2021).

Prognóstico e Tratamento do Melanoma

O prognóstico da doença leva em consideração a espessura do tumor (nível de Breslow), tipo histológico, presença de ulceração ou de regressão, localização, nível histológico de invasão da pele (nível de Clarck) e a presença de metástase (Fig 4) (Papadopoulos et al., 2020). A maioria dos pacientes diagnosticados se encontram em estágio inicial da doença; nesses casos, o tratamento recomendado e altamente eficaz a ressecção cirúrgica. Entretanto, essa

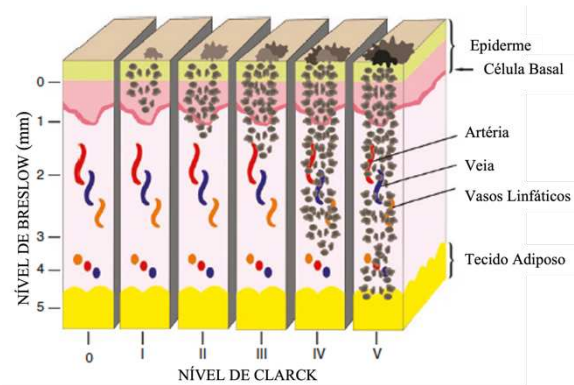


Figura 4: Correlação entre a profundidade do melanoma e a infiltração da estrutura dérmica. Adaptado de Champsas e Papadoulos (2020)

abordagem não funcionará em alguns desses pacientes que apresentarão relapso e nos cerca de 10% que são diagnosticados em estados avançado (Leonardi et al., 2018). Nesse contexto, a taxa de sobrevida em cinco anos cai de aproximadamente 98% quando identificado em estágio 0, I e II para 22% quando diagnosticado em estágio IV (Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, 2020; Leonardi et al., 2018). Classicamente é recomendado ressecção cirúrgica em metástase única para retardar a necessidade do uso de quimioterapia citotóxica, sendo Dacarbazina, Temozolomida, Fotemustina, Carboplatina os mais utilizados (CONITEC, 2018). A sobrevida média de pacientes com melanoma em estágio IV aumentou de 6% para cerca de 22% em 5 anos pós-tratamento com a introdução de terapias alvo e imunoterapias (Bolick and Geller, 2021; Leonardi et al., 2018).

Em 2011 foi aprovado pelo FDA (do inglês: *Food and Drug Administration*) o uso do Vemurafenib seguido de Dabrafenib, os primeiros inibidores de BRAF (BRAFi). Devido à frequente reativação da via MAPK induzida por BRAFi, foram desenvolvidos inibidores de

MEK (MEKi) Trametinib, que bloqueia MEK1/2. A administração combinada de BRAFi e MEKi (Dabrafenib/Trametinib ou Vemurafenib/Cobimetinib) induz redução significativa do tumor, estende a expectativa de vida em comparação com a monoterapia de BRAFi ou quimioterapia, com sobrevida global em 5 anos de 34% (Leonardi et al., 2018). Apesar de melhorar a expectativa de vida, essa estratégia terapêutica apresenta diversos efeitos colaterais e o desenvolvimento de resistência adquirida a esses inibidores é um obstáculo significativo o tratamento eficaz dessa doença (Fischer et al., 2019; Zhang et al., 2016). Cabe ressaltar que essa estratégia se limita ao perfil de mutação presente no paciente, enquanto a imunoterapia se aplica a todos os pacientes.

Os inibidores do ponto de verificação imune, o inibidor do antígeno-4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4, do inglês: *immune checkpoints T-lymphocyte-associated protein 4*) Ipilimumabe e os inibidores da proteína-1 de morte celular programada (PD-1, do inglês: *programmed cell death protein 1*) Nivolumabe e Pembrolizumabe, mostraram resultados terapêuticos promissores para melanoma avançado ou metastático; 35% - 40% em sobrevida em 5 anos apenas para anti-PD-1 e mais de 50% na taxa de sobrevida em 4 anos para a combinação Nivolumabe e Ipilimumabe (Weiss et al., 2019). Além disso, 20% dos pacientes com resposta total ao tratamento, apresentam progressão da doença dentro de 5 anos após a terapia devido à resistência adquirida (Steininger et al., 2021).

Mesmo com esses avanços, ainda há um alto número de pacientes que apresentam resistência primária ou adquirida (Hugo et al., 2015; Weiss et al., 2019). No Brasil, tanto a imunoterapia quanto a terapias-alvo ainda não fazem parte do tratamento do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) devido a custo-efetividade (CONITEC, 2019). Dessa forma, existe a necessidade de aumentar a eficácia dos tratamentos disponíveis para a clínica, ampliar a abordagem terapêutica com alternativas mais acessíveis. Para isso, compreender a biologia do melanoma e seus mecanismos de

resistência aos tratamentos disponíveis e desenvolver novas ferramentas para o estudo dessa enfermidade se faz necessário.

Célula de Ciclagem Lenta na Resistência e Relapso no Melanoma

A heterogeneidade tumoral, considerada uma das principais razões para respostas mistas ao tratamento, é complexa no melanoma, já que diferentes células tumorais do mesmo paciente podem exibir uma ampla variedade de respostas ao tratamento, apesar de compartilharem as mesmas mutações oncogênicas (Yang et al., 2020). A maioria das estratégias terapêuticas, incluindo quimioterapia citotóxica e de terapia alvo, atuam sobre a massa tumoral com fenótipo proliferativo, enquanto aquelas que retêm ou mudam para um fenótipo de ciclagem lenta (do inglês, *slow cycling cells*) escapam ao estresse terapêutico (Ahn et al., 2017; Hoang-Minh et al., 2018). Foi observado que as células remanescentes ao tratamento de BRAFi e MEKi apresentam parada no ciclo celular, aumento na expressão genica da proteína p21 e p16 (codificado respectivamente pelos genes *CDKN1A/2A*, do inglês: *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A/2A*) e diminuição nos níveis dos marcadores de proliferação ciclina D1 e cinase dependente da ciclina 4 (CDK4, do inglês: *cyclin dependent kinase 4*), assim como aumento na atividade da SA- β -gal (Diener et al., 2021; Liu et al., 2019; Martínez et al., 2019; Roesch et al., 2010; Zhang et al., 2016). Da mesma forma, biópsias de 94 tumores de melanoma coletados no diagnóstico e após a resistência a inibidores de PD-1 apresentam aumento na expressão genica do ponto de verificação G₂/M que impede que as células entrem em mitose (Lee et al., 2020).

Existem vários perfis de expressão genica que convergem para a mesma estratégia de evasão do tratamento através de um fenótipo de ciclagem lenta, comumente caracterizado por um baixo grau de diferenciação devido à baixa expressão do fator de transcrição associado à microftalmia MITF (do inglês, *microphthalmia-associated transcription factor*) (Bristot et al.,

2020). O gene *POU3F2*, membro da família do domínio POU, que codifica o fator de transcrição BRN2, foi um dos primeiros fatores de transcrição identificados com expressão inversa ao MITF (Fane et al., 2018). *In vitro*, a expressão de MITF é necessária para manter a proliferação celular, mas sua depleção (e não de BRN2) reduz a migração e a invasão. (Simmons et al., 2017). A BRN2 tem sido implicado como um dos principais reguladores da aquisição de comportamento invasivo dentro do modelo de progressão de mudança de fenótipo (Fane et al., 2018). Essa subpopulação de células presentes em pequenas proporções, apresenta maior capacidade de reestabelecer a heterogeneidade fenotípica inicial comparada a células proliferativas do melanoma (Roesch et al., 2010; Zhang et al., 2016).

Alguns desses estudos relacionam a habilidade de repovoar o tumor com esse fenótipo a presença de marcadores de célula-tronco cancerígena, como CD271, atividade de aldeído desidrogenase, e expressão de transportadores ABC (do inglês: *ATP-Binding Cassette*) e do fator de transcrição SOX2 (Cheli et al., 2011; Lee et al., 2016; Petrachi et al., 2017). Além disso, a sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β , do inglês: *transforming growth factor beta*) codificado pelo gene *TGFBI*, a via de sinalização NOTCH, aumento da histona desmetilase JARID1B (do inglês: *Jumonji, AT Rich Interactive Domain 1B*, codificado pelo gene *KDM5B*) e β -catenina também foram identificadas como potencial impulsor da resistência e do fenótipo de ciclagem lenta, assim como alta expressão do receptor tirosina cinase AXL (Chauhan et al., 2022; Diener et al., 2021; Fane et al., 2018; Sachdeva et al., 2019).

In vitro, foi demonstrado que a presença desse fenótipo existe em baixas proporções, tendo sua população aumentada quando exposta à quimioterápicos e BRAFi/MEKi. O isolamento dessa subpopulação de células pelo corante de membrana celular PKH26, que é retido por células com menor taxa proliferativa, possibilitou a análise proteômica, revelando um aumento na regulação de proteínas-chave do controle da respiração celular mitocondrial

(Liu et al., 2019; Martínez et al., 2019; Roesch et al., 2013). Em um outro estudo *in vitro*, observou-se que as células remanescentes aos tratamentos de BRAFi ou MEKi apresentam metabolismo oxidativo. Esse experimento foi realizado em um painel com vinte linhagens celulares de melanoma, indicando uma característica compartilhada de resistência (Zhang et al., 2016). Além do mais, um fenótipo com metabolismo dependente da mitocôndria também já foi descrito na resistência do melanoma com expressão aberrante de MITF (Ennen et al., 2015; Lebleu et al., 2014; Najem et al., 2017). Embora a glicólise aeróbica no câncer tenha sido extensivamente estudada e descrita como uma vantagem adquirida durante o processo tumorigênico para apoiar a proliferação celular, a aquisição de perfil metabólico oxidativo traz novos *insights* no comportamento tumoral (Fig. 5).

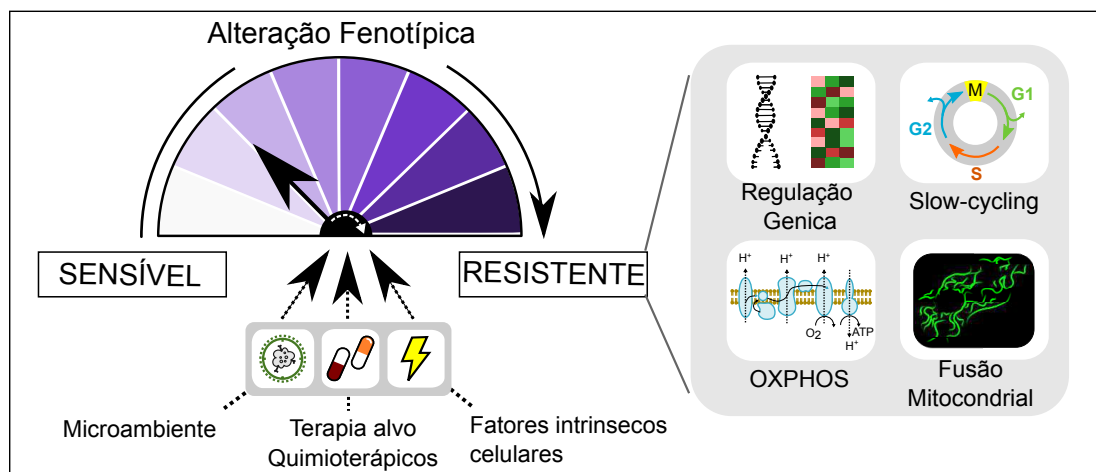


Figura 5: As células de melanoma podem mudar seu fenótipo sob fatores intrínsecos celulares, forças microambientais e em resposta à terapia alvo. Sugere-se que essas células são responsáveis pela resistência e invasão, compartilhando várias características fenotípicas como plasticidade celular, retenção de marcadores, alta fosforilação oxidativa (OXPHOS), rede mitocondrial fusionada, embora a expressão gênica não siga necessariamente o mesmo padrão.

Metabolismo energético no desenvolvimento do melanoma e na resistência

A ativação aberrante da via de sinalização MAPK, induzida pelas principais mutações genéticas encontradas no melanoma (*BRAF*, *NF1* e *NRAS*), além de promover a proliferação celular também demonstrou alterar o metabolismo energético das células do melanoma. Assim,

células de melanoma com mutações somáticas variadas exibem fenótipos altamente glicolíticos, nos quais 60 - 80% da glicose é convertida em lactato, uma atividade aumentada para 90% ou mais na hipóxia (Ratnikov et al., 2017). Esse metabolismo anaeróbico na presença de oxigênio em células tumorais, chamado de Efeito Warburg, descrito pela primeira vez pelo bioquímico alemão Otto Warburg no início do século 20 que tem sido observado em muitos tipos de câncer, é essencial para sustentar a produção de macromoléculas (biomassa) e manter o balanço redox (Deberardinis and Chandel, 2016).

Foi demonstrado que BRAFV600E, que representa 37 - 50% dos melanomas portadores de mutação somática, induzem a ativação do fator induzível por hipóxia-1 (HIF1 α , do inglês: *hypoxia inducible factor-1 alpha*). O HIF1 α diminui o metabolismo mitocondrial pela ativação da piruvato desidrogenase cinase, que impede os carbonos da glicose de entrarem no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA, do inglês: *tricarboxylic acid cycle*) via inibição da piruvato desidrogenase (Ratnikov et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que o BRAFV600E ativa o fator de transcrição OCT1 (POU class 2 homeobox 1) que desempenha um papel na regulação da glicólise, ligando-se à região promotora do gene que codifica o PGC1 α (do inglês: *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) e inibe sua expressão. Isso pode levar à supressão da fosforilação oxidativa e à promoção da glicólise, um processo pelo qual as células oxidam a glicose para obter energia (Girnun, 2012). Nessas células, OCT1 promove a regulação positiva das enzimas citosólica e mitocondrial da cetogênicas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1 e liase (HMGCS1 e HMGCL, respectivamente), evidenciando um possível papel da regulação da cetogênese para sustentar a alta taxa proliferativa (Kang et al., 2015; Zhao et al., 2017). Nesse sentido, o melanoma sustenta um estado anabólico tanto pela hiperativação da glicólise, quanto pela diminuição da fosforilação oxidativa (Fig. 6).

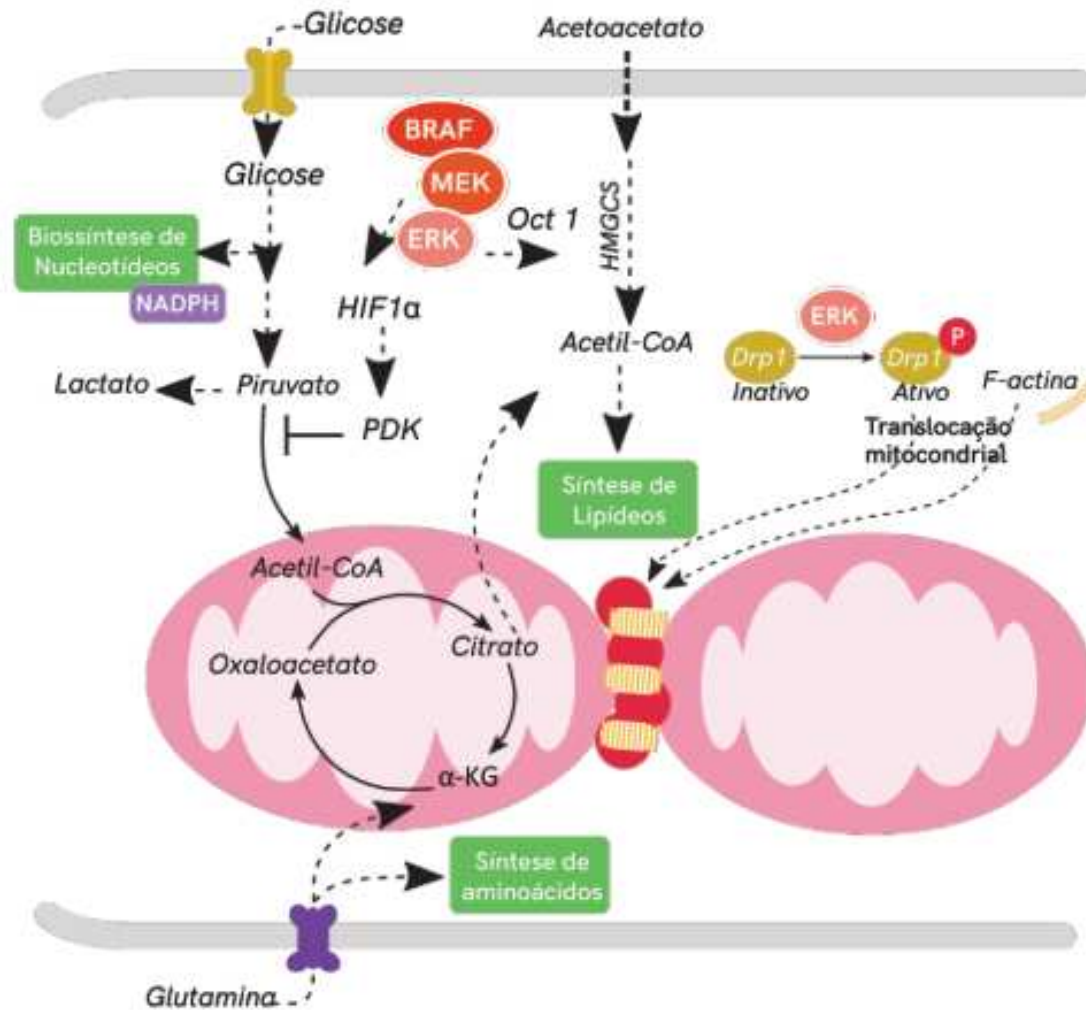


Figura 6: O Efeito Warburg no melanoma é sustentado pela interseção da sinalização celular, transcrição e metabolismo. A ativação aberrante da via de sinalização MAPK, mediada tanto pelo estímulo do fator do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) quanto por mutações de ativação (BRAF), aumenta a transcrição de HIF1 α que diminui o metabolismo mitocondrial pela ativação da piruvato desidrogenase quinase (PDK) e reduz a expressão dos níveis de MITF-PGC1 α , resultando na redução da atividade mitocondrial (OXPHOS). A ativação da via MAPK também induz os processos de fissão mitocondrial pela fosforilação e consequentemente ativação da proteína DRP1 por ERK. Retirado de Dias (2021).

Na clínica, esse fenômeno pode ser observado tanto pelos níveis elevados de lactato sérico, quanto pela alta captação do análogo da glicose 2-[¹⁸F]-fluoro-2-desoxi-D-glicose (FDG) observada nas imagens de tomografia por emissão de pósitron / tomografia computadorizada (conhecido como FDG-PET / CT) quando comparado com tecidos saudáveis, em pacientes com melanoma (Haq et al., 2013; Ratnikov et al., 2017; Schmitt et al., 2018). Corroborando com a atuação da via de sinalização MAPK no melanoma, o manejo clínico de pacientes com melanoma usando terapia alvo promove diminuição substancial na captação de FDG (Schmitt et al., 2018).

Apesar da rápida regressão tumoral em pacientes tratados com BRAFi e MEKi, a resistência a terapias alvo é um problema recorrente no tratamento de melanoma (Ahn et al., 2017). *In vitro*, o tratamento quimioterápico citotóxico ou inibidores da via MAPK levam a um enriquecimento uniforme de células de ciclagem lento responsáveis pela manutenção do melanoma independente da mutação presente (*BRAF*, *NRAS*, *TP53*, *PTEN*, *KIT*, *MEK1*, *MEK2*, *AKT1*, *CDKN2A*, ou *CDK4*) e sem ganho de mutações secundárias caracterizado por perfil proteômico oxidativo (Roesch et al., 2013, 2010; Vogel et al., 2019). Tanto a subpopulação de células de ciclagem lenta que ocorrem em baixa frequência na massa tumoral quanto as residuais ao tratamento com BRAFi e MEKi apresentam aumento da taxa de consumo de oxigênio, comumente relacionada à respiração máxima, aumento em intermediários TCA e na produção ERO (Fig. 7) (Haq et al., 2013; Lee et al., 2016; Liu et al., 2019; Roesch et al., 2013; Sahoo et al., 2019; Vogel et al., 2019; Zhang et al., 2016). O aumento na atividade mitocondrial nas células resistentes de melanoma tem uma correlação com o aumento do DNA mitocondrial, massa total, potencial de membrana mitocondrial e também na distribuição dessa organela (Caino et al., 2015; Zhang et al., 2016). A reativação do metabolismo mitocondrial como mecanismo de resistência é heterogênea, sendo observado: (i) ativação da fosforilação oxidativa (OXPHOS, do inglês: *oxidative phosphorylation*) por meio do recrutamento da piruvato carboxilase e diminuição da glicólise; (ii) aumento do metabolismo lipídico e síntese de prostaglandina E2; e (iii) aumento significativo na dependência de glicose, glutamina e ácidos graxos como combustível da OXPHOS (Delgado-Goñi et al., 2019; Roesch et al., 2013; Vogel et al., 2019).

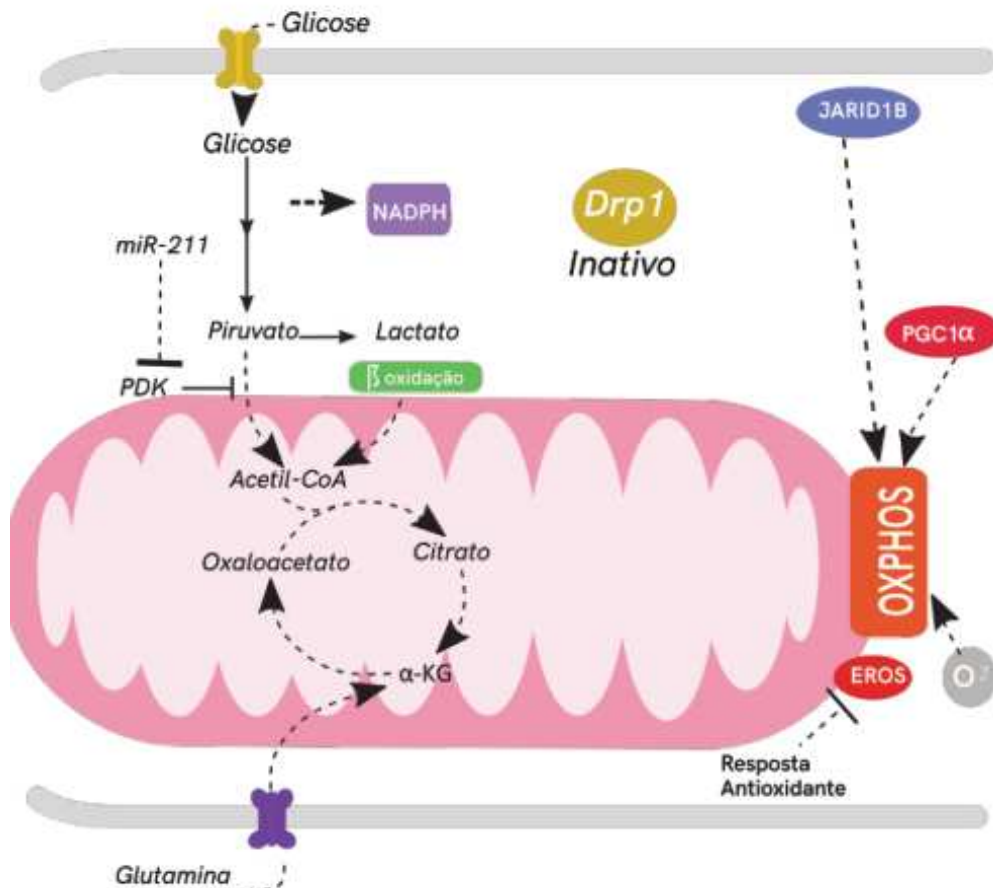


Figura 7: Reativação do metabolismo mitocondrial em células de melanoma resistentes ao tratamento. BRAFi causa estresse energético e induz a apoptose. No entanto, um subconjunto de células de melanoma que já apresentavam ou que mudam seu metabolismo para um estado catabólico não responde ao tratamento. Retirado de Dias (2021).

Na clínica, amostras de pacientes com melanoma mutante para BRAF que desenvolveram resistência a terapia alvo exibiram aumento da expressão de genes da fosforilação oxidativa (Haq et al., 2013). Uma análise de sequenciamento de RNA identificou supressão de múltiplos componentes da resposta imune antitumoral e enriquecimento da OXPHOS em 88 metástases cerebrais de melanoma quando comparado com 42 metástases extracranianas paciente-específico (Fischer et al., 2019). Nesse contexto, pode-se supor que a desregulação do ciclo celular e metabolismo tenha um papel essencial na progressão tumoral e na resistência a drogas, mas a influência do fenômeno é pouco estudada, especialmente porque a proporção de células com esta característica *in vivo* e *in vitro* é baixa.

A Linhagem de Melanoma Humano A347 e seus Clones A7 e G10

A linhagem celular A375 de melanoma metastático amelanocítico foi estabelecido a partir da expansão de um tumor sólido de uma mulher de 54 anos em 1973 (Giard et al., 1973). Essa linhagem apresenta morfologia epitelial, rápido crescimento e mutação no gene BRAF, presente entre 37 - 50% dos melanomas portando uma mutação somática, tornando-a uma ótima ferramenta para estudar essa neoplasia (Bracalente et al., 2016b; Gray-Schopfer et al., 2007; Haq et al., 2013). A partir dessa linhagem, foi estabelecido um modelo de agressividade pela transfecção e expressão constitutiva do gene da catalase, originando os clones A375-G10 (G10) e A375-A7 (A7). O desenvolvimento dessa linhagem utilizou, para controle de transfecção, o vetor vazio A375-PCDNA3 (PCDNA3) (Bracalente et al., 2016b).

Existe uma grande produção de ERO no melanoma necessária na neoplasia como, por exemplo, na ativação de vias de transdução de sinal associadas à proliferação celular (Diebold and Chandel, 2016). A catalase, por sua vez, é uma das principais enzimas no processo de metabolização do H₂O₂, ERO, produzido durante a síntese de melanina. A transfecção dessa enzima deu resultou em duas estratégias distintas para lidar com a dissipação do H₂O₂, com padrões de agressividade divergentes, apesar de terem a mesma origem (**Fig. 8**).

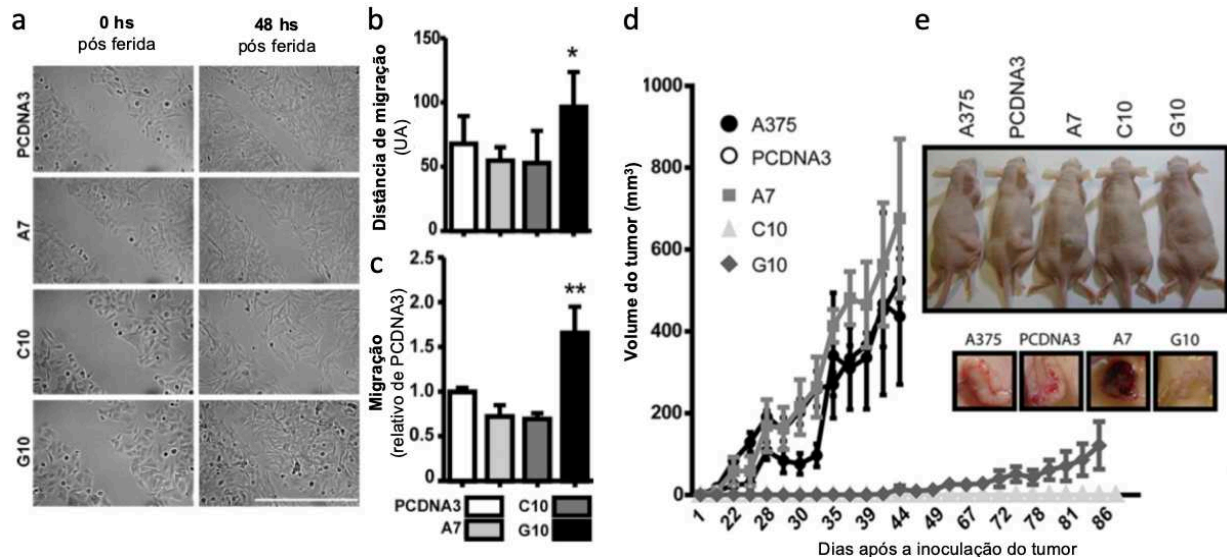


Figura 8: Superexpressão de catalase na linhagem de melanoma A375 originou clones com padrões distintos de migração e agressividade. **(a)** Imagens representativas do ensaio de ferida (wound assay). Barra representa 200 μm . **(b)** Quantificação da distância de migração em unidades arbitrárias (UA). **(c)** Avaliação da capacidade migratória relativa por PCDNA3. **(d)** Camundongos nus inoculados com células A375 transfectadas com catalase (A7, C10 e G10), com vetor vazio (PCDNA3) ou não transfectadas (A375). Camundongos nus inoculados com células A375 transfectadas com catalase (A7, C10 e G10), com vetor vazio (PCDNA3) ou não transfectadas (A375). O crescimento do tumor se curva ao longo do tempo após a inoculação, monitorando o volume do tumor ao longo do tempo. **(e)** Imagens representativas de camundongos inoculados com cada tipo de célula e os respectivos tumores tumorigênicos: A375, PCDNA3, A7 e G10. (Bracalente et al., 2016b)

O clone A7 apresentou diminuição nos níveis de ERO e ativação da via melanogênica, observada tanto pelo aumento da atividade da tirosinase e aumento da expressão da proteína TYRP1 (do inglês: *tyrosinase related protein 1*), quanto pela formação de tumores pigmentados *in vivo* (Bracalente et al., 2016b). A outra estratégia, observada no clone G10, aumentou a produção de ERO e a expressão de cofilina-1, uma proteína envolvida na remodelação do citoesqueleto durante a migração celular, estando associados a um pior prognóstico em melanoma (Bracalente et al., 2018, 2016a, 2016b; Ibañez et al., 2019). Surpreendentemente, o clone com características relacionadas a diferenciação, classicamente associada a tumores menos agressivos, apresentou uma curva de crescimento tumoral *in vivo* maior que G10, que, apesar da baixa proliferação, foi o único capaz de produzir nódulos metastáticos (Bracalente et al., 2016b). Assim, foi observado uma resposta heterogênea à superexpressão de catalase, resultando em dois clones com fenótipos bastante distintos. Dessa forma, esse trabalho corrobora com os dados da literatura que mostram uma variedade de

mecanismos não genéticos que permitem a reprogramação transcricional em resposta a fatores intrínsecos e extrínsecos.

A prevalência e diversidade de vias de resistência não genética representam um novo desafio para o campo que requer estratégias inovadoras para compreender esses mecanismos e desenvolver abordagens terapêuticas que possam neutralizar esses processos adaptativos e enfim implementá-los na arena clínica. Nesta perspectiva, o modelo de agressividade celular estabelecido por Bracalente e colaboradores apresenta características promissoras como modelo experimental no estudo da heterogeneidade fenotípica do melanoma.

OBJETIVOS

Como objetivo principal deste estudo, buscamos identificar e revisar as características necessárias para a progressão do melanoma, explorar a relevância clínica do fenótipo *slow-cycling* e investigar o perfil metabólico e proliferativo no modelo de agressividade estabelecido a partir da linhagem celular A375, composto pelos clones G10 e A7, e reforçar seu uso como ferramenta pré-clínica para estudos de elucidação de mecanismos básicos destas doenças.

Objetivos específicos

- Realizar uma análise dos dados disponíveis na literatura para definir fatores biológicos, não genéticos, na resistência terapêutica no melanoma;
- Avaliar os fatores biológicos relacionados a resistência do melanoma no modelo de agressividade composto por A7 e G10;
- Estabelecer o padrão metabólico e morfologia mitocondrial das células derivadas da linhagem celular A375;
- Demonstrar o uso potencial do modelo de agressividade composto por A7 e G10 como modelo *in vitro* para o *screening* de novas estratégias terapêuticas;
- Estabelecer uma lista de genes que caracterize o fenótipo *slow-cycling*;
- Analisar a relevância do fenótipo *slow-cycling* na clínica, correlacionando com prognóstico e na predição de resposta aos tratamentos utilizados no manejo dessa doença.

PARTE II

CAPÍTULO I

Artigo publicado:

Metabolic Rewiring in Drug-resistance Melanoma Cells

Revista: Critical Reviews in Oncology/Hematology

Qualis-CAPES-CBII: A1

Fator de Impacto: 6.625

DOI: 10.1016/j.critrevonc.2020.102995

Justificativa: O melanoma é o câncer de pele mais agressivo e sua agressividade já vem sendo estudada há algumas décadas. Entretanto, existe muitos dados conflitantes na literatura em termos de marcadores e sobre a forma como as células resistentes são chamadas. Contudo, a alteração no metabolismo parece convergir para uma mesma estratégia.

Objetivo geral: O objetivo desta revisão foi reunir todos os estudos que avaliaram os fatores não genéticos na agressividade do melanoma e compreender a alteração metabólica no processo de resistência

Objetivo específico: Definir características de expressão genica e relacioná-los com o padrão de diferenciação celular, perfil do ciclo celular e metabolismo, tanto na resistência aos tratamentos quanto na capacidade metastática.



Contents lists available at ScienceDirect

Critical Reviews in Oncology / Hematology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/critrevonc



Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells

Ivi Juliana Bristot^{a,b,*}, Camila Kehl Dias^{a,b}, Henrique Chapola^{a,b}, Richard B. Parsons^c, Fábio Klamt^{a,b}

^a Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b National Institutes of Science & Technology – Translational Medicine (INCT- TM), 90035-903, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Institute of Pharmaceutical Science, King's College London, 150 Stamford Street, London SE1 9NH, UK



Abbreviations: ABC, ATP binding cassette; ABCB5, ATP binding cassette subfamily B member 5; AKT, AKT kinase; ALDH1, aldehyde dehydrogenase 1; ALDH1A1, aldehyde dehydrogenase 1 family member A1; AMPK, AMP-activated protein kinase; ATF2, activating transcription factor 2; ATF4, activating transcription factor 4; ATP5H, ATP synthase peripheral stalk subunit D; AXL, AXL receptor tyrosinase kinase; BAM15, BAM 15, N5,N6-bis(2-fluorophenyl)[1,2,5]oxadiazolo[3,4-b]pyrazine-5,6-diamine; BCL2, apoptosis regulator Bcl-2; BCL2A1, Bcl-2-related protein A1; BIK, BCL2 interacting killer; BIM, pro-apoptotic protein associated to Bcl2; BIRC7, baculoviral IAP repeat containing 7; BMI1, BMI1 proto-oncogene; BRAF, B-Raf proto-oncogene; BRD4, bromodomain-containing protein 4; BRN2, POU domain transcription factor; c-Myc, MYC proto-oncogene; CCCP, Carbonyl Cyanide m-chlorophenyl Hydrazone; CD271, nerve growth factor receptor, also known as NGFR or p75NTR; CDH2, N-cadherin; CDK2, cyclin dependent kinase 2; CDK4, cyclin dependent kinase 4; COX1, mitochondrially encoded cytochrome c oxidase 1; COX2, mitochondrially encoded cytochrome c oxidase 2; CRE, cAMP response element; CREB, cAMP response element-binding protein; CSCs, cancer stem cells; CTLA4, cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4; CTNNA1, α -catulin; DNMT3A, DNA methyltransferase 3 alpha; Drp1, dynamin-related protein 1; eATP, extracellular ATP; EGFR, epidermal growth factor receptor; eIF2B, eukaryotic translation initiation factor 2B; EMT, epithelial-to-mesenchymal transition; ETS, electron transport chain; EZH2, enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit; FACS, fluorescence activated cell sorting; FCCP, carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone; FDG-PET/CT, fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography; FOXD3, forkhead box D3; FOXM1, forkhead box M1; GLS, glutaminase; GLUT, glucose transporter; GLUT1, glucose transporter type 1; GLUT3, glucose transporter type 3; GSH, reduced glutathione; GSSG, oxidized glutathione; HIF α , hypoxia inducible factor subunit alpha; HK1, hexokinase1; HK2, hexokinase2; HLA, human leukocyte antigen; HMGCL, HMG-CoA synthase 1 and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase; HMGCS1, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase; Hsp90, heat shock protein; IL, interleukin; INF2, ER-bound inverted formin 2; JARID1B, histone demethylase JARID1B; KDM, histone lysine demethylase; LDH, lactate dehydrogenase; LDHA, lactate dehydrogenase A; LKB, serine/threonine kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; Mcl-1, MCL1 apoptosis regulator; MDSCs, myeloid-derived suppressor cells; miR, microRNA; MITF, melanocyte inducing transcription factor; MLANA, melan-A; mTOR, mechanistic target of rapamycin kinase; NAMPT, nicotinamide phosphoribosyltransferase; NANOG, homeobox transcription factor Nanog; NDUFB8, NADH Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit B8; NDUFS3, NADH Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S3; NF1, neurofibromin 1; NFATc, nuclear factor of activated T cells; NNMT, nicotinamide N-methyltransferase; NRAS, NRAS proto-oncogene; NRF2, nuclear respiratory factor2; NUP133, nucleoporin 133; OCR, oxygen consumption rate; Oct-1, POU class 2 homeobox 1; Oct-4, POU class 5 homeobox 1; OMM, outer mitochondrial membrane; OXPHOS, oxidative phosphorylation; P2RX7, purinergic receptor P2X 7; PARK2, parkinson protein 2; PARP1, poly (ADP-ribose) polymerase 1; PAX3, transcriptional factor PAX3; PD-1, programmed cell death protein 1; PDH, pyruvate dehydrogenase; PDH2, pyruvate dehydrogenase kinase 2; PDHE1, pyruvate dehydrogenase E1 subunit beta; PDK, pyruvate dehydrogenase kinase; PDK1, pyruvate dehydrogenase kinase 1; PDK4, pyruvate dehydrogenase kinase 4; PEITC, phenethyl isothiocyanate; PGC1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1; PI3K, phosphoinositol-3-kinase; PINK1, PTEN-induced putative protein kinase 1; PKM1, pyruvate kinase M1; PMEL, premelanosome protein; PPP, pentose phosphate pathway; PTEN, phosphatase and tensin homolog; ROS, reactive oxygen species; S1P, sphingosine-1-phosphate; SALL4, spalt like transcription factor 4; SAM, S-adenosylmethionine; SAMMSON, survival associated mitochondrial melanoma specific oncogenic non-coding RNA; SDHA, succinate dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur subunit A; SDHB, succinate dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur subunit B; SIRT1, sirtuin 1; SIRT3, sirtuin 3; SK, sphingosine kinases; SK1, sphingosine kinases 1; SNAI1, snail family member transcriptional repressor 1; SOD, superoxide dismutase; SOD2, mitochondrial superoxide dismutase; SOX10, SRY-box transcription factor10; SOX2, SRY-box transcription factor 2; SSH-1L, slingshot protein phosphatase 1; TAZ, transcriptional coactivator with PDZ-binding motif; TCA, tricarboxylic acid cycle; TEAD, TEF transcription factors/TEA domain; TET2, tet methylcytosine dioxygenase 2; TFEB, transcription factor EB; TGF β , transforming growth factor beta; TNF α , tumor necrosis factor alpha; TRAP1, TNF receptor associated protein 1; TRPM1, transient receptor potential cation channel subfamily M member 1; TYR, tyrosinase; TYRP1, tyrosinase related protein 1; UQCRC2, ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2; VDAC1, voltage-dependent anion channel 1; VEGF, vascular endothelial growth factor; YAP, yes-associated protein; ZEB1, zinc finger E-box binding homeobox 1; ZEB2, zinc finger E-box binding homeobox 2; α -KG, α -ketoglutarate; $\Delta\Psi_m$, mitochondrial membrane potential

* Corresponding author at: Laboratório de Bioquímica Celular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Rua Ramiro Barcelos, 2600, Porto Alegre, RS, 90035-003, Brazil.

E-mail address: ivibt@gmail.com (I.J. Bristot).

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102995>

Received 22 January 2020; Received in revised form 15 May 2020; Accepted 18 May 2020

Available online 24 May 2020

1040-8428/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

ARTICLE INFO

Keywords:

Melanoma
Slow-cycling
Metabolic adaptation
Mitochondria
OXPHOS
Resistance
Phenotype shifting

ABSTRACT

Several evidences indicate that melanoma, one of the deadliest types of cancer, presents the ability to transiently shift its phenotype under treatment or microenvironmental pressure to an invasive and treatment-resistant phenotype, which is characterized by cells with slow division cycle (also called slow-cycling cells) and high-OXPHOS metabolism. Many cellular marks have been proposed to track this phenotype, such as the expression levels of the master regulator of melanocyte differentiation (*MITF*) and the epigenetic factor *JARID1B*. It seems that the slow-cycling phenotype does not necessarily present a single gene expression signature. However, many lines of evidence lead to a common metabolic rewiring process in resistant cells that activates mitochondrial metabolism and changes the mitochondrial network morphology. Here, we propose that mitochondria-targeted drugs could increase not only the efficiency of target therapy, bypassing the dynamics between fast-cycling and slow-cycling, but also the sensitivity to immunotherapy by modulation of the melanoma microenvironment.

1. Introduction

Melanoma is the deadliest type of skin cancer, and its incidence has been rising 2–7% annually worldwide (Cannavò et al., 2019). The main genetic mutations are related to B-Raf proto-oncogene (*BRAF*), neurofibromin 1 (*NF1*), and *NRAS*, being usually associated with chronically sun-exposed skin that has a high mutational load related to UV exposure, only 7–15% of all cases are due to family history. Melanoma has a powerful metastatic ability and approximately 10% of patients are diagnosed in an advanced stage, which implicates in low survival rates. (Leonardi et al., 2018). Conventional chemotherapies, most of the time, are not curative and provide limited benefits. Additionally, the average survival of patients with stage IV melanoma is approximately 6% in 5-years post-treatment (Leonardi et al., 2018).

Recent advances in oncology have led to the concept of personalized medicine in clinical practice. Several biomarkers are currently used to determine patient eligibility for targeted treatments, such as the melanoma oncogene *BRAF*, which represents 37–50% of melanomas carrying a somatic mutation (Gray-Schopfer et al., 2007). This mutation hyperactivates MAPK (RAF/MEK/ERK) signaling, resulting in cancer cells relying primarily upon it (Gray-Schopfer et al., 2007). The *BRAF*-inhibitors dabrafenib (GSK2118436) or vemurafenib (PLX4032), and the MEK-inhibitor trametinib (GSK1120212), as a combination therapy, have improved overall survival of patients. However, this treatment strategy only works in patients carrying the *BRAF* mutation, and after 6–8 months, patients are likely to relapse after initial tumor regression (Sullivan and Flaherty, 2013).

Another important recent improvement in melanoma management is immunotherapy, which can be applied in all patients regardless of mutations profiles. The immune checkpoint inhibitors, cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 (CTLA-4) antibody inhibitor ipilimumab and the programmed cell death protein 1 (PD-1) inhibitors nivolumab and pembrolizumab, showed promising therapeutic outcomes for advanced or metastatic melanoma, 35–40% in 5-year survival for anti-PD-1 alone and more than 50% for the 4-year survival rate for nivolumab plus ipilimumab (Weiss et al., 2019). Despite all the benefits of immunotherapy, half of all melanoma patients treated with immune checkpoint inhibitors are likely to present primary or acquired resistance (Hugo et al., 2016; Weiss et al., 2019).

Then, several studies have been focusing to improve the performance of immunotherapy and target therapy, in which the combination regime demonstrated advantages and some side effects (Luther et al., 2019). Thus, understanding the biology of melanoma can increase the therapeutic possibilities. In this context, many lines of evidence suggest a universal resistance profile that occurs due to cancer biology heterogeneity (genetic and epigenetic), which is not only between the same type of cancer from distinct patients but also within a single tumor. Besides the highly heterogeneous features of melanoma, these cells tend to switch their molecular and cellular phenotype in order to bypass drug treatment. Two specific groups have been described regarding the intra-tumoral heterogeneity characterized by cell division

rate: fast-cycling cells and slow-cycling cells. Although slow-cycling cells represent a small proportion of the tumor mass, it has been suggested that this phenotype is able to survive under different forms of treatment and can lead to metastatic outcomes (Hoang-Minh et al., 2018; Maccalli et al., 2017; Reim et al., 2009; Reitman and Yan, 2010; Roesch et al., 2010). Surprisingly, the metabolic characterization of slow-cycling cancer cells did not follow the classic conception of high glycolysis rates as the main energy source, also known as the Warburg effect (Cantor and Sabatini, 2012; Vogel et al., 2019). In contrast, this phenotype depends on mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS), suggesting the importance of the respiratory metabolism to sustain slow-cycling cells (Haq et al., 2013; Roesch et al., 2013a).

The ongoing challenge in oncology is to understand the complexity of tumor heterogeneity within the aggressive phenotypes as well as its dynamics between fast-cycling and slow-cycling phenotypes. Presenting an urgent demand for development of treatment approaches that take into account evolutionary tumor behavior and that is capable of avoiding relapse. This review overviews the dynamics between the slow-cycling and fast-cycling phenotypes and how it fits into the evolutionary and cancer stem cells (CSCs) hypotheses of cancer heterogeneity origin. This article also discusses the ability of the slow-cycling phenotype to challenge the Warburg effect, presenting a mitochondrial-dependent bioenergetic metabolism. Finally, we suggest the use of mitochondria-targeting drugs in combination with *BRAF*/MEK/ERK target therapy or immunotherapy to bypass the dynamic process between fast-cycling and slow-cycling in melanoma as a potential therapeutic approach to confer better overall survival in melanoma patients.

2. Heterogeneity hypotheses in melanoma

In 1976, Peter Nowell was the first to observe heterogeneity in cancer and proposed the clonal evolution model, explained by Darwinian-like clonal evolution of a single tumor, and suggested personalized treatments that would target oncogenes (Nowell, 1976). Recently, the clonal evolution hypothesis has taken the tumoral microenvironment into account. Intra-tumoral heterogeneity is a result of genetic instability together with a natural selection for certain phenotypes exerted by microenvironmental forces, which leads to dynamical microhabitats and distinct cellular features (Gillies et al., 2012). In addition, cancer itself can alter the microenvironment conditions by decreasing local pH and producing signal proteins. For example, interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-10 secretion by cancer cells can recruit macrophages (M ϕ), one of the most common immune cells in the tumor microenvironment, to support tumor progression and metastasis by shifting their phenotype (Becker et al., 2014). M ϕ can be polarized into two distinct phenotypes; while M1 (classically activated) is pro-inflammatory and presents a cytotoxic response against tumor cells, M2 (alternatively activated) assists the tumor process by releasing anti-inflammatory mediators such as transforming growth factor beta (TGF β), IL-10, prostaglandin E2, lactoferrin and vascular endothelial growth

factor (VEGF) (Becker et al., 2015). Besides, the microenvironment composition created by cancer cells can induce tumoral processes in neighbor somatic cells, promoting another source of subclones for cancer heterogeneity (Konrad et al., 2016).

Alternatively, the traditional CSCs hypothesis is based on a hierarchical system in which tumor initiation occurs exclusively from CSCs, also meaning that the tumor is organized and sustained by this distinct subpopulation with stem-like characteristics (Clarke et al., 2006). These cells are capable of self-renewal, creating identical daughter cells by cell division and generating all the diverse subtypes that compose a tumor as well, but their initial origin – the first somatic cell to acquire the oncogenes – is not necessarily due to transformation of a normal stem cell (Clarke et al., 2006). The first work that aimed to describe these cells discovered that leukemia initiation processes were due to a rare subset of cells presenting the normal stem cell surface markers CD34^{high}/CD38^{low} (Lapidot et al., 1994). Since then, many cancer stem cell markers have been proposed as extensively revised by Gopalan and colleagues (Gopalan et al., 2018).

However, it is challenging to clearly define which cells are indeed CSCs, being necessary a combination of methods (Prager et al., 2019). For example, cells can be sorted using surface markers and cancer cells occupancy in fluorescence activated cell sorting (FACS), followed by validation of CSCs behavior. Then, the FACS-sorted cells can be cultivated as tumorspheres or injected in immunodeficient mice to evaluate the capacity of reestablishment of tumoral heterogeneity and tumorigenic potential (Boiko et al., 2010; Kumar et al., 2016; Perego et al., 2018). In addition, the proportion of CSCs and its location can be visualized by immunofluorescence (Wickremesekera et al., 2019). Due to cancer-initiating quiescent nature, techniques that measure slow division rates have been widely used, such as cell cycle assays to identify cell cycle arrest or even to visualize by label retention assay how cells dilute the dye according to their proliferation rate, being that slow-cycling cells retain the dye longer (Zeng et al., 2016).

Although melanoma CSCs markers have been proposed (Table 1), the current data in the literature presents divergent information over a classic hierarchical system. Quintana and colleagues demonstrated that almost every melanoma cell is capable of originating a tumor depending on experimental conditions and they could not find a marker that distinguished tumorigenic from non-tumorigenic cells (Quintana et al., 2008). Similarly, the ability to acquire the expression pattern CD44^{high}/CD24^{low} (breast CSCs markers) in the presence of recombinant TGFβ has been shown in immortalized human mammary epithelial cells (Mani et al., 2008). Subsequent experiments with

melanoma showed what appears to be a dynamic relationship between CSCs features. The nerve growth factor receptor, CD271(NGFR/p75NTR), which is a marker of melanoma-initiating cells, has been reported on melanoma CSCs, which also exhibited a high tumorigenic potential (Boiko et al., 2010). However, further studies demonstrated plasticity between the CD271^{high} and CD271^{low} phenotype, and that not necessarily the tumor initiation was due to the CD271^{high}, but instead it was dependent on slow-cycling cells displaying a high tumorigenic potential (Boyle et al., 2016; Cheli et al., 2014). These studies contradict the classic CSCs hypothesis, in which the treatment recurrence and the metastatic cells will be created exclusively by CSCs which have enhanced therapeutic resistance and higher capacity for immune evasion, tissue invasion, and metastasis (Prager et al., 2019). Hence, an alternative to the evolutionary clonal vs. CSCs hypothesis explanation is a crosstalk between them: the dynamic stemness hypothesis. In this context, stem-like cells from solid tumors may not be fixed units, but rather tumor cells that transiently acquire stemness properties. Importantly, the fact that there is great heterogeneity in the melanoma-initiating cells gene expression described in the literature brings the discussion about CSCs into the spotlight. Moreover, much of the literature uses only a few initiating cell markers in studies with slow-cycling cells, which compromises the entire understanding of the transient ability to acquire a stemness phenotype in melanoma. Consequently, the large quantity of stemness markers and the heterogenous expression of those markers within this subpopulation can lead to misleading analysis.

3. Phenotype plasticity in melanoma

An important evidence about the transient ability to acquire stemness markers in melanoma comes from studies of cells positive for the histone lysine demethylase (KDM) called JARID1B, which represent only a small proportion of the cells within primary and metastatic melanoma population (Roesch et al., 2010). Although both JARID1B^{low} and JARID1B^{high} melanoma cells were able to initiate tumors in xenograft models as to recreate heterogeneity, JARID1B^{high} are more efficiently in the repopulation of the melanoma heterogeneity under treatment. These cells also show significantly higher metastatic potential and high expression of stemness-related genes (Aguilar et al., 2018; Roesch et al., 2010). JARID1B^{high} phenotype presented activation of phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/AKT pathway, reduced cell proliferation rate due to cell cycle arrest on G2/M and mitochondrial-dependent cellular respiration without the CSCs markers CD133 and CD271

Table 1
Markers used to identify initiating melanoma cells.

Marker	Marker proprieties	Reference
ABCB1 ABCB5 ABCG2	ATP binding cassette family that mediates drug efflux from cells	(Kumar et al., 2016; Landreville et al., 2011; Sztiller-Sikorska et al., 2014)
CD166	Activated leukocyte cell adhesion molecule	(Quintana et al., 2010; Redmer et al., 2014; Wickremesekera et al., 2019)
CD271	Nerve growth factor receptor (NGFR, also known as p75 neurotrophin receptor) that is expressed on neural crest cells from which melanocytes are derived	(Boyle et al., 2016; Wouters et al., 2014)
CD133	Glioma and neural stem cell marker	(Boyle et al., 2016; Ostyn et al., 2014; Quintana et al., 2010)
CD20	B cell marker	(Pinc et al., 2012)
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase1 catalyzes the oxidation of aldehydes. It also converts retinoic acid into retinoic acid	(Pérez-Alea et al., 2017; Petrachi et al., 2017)
Oct4	Transcription factor that regulates of stem cell self-renewal and differentiation	(Cheli et al., 2014; Ennen et al., 2015; Wickremesekera et al., 2019)
JARID1B	Promotes epigenetic regulation through demethylation	(Roesch et al., 2010, 2013a; Vogel et al., 2019)
SOX2	Transcription factor essential for maintaining pluripotency in stem cells	(Andreucci et al., 2018; Laga et al., 2010; Wickremesekera et al., 2019)(Petrachi et al., 2017)
SALL4	Spalt like transcription factor that maintains stem cell pluripotency	(Wickremesekera et al., 2019)
CD34	Endothelial marker	(Liu et al., 2019; Wickremesekera et al., 2019)
ZEB1	Transcription factor that induces epithelial-mesenchymal transition	(Wouters et al., 2014)
SOX10	Transcription factor responsible for maintaining the multipotent phenotype of neural crest stem cell	(Redmer et al., 2014)

(Nakagawa et al., 2016; Roesch et al., 2010, 2013a). This indicates that the subpopulation most likely to initiate tumors is heterogeneous and does not follow a simple gene expression pattern. Importantly, some portion of JARID1B^{low} population is capable of becoming JARID1B^{high} under oxidative stress as well as to chemotherapy stimulation (Roesch et al., 2013a).

The essential role of JARID1B as an epigenetic regulator that governs the tumor heterogeneity was demonstrated in another melanoma experiment composed of three major populations CD34^{high}/CD271^{low}, CD34^{low}/CD271^{low}, and CD34^{low}/CD271^{high}, where the most present subpopulation was CD34^{high}/CD271^{low}. JARID1B promotes a shift from a phenotype CD34^{high}/CD271^{low} to a CD34^{low}/CD271^{low} phenotype, being a more drug-tolerant phenotype. The impairment of JARID1B in the population turns cells susceptible to BRAF-inhibitor action (Liu et al., 2019). In oral squamous cell carcinomas, JARID1B participates in the dynamics between two distinct CSCs subpopulations, one characterized by cell cycle arrest on G0 phase and the other with high expression of JARID1B. The G0-arrested cells can shift to a JARID1B^{high} state mediated by PI3K and increase the expression of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) genes and *Oct4* (POU class 5 homeobox 1), *BMI1* (BMI1 proto-oncogene), *ALDH1A1* (aldehyde dehydrogenase 1 family member A1) as well (Nakagawa et al., 2016). All these dynamic regulations do not follow a hierarchical CSCs hypothesis, as in both examples, the phenotypes can reestablish the population. However, JARID1B seems to be not only a critical defense mechanism for drug therapy in cancer cells but also acts on increasing the metastatic ability.

The change in cell growth rate in response to MAPK inhibitors has been demonstrated in a drug-screening study with twenty melanoma cell lines, indicating a shared feature of resistance on this neoplasia (Zhang et al., 2016). This invasive and resistant phenotype presents a complex regulatory network which is also associated with the master regulator of melanocyte differentiation MITF (melanocyte inducing transcription factor) expression and activity (Fig. 1). It regulates multiple biological processes by activating the expression of genes related to differentiation (premelanosome protein, *PMEL*; melan-A, *MLANA*; transient receptor potential cation channel subfamily M member 1, *TRPM1*; tyrosinase, *TYR*; and tyrosinase related protein 1, *TYRP1*), survival (apoptosis regulator Bcl-2, *BCL2*; Bcl-2-related protein A1, *BCL2A1*; and baculoviral IAP repeat containing 7, *BIRC7*) and proliferation (cyclin dependent kinase 2, *CDK2*; and cyclin dependent kinase 4, *CDK4*), for example (Miskolczi et al., 2018). In melanoma, MITF levels are controlled by MAPK signaling, but this regulation is not fully understood yet. It has been described that ERK controls the ratio between the POU domain transcription factor BRN2 and the transcription factor PAX3 to maintain MITF expression levels optimal for growth (Smith et al., 2019). Hence, increased expression of *BRN2* shifts MITF^{high} to MITF^{low} and regulates the level of differentiation in melanoma, leading to increased expression of stem cell markers (e.g., *Oct4*, homeobox transcription factor *NANOG*) and reducing expression of melanocytic differentiation markers, such as *TYR* (Cheli et al., 2011; Ohanna et al., 2018; Redmer et al., 2014). The PI3K/AKT pathway, that is commonly activated by loss of the tumor suppressor phosphatase and

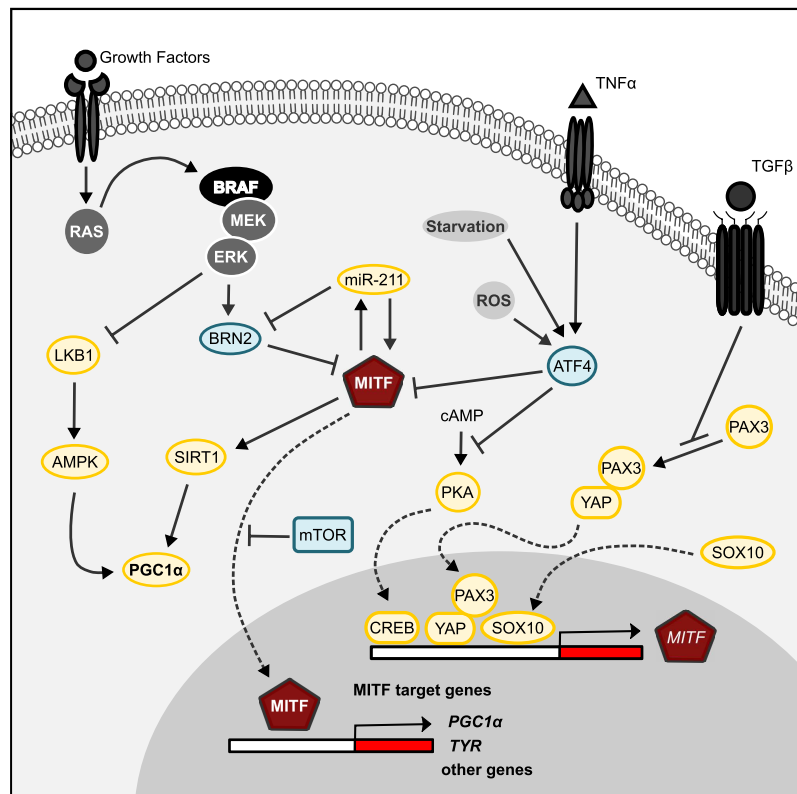


Fig. 1. Overview of the MITF regulatory network. MITF levels are strongly controlled in melanoma cells. ERK can activate MITF by its direct phosphorylation, inactivate it by marking it to degradation or decrease it through BRN2 activity. MITF suppression can also occur by the upregulation of ATF4 by microenvironmental factors. Several proteins promote MITF expression, as SOX10 and PAX3. However, TGFβ reduces the ability of PAX3/YAP to bind to MITF's promoter. When active, MITF can translocate to the nucleus and promote expression of its target genes, such as *TYR*, *TRP1* and *PGC1α*.

tensin homolog (*PTEN*), decreases *MITF* levels by direct phosphorylation, leading to its proteasome degradation (Wang et al., 2016). When *MITF* gene is silenced by siRNA, melanoma cells present arrest on G0/G1 and higher tumor formation in xenoinplants. However, cells under constant silencing were not able to develop tumors, showing *MITF*'s importance for the reestablishment of the tumor populations (Cheli et al., 2011).

The tumor microenvironment also regulates the *MITF* levels in melanoma. For example, starvation, tumor necrosis factor alpha (TNF α), and reactive oxygen species (ROS) can promote upregulation of the activating transcription factor 4 (*ATF4*) in response to eIF2B (eukaryotic translation initiation factor 2B) inhibition; this way *ATF4* can promote *MITF* suppression while up-regulating the receptor tyrosine kinase *AXL* (Falletta et al., 2016). *ATF4* negatively regulates the binding of CRE (cAMP responsive element) to CREB (cAMP response element-binding protein), which is a transcriptional inducer of the *MITF* promoter (Ferguson et al., 2017). In this case, the *MITF*^{low}/*AXL*^{high} axis with invasive and OXPHOS phenotype occurs independently of *BRN2*/*PAX3* process (Falletta et al., 2016; Ohanna et al., 2018). Furthermore, TNF α can act through c-Myc and *BRN2* to decrease *MITF* under NFATc (nuclear factor of activated T cells) induction, a key modulator of intracellular calcium levels (Perotti et al., 2015). NFATc inhibition decreases the levels of *AXL*, *c-Myc*, *FOXM1* (forkhead box M1), and *EZH2* (enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit) and downregulates the expression of EMT-related genes (zinc finger E-box binding homeobox 1, *ZEB1*; N-cadherin, *CDH2*; α -catulin, *CTNNA1*; and snail family member transcriptional repressor 1, *SNAI1*) while increasing the transcription factors *SOX10*/*MITF* (Perotti et al., 2019). Additionally, TGF β plays an essential role in *MITF* expression due to its capacity to inhibit *PAX3*, consequently reducing the binding of YAP (yes-associated protein) to the *MITF* promoter and favoring a *MITF*^{low} phenotype. As a result, YAP is free to form the YAP /TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) /TEAD (TEF transcription factors/TEA domain) transcriptional complex, which transactivates a wide variety of genes linked to an invasive phenotype, such as *AXL* and *EGFR* (epidermal growth factor receptor) (Ji et al., 2015; Kim et al., 2016; Ohanna et al., 2018; Yang et al., 2008). Moreover, melanoma cells attract and activate fibroblasts to express a number of growth factors and cytokines, including TGF β , reinforcing the dedifferentiated state (Miskolczi et al., 2018). Indeed, a study using single-cell RNA-seq from nonmalignant cells from melanoma microenvironment revealed an abundance of cancer-associated fibroblasts associated with tumors under *MITF*^{low}/*AXL*^{high} signature (Tirosh et al., 2016). This dedifferentiated *MITF*^{low} phenotype has also been linked to the expression of *SNAI1* and *ZEB1*, previously proposed as stem-like melanoma markers together with ATP binding cassette subfamily B member 5 (*ABC5*), hypoxia-inducible factor 2 alpha (*HIF2 α*), *JARID1B* and *CD271* (K.

Noguchi et al., 2017a, 2017b; Wouters et al., 2014).

Some studies demonstrate *JARID1B* overexpression in *MITF*^{low} cells, while other studies that used dye retention assays to identify slowly dividing label-retaining cells showed no direct correlation (Cheli et al., 2011; Perego et al., 2018). Regardless of this possible association, the *JARID1B*^{high} cells seem to have a similar degree of dedifferentiation to *MITF*^{low} phenotype, as its ability to undergo EMT-associated metastasis (Kuo et al., 2015; Noguchi et al., 2017a, 2017b; Shigekawa et al., 2018). Nevertheless, there is great heterogeneity within the label-retaining cells and some of them present *MITF* overexpression as well as high-OXPHOS (Perego et al., 2018; Redmer et al., 2014; Zhang et al., 2016). Accordingly, many studies indicate that *MITF* expression is promoted by target therapy (Haq et al., 2013; Margue et al., 2013; Vazquez et al., 2013; Zhang et al., 2016). For instance, MEK inhibition in *NRAS*-mutant melanoma blocked cellular proliferation, which was associated with a decrease of both ERK and AKT phosphorylation, but this treatment caused limited degree of apoptosis. Cells resistant to this treatment showed increased expression of *PTEN* which inhibits AKT activity, promoting *MITF*^{high}/cAMP/Bcl-2 state (Najem et al., 2017).

SOX10, a transcriptional activator of *MITF*, can be inhibited by ERK phosphorylation. Thus, in the presence of BRAF/MEK inhibitors, *SOX10* acts synergistically with *PAX3*, promoting *MITF* expression (Han et al., 2018; Smith et al., 2019). *SOX10* also targets the survival factors *FOXD3* (forkhead box D3) and *SAMMSON* (survival associated mitochondrial melanoma specific oncogenic non-coding RNA) that might participate in protection during the resistance process (Han et al., 2018). Importantly, *MITF*^{high} phenotype expresses some, but not all, *MITF* target genes, which indicates that the context in which *MITF* activation occurs contributes to its physiological role (Haq et al., 2013). For example, a worse prognosis from a cohort of 57 stage IV melanoma patients was observed with both higher collagen and *MITF* expression, showing a possible influence of microenvironment in *MITF*-action context (Miskolczi et al., 2018). In addition, *MITF* nuclear localization is critical to this phenotype. As mTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) promotes *MITF* cytoplasmic retention, its inactivation is necessary for *MITF* translocation, which usually occurs during cellular stress or nutrient limitation (Möller et al., 2019; Vazquez et al., 2013).

Thus, the *MITF* rheostat model shows that slow-dividing cells with EMT features in a dedifferentiated state (*MITF*^{low}) can switch to a fast rate proliferation state (*MITF*^{intermediate}) that is sensitive to BRAF/MEK inhibition, and then to a differentiated-like state, which is again drug-resistant. Phenotype switching is a complex process where a single cell context confers a unique gene expression network that can be the cause or consequence of the *MITF* levels (Vlčková et al., 2018). A single-cell gene expression analysis of 5 primary human melanoma biopsies not only confirmed the coexistence of *MITF*^{high} and *MITF*^{low} subpopulations but also revealed a heterogeneous distribution of these phenotypes

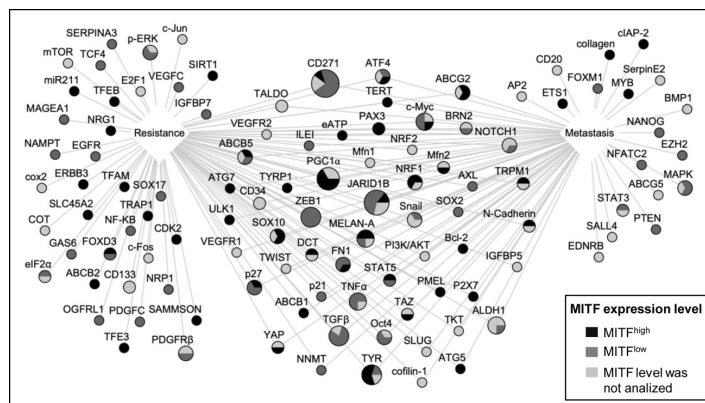


Fig. 2. Biological factors in melanoma resistance and metastasis. Several research articles were analyzed to visually demonstrate the biological factors (membrane proteins, transcription factors, cytosines, e.g.) profile described in target therapy resistant *MITF*^{high} (black) or *MITF*^{low} (dark gray) phenotype. Biological factors that were related to metastasis and/or BRAF/MEK/ERK-inhibitors resistance but the research did not evaluate *MITF* expression are marked in light gray. The node size indicates how many times this factor has been described in the analyzed studies. This network was visualized using Cytoscape® version 3.7.2. The list of enriched biological factors is in supplementary material (Table S1).

between different samples (Ennen et al., 2015). Moreover, it was found that some cells express gene signatures of both $MITF^{high}$ and $MITF^{low}$, as evidenced by $MITF^{low}$ cells expressing *SOX10/PAX3/ZEB2* axis while some $MITF^{high}$ cells lacked expression of these genes and others had *BRN2* expression (Ennen et al., 2015). Another relevant aspect is that $MITF$ levels may change during the resistance process, being increased immediately after acute treatment but decreased upon prolonged exposure to it (Han et al., 2018; Sun et al., 2014). As a consequence of research experiments showing a static photograph of a dynamic cellular process, there is conflicting data in the literature about the gene expression networks in melanoma and their relationship with *MITF* expression. Nevertheless, many biological factors have been described to promote resistance to treatment and metastasis in melanoma (Fig. 2).

It is not an easy task to establish a hierarchical organization in phenotype-switching cells. Therefore, several research groups have come to consider slow-cycling cells to be different from CSCs, while others may still catalog $JARID1B^{high}$, for example, as a CSC marker (Nakagawa et al., 2016; Roesch et al., 2010). Independently of classification of this phenotype, there is a subset of melanoma-initiating cells resulting from genetic and epigenetic instability which is selected/induced by cell intrinsic factors, microenvironmental forces as well as target therapy (Fig. 3). These cells are responsible for resistance and invasion, sharing several phenotypic characteristics such as cellular plasticity, label retention, asymmetric cell division, colony-formation and high-OXPHOS, even though gene expression will not necessarily follow the same pattern.

4. Dynamic stemness challenging the Warburg effect in melanoma

Almost a century ago, the German scientist Otto Warburg proposed that the dependency of neoplastic cells over glycolysis to obtain energy was caused by a supposed dysfunction of cancer cells mitochondria. Subsequent studies have shown that tumor cells can use mitochondrial respiration; however, these cells prefer to convert glucose to lactate even in the presence of oxygen, a phenomenon coined as aerobic glycolysis or the Warburg Effect. Although glycolysis produces fewer ATP molecules per glucose molecule, this metabolic pathway provides not only building blocks for macromolecule biosynthesis but also recycles NADPH levels, which is essential in reductive anabolic processes. Shortly, enhanced glycolysis in cancer cells supports the high proliferation rate of dividing cells (Hanahan and Weinberg, 2011).

Accordingly, melanoma cells with the $BRAF^{V600E}$ mutation present high levels of HIF1 α transcription factor, induced mainly by hyperactivation of MAPK pathway, but PI3K/AKT/mTOR and Wnt/ β -catenin signaling pathway are also involved in this process (Fig. 4A) (Haq et al., 2013; Marchetti et al., 2018; Yeung et al., 2008). This hyperactivation is not exclusive to cells harboring *BRAF* mutations, given that up to 90% of melanomas exhibit an aberrant activation state of the MAPK pathway (Leonardi et al., 2018). Pyruvate dehydrogenase kinase (PDK), that is a downstream target of HIF1 α , which contributes to low

mitochondrial activity in melanoma. PDK mediates loss of glucose carbon utilization in the tricarboxylic acid cycle (TCA) via pyruvate dehydrogenase (PDH) inhibition, which results in high levels of serum lactate observed in melanoma *BRAF* mutation positive patients (Haq et al., 2013; Ratnikov et al., 2017). Upregulation of glucose transporters has also been identified, as well as numerous glycolytic genes, due to aberrant MAPK pathway activation, resulting in a classic Warburg phenotype (Theodosakis et al., 2015). This phenomenon can be visualized through imaging obtained with fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography (FDG-PET/CT), which quantifies *in vivo* the enormous glucose uptake across many different types of cancers when compared to healthy tissue. In melanoma, FDG-PET/CT images of patients after treatment with *BRAF* and *MEK* inhibitors show a substantial decrease in fluorodeoxyglucose uptake (Schmitt et al., 2018).

Melanoma aberrant metabolism extends beyond glycolysis, and these cells can also become dependent on glutamine, irrespective of the oncogenic background (Ratnikov et al., 2015). The oncogene *c-Myc* upregulates glutaminase (GLS) that converts glutamine to glutamate not only to supply the TCA cycle but also to induce the biosynthesis of proline from glutamine (Liu et al., 2012). Besides, it has been shown that $BRAF^{V600E}$ activates Oct-1 (POU class 2 homeobox 1) to promote upregulation of mitochondrial ketogenic enzymes 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1 and lyase (HMGCS1 and HMGCL, respectively), showing an essential role of ketogenesis in cancer. It increases the intracellular levels of amino acids specifically promotes $BRAF^{V600E}$ binding to MEK1 and, subsequently, MEK1 phosphorylation (Kang et al., 2015). Additionally, Oct-1 decreases mitochondrial metabolism related to PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1) transcription factor promoter and inhibits it, reinforcing the Warburg Effect (Girmun, 2012). The anabolic state is also sustained by preventing the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), a key sensor of cellular stress, which stimulates ATP-production in catabolic pathways. In $BRAF^{V600E}$, the serine/threonine kinase LKB, which directly phosphorylates and activates AMPK, is inhibited by ERK activity, favoring the use of energy resources for anaerobic routes (Zheng et al., 2009).

Initially, *BRAF* inhibition increases ROS production leading to PDH phosphorylation via PDK hyperactivation. This way, pyruvate does not enter the TCA cycle. However, the overcome of PDH inhibition has been reported, suggesting a metabolic adaptive process occurring during drug treatment (Cesi et al., 2017). Accordingly, many studies report a metabolic rewiring under *BRAF/MEK/ERK* inhibitors treatment increasing mitochondrial metabolic rates leading to recurrence of the disease (Fig. 4A) (Haq et al., 2013; Lebleu et al., 2014; Nakagawa et al., 2016; Vogel et al., 2019). Clinically, increased expression of genes related to mitochondrial biogenesis network has been observed in two independent cohorts of patients associated with worse melanoma patients overall survival (Zhang et al., 2016). In this sense, we highlight that a drug-resistant phenotype characterized by high-OXPHOS

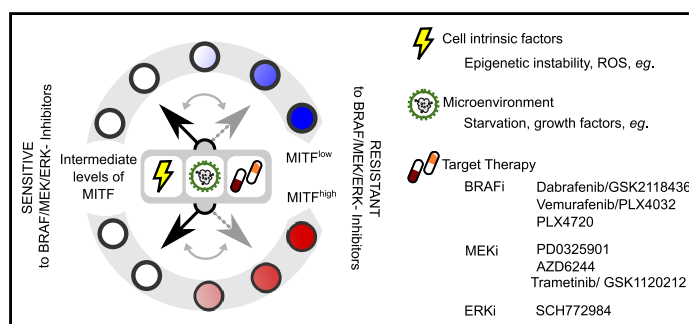


Fig. 3. Melanoma cell plasticity. Melanoma cells present a transient ability to shift their gene expression status to more or less resistant/invasive under microenvironment, cell intrinsic factors, or therapy pressure. Although the resistant phenotype does not necessarily exist in a single gene expression signature, $MITF$ levels have been related as an indicator of these cellular state. *BRAF*i (*BRAF* inhibitor); *MEK*i (*MEK* inhibitor); *ERK*i (*ERK* inhibitor).

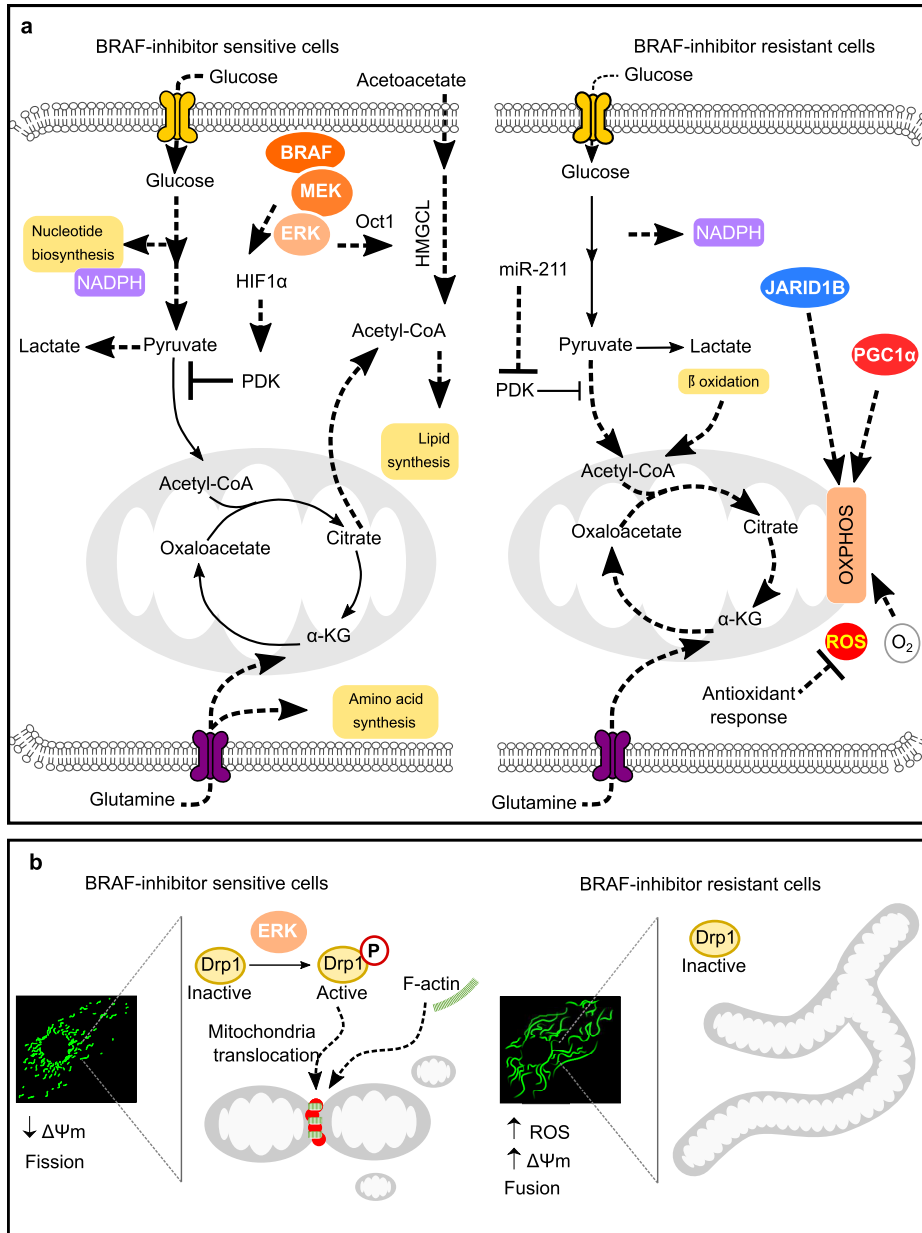


Fig. 4. Metabolic rewiring and mitochondrial morphology rearrangement in melanoma BRAF-inhibitor resistant cells. **A)** Metabolic rewiring in melanoma. *BRAF*^{V600E} melanoma cells sustain high glucose and glutamine pool to synthesize macromolecules (lipid, amino acid, nucleotide) to promote proliferation. BRAF-inhibitors cause energy stress, inducing apoptosis. However, a subset of melanoma cells that previously presented or the ones that switch their metabolism to a catabolic state does not respond to treatment. **B)** Mitochondrial dynamics in melanoma. While the hyperactivation of BRAF/MAPK/ERK pathway in melanoma promotes the activation of the mitochondrial fission process, melanoma resistant cells present a highly fused mitochondrial network.

metabolism can be acquired by: (1) either a de-differentiated phenotype commonly characterized by *JARID1B*^{high}/*MITF*^{low}; or (2) differentiated (-like) phenotype characterized by *MITF*^{high}/*PGC1α*^{high}. Importantly, there is a pronounced heterogeneity inside melanoma cells and some reports showed co-expression of *JARID1B*^{high}/*PGC1α*^{high}, highlighting

the complexity of gene expression patterns in cancer (Vogel et al., 2019).

The slow-cycling cells, characterized by *JARID1B*^{high} with increased capability of self-renewal, are intrinsically resistant to drugs. This phenotype occurs spontaneously in low frequency in the tumor bulk,

but the percentage of this subpopulation can increase under cisplatin, vemurafenib, or temozolomide treatments (Roesch et al., 2013a). The proteome profile of *JARID1B*-overexpressing cells revealed upregulation of several members of the cell respiratory electron transport chain (ETS) such as NADH dehydrogenase (Complex I), ubiquinol cytochrome *c* reductase (Complex III), cytochrome *c* oxidase (Complex IV), and ATP synthase, with the down-regulation of glycolytic enzymes such as hexokinase I (HK1) and hexokinase 2 (HK2) (Roesch et al., 2013a). In this sense, *JARID1B*-overexpressing cells present higher OXPHOS with substrate preference to glucose, glutamine, and fatty acids, and these cells have higher intracellular levels of the substrates for β -oxidation while reduced levels of lactate (Haq et al., 2013; Vogel et al., 2019).

Another adaptive metabolic program that limits the efficacy of BRAF-inhibitors occurs upon triggering of the MITF transcription factor, which translocates to the nucleus and transactivates *PGC1 α* expression (Vazquez et al., 2013). The MITF^{high}/*PGC1 α* ^{high} phenotype is also a key factor in metastasis, as circulating cancer cells showed dependency on high *PGC1 α* expression to develop an invasive potential (Lebleu et al., 2014). Clinically, biopsies from patients treated with BRAF-inhibitors showed increased expression of *MITF* (Haq et al., 2013). While *BRAF*-mutated melanoma downregulates *PGC1 α* , BRAF inhibitors induce *MITF* expression increasing the amount of mitochondrial ETS complexes, raising the OXPHOS capacity and intracellular ATP levels, which is sustained by TCA metabolites (Girnun, 2012; Haq et al., 2013; Rodrigues et al., 2016; Vazquez et al., 2013).

Metabolic rewiring in BRAF-inhibitor resistant melanoma cells is also promoted by the microRNA miR-211. Even though it is a transcriptional target of MITF and there is a positive correlation in expression, miR-211 activity is not necessarily due to MITF (Díaz-Martínez et al., 2018). Mazar and colleagues demonstrated that ectopic expression of miR-211 regulates mitochondrial respiration by increasing the conversion of pyruvate to acetyl-CoA to fuel the TCA cycle in A375 cell line by downregulation of PDK4 (Mazar et al., 2016). As expected, miR-211^{high} cells showed an increase in oxygen consumption rates (OCR), TCA intermediates (citrate, succinate, keto-glutamate, succinate, fumarate and malate), expression of respiratory complexes and decreased NADP⁺/NADPH ratio (Sahoo et al., 2019). In contrast, miR-211-deficiency induced by CRISPR/Cas9 deletion decreased OCR without modifying the extracellular acidification rate or mitochondrial mass (Sahoo et al., 2019). In addition, miR-211 deficiency decreased the respiratory reserve capacity, which is described as the ability to increase ATP production in energy demand, suggesting a compromised ability to respond to respiratory stress. Importantly, miR-211 deletion promotes drug sensitivity in melanoma cells treated with the BRAF-inhibitor vemurafenib (Sahoo et al., 2019). Several studies also report miR-211 acting as a tumor suppressor due to its capacity to negatively modulate EMT (Mazar et al., 2016; Yu and Yang, 2016). As the MITF rheostat model, the variation in miR-211 expression levels may be responsible for its role in tumorigenesis (Margue et al., 2013).

Because BRAF inhibitor treatments cause cell stress, autophagy has been described as one of the adaptive processes in resistant cells (Martin et al., 2017). Recently, it was described that the MITF^{high}/miR211 axis sustains an autophagy amplification system under mTOR inhibition by starvation or Torin-1 treatment (Ozturk et al., 2019). In this context, MITF can translocate to the nucleus to transactivate autophagy-related targets as well as miR211. Interestingly, miR211 reinforces the autophagic process by downregulating the mTOR signal, stimulating nuclear localization of MITF, as well as the master gene regulator for lysosomal biogenesis TFEB (transcription factor EB) (Ozturk et al., 2019). Nevertheless, autophagy-mediated ATP secretion was observed in BRAF-inhibitor resistant cells and confirmed by knockdown of autophagy genes, which attenuated the levels of extracellular ATP (eATP) (Martin et al., 2017). This eATP is taken up via the purinergic receptor P2RX7, promoting invasiveness. Besides, the higher expression of *JARID1B* and *SOX10* in BRAF inhibitor-resistant cells was reverted by exposure to apyrase, which executes the hydrolysis of ATP

to ADP (Martin et al., 2017).

Delgado-Goñi and colleagues demonstrated that the reactivation of mitochondrial metabolism under vemurafenib treatment is not uniform. In their study, BRAF-inhibition gave rise to three melanoma cell clones with decreased glucose consumption; one of them changed the focus of its metabolism to OXPHOS via anaplerotic pyruvate-carboxylase activity. The other two clones shifted to lipid metabolism and increased prostaglandin E2 synthesis, being more responsive to BRAF inhibitor when co-treated with epidermal growth factor receptor EGFR inhibitor, indicating that inflammatory lipid metabolism and EGFR pathways in ERK reactivation in those cells (Delgado-Goñi and Whittaker, 2019). High level of mitochondrial-dependent oxidative stress is one of the features of resistant melanoma cells, as the majority of cellular ROS is a side-product of ETS activity (Cierlitz et al., 2015; Zhang et al., 2016). The levels of malondialdehyde, a biomarker of ROS-dependent lipid peroxidation, are elevated in the plasma of patients after one-month treatment with vemurafenib (Corazao-Rozas et al., 2013). Although ROS promotes many aspects of tumor development and progression, activation of the antioxidant defense system is a strategy of tumor cells to modulate and control its action. The subset of MITF^{high}/*PGC1 α* ^{high} cells has increased levels of the mitochondrial superoxide dismutase (SOD2), and its presence in the inner mitochondrial membrane allows readily dissipation of superoxide anions produced by OXPHOS activity (Vazquez et al., 2013). These cells also present the nuclear respiratory factor *NRF2* upregulated, which plays a key role in the antioxidant response against oxidative stress (Zhang et al., 2016). Increased activity of *NRF2* leads to activation of the pentose phosphate pathway (PPP) and NADPH production, which is involved in the regeneration of reduced glutathione (GSH), altering the glutathione-dependent redox potential (GSH/GSSG ratio). (Khamari et al., 2018). Thus, these routes protect resistant MITF^{high}/*PGC1 α* ^{high} cells from their own high ROS production via increased mitochondrial activity and protects them against drug-induced oxidative stress by molecules such as PEITC (phenethyl isothiocyanate), H₂O₂, piperlongumine and vemurafenib (Vazquez et al., 2013). Although there is no clear evidence that *NRF2* is upregulated in melanoma *JARID1B*^{high} cells, this phenotype shifts carbon use from glycolysis to an elevated flux through the PPP, recycling NADPH, which then contributes to an enhanced glutathione-dependent antioxidant capacity (Vogel et al., 2019).

Melanoma plasticity allows it to survive in hostile environments. Under acidic microenvironment, *SOX2* expression is stimulated and it contributes to OXPHOS metabolism. Knockdown of *SOX2* in acidic environment-exposed melanoma cells inhibits *PGC1 α* activity and enhances expression of glucose transporters (*GLUTs*), *HK2*, *PDK1* and lactate dehydrogenase A (*LDHA*) (Andreucci et al., 2018). Accordingly, it has been reported that A375 and SK-MEL-28 melanoma cell lines acquired cisplatin resistance at low pH (6.7) culture conditions (Noguchi et al., 2017a, 2017b).

In contrast to target therapy, Harel and colleagues have demonstrated that high mitochondrial metabolism leads to greater immunotherapy response (Harel et al., 2019). They demonstrated, in a proteomic analysis of 116 samples of stage IV melanoma patients treated with anti-PD1 or tumor-infiltrating lymphocytes, an enrichment of metabolic enzymes, including those of the TCA cycle, β -oxidation, and ketone body metabolism (Harel et al., 2019). Moreover, the treatment of melanoma cell lines with dichloroacetate, which elevates the carbon flux into the mitochondria by PKD inhibition, increased human leukocyte antigen (HLA) mRNA expression and its presentation on the cell surface, which is essential for tumor-associated antigens to activate cytotoxic T cells. In accordance with this observation, treatment with OXPHOS inhibitors decreased HLA expression (Harel et al., 2019). Thus, increased life expectancy in patients treated with immunotherapy can be due to its action over the high-OXPHOS aggressive phenotype.

5. Melanoma plasticity interplay between metabolism and epigenetics

Although secondary mutations gain under treatment occurs, the plasticity described in this review is not only independent of it but, as observed in melanomas, originated from different oncogenes (Roesch et al., 2013b; Zhang et al., 2016). Thus, variations in the DNA sequence do not explain this phenomenon. In this sense, the molecular mechanisms that regulate gene expression without DNA sequence alterations, known as epigenetics, seem to command this process. Notably, the activity of many epigenetic factors depends on the availability of specific metabolites, including acetyl-CoA, S-adenosylmethionine (SAM), ATP, NAD⁺, FADH⁺, α -ketoglutarate (α -KG) and uridine diphosphate (as reviewed by Etchegaray and Mostoslavsky in 2016) (Etchegaray and Mostoslavsky, 2016).

The chemoresistant melanoma slow-cycling cells exhibit iron (Fe²⁺) and α -KG-dependent epigenetic factors, such as TET2 (tet methylcytosine dioxygenase 2), which catalyzes the oxidation of the modified DNA base 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine (Aguilar et al., 2018). It was showed that TET2 appears to control the expression of TNF α signaling components and restrains its proapoptotic signaling. In addition, JARID1B, as all the JmjC domain-containing enzymes, promotes an iron (Fe²⁺) and α -KG-dependent demethylation reaction (Etchegaray and Mostoslavsky, 2016). Interestingly, glutamine, one of the main sources of carbon of the resistant melanoma cells, can be converted into α -KG either by glutamate dehydrogenase or by the alanine or aspartate transaminases. In turn, α -KG can either fuel OXPPOS, and activate KDMs (Wong et al., 2017). However, succinate, a downstream intermediate to α -KG in the TCA cycle, can inhibit the activation of KDMs. Hence, it was showed that metastatic cells with high OXPPOS have lower levels of succinate due to its high consumption (Rodrigues et al., 2016). Moreover, JARID1B not only has its activity controlled by metabolism, but it also controls metabolic gene expression by modulation of histone H3K4 tri-methylation on the promoter regions of DNA methyltransferase 3 Alpha (*DNMT3A*), nucleoporin 133 (*NUP133*), and *GLS* genes (Vogel et al., 2019).

Cellular metabolites can act on epigenetic events to support *PGC1 α* expression, reinforcing the high-OXPPOS state. Firstly, acetyl-coA is necessary for the histone acetylation process, and high acetylation levels by H3K27, which is responsible for losing the contact of histones with DNA, were observed, followed by high BRD4(bromodomain-containing protein 4)-bound densities driving the expression of *PGC1 α* (Gelato et al., 2018). Secondly, many post-translational modifications have been described to activate *PGC1 α* , such as phosphorylation by AMPK and deacetylation by sirtuin 1 (SIRT1), which is NAD⁺ dependent (Scarpulla, 2011). Hence, the pyridine nucleotide NAD⁺ role is essential to various cellular functions, required in the form of NADH for the generation of ATP via the mitochondrial respiratory chain, this cofactor is essential as a substrate for several key proteins such as poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) and sirtuins family (Mendelsohn and Larrick, 2017). NAD⁺ levels are controlled by either its consumption, production or degradation. Along these lines, melanoma BRAF/MEK/ERK signaling plays a key role in NAD⁺ levels by controlling the cellular levels of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) that is responsible for the NAD⁺ biosynthesis from nicotinamide mononucleotide. Ohanna and colleagues demonstrated that ectopic expression of *NAMPT* increased resistance to vemurafenib treatment. Transcriptomic and ChIP-seq analysis revealed that *NAMPT* overexpression showed alteration on histone markers and induced the activation of TNF α , TGF β , ZEB1 (Ohanna et al., 2018).

On the other hand, the nicotinamide *N*-methyltransferase (NNMT) enzyme regulates NAD⁺ levels by limiting nicotinamide availability. This maximises the efficiency of NAD⁺-dependent pathways, many of which are essential for the neoplastic cell, by limiting the build-up of nicotinamide through NAD⁺-consuming pathways. As nicotinamide is the physiological inhibitor of NAD⁺-consuming enzymes, this removes

the inhibitory block of accumulating nicotinamide upon these pathways (Bockwoldt et al., 2019). One consequence of this cellular NAD⁺ levels regulation is the ability to link increased *NNMT* expression to increased mitochondrial function and subsequent ATP synthesis via sirtuin activation.

In this way, we have shown that increased *NNMT* expression in the neuroblastoma SH-SY5Y cell-line, which has no endogenous expression of *NNMT*, increased Complex I activity and subsequent ATP synthesis (Liu et al., 2015; Parsons et al., 2011). This increase in ATP generation did not arise from an increase in mitochondrial number but from an increase in electron flow through the mitochondrial respiratory chain, as evidenced by increased oxygen consumption in the isolated mitochondria of *NNMT*-expressing SH-SY5Y cells. This also coincided with an increased expression of Complex I as NADH Ubiquinone Oxidoreductase Core Subunit S3 (*NDUFS3*) (Parsons et al., 2011). This increase in Complex I activity was mediated by an increase in the expression and activity of SIRT3, as silencing of *SIRT3* expression in *NNMT*-expressing SH-SY5Y cells reduced both Complex I activity and ATP synthesis (Liu et al., 2015). One possible mechanism by which *NNMT* increases SIRT3 activity is via increased 1-methylnicotinamide production, which binds to SIRT3 and prevents its ubiquitination and subsequent proteasome degradation (Hong et al., 2015).

At the level of gene expression, *NNMT* expression modulates the epigenetic environment during the differentiation of stem cells by reducing SAM levels, inducing DNA hypomethylation which favours a pattern of gene expression which, in turn, promotes dedifferentiation and evolution towards the cancer phenotype (Sartini et al., 2015; Ulanovskaya et al., 2013; Yu et al., 2015). Accordingly, Koroknai and colleagues demonstrated that invasive cells selected from original melanoma cell lines presented invasion capacity dependent on DNA methylation, characterized by the upregulation of *NNMT* and *MITF* hypermethylation (Koroknai et al., 2019). Previously, it has been described that the “melanocyte-specific” *MITF* isoform, *MITF-M*, appears to be negatively regulated by DNA methylation (Lauss et al., 2015). Although the fact that hypermethylation could decrease the *MITF* levels, parallel expression of *MITF* and *SIRT1* was observed in vemurafenib-resistant *BRAF*^{V600E}-mutated melanoma cells which brings forth the role of the *MITF*^{high}/*PGC1 α* ^{high} phenotype in melanoma’s drug-resistance (Ohanna et al., 2014).

6. Mitochondrial dynamics in melanoma aggressiveness

Mitochondria are dynamic organelles and their morphology and distribution influence many cellular functions in physiological and pathological conditions (Friedman and Nunnari, 2014). As a result of being the main site of oxidative energy transfer, there is an intrinsic relationship between bioenergetic adaptation and mitochondrial activity (Serasinghe et al., 2015). For example, hyperactivation of BRAF/ MAPK/ERK pathway induces a highly glycolytic phenotype in melanoma (Haq et al., 2013; Marchetti et al., 2018; Yeung et al., 2008). Conversely, cells resistant to BRAF/ MAPK inhibitors shift their metabolism to high-OXPPOS. This metabolic rewiring is accompanied by a high expression of *PGC1 α* , which modulates mitochondrial biogenesis (Haq et al., 2013). *PGC1 α* binds a large number of transcription factors associated with mitochondrial respiratory function, inducing respiratory-related gene expression and steady-state levels of mtDNA followed by rapid mitochondrial fusion in the vast majority of cells (Friedman and Nunnari, 2014; Serasinghe et al., 2018). Similarly, cells resistant to PI3K-targeted therapy also increase oxidative phosphorylation capacity, generating a local ATP source to fuel cell movements, which require a high energy demand. Moreover, it has also been observed that elongated mitochondria localize next to membrane protrusions effected in cell motility (Caino et al., 2015).

Throughout the processes of melanoma progression and drug-resistance acquisition, all metabolic changes are bound to have an impact on mitochondria morphology and cellular distribution due to

undergoing fusion and fission processes (Fig. 4B) (Kashatus et al., 2015). A study about the relationship between melanin production and mitochondrial dynamics showed that ERK has an anti-melanogenic effect and induces mitochondrial fragmentation by activation of Drp1 (dynamin-related protein 1) (Kim et al., 2014). Drp1 is a GTPase that regulates mitochondrial fission. Its phosphorylation at serine 616 (S616) induces activation and translocation to the mitochondria while serine 637 (S637) phosphorylation inhibits both processes (Rehklau et al., 2017). ERK1/ERK2 can phosphorylate S616 of Drp1, this activity is prerequisite for MAPK-driven tumorigenesis. Thus, the aberrant expression of MAPK/ERK signaling in melanoma increases the expression of Drp1 and phosphorylation of S616, leading to mitochondrial fission while decreasing OCR (Kashatus et al., 2015; Serasinghe et al., 2015). Drp1^{S616} phosphorylation in dysplastic nevi is a promising biomarker, along with BRAF^{V600E}, to determine which lesions are most likely to develop into melanoma (Wieder et al., 2015). However, a qualitative examination of mitochondria by electron microscopy in BRAF-inhibitor resistant cells showed morphological changes, including significantly more cristae with wide intracristae space, when compared to sensitive cells (Corazao-Rozas et al., 2016, 2013).

The mitochondrial Drp1 recruitment mechanism, as well as its oligomerization around the outer mitochondrial membrane (OMM), seems to be driven by actin polymerization through INF2 (ER-bound inverted formin 2) stimulation (Chakrabarti et al., 2018). Actin activity in mitochondrial fission depends on its stabilization as filamentous (F-actin), which is controlled by cofilin-1. When dephosphorylated, cofilin-1 binds to F-actin and induces its depolymerization in free actin monomers (G-actin). Thus, cofilin-1 decreases Drp1 activity by disassembling F- into G-actin, negatively regulating mitochondrial fission (Rehklau et al., 2017). A remarkably fused mitochondrial network is a feature in BRAF/MAPK inhibitors-resistant cells due to loss of Drp1 phosphorylation in S616, while in sensitive cells its activity causes mitochondrial morphology fragmentation (Kim et al., 2014; Serasinghe et al., 2015). Although there is evidence supporting the regulation of cofilin-1 over Drp1-dependent mitochondrial fission processes, this relationship with regards to melanoma is still unknown. Further, cofilin-1 has been reported to regulate cell migration and metastasis in different types of cancer (Castro et al., 2010; Hensley et al., 2016; Popow-Woźniak et al., 2012). We developed a melanoma model composed of stable subclones with distinct features, in which the metastatic subclone presented higher cofilin-1 expression as well as elevated ROS production (Bracalente et al., 2016b). Interestingly, increased ROS levels can be a strategy to sustain metastasis by oxidation of the slingshot protein phosphatase 1 (SSH-1 L) which releases it from its regulatory protein and activates cofilin-1 by dephosphorylation (Bracalente et al., 2016b).

Cofilin-1 plays a key role in several cellular processes, and its concentration or subcellular location can influence its function. Li and colleagues showed that exposure of cells to the Erucic compound promotes not only cofilin-1 dephosphorylation but also cofilin-1 and Drp1 translocation to the mitochondria, leading to fission and apoptosis (Li et al., 2015). Another study showed that mitochondrial fission, as well as PINK1 (PTEN-induced putative protein kinase 1) and PARK2 (parkinson protein 2) -dependent mitophagy induced by staurosporine/etoposide/CCCP is dependent on cofilin-1 (Li et al., 2018). This study proposed that Drp1 and G-actin translocate to the mitochondria to form the helical ring on constriction sites at the beginning of the mitochondrial fission process. Subsequently, cofilin-1 translocates to the mitochondria to depolymerize F-actin. As a result, there is a dissipation of the mitochondrial membrane potential, which results in the activation of PINK1/PARK2 (Li et al., 2018). Additionally, cofilin-1 also undergoes nuclear subcellular localization under specific chemical or physical stimuli, which correlates to resistance in lung adenocarcinomas (Becker et al., 2013). Recently, the same phenomenon was observed in a cohort of melanoma patients, in which the aggressiveness of the disease was correlated with the nuclear subcellular localization of this protein (Bracalente et al., 2018). Thus, not only high cofilin-1 expression but

also its localization can be used as a prognosis marker in melanoma and lesion progression (Bracalente et al., 2018, 2016b, 2016a; Ibañez et al., 2019).

Besides mitochondrial morphology and cell distribution, some proteins that compose the double-membrane structure of this organelle are responsible for cell survival. While the inner mitochondrial membrane coordinates OXPHOS, the OMM controls apoptosis. Apoptosis proceeds when the pro-apoptotic Bcl-2 family triggers the release of cytochrome c to the cytoplasm. The activities of the Bcl-2 family proteins are mediated via interactions with the OMM protein voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1), which controls mitochondrial permeability (Serasinghe et al., 2018). The BRAF inhibitor induces mitochondrial accumulation of ATF2, which in turn induces BIM (pro-apoptotic protein associated to Bcl2) dissociation from the BIM/Mcl-1 (MCL1 Apoptosis Regulator) complex resulting in mitochondria triggering. Finally, BIM interacts with VDAC1 to release cytochrome c, promoting apoptosis. It is relevant to highlight that VDAC1 oligomerization is required for mitochondrial changes. However, acquired BRAF-inhibitor resistant cells present inhibition of VDAC1 oligomerization (Gao et al., 2015). Another pro-apoptotic Bcl-2 protein involved in BRAF-inhibitor resistant cells is BIK (BCL2 interacting killer). The subset of resistant cells, characterized by cell cycle arrest, present low levels of BIK mRNA. Ectopic expression of BIK in resistant cells leads to sensitivity under subsequent exposure to vemurafenib/trametinib treatment (Borst et al., 2017). In agreement, tumors containing cells with higher pro-apoptotic signaling become more sensitive (so called "priming for death"), presenting a better clinical response to different chemotherapeutic agents (Montero et al., 2015). In summary, the research evidence presented highlights the key role of mitochondria in melanoma not just as a cellular energy source, but also as a coordinator of invasion processes through influencing morphological arrangement and cell fate, ultimately determining progression or apoptosis.

7. Mitochondria as a target to slow-cycling therapeutic perspective

Many therapeutic options have emerged in recent years, increasing overall survival of melanoma patients. The search for a more effective treatment brought the possibility of combination therapy, being that the study of several combinations has evolved into clinical trials (as extensively reviewed by Luther et al.) (Luther et al., 2019). Thus, understanding the cell biology of melanoma cells is essential to select drugs that could improve the action of the current melanoma treatments, as it is the case of target therapy and immunotherapy.

In this sense, there is a dynamic shift through phenotypes that is capable of promoting an adaptive metabolic rewiring, which contributes to resistance. Melanoma's wide heterogeneity, even at protein levels, can fluctuate at single-cell analysis (Liu et al., 2019). Apparently, a mitochondrial-dependent metabolic reprogramming is necessary for melanomas to trigger metastasis and to relapse under treatment (Roesch et al., 2010; Serasinghe et al., 2018; Zhang et al., 2016). For example, it was demonstrated that depletion of PGCI α decreases the content of proteins involved in response to oxidative stress, such as SOD, thioredoxins, peroxiredoxins and glutaredoxin; as a consequence, it was observed enhanced sensibility to apoptosis under H₂O₂, PEITC and piperlongumine in melanoma (Vazquez et al., 2013). Likewise, the inhibition of the complex I from the ETS or ATP-synthase is accompanied by the complete loss of endogenous JARID1B (Roesch et al., 2013a). All these evidences have brought the mitochondria to the spotlight, as a therapeutic opportunity to bypass melanoma phenotype dynamics responsible for disease recurrence.

An epidemiological study in 2014 suggested that type 2 diabetes patients under biguanides treatment are less likely to develop cancer (Morales and Morris, 2014). Biguanides, such as metformin and phenformin, inhibit the complex I of the respiratory chain (Kim et al., 2017). Hence, the authors suggested that cotreatment of BRAF/MEK/ERK

inhibitors with biguanides would be an attractive treatment option. Petrachi and colleagues showed that phenformin, but not metformin, decreased *SOX2* expression and melanoma cell invasion in 3D tumor models (Petrachi et al., 2017). A combination of phenformin and MAPK inhibitors (PD0325901 or AZD6244) or BRAF inhibitor (PLX4720) led to a marked increase in apoptosis when compared to MAPK inhibitor treatment alone (Yuan et al., 2013; Zhang et al., 2016). As MAPK/BRAF-inhibitors, the synergistic interaction of the ERK inhibitor (SCH772984) with phenformin in *NF1*-mutant melanoma suppressed the *JARID1B*^{high}-resistant subpopulation (Trousil et al., 2017). Currently, there is a phase I trial of phenformin with dabrafenib and trametinib in BRAF-mutated melanoma ongoing to test the safety of this combination (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03026517).

BRAF/MEK-resistant cells present fused mitochondrial networks with high mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), as well as high OCR (Rodrigues et al., 2016; Roesch et al., 2013a; Vazquez et al., 2013). Blocking OXPHOS by targeting $\Delta\Psi_m$ with uncoupling agents could be useful. BAM15, an uncoupling agent that has equal efficiency when compared to FCCP, is well tolerated *in vivo* (Serasinghe et al., 2018). Although BAM15 alone is insufficient to induce cell death, combined treatment with low concentrations of BRAF or MEK (vemurafenib or trametinib) inhibitors were capable of inducing apoptosis on melanoma cells (Serasinghe et al., 2018).

OXPHOS-dependent cells are sensitive to elesclomol, which induces oxidative stress and disruption of the mitochondrial respiration chain (Cierlitz et al., 2015). Followed by elesclomol treatment, suppression of OXPHOS and a reduction in *NDUFB8*, succinate dehydrogenase (ubiquinone) iron-sulfur subunit B (*SDHB*), ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2 (*UQCRC2*), and mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I and II (*COXI*, and *COXII*) expression was observed. However, a phase III study of elesclomol and the chemotherapy agent paclitaxel versus paclitaxel alone in stage IV metastatic melanoma did not present statistically significant improvement in progression-free survival. Importantly, there was an association between LDH levels and clinical outcomes in elesclomol plus paclitaxel treatment, suggesting that elesclomol generates more favorable outcomes in melanomas, presenting lower glycolytic states (O'Day et al., 2013). Since BRAF/MEK/ERK target therapy causes a favorable metabolic shift to an oxidative phenotype, it would be interesting to understand a possible synergy effect between BRAF/MEK/ERK inhibitors and elesclomol.

The stability of ETS proteins is essential for mitochondrial function and the heat shock protein (Hsp90) and the TNF Receptor Associated Protein 1 (TRAP1) are the main proteins responsible for that. Hence, gamitrinib, an inhibitor of Hsp90 activity and TRAP-1 activity, has been seen as a possible treatment strategy for melanoma (Reyes-Uribe et al., 2018; Zhang et al., 2016). MAPK-resistant cells under gamitrinib exposure not only decrease mitochondrial respiration, but also present lower expression of mitochondrial respiratory chain complex subunits *SDHA*, *SDHB*, *UQCRC2*, *ATP5H* (ATP synthase peripheral stalk subunit D), and *cyclophilin D* (Zhang et al., 2016). Additionally, a decrease in the expression of *HK1*, *HK2*, *PDHE1*, *PDK1*, *PDK2*, *LDHA*, *PKM1* (pyruvate kinase M1), *GLUT1*, and *GLUT3* as a consequence of gamitrinib plus BRAF-inhibitor (PLX4720) cotreatment was observed (Zhang et al., 2016). In *NRAS*-mutant melanoma, the combinatory treatment of the telomerase-dependent telomere uncapping agent (6-thio-2'-deoxyguanosine) and gamitrinib effectively increased anti-tumor responses (Reyes-Uribe et al., 2018).

Although there is some evidence showing that immunotherapy response is increased in cells with high mitochondrial metabolism, the use of drugs that inhibit this metabolism when co-treated with immunotherapy demonstrated some positive outcomes (Afzal et al., 2018; Harel et al., 2019; Kim et al., 2017; Scharping et al., 2017). The purpose of immunotherapy is to relieve the intrinsic ability of cells to inhibit the patient's own immune response to cancer treatment by using neutralizing antibodies targeting the immune checkpoints (Scharping et al., 2017). One component of a patient's intrinsic immune suppression is thought to be myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which are key

components of the tumor microenvironment. Interestingly, it has been shown that phenformin selectively inhibits MDSCs and enhances the effect of anti-PD-1 immune checkpoint blockade (Kim et al., 2017).

The metabolism of cancer cells changes tumor microenvironment by producing local acidification, low concentration of metabolites and decreased oxygen tension, which, in turn, promotes an immunosuppressive environment (Hanahan and Weinberg, 2011). Hence, tumor-infiltrating T cells are inhibited by cancer/surrounding-cancer cells' immunosuppressive mechanisms and by the lack of intermediates necessary for proliferation, cytokine synthesis, and cytotoxic activity of infiltrating T cells (Scharping et al., 2017). Therefore, metformin acts as an inhibitor of tumor OCR, decreasing tumor hypoxia, leading to a decreased hypoxia experienced by tumor infiltrating T cells. In addition, both activation of the PD-1 and the CLTA-4 signaling pathways promote oxidative phosphorylation in T cells, which is averse to its effector functions, supporting immunosuppression (Luís et al., 2019). Consequently, melanoma cells present increased sensitivity to PD-1 blockade due to an increase in intratumoral T-cell function, leading to tumor regression (Scharping et al., 2017). A recent clinical study has demonstrated that patients with malignant melanoma who are being treated simultaneously with an immunotherapeutic approach (anti-PD-1 or anti-CTLA-4) and metformin have a favorable treatment-related outcome (objective response rate, disease control rate, median progression-free survival and median overall survival) (Afzal et al., 2018).

Another use of metabolism modulation to overcome the resistance of melanoma to immunotherapy is by targeting key enzymes involved in the production of oncometabolites, such as sphingosine-1-phosphate (S1P). S1P is a lipid derived product from sphingosine kinases (SK) that catalyze the phosphorylation of sphingosine to S1P, involved in many biological processes such as regulating growth, survival and migration (Hannun and Obeid, 2017). Imbert and colleagues observed an attenuation in tumor growth under SK1 silencing as well as an increase in CD8⁺ T cells, which plays an essential anti-tumor role, whilst decreasing the accumulation of regulatory T cells that are indicative of worse prognosis (Imbert et al., 2020). Accordingly, SK1 antagonism may represent a new approach in anti-melanoma therapies.

8. Conclusion

Collectively, the data gathered by many melanoma researchers suggests that slow-cycling cells present a reversible high-OXPHOS phenotype in melanoma. This benefits tumor-initiating and metastatic processes, leading to higher resistance to conventional chemotherapies. Although historically ignored, mitochondria are key to melanoma progression, and the inhibition of its metabolism may provide a valuable clinical target. Hence, what is needed is a coordinated effort to improve our understanding of the dynamics of this phenotype and its interaction with metabolism to finally achieve a treatment that is fully efficient and addresses all the metabolic advantages of tumor cells.

Declaration of competing interest

None

CRediT authorship contribution statement

Ivi Juliana Bristot: Writing - original draft, Conceptualization. Camila Kehl Dias: Writing - original draft, Conceptualization. Henrique Chapola: Writing - original draft. Richard B. Parsons: Writing - review & editing. Fábio Klamt: Writing - review & editing, Conceptualization, Supervision.

Acknowledgment

This study was supported by the Brazilian funds MCTI/CNPq INCT-TM/CAPES/FAPESP (465458/2014-9), CNPq/MS/SCITE/DECIT

(466989/2014-8), MCTI/CNPQ/CBAB (465113/2014-1), and PRONEX/FAPERGS (16/2551-000499-4). FK received a fellowship from MCT/CNPq (306439/2014-0).

References

Afzal, M.Z., Mercado, R.R., Shirai, K., 2018. Efficacy of metformin in combination with immune checkpoint inhibitors (anti-PD-1/anti-CTLA-4) in metastatic malignant melanoma. *J. Immunother. Cancer* 6, 64. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0375-1>.

Aguilar, S., Argilés, G., Eguizabal, C., Tenbaum, S.P., Caratù, G., Seoane, J., Dienstmann, R., Ramírez, L., Vivanos, A., Landolfi, S., Puig, I., Nuciforo, P., Arqués, O., Tabernero, J., Casanovas, O., Villanueva, A., Martínez-Quintanilla, J., Soto, A., Cuesta-Borrás, E., Gonzalo, P., Arroyo, A.G., Palmer, H.G., Chicote, I., Terracciano, L., Prat, A., Recio, J.A., Serra, V., 2018. TET2 controls chemoresistant slow-cycling cancer cell survival and tumor recurrence. *J. Clin. Invest.* 128, 3887–3905. <https://doi.org/10.1172/jci96393>.

Andreucci, E., Pietrobono, S., Peppicelli, S., Ruzzolini, J., Bianchini, F., Biagioni, A., Stecca, B., Calorini, L., 2018. SOX2 as a novel contributor of oxidative metabolism in melanoma cells. *Cell Commun. Signal* 16, 87–100. <https://doi.org/10.1186/s12964-018-0297-z>.

Becker, M., Bastiani De, M.A., Müller, C.B., Markoski, M.M., Castro, M.A.A., Klamt, F., 2013. High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas. *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 35, 1233–1238. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1164-6>.

Becker, M., Müller, C.B., Bastiani De, M.A., Klamt, F., 2014. The prognostic impact of tumor-associated macrophages and intra-tumoral apoptosis in non-small cell lung cancer tumor-associated macrophages and intra-tumoral. *Histol. Histopathol.* 29, 335–343.

Becker, M., De Bastiani, M.A., Parisi, M.M., Guma, F.T.C.R., Markoski, M.M., Castro, M.A.A., Kaplan, M.H., Barbé-Tuana, F.M., Klamt, F., 2015. Integrated transcriptomics establish macrophage polarization signatures and have potential applications for clinical health and disease. *Sci. Rep.* 5, 13351. <https://doi.org/10.1038/srep13351>.

Bockwoldt, M., Houry, D., Niere, M., Gossmann, T.I., Reinartz, I., Schug, A., Ziegler, M., Heiland, I., 2019. Identification of evolutionary and kinetic drivers of NAD-dependent signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 15957–15966. <https://doi.org/10.1073/pnas.1902346116>.

Boiko, A.D., Razorenova, O.V., Van De Rijn, M., Swetter, S.M., Johnson, D.L., Ly, D.P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., Longaker, M.T., Weissman, L.L., 2010. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466, 133–137. <https://doi.org/10.1038/nature09161>.

Borst, A., Haferkamp, S., Grimm, J., Rösch, M., Zhu, G., Guo, S., Li, C., Gao, T., Meierjohann, S., Schrama, D., Houben, R., 2017. BIK is involved in BRAF/MEK inhibitor induced apoptosis in melanoma cell lines. *Cancer Lett.* 404, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.005>.

Boyle, S.E., Fedele, C.G., Corbin, V., Wybacz, E., Szeto, P., Lewin, J., Young, R.J., Wong, A., Fuller, R., Spillane, J., Speakman, D., Donahoe, S., Pohl, M., Gyorki, D., Henderson, M.A., Johnstone, R.W., Papanfili, A.T., Shackleton, M., 2016. CD271 expression on patient melanoma cells is unstable and unlinked to tumorigenicity. *Cancer Res.* 76, 3965–3977. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-2377>.

Bracalente, C., Ibañez, L.L., Berenstein, A., Notcovich, C., 2016a. Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression: upregulation of anti-oxidant genes correlates with regression of melanoma malignancy and with malignant progression when downregulated. *Oncotarget* 7, 41154–41171.

Bracalente, C., Salguero, N., Notcovich, C., Müller, C.B., Motta, L.L., Klamt, F., Ibañez, L.L., Durán, H., 2016b. Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression: reversion or promotion of malignancy by inducing melanogenesis or metastasis. *Oncotarget* 7, 41142–41153.

Bracalente, C., Rinflerch, A.R., Ibañez, L.L., García, F.M., Volonteri, V., Galimberti, G.N., Klamt, F., Durán, H., 2018. Cofilin-1 levels and intracellular localization are associated with melanoma prognosis in a cohort of patients. *Oncotarget* 9, 24097–24108. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25303>.

Caino, M.C., Ghosh, J.C., Chae, Y.C., Vaira, V., Rivadeneira, D.B., Favarsani, A., Rampini, P., Kossenkov, A.V., Aird, K.M., Zhang, R., Webster, M.R., Weeraratna, A.T., Bosari, S., Languino, L.R., Altieri, D.C., 2015. PI3K therapy reprograms mitochondrial trafficking to fuel tumor cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 8638–8643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1500722112>.

Cannavò, S.P., Tonacci, A., Bertino, L., Casciaro, M., Borgia, F., Gangemi, S., 2019. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: a systematic review. *Pathol. Res. Pract.* 215, 21–28. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.11.020>.

Cantor, J.R., Sabatini, D.M., 2012. Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces. *Cancer Discov.* 2, 881–898. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0345>.

Castro, M.A.A., Dal-Pizzol, F., Zdanov, S., Soares, M., Müller, C.B., Lopes, F.M., Zanotto-Filho, A., Fernandes, M.D.C., Moreira, J.C.F., Shacter, E., Klamt, F., 2010. CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in non-small cell lung cancer. *Cancer* 116, 3645–3655. <https://doi.org/10.1002/ncr.25125>.

Cesi, G., Walbrecq, G., Zimmer, A., Kreis, S., Haan, C., 2017. ROS production induced by BRAF inhibitor treatment rewires metabolic processes affecting cell growth of melanoma cells. *Mol. Cancer* 16, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0667-y>.

Chakrabarti, R., Ji, W.K., Stan, R.V., Sanz, J., de, J., Ryan, T.A., Higgs, H.N., 2018. INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *J. Cell Biol.* 217, 251–268. <https://doi.org/10.1083/jcb.201709111>.

Cheli, Y., Guigliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P.,

Bertolotto, C., Ballotti, R., 2011. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30, 2307–2318. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.598>.

Cheli, Y., Bonnazi, V.F., Jacquet, A., Allegra, M., De Donatis, G.M., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Ballotti, R., 2014. CD271 is an imperfect marker for melanoma initiating cells. *Oncotarget* 5, 5272–5283. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1967>.

Cierlitz, M., Chauvistré, H., Bogeski, I., Zhang, X., Hauschild, A., Herlyn, M., Schandendorf, D., Vogt, T., Roesch, A., 2015. Mitochondrial oxidative stress as a novel therapeutic target to overcome intrinsic drug resistance in melanoma cell sub-populations. *Exp. Dermatol.* 24, 155–157. <https://doi.org/10.1111/exd.12613>.

Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H.M., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, L.L., Wahl, G.M., 2006. Cancer stem cells—perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 66, 9339–9344. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3126>.

Corazao-Rozas, P., Guerreschi, P., Jendoubi, M., André, F., Jonneaux, A., Scalbert, C., Garçon, G., Malet-Martino, M., Balayssac, S., Rocchi, S., Savina, A., Formstecher, P., Mortier, L., Kluzza, J., Marchetti, P., 2013. Mitochondrial oxidative stress is the achilles' heel of melanoma cells resistant to BRAF-mutant inhibitor. *Oncotarget* 4, 1986–1998. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1420>.

Corazao-Rozas, P., Guerreschi, P., André, F., Gabert, P.E., Lancel, S., Dekiok, S., Fontaine, D., Tardivel, M., Savina, A., Quesnel, B., Mortier, L., Marchetti, P., Kluzza, J., 2016. Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget* 7, 39473–39485. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7790>.

Delgado-goñi, T., Whittaker, S.R., 2019. Increased in inflammatory lipid metabolism and anaplerotic mitochondrial activation follow acquired resistance to vemurafenib in BRAF-mutant melanoma cells. *Br. J. Cancer* 122, 72–81. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0628-x>.

Díaz-Martínez, M., Benito-Jardon, L., Alonso, L., Koetz-Ploch, L., Hernandez, E., Teixeira, J., 2018. miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Cancer Res.* 78, 1017–1030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1318>.

Ennen, M., Keime, C., Kobi, D., Mengus, G., Lipsker, D., Thibault-Carpentier, C., Davidson, I., 2015. Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. *Oncogene* 34, 3251–3263. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.262>.

Etchegaray, J.P., Mostoslavsky, R., 2016. Interplay between metabolism and epigenetics: a nuclear adaptation to environmental changes. *Mol. Cell* 62, 695–711. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.029>.

Falletta, P., Sanchez-del-Campo, L., Chauhan, J., Efferm, M., Kenyon, A., Kershaw, C.J., Siddaway, R., Lisle, R., Freter, R., Daniels, M.J., Lu, X., Tüting, T., Middleton, M., Buffa, F.M., Willis, A.E., Pavitt, G., Ronai, Z.A., Sanka-Spengler, T., Hölzel, M., Goding, C.R., 2016. Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes Dev.* 31, 18–33. <https://doi.org/10.1101/gad.290940.116>.

Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C., Arozarena, I., 2017. Glucose availability controls ATP4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget* 8, 32946–32959. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16514>.

Friedman, J.R., Nunnari, J., 2014. Mitochondrial form and function. *Nature* 505, 335–343. <https://doi.org/10.1038/nature12985>.

Gao, Z., Shang, Q., Liu, Z., Deng, C., Guo, C., 2015. Mitochondrial ATF2 translocation contributes to apoptosis induction and BRAF inhibitor resistance in melanoma through the interaction of Bim with VDAC1. *Oncotarget* 6, 36338–36353. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5537>.

Gelato, K.A., Schöckel, L., Klingbeil, O., Rückert, T., Lesche, R., Toedling, J., Kalfon, E., Héroult, M., Lejeune, P., Mönning, U., Fernández-Montalván, A.E., Bäurle, S., Siegel, S., Haendler, B., 2018. Super-enhancers define a proliferative PGC-1 α -expressing melanoma subgroup sensitive to BET inhibition. *Oncogene* 37, 512–521. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.325>.

Gillies, R.J., Verduzzo, D., Gatenby, R.A., 2012. Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. *Nat. Rev. Cancer* 12, 487–493. <https://doi.org/10.1038/nrc3298>.

Girnun, G.D., 2012. The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.01.007>.

Gopalan, V., Islam, F., Lam, A.K., 2018. Surface markers for the identification of cancer stem cells. *Cancer Stem Cells: Methods and Protocols Methods in Molecular Biology Series.* Humana Press, New York, NY, pp. 17–29. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6>.

Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–857. <https://doi.org/10.1038/nature05661>.

Han, S., Ren, Y., He, W., Liu, H., Zhi, Z., Zhu, X., Yang, T., Rong, Y., Ma, B., Purwin, T.J., Ouyang, Z., Li, C., Wang, Xun, Wang, Xueqiang, Yang, H., Zheng, Y., Aplin, A.E., Liu, J., Shao, Y., 2018. ERK-mediated phosphorylation regulates SOX10 sumoylation and targets expression in mutant BRAF melanoma. *Nat. Commun.* 9, 28. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02354-x>.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2017. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Publ. Gr.* 19, 175–191. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.107>.

Hag, R., Shoaq, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., Wargo, J.A., Song, J.S., Fisher, D.E., Arant, Z., Widlund, H.R., 2013. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* 23, 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.003>.

Harel, M., Ortenberg, R., Varanasi, S.K., Mangalharra, K.C., Mardamshina, M., Markovits, E., Baruch, E.N., Tripple, V., Arama-Chayoth, M., Greenberg, E., Shenoy, A., Ayasun,

- R., Knafo, N., Xu, S., Anafi, L., Yanovich-Arad, G., Barnabas, G.D., Ashkenazi, S., Besser, M.J., Schachter, J., Bosenberg, M., Shadel, G.S., Barshack, I., Kaech, S.M., Markel, G., Geiger, T., 2019. Proteomics of melanoma response to immunotherapy reveals mitochondrial dependence. *Cell* 179, 236–250. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.012>.
- Hensley, P.J., Zetter, D., Horbinski, C.M., Strup, S.E., Kyprianou, N., 2016. Association of epithelial-mesenchymal transition and nuclear cofilin with advanced urothelial cancer. *Hum. Pathol.* 57, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.06.020>.
- Hoang-Minh, L.B., Siebzehrubli, F.A., Yang, C., Suzuki-Hatano, S., Dajac, K., Loche, T., Andrews, N., Schmolli Massari, M., Patel, J., Amin, K., Vuong, A., Jimenez-Pascual, A., Kubilis, P., Garrett, T.J., Money Penny, C., Pacak, C.A., Huang, J., Sayour, E.J., Mitchell, D.A., Sarkisian, M.R., Reynolds, B.A., Deleyrolle, L.P., 2018. Infiltrative and drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma. *EMBO J.* 37. <https://doi.org/10.15252/embj.201798772>.
- Hong, S., Moreno-Navarrete, J.M., Wei, X., Kikukawa, Y., Tzamei, I., Prasad, D., Lee, Y., Asara, J.M., Fernandez-Real, J.M., Maratos-Flier, E., Pissios, P., 2015. Nicotinamide N-methyltransferase regulates hepatic nutrient metabolism through Sirt1 protein stabilization. *Nat. Med.* 21, 887–894. <https://doi.org/10.1038/nm.3882>.
- Hugo, W., Zaretsky, J.M., Sun, L., Song, C., Moreno, B.H., Hu-Lieskovan, S., Berent-Maoz, B., Pang, J., Chmielowski, B., Cherry, G., Seja, E., Lomeli, S., Kong, X., Kelley, M.C., Sosman, J.A., Johnson, D.B., Ribas, A., Lo, R.S., 2016. Genomic and transcriptomic features of response to anti-PD-1 therapy in metastatic melanoma. *Cell* 165, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.065>.
- Ibanez, L.L., Grings, F.M., Bracaleante, C., Rinflerch, A.R., Volonteri, V., Castro, M.A.A., Klamt, F., Durán, H., 2019. Potential predictive value of cofilin-1 for metastasis occurrence in a small cohort of Argentinian patients with mid-low Breslow thickness melanoma. *Pathol. - Res. Pract.* 152582. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152582>.
- Imbert, C., Montfort, A., Fraisse, M., Marcheteau, E., Gilhodes, J., Martin, E., Bertrand, F., Marcellin, M., Bulet-schiltz, O., Peredo De, A.G., Garcia, V., Carpentier, S., Tartare-deckert, S., Brousset, P., Rochoaix, P., Puisse, F., Filleron, T., Meyer, N., Lamant, L., Levade, T., Séguis, B., Andrieu-abadie, N., Colacios, C., 2020. Resistance of melanoma to immune checkpoint inhibitors is overcome by targeting the sphingosine kinase-1. *Nat. Commun.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14218-7>.
- Ji, Z., Erin Chen, Y., Kumar, R., Taylor, M., Jenny Njauw, C.N., Miao, B., Frederich, D.T., Wargo, J.A., Flaherty, K.T., Jönsson, G., Tsao, H., 2015. MITF modulates therapeutic resistance through EGFR signaling. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1863–1872. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.105>.
- Kang, H.B., Fan, J., Lin, R., Elf, S., Ji, Q., Zhao, L., Jin, L., Seo, J.H., Shan, C., Arbiser, J.L., Cohen, C., Brat, D., Miziorok, H.M., Kim, E., Abdel-Wahab, O., Merghoub, T., Fröhling, S., Scholl, C., Tamayo, P., Barbie, D.A., Zhou, L., Pollack, B.P., Fisher, K., Kudchadkar, R.R., Lawson, D.H., Sica, G., Rossi, M., Lonial, S., Khoury, H.J., Khuri, F.R., Lee, B.H., Boggon, T.J., He, C., Kang, S., Chen, J., 2015. Metabolic rewiring by oncogenic BRAF V600E links ketogenesis pathway to BRAF-MEK1 signaling. *Mol. Cell* 59, 345–358. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.037>.
- Kashatus, J.A., Nascimento, A., Myers, L.J., Sher, A., Byrne, F.L., Hoehn, K.L., Counter, C.M., Kashatus, D.F., 2015. Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth. *Mol. Cell* 57, 537–551. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.002>.
- Khamari, R., Trinh, A., Gabert, P.E., Corazao-Rozas, P., Riveros-Cruz, S., Balayssac, S., Malet-Martino, M., Dekiokou, S., Joncquel Chevalier Curt, M., Maboudou, P., Garçon, G., Ravasi, L., Guerreschi, P., Mortier, L., Quesnel, B., Marchetti, P., Kluzza, J., 2018. Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors. *Cell Death Dis.* 9, 325–339. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0340-4>.
- Kim, E.S., Park, S.J., Goh, M.J., Na, Y.J., Jo, D.S., Jo, Y.K., Shin, J.H., Choi, E.S., Lee, H.K., Kim, J.Y., Jeon, H.B., Kim, J.C., Cho, D.H., 2014. Mitochondrial dynamics regulate melanogenesis through proteasomal degradation of MITF via ROS-ERK activation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27, 1051–1062. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12298>.
- Kim, M.H., Kim, Jongshin, Hong, H., Lee, S., Lee, J., Jung, E., Kim, Joon, 2016. Actin remodeling confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through YAP / TAZ activation. *EMBO J.* 35, 462–478. <https://doi.org/10.15252/embj.201592081>.
- Kim, S.H., Li, M., Trousil, S., Zhang, Y., Pasca di Magliano, M., Swanson, K.D., Zheng, B., 2017. Phenformin inhibits myeloid-derived suppressor cells and enhances the anti-tumor activity of PD-1 blockade in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 137, 1740–1748. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.03.033>.
- Konrad, C.V., Murali, R., Varghese, B.A., Nair, R., 2016. The role of cancer stem cells in tumor heterogeneity and resistance to therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 95, 1–15. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0079>.
- Koroknai, V., Szász, I., Hernandez, H., Nora, V., Cyrille, J., Zdenko, C., Laura, H., Ádány, R., Ecsedi, S., Balázs, M., 2019. DNA Hypermethylation is Associated with Invasive Phenotype of Malignant Melanoma. pp. 1–10. <https://doi.org/10.1111/exd.14047>.
- Kumar, D., Kumar, S., Gorain, M., Tomar, D., Patil, H.S., Radharani, N.N.V., Kumar, T.V.S., Patil, T.V., Thulasiram, H.V., Kundu, G.C., 2016. Notch1-MAPK signaling axis regulates CD133 + cancer stem cell-mediated melanoma growth and angiogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 136, 2462–2474. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.07.024>.
- Kuo, Y.T., Liu, Y.L., Adebayo, B.O., Shih, P.H., Lee, W.H., Wang, L.S., Liao, Y.F., Hsu, W.M., Yeh, C.T., Lin, C.M., 2015. JARID1B expression plays a critical role in chemoresistance and stem cell-like phenotype of neuroblastoma cells. *PLoS One* 10, 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125343>.
- Laga, A.C., Lai, C.Y., Zhan, Q., Huang, S.J., Velazquez, E.F., Yang, Q., Hsu, M.Y., Murphy, G.F., 2010. Expression of the embryonic stem cell transcription factor SOX2 in human skin: relevance to melanocyte and Merkel cell biology. *Am. J. Pathol.* 176, 903–913. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.090495>.
- Landreville, S., Agapova, O.A., Kneass, Z.T., Saless, C., Harbour, J.W., 2011. ABCB1 identifies a subpopulation of uveal melanoma cells with high metastatic propensity. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23, 430–437. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00841.x>.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., Dick, J.E., 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648. <https://doi.org/10.1038/367645a0>.
- Lauss, M., Haq, R., Cirenajwis, H., Phung, B., Harbst, K., Staaf, J., Rosengren, F., Holm, K., Aine, M., Jirstrom, K., Borg, A., Busch, C., Geisler, J., Lønning, P.E., Ringnér, M., Howlin, J., Fisher, D.E., Jönsson, G., 2015. Genome-wide DNA methylation analysis in melanoma reveals the importance of CpG methylation in MITF regulation. *J. Invest. Dermatol.* 135, 1820–1828. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.61>.
- Lebleu, V.S., O'Connell, J.T., Gonzalez Herrera, K.N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M.C., De Carvalho, F.M., Damascena, A., Domingos Chinen, L.T., Rocha, R.M., Asara, J.M., Kalluri, R., 2014. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 16, 992–1003. <https://doi.org/10.1038/ncb3039>.
- Leonardi, G.C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghi, A., Spandidos, D.A., Mccubrey, J.A., Candido, S., Libra, M., 2018. Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (Review). *Int. J. Oncol.* 52, 1071–1080. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>.
- Li, G., Zhou, J., Budhraj, A., Hu, X., Chen, Y., Cheng, Q., Liu, L., Zhou, T., Li, P., Liu, E., Gao, N., 2015. Mitochondrial translocation and interaction of cofilin and Drp1 are required for erucin-induced mitochondrial fission and apoptosis. *Oncotarget* 6, 1834–1849. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2795>.
- Li, G.B., Zhang, H.W., Fu, R.Q., Hu, X.Y., Liu, L., Li, Y.N., Liu, Y.X., Liu, X., Hu, J.J., Deng, Q., Luo, Q.S., Zhang, R., Gao, N., 2018. Mitochondrial fission and mitophagy depend on cofilin-mediated actin depolymerization activity at the mitochondrial fission site. *Oncogene* 37, 1485–1502. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0064-4>.
- Liu, W., Le, A., Hancock, C., Lane, A.N., Dang, C.V., Fan, T.W.-M., Phang, J.M., 2012. Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8983–8988. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203244109>.
- Liu, K.Y., Mistry, R.J., Aguirre, C.A., Fasouli, E.S., Thomas, M.G., Klamt, F., Ramsden, D.B., Parsons, R.B., 2015. Nicotinamide N-methyltransferase increases complex I activity in SH-SY5Y cells via sirtuin 3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 467, 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.023>.
- Liu, X., Zhang, S.-M., McGeary, M.K., Krykbaeva, I., Lai, L., Jansen, D.J., Kales, S.C., Simeonov, A., Hall, M.D., Kelly, D.P., Bosenberg, M.W., Yan, Q., 2019. KDM5B promotes drug resistance by regulating melanoma propagating cell subpopulations. *Mol. Cancer Ther.* 18, 706–717. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.ct18-0395>.
- Luis, R., Brito, C., Pojo, M., 2019. Melanoma metabolism: cell survival and resistance to therapy. In: Serpa, J. (Ed.), *Tumor Microenvironment. The Main Driver of Metabolic Adaptation*. Springer, Cham, pp. 203–233.
- Luther, C., Swami, U., Zhang, J., Milhem, M., Zakharia, Y., 2019. Advanced stage melanoma therapies : detailing the present and exploring the future. *Crit. Rev. Oncol. / Hematol.* 133, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.11.002>.
- Maccalli, G., Parmiani, G., Ferrone, S., 2017. Immunomodulating and immunoresistance properties of cancer-initiating cells: implications for the clinical success of immunotherapy. *Immunol. Invest.* 46, 221–238. <https://doi.org/10.1080/08820139.2017.1280051>.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shiptsin, M., Campbell, L.L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., Weinberg, R.A., 2008. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133, 704–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>.
- Marchetti, P., Trinh, A., Khamari, R., Kluzza, J., 2018. Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1862, 999–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.01.018>.
- Margue, C., Philippidou, D., Reinsbach, S.E., Schmitt, M., Behrmann, I., Kreis, S., 2013. New target genes of MITF-induced microRNA-211 contribute to melanoma cell invasion. *PLoS One* 8, e73473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073473>.
- Martin, S., Dudek-Peric, A.M., Garg, A.D., Roose, H., Demirsoy, S., Van Eygen, S., Mertens, F., Vangheluwe, P., Vankelecom, H., Agostinis, P., 2017. An autophagy-driven pathway of ATP secretion supports the aggressive phenotype of BRAFV600E inhibitor-resistant metastatic melanoma cells. *Autophagy* 13, 1512–1527. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1332550>.
- Mazar, J., Qi, F., Lee, B., Marchica, J., Govindarajan, S., Shelley, J., Li, J.-L., Ray, A., Perera, R.J., 2016. MicroRNA 211 functions as a metabolic switch in human melanoma cells. *Mol. Cell Biol.* 36, 1090–1108. <https://doi.org/10.1128/mcb.00762-15>.
- Mendelsohn, A.R., Larrick, J.W., 2017. The NAD+ / PARP1 / SIRT1 Axis in aging. *Rejuvenation Res.* 20, 244–247. <https://doi.org/10.1089/rej.2017.1980>.
- Miskolczi, Z., Smith, M.P., Rowling, E.J., Ferguson, J., Barrasso, J., Wellbrock, C., 2018. Collagen abundance controls melanoma phenotypes through lineage-specific micro-environment sensing. *Oncogene* 37, 3166–3182. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0209-0>.
- Möller, K., Sigurbjörnsdóttir, S., Arnthorsson, A.O., Pogenberg, V., Dilshat, R., Fock, V., Brynjólfsdóttir, S.H., Bindesboll, C., Bessadottir, M., Ögmundsdóttir, H.M., Simonsen, A., Larue, L., Wilmanns, M., Thorsson, V., Steingrímsson, E., Ögmundsdóttir, M.H., 2019. MITF has a central role in regulating starvation-induced autophagy in melanoma. *Sci. Rep.* 9, 1055. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37522-6>.
- Montero, J., Sarosiek, K.A., Deangelo, J.D., Maertens, O., Ryan, J., Ercan, D., Piao, H., Horowitz, N.S., Berkowitz, R.S., Matulonis, U., Jänne, P.A., Amrein, P.C., Cichowski, K., Drapkin, R., Letai, A., 2015. Drug-Induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell* 160, 977–989. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.042>.
- Morales, D.R., Morris, A.D., 2014. Metformin in Cancer treatment and prevention. *Annu. Rev. Med.* 66, 17–29. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093128>.

- Najem, A., Krayem, M., Salès, F., Hussein, N., Badran, B., Robert, C., Awada, A., Journe, F., Ghanem, G.E., 2017. P53 and MTF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. *Eur. J. Cancer* 83, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.06.033>.
- Nakagawa, H., Facompre, N.D., Belden, Z., Roesch, A., Whelan, K., Ramaswamy, S., Harmeyer, K.M., Herlyn, M., Tanaka, K., Basu, D., Sole, X., Gimotty, P.A., Kabraji, S., Rustgi, A.K., Montone, K.T., Sahu, V., Weinstein, G.S., 2016. JARID1B enables transit between distinct states of the stem-like cell population in oral cancers. *Cancer Res.* 76, 5538–5549. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-15-3377>.
- Noguchi, F., Inui, S., Fedele, C., Shackleton, M., Itami, S., 2017a. Calcium-dependent enhancement by extracellular acidity of the cytotoxicity of mitochondrial inhibitors against melanoma. *Mol. Cancer Ther.* 16, 936–947. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-15-0235>.
- Noguchi, K., Dalton, A.C., Howley, B.V., McCall, B.J., Yoshida, A., Alan Diehl, J., Howe, P.H., 2017b. Interleukin-like EMT inducer regulates partial phenotype switching in MITF-low melanoma cell lines. *PLoS One* 12, e0177830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177830>.
- Nowell, P., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 80- (194), 23–28.
- O'Day, S.J., Eggermont, A.M.M., Chiarion-Sileni, V., Kefford, R., Grob, J.J., Mortier, L., Robert, C., Schachter, J., Testori, A., Mackiewicz, J., Friedlander, P., Garbe, C., Ugurel, S., Collichio, F., Guo, W., Lufkin, J., Bahcall, S., Vukovic, V., Hauschild, A., 2013. Final results of phase III SYMMETRY study: randomized, double-blind trial of elesclomol plus paclitaxel versus paclitaxel alone as treatment for chemotherapy-naïve patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.* 31, 1211–1218. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.44.5585>.
- Ohanna, M., Bonet, C., Bille, K., Allegra, M., Davidson, I., Bahadoran, P., Lacour, J.-P., Ballotti, R., Bertolotto, C., 2014. SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Oncotarget* 5, 2085–2095. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1791>.
- Ohanna, M., Cerezo, M., Nottet, N., Bille, K., Didier, R., Beranger, G., Mograbi, B., Rocchi, S., Yvan-Charvet, L., Ballotti, R., Bertolotto, C., 2018. Pivotal role of NAMPT in the switch of melanoma cells toward an invasive and drug-resistant phenotype. *MedicineSciences* 34, 1025–1028. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018283>.
- Ostyn, P., Machhour, R.E.I., Begard, S., Kotecki, N., Vandomme, J., Flamenco, P., Segard, P., Masselot, B., Formstecher, P., Touil, Y., Polakowska, R., 2014. Transient TNF regulates the self-renewal capacity of stem-like label-retaining cells in sphere and skin equivalent models of melanoma. *Cell Commun. Signal* 12, 52. <https://doi.org/10.1186/s12964-014-0052-z>.
- Ozturk, D.G., Kocak, M., Akcay, A., Kinoglu, K., Kara, E., Buyuk, Y., Kazan, H., Gozuacik, D., 2019. MITF-MIR211 axis is a novel autophagy amplifier system during cellular stress. *Autophagy* 15, 375–390. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1531197>.
- Parsons, R.B., Aravindan, S., Kadampeswaran, A., Evans, E.A., Sandhu, K.K., Levy, E.R., Thomas, M.G., Austen, B.M., Ramsden, D.B., 2011. The expression of nicotinamide N-methyltransferase increases ATP synthesis and protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against the toxicity of Complex I inhibitors. *Biochem. J.* 436, 145–155. <https://doi.org/10.1042/BJ20101685>.
- Perego, M., Maurer, M., Wang, J.X., Shaffer, S., Müller, A.C., Parapatics, K., Li, L., Hristova, D., Shin, S., Keeney, F., Liu, S., Xu, X., Raj, A., Jensen, J.K., Bennett, K.L., Wagner, S.N., Somasundaram, R., Herlyn, M., 2018. A slow-cycling subpopulation of melanoma cells with highly invasive properties. *Oncogene* 37, 302–312. <https://doi.org/10.1038/ncr.2017.341>.
- Pérez-Alea, M., Mcgrail, K., Sánchez-Redondo, S., Ferrer, B., Fournet, G., Cortés, J., Muñoz, E., Hernandez-Losa, J., Tenbaum, S., Martin, G., Costello, R., Ceylan, I., Garcia-Patos, V., Recio, J.A., 2017. ALDH1A3 is epigenetically regulated during melanocyte transformation and is a target for melanoma treatment. *Oncogene* 36, 5695–5708. <https://doi.org/10.1038/ncr.2017.160>.
- Perotti, V., Baldassari, P., Molla, A., Vegetti, C., Bersani, I., Maurichi, A., Santinami, M., Anichini, A., Mortarini, R., 2015. NFATc2 is an intrinsic regulator of melanoma dedifferentiation. *Oncogene* 35, 2862–2872. <https://doi.org/10.1038/ncr.2015.355>.
- Perotti, V., Baldassari, P., Molla, A., Nicolini, G., Bersani, I., Grazia, G., Benigni, F., Maurichi, A., Santinami, M., Anichini, A., Mortarini, R., 2019. An actionable axis linking NFATc2 to E2H2 controls the EMT-like program of melanoma cells. *Oncogene* 38, 4384–4396. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0729-2>.
- Petrachi, T., Romagnani, A., Albini, A., Longo, C., Argenziano, G., Grisendi, G., Dominici, M., Ciarrocchi, A., Dallaglio, K., 2017. Therapeutic potential of the metabolic modulator phenformin in targeting the stem cell compartment in melanoma. *Oncotarget* 8, 6914. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14321>.
- Pinc, A., Somasundaram, R., Wagner, C., Hörmann, M., Karanikas, G., Jalili, A., Bauer, W., Brunner, P., Grabmeier-Pfistershammer, K., Gschaidner, M., Lai, C.Y., Hsu, M.Y., Herlyn, M., Stingl, G., Wagner, S.N., 2012. Targeting CD20 in melanoma patients at high risk of disease recurrence. *Mol. Ther.* 20, 1056–1062. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.27>.
- Popow-Woźniak, A., Mazur, A.J., Mannherz, H.G., Malicka-Błaszkiewicz, M., Nowak, D., 2012. Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells. *Histochem. Cell Biol.* 138, 725–736. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0988-2>.
- Prager, B.C., Xie, Q., Bao, S., Rich, J.N., 2019. Cancer stem cells: the architects of the tumor ecosystem. *Cell Stem Cell* 24, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.009>.
- Quintana, E., Shackleton, M., Sabel, M.S., Fullen, D.R., Johnson, T.M., Morrison, S.J., 2008. Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature* 456, 593–598. <https://doi.org/10.1038/nature07567>.
- Quintana, E., Shackleton, M., Foster, H.R., Fullen, D.R., Sabel, M.S., Johnson, T.M., Morrison, S.J., 2010. Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized. *Cancer Cell* 18, 510–523. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.10.012>.
- Ratnikov, B., Aza-Blanc, P., Ronai, Z.A., Smith, J.W., Osterman, A.L., Scott, D.A., 2015. Glutamate and asparagine catabolism underlie glutamine addiction in melanoma. *Oncotarget* 6, 7379–7389. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3132>.
- Ratnikov, B.I., Scott, D.A., Osterman, A.L., Smith, J.W., Ronai, Z.A., 2017. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene* 36, 147–157. <https://doi.org/10.1038/ncr.2016.198>.
- Redmer, T., Welte, Y., Behrens, D., Fichtner, I., Przybilla, D., Wruck, W., Yaspo, M.L., Lehrach, H., Schäfer, R., Regenbrecht, C.R.A., 2014. The nerve growth factor receptor CD271 is crucial to maintain tumorigenicity and stem-like properties of melanoma cells. *PLoS One* 9, e92596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092596>.
- Rehklau, K., Hoffmann, L., Gurniak, C.B., Ott, M., Witke, W., Scorrano, L., Culmsee, C., Rust, M.B., 2017. Cofilin-1-dependent actin dynamics control DRP1-mediated mitochondrial fission. *Cell Death Dis.* 8, e3063. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.448>.
- Reim, F., Dombrowski, Y., Ritter, C., Buttman, M., Häusler, S., Ossadnik, M., Krockenberger, M., Beier, D., Beier, C.P., Dietl, J., Becker, J.C., Hönig, A., Wischhusen, J., 2009. Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44high/CD24 low/HER2low breast cancer stem cells. *Cancer Res.* 69, 8058–8066. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0834>.
- Reitman, Z.J., Yan, H., 2010. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 932–941. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq187>.
- Reyes-Urbe, P., Adrianzen-Ruesta, M.P., Deng, Z., Echevarria-Vargas, I., Mender, I., Saheb, S., Liu, Q., Altieri, D.C., Murphy, M.E., Shay, J.W., Lieberman, P.M., Villanueva, J., 2018. Exploiting TERT dependency as a therapeutic strategy for NRAS-mutant melanoma. *Oncogene* 37, 4058–4072. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0247-7>.
- Rodrigues, M.F., Obre, E., de Melo, F.H.M., Santos, G.C., Galina, A., Jasiulionis, M.G., Rossignol, R., Rumjanek, F.D., Amoedo, N.D., 2016. Enhanced OXPHOS, glutaminolysis and β -oxidation constitute the metastatic phenotype of melanoma cells. *Biochem. J.* 473, 703–715. <https://doi.org/10.1042/bj20150645>.
- Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., Herlyn, M., 2010. A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141, 583–594. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.020>.
- Roesch, A., Vultur, A., Bokeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Korbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E., Krause, E., Patzold, S., Villanueva, J., Krepler, C., Fukunaga-Kalabis, M., Hoth, M., Bastian, B.C., Vogt, T., 2013a. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1Bhigh cells. *Cancer Cell* 23, 811–825. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.003>.
- Roesch, A., Vultur, A., Bokeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D., Korbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E., Krause, E., Patzold, S., Villanueva, J., Krepler, C., Fukunaga-Kalabis, M., Hoth, M., Bastian, B.C., Vogt, T., Herlyn, M., 2013b. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial. *Cancer Cell* 23, 811–825. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.003>.
- Sahoo, A., Sahoo, S.K., Joshi, P., Lee, B., Perera, R.J., 2019. MicroRNA-211 loss promotes metabolic vulnerability and BRAF inhibitor sensitivity in melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 139, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.06.189>.
- Sartini, D., Seta, R., Pozzi, V., Morganti, S., Rubini, C., Zizzi, A., Tomasetti, M., Santarelli, L., Emanuelli, M., 2015. Role of nicotinamide N-methyltransferase in non-small cell lung cancer: in vitro effect of shRNA-mediated gene silencing on tumorigenicity. *Biol. Chem.* 396, 225–234. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0231>.
- Scarpulla, R.C., 2011. Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 1813, 1269–1278. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2010.09.019>.
- Scharching, N.E., Menk, A.V., Whetstone, R.D., Zeng, X., Delgoffe, G.M., 2017. Efficacy of PD-1 blockade is potentiated by metformin-induced reduction of tumor hypoxia. *Cancer Immunol. Res.* 5, 9–16. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.cir-16-0103>.
- Schmitt, R.J., Kreidler, S.M., Glueck, D.H., Amaria, R.N., Gonzalez, R., Lewis, K., Bagrosky, B.M., Kwak, J.J., Koo, P.J., 2018. Correlation between early FDG PET/CT response to BRAF and MEK inhibition and survival in patients with BRAF-mutant metastatic melanoma. *Pathol. Melanocytic Tumors* 37, 314–329. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-37457-6.00027-4>.
- Serasinghe, M.N., Wieder, S.Y., Renault, T.T., Elkholi, R., Asciola, J.J., Yao, J.L., Jabado, O., Hoehn, K., Kageyama, Y., Sesaki, H., Chipuk, J.E., 2015. Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors. *Mol. Cell* 57, 521–536. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.003>.
- Serasinghe, M.N., Gelles, J.D., Li, K., Zhao, L., Abbate, F., Syku, M., Mohammed, J.N., Badal, B., Rangel, C.A., Hoehn, K.L., Celebi, J.T., Chipuk, J.E., 2018. Dual suppression of inner and outer mitochondrial membrane functions augments apoptotic responses to oncogenic MAPK inhibition. *Cell Death Dis.* 9, 29. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0044-1>.
- Shigekawa, Y., Hayami, S., Ueno, M., Miyamoto, A., Suzuki, N., Kawai, M., Hirono, S., Okada, K., Hamamoto, R., Yamaue, H., 2018. Overexpression of KDM5B/JARID1B is associated with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncol. Ther.* 9, 34320–34335. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26144>.
- Smith, M.P., Rana, S., Ferguson, J., Rowling, E.J., Flaherty, K.T., Wargo, J.A., Marais, R., Wellbrock, C., 2019. A PAX3/BRN2 rheostat controls the dynamics of BRAF mediated MITF regulation in MITFhigh/AXLlow melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 32, 280–291. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12741>.
- Sullivan, R.J., Flaherty, K.T., 2013. Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma. *Eur. J. Cancer* 49, 1297–1304. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.11.019>.
- Sun, C., Wang, L., Huang, S., Heynen, G.J.J.E., Prahallad, A., Robert, C., Haanen, J.,

- Blank, C., Wesseling, J., Willems, S.M., Zecchin, D., Hobar, S., Bajpe, P.K., Liefink, C., Mateus, C., Vagner, S., Grenrum, W., Hofland, I., Schlicker, A., Wessels, L.F.A., Beijersbergen, R.L., Bardelli, A., Di Nicolantonio, F., Eggermont, A.M.M., Bernards, R., 2014. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature* 508, 118–122. <https://doi.org/10.1038/nature13121>.
- Sztiller-Sikorska, M., Koprowska, K., Majchrzak, K., Hartman, M., Czyz, M., 2014. Natural compounds' activity against cancer stem-like or fast-cycling melanoma cells. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090783>.
- Theodosakis, N., Held, M.A., Marzuka-Alcala, A., Meeth, K.M., Micevic, G., Long, G.V., Scolyer, R.A., Stern, D.F., Bosenberg, M.W., 2015. BRAF inhibition decreases cellular glucose uptake in melanoma in association with reduction in cell volume. *Mol. Cancer Ther.* 14, 1680–1692. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-15-0080>.
- Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S.M., Wadsworth, M.H., Treacy, D., Trombetta, J.J., Rotem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., Fallahi-Sichani, M., Dutton-Regester, K., Lin, J.R., Cohen, O., Shah, P., Lu, D., Genshaft, A.S., Hughes, T.K., Ziegler, C.G.K., Kazer, S.W., Gaillard, A., Kolb, K.E., Villani, A.C., Johannessen, C.M., Andreev, A.Y., Van Allen, E.M., Bertagnoli, M., Sorger, P.K., Sullivan, R.J., Flaherty, K.T., Frederick, D.T., Jané-Valbuena, J., Yoon, C.H., Rozenblatt-Rosen, O., Shalek, A.K., Regev, A., Garraway, L.A., 2016. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352(6298), 189–196. <https://doi.org/10.1126/science.1243449>.
- Trousil, S., Chen, S., Mu, C., Shaw, F.M., Yao, Z., Ran, Y., Shakuntala, T., Merghoub, T., Manstein, D., Rosen, N., Cantley, L.C., Zippin, J.H., Zheng, B., 2017. Phenformin enhances the efficacy of ERK inhibition in NF1-Mutant melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 137, 1135–1143. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.01.013>.
- Ulanovskaya, O.A., Zuhl, A.M., Cravatt, B.F., 2013. NNMT promotes epigenetic remodeling in cancer by creating a metabolic methylation sink. *Nat. Chem. Biol.* 9, 300–306. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1204>.
- Vazquez, F., Lim, J.H., Chim, H., Bhalla, K., Girmun, G., Pierce, K., Clish, C.B., Granter, S.R., Widlund, H.R., Spiegelman, B.M., Puigserver, P., 2013. PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell* 23, 287–301. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.020>.
- Vlčková, K., Vachtenheim, J., Réda, J., Horák, P., Ondrušová, L., 2018. Inducibly decreased MITF levels do not affect proliferation and phenotype switching but reduce differentiation of melanoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 2240–2251. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13506>.
- Vogel, F.C.E., Bordağ, N., Zügner, E., Trajkovic-Arsic, M., Chauvistré, H., Shannan, B., Váraljai, R., Horn, S., Magnes, C., Siveke, J., Schadendorf, D., Roesch, A., 2019. Targeting the H3K4 demethylase KDM5B reprograms the metabolome and phenotype of melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.06.124>.
- Wang, C., Zhao, L., Su, Q., Fan, X., Wang, Y., Gao, S., Wang, H., Chen, H., Chan, C.B., Liu, Z., 2016. Phosphorylation of MITF by AKT affects its downstream targets and causes TP53-dependent cell senescence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 80, 132–142. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.029>.
- Weiss, S.A., Wolchok, J.D., Sznol, M., 2019. Immunotherapy of melanoma: facts and hopes. *Clin. Cancer Res.* 25, 5191–5201. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1550>.
- Wickremesekera, A.C., Brasch, H.D., Lee, V.M., Davis, P.F., Woon, K., Johnson, R., Tan, S.T., Itinteang, T., 2019. Expression of cancer stem cell markers in metastatic melanoma to the brain. *J. Clin. Neurosci.* 60, 112–116. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2018.10.068>.
- Wieder, S.Y., Serasinghe, M.N., Sung, J.C., Choi, D.C., Birge, M.B., Yao, J.L., Bernstein, E., Celebi, J.T., Chipuk, J.E., 2015. Activation of the mitochondrial fragmentation protein DRP1 correlates with BRAFV600E melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 135, 2544–2547. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.196>.
- Wong, C.C., Qian, Y., Yu, J., 2017. Interplay between epigenetics and metabolism in oncogenesis: mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene* 36, 3359–3374. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.485>.
- Wouters, J., Stas, M., Govaere, O., Barrette, K., Dudek, A., Vankelecom, H., Haydu, L.E., Thompson, J.F., Scolyer, R.A., Van Den Oord, J.J., 2014. A novel hypoxia-associated subset of FN1 high MITF low melanoma cells: identification, characterization, and prognostic value. *Mod. Pathol.* 27, 1088–1100. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.228>.
- Yang, G., Li, Y., Nishimura, E.K., Xin, H., Zhou, A., Guo, Y., Dong, L., Denning, M.F., Nickoloff, B.J., Cui, R., 2008. Inhibition of PAX3 by TGF- β modulates melanocyte viability. *Mol. Cell* 32, 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.11.002>.
- Yeung, S.J., Pan, J., Lee, M.H., 2008. Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3981–3999. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8224-x>.
- Yu, H., Yang, W., 2016. MiR-211 is epigenetically regulated by DNMT1 mediated methylation and inhibits EMT of melanoma cells by targeting RAB22A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 476, 400–405. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.133>.
- Yu, T., Wang, Y.T., Chen, P., Li, Y.H., Chen, Y.X., Zeng, H., Yu, A.M., Huang, M., Bi, H.C., 2015. Effects of nicotinamide n-methyltransferase on PANC-1 cells proliferation, metastatic potential and survival under metabolic stress. *Cell. Physiol. Biochem.* 35, 710–721. <https://doi.org/10.1159/000369731>.
- Yuan, P., Ito, K., Perez-Lorenzo, R., Del Guzzo, C., Lee, J.H., Shen, C.H., Bosenberg, M.W., McMahon, M., Cantley, L.C., Zheng, B., 2013. Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAFV600E inhibition in melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 18226–18231. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317577110>.
- Zeng, L., Zhao, Y., Ouyang, T., Zhao, T., Zhang, S., Chen, J., Yu, J., Lei, T., 2016. Label-retaining assay enriches tumor-initiating cells in glioblastoma spheres cultivated in serum-free medium. *Oncol. Lett.* 12, 815–824. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4690>.
- Zhang, G., Brafford, P., Wei, Z., Xu, Wei, Dimwamwa, E., Ope, O., Xiao, M., Xu, X., Zha, S., Randell, S., Ghosh, A., Shannan, B., Flaherty, K.T., Karakousis, G.C., Gangadhar, T.C., Wu, L., Lu, Y., Schuchter, L.M., Srinivasan, S., Krepler, C., Frederick, D.T., Herlyn, M., Mills, G.B., Wargo, J.A., Chae, Y.C., Zhang, D., Guha, M., Liu, Q., Zhang, J., Liu, J., Altieri, D.C., Xu, Weiting, Davies, M.A., Zhang, G., Sprosser, K., Choi, H., Tian, T., Basu, D., Amaravadi, R.K., Gu, M., Weeraratna, A., Avadhani, N.G., Xu, C., 2016. Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J. Clin. Invest.* 126, 1834–1856. <https://doi.org/10.1172/jci82661>.
- Zheng, B., Jeong, J.H., Asara, J.M., Yuan, Y.Y., Granter, S.R., Chin, L., Cantley, L.C., 2009. Oncogenic B-RAF negatively regulates the tumor suppressor LKB1 to promote melanoma cell proliferation. *Mol. Cell* 33, 237–247. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.026>.

Ivi Juliana Bristot MSc and Camila Kehl Dias have been studying the role of cancer metabolism, participating in several collaborations due to their skills in *High Resolution Respirometry*. Ivi Juliana Bristot is a PhD student, investigating the influence of metabolism in melanoma heterogeneity and aggressiveness.

Camila Kehl Dias has started her MSc in biochemistry, focusing in acute leukemias metabolism and imunobiochemistry.

Henrique Chapola is a MSc student, his studies are based on database prospection and systems biology to understand the influence of cofilin-1 expression and regulation of other factors on the molecular biology of cancer.

Dr. Richard Parsons is a Senior Lecturer in Biochemical Toxicology in the School of Cancer & Pharmaceutical Sciences of King's College London, being a pioneer in the study of the enzyme N-methyltransferase (NNMT).

Prof. Fábio Klamt PhD leads a research group that have been working with cancer cell biology for the last 20 years at the Laboratory of Cellular Biochemistry – ICBS/UFGRS, as well as being part of the Mitochondria and Cell Research - the Orboros Ecosystem. His group established a method for diagnosis and/or prognosis using cofilin-1 as a biomarker in lung cancer. Nowadays, there has been studied as a possible biomarker in melanoma aggressiveness

CAPÍTULO II

Manuscrito a ser submetido para publicação:

Bioenergetics And Mitochondrial Dynamics In *Slow-Cycling* Melanoma Cells

Revista: The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

Qualis-CAPES-CBII: A2

Fator de Impacto: 5.652

Justificativa: Diversas evidências indicam que a recidiva de pacientes com melanoma está relacionada a uma subpopulação de células caracterizadas por uma lenta taxa de proliferação celular. Nesse sentido, nosso grupo estabeleceu um modelo celular com diferentes níveis de agressividade e uma das linhagens demonstrou alta capacidade metastática, mas crescimento tumoral lento.

Objetivo geral: O objetivo desse manuscrito foi analisar se o modelo de agressividade composto pelas células A7 e G10 pode ser utilizado no estudo de células de ciclagem lenta.

Objetivo específico: Caracterizar o perfil de proliferação, a expressão de biomarcadores de ciclagem lenta e, principalmente, explorar os estados bioenergéticos celulares das células A7 e G10, e avaliar o potencial desse modelo celular pré-clínico para o estudo de mecanismos moleculares e celulares subjacente ao fenótipo de ciclagem lenta no melanoma.

CAPÍTULO III

Manuscrito a ser submetido para publicação

Slow-cycling cells in melanoma: “Now you see it (preclinical); Now you don’t (at the clinic)”

Justificativa: Estudos recentes em modelos celulares pré-clínicos sugerem que fatores não genéticos desempenham um papel importante na heterogeneidade do melanoma, especialmente relacionados com o desenvolvimento de células de ciclagem lenta, mas o seu papel no diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento de pacientes com melanoma ainda não foi estabelecido.

Objetivo geral: Investigar a relevância clínica do perfil descrito como fenótipo *MITF*^{low} de ciclagem lenta em pacientes com melanoma.

Objetivos específicos: Prospectar e estabelecer uma lista de genes que possa ser usado para caracterizar o perfil *MITF*^{low} de ciclagem lenta e analisar a rede de interatoma de proteínas para avaliar as funções biológicas por trás desse fenótipo. Além disso, buscamos investigar a relevância clínica desta lista de genes de ciclagem lenta através da análise da sua capacidade prognóstica e preditiva em conjuntos de dados de microarranjo e RNAseq de diferentes amostras clínicas derivadas de pacientes, disponíveis no repositório público *Gene Expression Omnibus* (GEO).

PARTE III

DISCUSSÃO

O melanoma é o tipo de câncer de pele mais agressivo, apresentando alta capacidade metastática. A taxa de sobrevida global para essa neoplasia pode variar dependendo de vários fatores, incluindo o estágio clínico do câncer no momento do diagnóstico, o tamanho e a localização do tumor (Leonardi et al., 2018). De acordo com a *American Cancer Society*, a taxa de sobrevivência de 5 anos para o melanoma não-metastático é de cerca de 98%, mas cai para cerca 22% quando diagnosticado em estágio IV (American Cancer Society, 2015). A aprovação pelo FDA para o uso de terapias alvo para pacientes com mutações BRAF e imunoterapias com os anticorpos anti-PD-1 e anti-CTLA-4 no melanoma revolucionaram o tratamento desse tipo de câncer e trouxeram uma nova perspectiva para as pessoas com melanoma em estágio IV (Leonardi et al., 2018). Contudo, a resposta à terapia-alvo é muitas vezes limitada pelo desenvolvimento de resistência por meio de diferentes mecanismos moleculares e os pacientes que progridem após o tratamento com os inibidores de BRAF e MEK e falha da imunoterapia, têm um prognóstico ruim, pois a quimioterapia paliativa é a única opção adicional atualmente disponível fora dos ensaios clínicos (Lee et al., 2020). Desafiando o conceito de que mutações secundárias seriam selecionadas na resistência adquirida, uma variedade de mecanismos não genéticos permite a essas células cancerígenas adaptarem, rapidamente, seu programa transcricional e/ou metabólico para atender e sobreviver à pressão terapêutica, representam um novo desafio que requer estratégias inovadoras para monitorar e neutralizar esses processos adaptativos.

No **capítulo I** deste trabalho consta o resultado de uma revisão da literatura, já publicado na revista *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Bristot et al., 2020), onde elencamos informações, muitas vezes conflitantes, que relatam características biológicas na mudança transitória (por pressão terapêutica ou microambiental) para um fenótipo invasivo e resistente ao tratamento. Inicialmente, o objetivo desse trabalho foi caracterizar um perfil

celular emergente na literatura identificado pela sua baixa taxa proliferativa, mas com nomenclatura não harmônica, sendo chamado de célula de ciclagem lenta, células em um estado semelhantes à senescência (do inglês: *senescent-like cell*), células semelhantes à célula tronco (*stem-like cells*), fenótipo dormente e invasivo (do inglês: *dormant-invasive phenotype*). Nesse sentido, observamos que muitos marcadores foram propostos para rastrear esse fenótipo, destacando-se os níveis de expressão do regulador mestre da diferenciação de melanócitos MITF. Através dessa revisão, listamos 49 fatores biológicos relacionados com resistência e/ou metástase no melanoma, e associamos à expressão do MITF estava alta, baixa ou se não foi analisada. Apesar da grande maioria dos artigos relacionar o fenótipo agressivo/resistente a um perfil com baixa expressão de MITF, características semelhantes às células-tronco cancerígenas, como aumento da via sinalização ERBB e transição epitelio-mesenquimal, já foram observadas em células resistentes após o tratamento que superexpressavam MITF (Fig. 9).

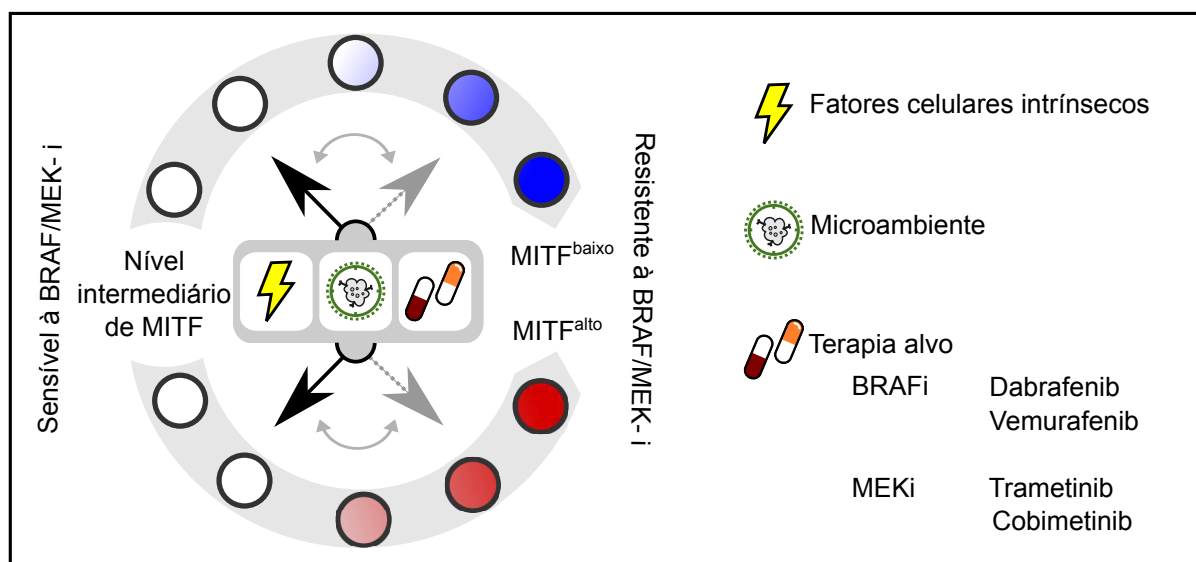


Figura 9 As células de melanoma apresentam uma capacidade transitória de mudar seu status de expressão gênica para mais ou menos resistente/invasivo sob microambiente, fatores intrínsecos celulares ou pressão terapêutica. Embora o fenótipo resistente não exista necessariamente em uma única assinatura de expressão gênica, os níveis de MITF têm sido relacionados como um indicador desse estado celular. BRAFi (inibidor de BRAF); MEKi (inibidor de MEK).

Contudo, diversos estudos apontam, independente dos níveis de MITF, uma marcante alteração metabólica, onde as células do melanoma acabam adquirindo um perfil de oxidação

mitocondrial em resposta ao tratamento. Dessa forma, esse artigo descreve a heterogeneidade presente no melanoma, sua plasticidade em resposta ao ambiente, e foca na capacidade dinâmica dessa neoplasia de alterar o metabolismo para um estado oxidativo, alterações morfológicas na mitocôndria que resultam em uma malha mitocondrial mais alongada e ramificada, e como o metabolismo sustenta processos epigenéticos nessas células. Devido a esse artigo, os autores foram convidados a escrever um capítulo do livro “O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2” da editora Atena, que, utilizando-se uma linguagem menos técnica, disserta sobre a reprogramação metabólica na resistência ao tratamento quimioterápico. Ele se encontra no **Anexo 1** dessa tese.

Dados publicados recentemente na revista *Nature* reforçam a dualidade da expressão de MITF no melanoma. Chauvistré e colegas demonstraram que a hiperativação de *JARID1B* (*KDM5B* – do inglês: *Lysine-specific demethylase 5B*) promoveu um fenótipo resistente a BRAFⁱ caracterizado por células de ciclagem lenta e alta expressão dos genes *MITF*, *DCT* (do inglês: *dual-clutch transmission*), *TYR* (do inglês: *tyrosinase*) e *MLANA* (Chauvistré et al., 2022). Enquanto Simmons e colaboradores observaram que o fenótipo de células de melanoma com baixa expressão de MITF e alta expressão do fator de transcrição BRN2, também conhecido como MITF^{baixo}/BRN2^{alto}, apresenta alta capacidade metastática. Eles também demonstraram que ambos os fatores de transcrição são necessários para o crescimento metastático *in vivo* (Simmons et al., 2017). Além disso, foi observado que o RNA mitocondrial molda a plasticidade metabólica no melanoma e a incapacidade de alterar o metabolismo glicolítico para OXPHOS diminui a capacidade metastática (Delaunay et al., 2022).

A compreensão de que o câncer é uma doença genética causada por alterações nos genes que controlam a sobrevivência e proliferação moldou o olhar dos cientistas sobre essa enfermidade. Contudo, a noção de que múltiplos estados fenotípicos dentro de uma massa tumoral podem ter o mesmo genoma, e que células cancerígenas podem alternar entre esses

estados está ganhando maior reconhecimento (Diener et al., 2021; Hossain et al., 2022; Puig et al., 2018). Assim, o estabelecimento de modelos de agressividade, tanto para a ampliar o nosso conhecimento sobre a heterogeneidade tumoral, quanto para a compreensão dos mecanismos que possibilitam às células de ciclagem lenta resistirem aos tratamentos convencionais se faz necessário.

Nesse sentido, ao explorar o papel das ERO no melanoma, nosso grupo de pesquisa estabeleceu previamente um modelo de células com distintos níveis agressividade em colaboração com o INN - Nodo CAC, CNEA, Argentina. Esse modelo foi estabelecido através da transfecção e superexpressão constitutiva de Catalase na linhagem celular humana A375, que originou os fenótipos estáveis A7 e G10, que, apesar de apresentarem o mesmo perfil genético, diferem na resposta redox, pigmentação e estado de diferenciação/dediferenciação. Nesse estudo, observamos uma alta capacidade metastática em G10 pelo ensaio de migração celular por cicatrização (*Wound Healing*). Contudo, G10 produziu tumores com 40 dias de atraso de crescimento em comparação com A7 e as células controle em modelo de *xeno enxerto* (Bracalente et al., 2016b). Além disso, G10 foi o único fenótipo do modelo de células capaz de produzir nódulos metastáticos no pulmão no modelo de inoculação intravenosa na veia caudal média em roedores. Assim, no **capítulo II** dessa tese, nós exploramos características relacionadas ao fenótipo de ciclagem lenta descrito no artigo de revisão (**capítulo I**) nesse nas células A7 e G10 com o intuito de compreender a capacidade heterogênea desse modelo e verificar se G10 apresenta enriquecimento de características desse fenótipo.

Inicialmente, analisamos o tempo de duplicação e identificamos que a célula A375 e A7 apresentam um tempo de duplicação constante independente da densidade de células inicial. Contudo, G10 é capaz de ajustar seu crescimento e retardar a duplicação da população em ambientes populosos, mostrando uma característica de inibição por contato, enquanto A7 se torna inviável nesta situação. Além disso, nós observamos um acúmulo de células na fase

G₀/G₁ do ciclo celular e aumento na atividade de SA-β-gal em sub-confluência. A descrição de células de ciclagem lenta é comumente associada a um estado transitório semelhante à senescência celular, caracterizado por parada transitória do ciclo celular, já foram relatados em muitas malignidades, conferindo citoproteção contra quimioterapia e formação de esferóides enriquecidos com marcadores de células-tronco, como SOX2 (Sachdeva et al., 2019; Yin et al., 2011).

Bracalente e colaboradores também demonstraram que A7 produz grandes tumores pigmentados *in vivo* devido ao aumento no conteúdo de melanina, atividade de TYR e expressão de *TYRP1*, enquanto G10 produziu tumores necróticos e apigmentados (Bracalente et al., 2016b, 2016a). Corroborando com esses resultados, analisando os dados de microarranjo aqui apresentados, demonstramos que G10 também apresenta expressão gênica características do estado indiferenciado, como alta expressão de *POU3F2*, *AXL* e *TGFBI*. O TGFβ desempenha um papel essencial na manutenção do estado invasivo pela estimulação indireta de N-caderina, induzindo transição epitelio-mesenquimal e características de células-tronco ao ativar a via ERBB (Bristot et al., 2020). Modelos que tentam estabelecer esse fenótipo invasivo de ciclagem lenta pelo silenciamento de MITF produziram células com parada em G₀/G₁ (Cheli et al., 2011). Contudo, o silenciamento constitutivo de MITF impede a capacidade metastática (Cheli et al., 2011; Simmons et al., 2017).

Diferente de células com altas taxas proliferativas que utilizam parte do seu metabolismo para suprir a alta demanda de biomassa, as células de ciclagem lenta exibem um programa metabólico comum em diferentes tumores caracterizados pela dependência da respiração mitocondrial. Através da análise dos dados de microarranjo, observamos tênues alterações metabólicas, sendo algumas relacionadas a isoenzimas, como no caso da expressão da enzima isocitrato desidrogenase (IDH, do inglês: *isocitrate dehydrogenase*), enzima que catalisa a descarboxilação oxidativa do isocitrato em alfa-cetoglutarato. O fenótipo A7

apresenta a isoforma citosólica, *IDH1*, que desempenha um papel fundamental na proteção celular contra danos oxidativos induzidos por radiação ultravioleta (Bristot et al., 2018) (mais informações sobre esse gene se encontra no **Anexo II** dessa tese). Enquanto G10 demonstrou maior expressão da *IDH3B*, subunidade beta da isoforma mitocondrial, cujo gene já foi positivamente correlacionado com o fator de transcrição mestre que regula a pluripotência de células-tronco *OCT4*, em câncer colorretal (Saha et al., 2018). Ressaltamos que é importante para nosso campo reconhecer a contribuição generalizada da heterogeneidade fenotípica, onde a soma de pequenas alterações pode resultar em comportamento celular distintos. Dessa forma, utilizamos a oximetria de alta resolução (OROBOROS Oxygraph-2k), para analisar as taxas de consumo de oxigênio e desvendar parâmetros críticos da fisiologia mitocondrial no modelo celular de melanoma explorados no capítulo II. Assim, demonstramos que as células A7 e G10 apresentam distintos padrões metabólicas, apesar de terem a mesma origem em comum. O fenótipo G10, como descrito nas células de ciclagem lenta, apresentou maior respiração mitocondrial.

A influência do metabolismo mitocondrial, negligenciada durante muito tempo devido ao metabolismo predominantemente glicolítico das células cancerosas, está sendo estudado como um processo fisiológico necessário na progressão tumoral. Nesse sentido, G10 demonstrou aumento em número de mitocôndrias e uma morfologia mais fusionada quando comparada a A7. Sustentando esse padrão de morfologia mitocondrial, G10 demonstrou maior imunocontéudo de proteínas envolvidas no processo de fusão da membrana interna e externa OPA1 (do inglês: *optic atrophy protein 1*) e na mitofusina 2 (Mfn2), respectivamente, enquanto A7 apresentou aumento de Drp1 (do inglês: *dynamamin-related protein 1*). Surpreendentemente, quando analisamos o imunocontéudo total de piruvato cinase (PK), enzima que participa da décima etapa da glicólise que converte o fosfoenolpiruvato em uma molécula de piruvato e uma de ATP, não encontramos diferenças. Cabe aqui ressaltar que o anticorpo utilizado

reconhece todas as isoformas de PK. Ao investigar a distribuição do imunocontéudo dessa enzima, observamos que G10 apresenta acúmulo de PK na mitocôndria e A7 no citosol. Curiosamente, um estudo utilizando o modelo de invasão de células âncoras em *C. elegans* demonstrou que as enzimas glicolíticas fosfofrutocinase (PFK-1), enolase e PK agrupam-se na superfície das mitocôndrias para abastecer a organela com substratos requeridos para síntese de ATP e que são fundamentais para propagação através da membrana basal. Esse estudo também mostrou que células não-invasivas apresentam localização citosólica de PK (Garde et al., 2022). As enzimas metabólicas podem atuar em diversos processos celulares não diretamente relacionados com o metabolismo, como a isoforma 2 da PK que, quando localizada na mitocôndria interage com a proteína Bcl2, inibindo diretamente a apoptose (Liang et al., 2017).

O desenvolvimento de estratégias no combate ao câncer comumente utiliza a parada do ciclo celular, diminuição na proliferação e marcadores de senescência como desfechos favoráveis. Como reflexo dessa abordagem investigativa, as intervenções terapêuticas disponíveis na clínica, especialmente quimioterápicos e terapia alvo, visam células com alta taxa proliferativa que necessitam de um metabolismo glicolítico para suprir a alta demanda de macromoléculas da divisão celular. Aqui, observamos que as células com taxa proliferativa alta, tanto o fenótipo A7 quanto a linhagem celular progenitora desse modelo (A375), mostraram uma maior sensibilidade ao quimioterápico Carboplatina quando comparado a G10. A heterogeneidade intratumoral tem implicações significativas para o comportamento do câncer e seu manejo e é visto como um dos fatores responsáveis pela resposta mista aos tratamentos, como no caso da Carboplatina (Delaunay et al., 2022). Essas subpopulações podem estar associadas com distintas composições genéticas, alteração na expressão gênica devido a fatores epigenéticos, interações com diversos tipos celulares no microambiente tumoral, exposição a nível de oxigênio e nutrientes. Dadas as devidas proporções do modelo

celular, as células A375 exibem algum grau de heterogeneidade e, da mesma forma, A7 e G10 demonstraram subpopulações nas análises de citometria de fluxo. Dessa forma, observamos um enriquecimento de características semelhantes às células de ciclagem lenta em G10.

A revisão da literatura presente no Capítulo I, auxiliou na análise feita no Capítulo II, onde observamos que a célula G10 do nosso modelo tem características comumente descritas em células de ciclagem lenta MITF^{baixo}. Isso posto, no Capítulo II desta tese, criamos uma lista de genes baseada em artigos que descreviam células de ciclagem lenta na baixa expressão de MITF para consolidar nosso modelo de agressividade *in vitro* com dados clínicos independentes depositados no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GSE43081, GSE65185, GSE65904, GSE54467, GSE156030 e GSE22155). A análise de Interatômica das proteínas descritas na ciclagem lenta MITF^{baixa} deu origem a dez clusters, ressaltando a importância de processos necessários na agressividade, como, por exemplo, a adesão celular e fatores de crescimento, o metabolismo oxidativo e dinâmica mitocondrial, a regulação epigenética, do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês: *major histocompatibility complex*), a regulação do ciclo celular e senescência, e sinalização de citocinas. Dentre os seis bancos de dados analisados, quatro (GSE54467, GSE65904, GSE22155 e GSE43081) não demonstraram genes diferencialmente expressos na comparação entre os genes definidos como de ciclagem lenta, MITF^{baixa}, em amostras de melanoma em diversos estágios (I, II, e III), em biópsias pré-tratamento e pós-recidiva, no prognóstico bom e negativo, nos subtipos celulares encontrados em melanomas de estágio IV, ou em linfonodo sentinela na comparação com prognóstico ruim. *In vitro*, o subgrupo celular de ciclagem lenta está presente em baixas proporções sendo capaz de aumentar sua população com estimulação ambiental (Perego et al., 2018; Puig et al., 2018). Talvez, por apresenta-se em baixas densidades, a detecção desse fenótipo celular na análise total de amostras pode estar mascarando os resultados, especialmente em amostras de linfonodo sentinela onde se

encontram as primeiras células que se desviam do tumor primário, indicando um princípio de metástases (Papadopoulos et al., 2020).

A única análise com significância foi entre amostras de melanoma sensíveis ou resistentes ao tratamento de inibidores de MAPK (GSE65185), onde 29 genes *slow-cycling* demonstraram estar super-representados. Contudo, 19 apresentaram expressão reduzida, incluindo *SERPINE1*, *EGFR*, *HLA-B*, *FNI* e *JUN*. Além disso, não foi encontrado diferenças na expressão de genes consistentemente descritos na literatura como indicadores de células de ciclagem lenta como *AXL*, *CDKN1A/B*, *KDM5B*, *TGFBI*, *NANOG*, *NOTCH1* e *CDH2*. Sabendo que as células de ciclagem lenta são descritas *in vitro* como o fenótipo que seria responsável por eventos metastáticos, selecionamos as amostras pré-tratamento de todos os pacientes dessa corte e estratificamos os dados entre $MITF^{\text{alto}}$ e $MITF^{\text{baixo}}$ e correlacionamos com a alta ou baixa resposta (maior ou menor que a mediana). Nesse sentido, pudemos observar que os pacientes com pior prognóstico têm uma tendência a ter menor expressão de $MITF$. Essa pequena subpopulação de células pode repovoar a heterogeneidade tumoral, os dados encontrados nos bancos de dados, que são uma representação estática final do processo tumoral, também podem estar dificultando a identificação *in silico* dessas células. Chauhan e colaboradores discutem que amostras de tumor dentro da coorte de melanoma TCGA conterão células que, apesar de fazerem parte da massa tumoral, não são células cancerígenas. Além disso, o melanoma é um tumor heterogêneo e suas diversas subpopulações apresentam-se em proporções variadas dentro de uma mesma biopsias, podendo mascarar a análise da expressão gênica diferencial associada a células de melanoma $MITF^{\text{alto}}$ contra $MITF^{\text{baixo}}$ (Chauhan et al., 2022). Por exemplo, amostras de biopsias de 62 pacientes com melanoma mostram alta presença de heterogeneidade no imunocnteúdo de SOX10, fator de transcrição que apresenta baixa expressão em células de ciclagem lenta com fenótipo $MITF^{\text{baixo}}$ *in vitro* (Capparelli et al., 2022). Cabe ressaltar que nesse artigo, eles demonstraram que o fenótipo de

ciclagem lenta é essencial na agressividade e resistência do melanoma *in vitro* e *in vivo*, mas a análise de enriquecimento de genes EMT utilizou apenas os dados de um paciente. Assim, no capítulo III apresentamos e discutimos esse paradoxo entre os dados amplamente descritos e explorados em estudos com modelos celulares de melanoma pré-clínicos e a dificuldade de validarmos a relevância prognóstica e preditiva desses em ambiente clínico.

Variações no controle do ciclo celular, proteínas antiapoptóticas, aumento das proteínas de reparo de danos ao DNA, e aumento da atividade metabólica tem sido descrito como peças importantes na resistência a quimioterápicos em câncer de mama, colo, glioblastoma, adenocarcinoma do pâncreas, câncer oral e melanoma, principalmente em trabalhos *in vivo* ou *in vitro* (Hoang-Minh et al., 2018; Liu et al., 2019; Nakagawa et al., 2016; Wu et al., 2017; Yin et al., 2011). Modelos de estudo direcionados para as populações tumorais com baixas taxas de proliferação são essenciais para auxiliar pesquisas na busca por novos alvos terapêuticos ou para minimizar os efeitos colaterais tóxicos dos disponíveis na clínica. Assim, os diferentes fenótipos da linhagem humana A375 caracterizados nesse estudo mostram-se ferramentas promissoras no estudo da biologia do câncer, em especial, o melanoma. Cabe aqui ressaltar que modelos celulares pré-clínicos continuam sendo uma das principais ferramentas na pesquisa para a triagem e desenvolvimento de novas propostas terapêuticas, e apresentam um custo baixo quando comparados a estudos *in vivo*. Além disso, espera-se uma mudança significativa da comunidade científica para a implementação de métodos alternativos de pesquisa como reflexo da legislação que entrou em vigor nos Estados Unidos em 2023, onde novos medicamentos não precisarão ser testados em animais para receber aprovação da agência regulatória americana FDA (Wadman, 2023). Contudo, ainda temos um longo caminho para conseguir fazer uma conexão mais precisa entre os dados *in vitro* com o que encontramos clínica, principalmente pelo fato de analisarmos um momento específico da progressão da doença em amostras heterogêneas. Contudo, sabemos que a recidiva de melanoma em estágio

avançado ainda representa um desafio na clínica e que dentre a população tumoral existem células resistentes os tratamentos convencionais. Recentemente, o sequenciamento de RNA de célula única (scRNA-seq) está ampliando nosso conhecimento sobre a heterogeneidade do melanoma e sua importância clínica, assim como aumentando a complexidade da análise dos dados (Marin-Bejar et al., 2021). Assim, novos estudos são necessários para obtermos respostas mais amplas sobre as subpopulações do melanoma no progresso dessa doença.

Devido à característica exploratória dessa tese, este trabalho apresenta característica multicêntrica, contando com colaborações com regionais e internacionais. Além disso, essa tese proporcionou legado acadêmico ao implementar no Laboratório de Bioquímica Celular (UFRGS) a Respirometria de Alta Resolução, utilizando-se de oxígrafo tipo OROBOROS (Oxygraph-2k). Cabe aqui ressaltar que o conhecimento tecnológico adquirido durante a execução dessa tese foi também utilizado em artigos colaborativos (**Anexo III**) e compartilhado através de seminários e oficinas (**Anexo IV e Anexo V**), promovendo a aproximação e a troca de experiência entre instituições nacionais e internacionais de pesquisa.

CONCLUSÃO

Ainda é parcialmente desconhecido por que o câncer responde de maneira tão heterogênea ao tratamento e quais mecanismos que selecionam o conjunto de populações celulares compreendidas em um único tumor que acarretam a recidiva de paciente aos tratamentos disponíveis na clínica. Nesse sentido, o fenótipo de ciclagem lenta surge como uma possível explicação para esse fenômeno e apresenta um curso para uma melhor compreensão da evolução e dinâmica do tumor. Assim, identificamos fatores biológicos presentes na literatura que caracterizassem as células de ciclagem lenta. Essas características foram avaliadas no modelo de agressividade composto por A7 e G10, células derivadas da superexpressão do catalase na linhagem A375. Nossos dados mostraram que G10 apresenta atributos de células de ciclagem lenta, como acúmulo de células na fase G1 do ciclo celular, atividade de SA- β -gal, aumento na respiração mitocondrial, alterações na morfologia mitocondrial e maior resistência a Carboplatina. Além disso, as diferenças fenotípicas encontradas entre G10 e A7 ressaltam a capacidade heterogenia do câncer de responder ao ambiente, podendo ser utilizado como modelo de agressividade pode ser aplicado para ampliar o nosso conhecimento biologia e em estudos de *screening* de novas estratégias terapêuticas. Por fim, esse trabalho demonstrou que as informações conflitantes na literatura, especialmente em relação aos dados clínicos, sobre o fenótipo de ciclagem lenta podem estar associados ao tipo de abordagem na pesquisa e como isso impacta no nosso conhecimento atual sobre esse fenótipo.

PERSPECTIVAS

Em relação a essa tese, aprofundar o estudo sobre as alterações fenotípicas e metabólicas das células de ciclagem lenta e ampliar as análises de expressão diferenciada de dados clínicos.

Inicialmente, seria relevante realizar o sequenciamento genético das linhagens presente nesse modelo de agressividade para avaliar se as alterações fenotípicas são devido a variantes genéticas. Avaliar a proliferação celular pelo ensaio de incorporação de BrdU em citometria de fluxo e analisar as proporções populacionais marcadas para anticorpos monoclonais de MITF e BRN2 entre as linhagens A7 e G10 para confirmar os dados de expressão genica e a atividade de enzimas reguladas pelo MITF. Para observar a plasticidade fenotípica e compreender o papel do metabolismo nesse processo, forçar a fosforilação oxidativa com o ácido dicloroacético no fenótipo proliferativo e menos agressivo (A7) e avaliar o ciclo celular e atividade de SA- β -gal, o potencial invasivo pelo ensaio de migração celular por cicatrização e analisar se a sensibilidade a Carboplatina é afetada por essa alteração metabólica.

Para complementar o capítulo III, pretende-se realizar uma nova análise de expressão diferencial utilizando coortes de pacientes de dados de RNA de célula única para observar se as células de ciclagem lenta estão relacionadas a um pior prognóstico e correlacionar com o modelo de agressividade descrito no capítulo II dessa tese.

REFERÊNCIAS

- Ahn, A., Chatterjee, A., Eccles, M.R., 2017. The slow cycling phenotype: A growing problem for treatment resistance in melanoma. *Mol. Cancer Ther.* 16, 1002–1009.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0535>
- American Cancer Society, 2015. *Cancer Facts & Figures 2015*, American Cancer Society. American Cancer Society, Atlanta.
- Bender, E., 2014. Developing world: Global warning. *Nature* 509, S18–S19.
<https://doi.org/10.1038/scientificamerican0714-S18>
- Bolick, N.L., Geller, A.C., 2021. Epidemiology of Melanoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 35, 57–72. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.011>
- Bracalente, C., Ibañez, I.L., Berenstein, A., Notcovich, C., Cerda, M.B., Klamt, F., Chernomoretz, A., Durán, H., 2016a. Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression: Upregulation of antioxidant genes correlates with regression of melanoma malignancy and with malignant progression when downregulated. *Oncotarget* 7, 41155–41171.
<https://doi.org/http://doi.org/10.18632/oncotarget.9273>
- Bracalente, C., Rinflerch, A.R., Ibañez, I.L., García, F.M., Volonteri, V., Galimberti, G.N., Klamt, F., Durán, H., 2018. Cofilin-1 levels and intracellular localization are associated with melanoma prognosis in a cohort of patients. *Oncotarget* 9, 24097–24108.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.25303>
- Bracalente, C., Salguero, N., Notcovich, C., Müller, C.B., Motta, L.L., Klamt, F., Ibañez, I.L., Durán, H., 2016b. Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression : Reversion or promotion of malignancy by inducing melanogenesis or metastasis. *Oncotarget* 7, 41142–41153.
<https://doi.org/https://doi.org/10.18632/oncotarget.9273>

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., L. Siegel, R., Torres, L.A., Jemal, A., 2018. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* 68, 394–424.
<https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bristot, I.J., França, F.S., Klamt, F., 2018. IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase 1), in: Choi, S. (Ed.), *Encyclopedia of Signaling Molecules*. Springer, Cham, pp. 2506–2510.
https://doi.org/doi.org/10.1007/978-3-319-67199-4_101639
- Bristot, I.J., Kehl Dias, C., Chapola, H., C, R.B., Klamt, F., 2020. Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells - ScienceDirect. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 153, 102995.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2020.102995>
- Caino, M.C., Ghosh, J.C., Chae, Y.C., Vaira, V., Rivadeneira, D.B., Favarsani, A., Rampini, P., Kossenkov, A. V., Aird, K.M., Zhang, R., Webster, M.R., Weeraratna, A.T., Bosari, S., Languino, L.R., Altieri, D.C., 2015. PI3K therapy reprograms mitochondrial trafficking to fuel tumor cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 8638–8643.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1500722112>
- Capparelli, C., Purwin, T.J., Glasheen, M.K., Caksa, S., Tiago, M., Wilski, N., Pomante, D., Rosenbaum, S., Nguyen, M.Q., Cai, W., Franco-Barraza, J., Zheng, R., Kumar, G., Chervoneva, I., Shimada, A., Rebecca, V.W., Snook, A.E., Hookim, K., Xu, X., Cukierman, E., Herlyn, M., Aplin, A.E., 2022. Targeting SOX10-deficient cells to reduce the dormant-invasive phenotype state in melanoma. *Nat. Commun.* 13, 1–16.
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-28801-y>
- Chauhan, J.S., Hölzel, M., Lambert, J.P., Buffa, F.M., Goding, C.R., 2022. The MITF regulatory network in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 35, 517–533.
<https://doi.org/10.1111/pcmr.13053>
- Chauvistré, H., Shannan, B., Daignault-Mill, S.M., Ju, R.J., Picard, D., Egetemaier, S.,

- Váraljai, R., Gibhardt, C.S., Sechi, A., Kaschani, F., Keminer, O., Stehbens, S.J., Liu, Q., Yin, X., Jeyakumar, K., Vogel, F.C.E., Krepler, C., Rebecca, V.W., Kubat, L., Lueong, S.S., Forster, J., Horn, S., Remke, M., Ehrmann, M., Paschen, A., Becker, J.C., Helfrich, I., Rauh, D., Kaiser, M., Gul, S., Herlyn, M., Bogeski, I., Rodríguez-López, J.N., Haass, N.K., Schadendorf, D., Roesch, A., 2022. Persister state-directed transitioning and vulnerability in melanoma. *Nat. Commun.* 13, 3055. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30641-9>
- Cheli, Y., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., Ballotti, R., 2011. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30, 2307–2318. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.598>
- CONITEC, 2019. Terapia-alvo (vemurafenibe, dabrafenibe, cobimetinibe, trametinibe) e imunoterapia (ipilimumabe, nivolumabe, pembrolizumabe) para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático. Ministério da Saúde, Brasília.
- CONITEC, 2018. Ipilimumabe para tratamento de pacientes com melanoma metastático. Ministério da Saúde, Brasília.
- Deberardinis, R.J., Chandel, N.S., 2016. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600200>
- Delaunay, S., Pascual, G., Feng, B., Klann, K., Behm, M., Hotz-Wagenblatt, A., Richter, K., Zaoui, K., Herpel, E., Münch, C., Dietmann, S., Hess, J., Benitah, S.A., Frye, M., 2022. Mitochondrial RNA modifications shape metabolic plasticity in metastasis. *Nature* 607, 593–603. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04898-5>
- Delgado-Goñi, T., Galobart, T.C., Wantuch, S., Normantaite, D., Leach, M.O., Whittaker, S.R., Belouèche-Babari, M., 2019. Increased in inflammatory lipid metabolism and

anaplerotic mitochondrial activation follow acquired resistance to vemurafenib in BRAF-mutant melanoma cells. *Br. J. Cancer* 122, 72–81. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0628-x>

Diebold, L., Chandel, N.S., 2016. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. *Free Radic. Biol. Med.* 100, 86–93.

Diener, J., Baggiolini, A., Pernebrink, M., Dalcher, D., Lerra, L., Cheng, P.F., Varum, S., Häusel, J., Stierli, S., Treier, M., Studer, L., Basler, K., Levesque, M.P., Dummer, R., Santoro, R., Cantù, C., Sommer, L., 2021. Epigenetic control of melanoma cell invasiveness by the stem cell factor SALL4. *Nat. Commun.* 12, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25326-8>

Ennen, M., Keime, C., Kobi, D., Mengus, G., Lipsker, D., Thibault-Carpentier, C., Davidson, I., 2015. Single-cell gene expression signatures reveal melanoma cell heterogeneity. *Oncogene* 34, 3251–3263. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.262>

Fane, M.E., Chhabra, Y., Smith, A.G., Sturm, R.A., 2018. BRN2, a POUerful driver of melanoma phenotype switching and metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res. Cell Melanoma Res.* 32, 9–24. <https://doi.org/DOI: 10.1111/pcmr.12710>

Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, B.F., 2020. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, Fr. Int. Agency Res. Cancer. URL <https://gco.iarc.fr/today> (acessado 12.21.22).

Fischer, G.M., Jalali, A., Kircher, D.A., Lee, W.C., McQuade, J.L., Haydu, L.E., Joon, A.Y., Reuben, A., de Macedo, M.P., Carapeto, F.C.L., Yang, C., Srivastava, A., Ambati, C.R., Sreekumar, A., Hudgens, C.W., Knighton, B., Deng, W., Ferguson, S.D., Tawbi, H.A., Glitza, I.C., Gershenwald, J.E., Vashisht Gopal, Y.N., Hwu, P., Huse, J.T., Wargo, J.A., Andrew Futreal, P., Putluri, N., Lazar, A.J., Deberardinis, R.J., Marszalek, J.R., Zhang, J., Holmen, S.L., Tetzlaff, M.T., Davies, M.A., 2019. Molecular profiling reveals unique

- immune and metabolic features of melanoma brain metastases. *Cancer Discov.* 9, 628–645. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1489>
- Garde, A., Kenny, I.W., Kelley, L.C., Chi, Q., Mutlu, A.S., Wang, M.C., Sherwood, D.R., 2022. Localized glucose import, glycolytic processing, and mitochondria generate a focused ATP burst to power basement-membrane invasion. *Dev. Cell* 57, 732-749.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2022.02.019>
- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Parks, W.P., 1973. In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 51, 1417–1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>
- Girnun, G.D., 2012. The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer Geoffrey. *Semin Cell Dev Biol.* 23, 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.semdb.2012.01.007>.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–857. <https://doi.org/10.1038/nature05661>
- Grimaldi, A.M., Cassidy, P.B., Leachmann, S., Ascierto, P.A., 2014. Novel Approaches in Melanoma Prevention and Therapy. *Adv. Nutr. Cancer* 443–455. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38007-5>
- Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G.C., Frederick, D.T., Hurley, A.D., Nellore, A., Kung, A.L., Wargo, J.A., Song, J.S., Fisher, D.E., Arany, Z., Widlund, H.R., 2013. Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* 23, 302–315. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.02.003>
- Hoang-Minh, L.B., Siebzehnruhl, F.A., Yang, C., Suzuki-Hatano, S., Dajac, K., Loche, T., Andrews, N., Schmoll Massari, M., Patel, J., Amin, K., Vuong, A., Jimenez-Pascual, A., Kubilis, P., Garrett, T.J., Moneypenny, C., Pacak, C.A., Huang, J., Saylor, E.J., Mitchell, D.A., Sarkisian, M.R., Reynolds, B.A., Deleyrolle, L.P., 2018. Infiltrative and

drug-resistant slow-cycling cells support metabolic heterogeneity in glioblastoma.

EMBO J. 37, 1–21. <https://doi.org/10.15252/embj.201798772>

- Hossain, S.M., Gimenez, G., Stockwell, P.A., Tsai, P., Print, C.G., Rys, J., Cybulska-Stopa, B., Ratajska, M., Harazin-Lechowska, A., Almomani, S., Jackson, C., Chatterjee, A., Eccles, M.R., 2022. Innate immune checkpoint inhibitor resistance is associated with melanoma sub-types exhibiting invasive and de-differentiated gene expression signatures. *Front. Immunol.* 13, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.955063>
- Hugo, W., Shi, H., Sun, L., Piva, M., Song, C., Kong, X., Moriceau, G., Hong, A., Dahlman, K.B., Johnson, D.B., Sosman, J.A., Ribas, A., Lo, R.S., 2015. Non-genomic and Immune Evolution of Melanoma Acquiring MAPKi Resistance. *Cell* 162, 1271–1285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.061>.
- Ibañez, I.L., Grings, F.M., Bracalente, C., Rinflerch, A.R., Volonteri, V., Castro, M.A.A., Klamt, F., Durán, H., 2019. Potential predictive value of cofilin-1 for metastasis occurrence in a small cohort of Argentinian patients with mid-low Breslow thickness melanoma. *Pathol. - Res. Pract.* 152582. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152582>
- IBGE, 2022. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua, 1st ed. IBGE, Rio de Janeiro.
- INCA, 2022. Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro : INCA, 2022 Kang, H.B., Fan, J., Lin, R., Elf, S., Ji, Q., Zhao, L., Jin, L., Seo, J.H., Shan, C., Arbiser, J.L., Cohen, C., Brat, D., Mizioroko, H.M., Kim, E., Abdel-Wahab, O., Merghoub, T., Fröhling, S., Scholl, C., Tamayo, P., Barbie, D.A., Zhou, L., Pollack, B.P., Fisher, K., Kudchadkar, R.R., Lawson, D.H., Sica, G., Rossi, M., Lonial, S., Khoury, H.J., Khuri, F.R., Lee, B.H., Boggon, T.J., He, C., Kang, S., Chen, J., 2015. Metabolic Rewiring by Oncogenic BRAF V600E Links Ketogenesis Pathway to BRAF-MEK1 Signaling. *Mol. Cell* 59, 345–358.

<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.037>

Lebleu, V.S., O'Connell, J.T., Gonzalez Herrera, K.N., Wikman, H., Pantel, K., Haigis, M.C., De Carvalho, F.M., Damascena, A., Domingos Chinen, L.T., Rocha, R.M., Asara, J.M., Kalluri, R., 2014. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. *Nat. Cell Biol.* 16, 992–1003.
<https://doi.org/10.1038/ncb3039>

Lee, D.G., Choi, B.K., Kim, Y.H., Oh, H.S., Park, S.H., Bae, Y.S., Kwon, B.S., 2016. The repopulating cancer cells in melanoma are characterized by increased mitochondrial membrane potential. *Cancer Lett.* 382, 186–194.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.08.027>

Lee, J.H., Shklovskaya, E., Lim, S.Y., Carlino, M.S., Menzies, A.M., Stewart, A., Pedersen, B., Irvine, M., Alavi, S., Yang, J.Y.H., Strbenac, D., Saw, R.P.M., Thompson, J.F., Wilmott, J.S., Scolyer, R.A., Long, G. V., Kefford, R.F., Rizos, H., 2020. Transcriptional downregulation of MHC class I and melanoma de-differentiation in resistance to PD-1 inhibition. *Nat. Commun.* 11, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15726-7>

Leonardi, G.C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghi, A., Spandidos, D.A., Mccubrey, J.A., Candido, S., Libra, M., 2018. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int. J. Oncol.* 52, 1071–1080. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>

Liang, J., Cao, R., Wang, X., Zhang, Y., Wang, P., Gao, H., Li, C., Yang, F., Zeng, R., Wei, P., Li, D., Li, W., Yang, W., 2017. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. *Cell Res.* 27, 329–351.
<https://doi.org/10.1038/cr.2016.159>

Liu, X., Zhang, S.-M., McGeary, M.K., Krykbaeva, I., Lai, L., Jansen, D.J., Kales, S.C., Simeonov, A., Hall, M.D., Kelly, D.P., Bosenberg, M.W., Yan, Q., 2019. KDM5B

Promotes Drug Resistance by Regulating Melanoma Propagating Cell Subpopulations.

Mol. Cancer Ther. 18, 706–717. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-18-0395>

Marin-Bejar, O., Rogiers, A., Dewaele, M., Femel, J., Karras, P., Pozniak, J., Bervoets, G., Van Raemdonck, N., Pedri, D., Swings, T., Demeulemeester, J., Borght, S. Vander, Lehnert, S., Bosisio, F., van den Oord, J.J., Bempt, I. Vanden, Lambrechts, D., Voet, T., Bechter, O., Rizos, H., Levesque, M.P., Leucci, E., Lund, A.W., Rambow, F., Marine, J.C., 2021. Evolutionary predictability of genetic versus nongenetic resistance to anticancer drugs in melanoma. *Cancer Cell* 39, 1135-1149.e8. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.05.015>

Martínez, J., Tarallo, D., Martínez-Palma, L., Victoria, S., Bresque, M., Rodríguez-Bottero, S., Marmisolle, I., Escande, C., Cassina, P., Casanova, G., Bollati-Fogolín, M., Agorio, C., Moreno, M., Quijano, C., 2019. Mitofusins modulate the increase in mitochondrial length, bioenergetics and secretory phenotype in therapy-induced senescent melanoma cells. *Biochem. J.* 476, 2463–2486. <https://doi.org/10.1042/BCJ20190405>

Najem, A., Krayem, M., Salès, F., Hussein, N., Badran, B., Robert, C., Awada, A., Journe, F., Ghanem, G.E., 2017. P53 and MITF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. *Eur. J. Cancer* 83, 154–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.06.033>

Nakagawa, H., Facompre, N.D., Belden, Z., Roesch, A., Whelan, K., Ramaswamy, S., Harmeyer, K.M., Herlyn, M., Tanaka, K., Basu, D., Sole, X., Gimotty, P.A., Kabraji, S., Rustgi, A.K., Montone, K.T., Sahu, V., Weinstein, G.S., 2016. JARID1B Enables Transit between Distinct States of the Stem-like Cell Population in Oral Cancers. *Cancer Res.* 76, 5538–5549. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-15-3377>

Papadopoulos, O., Papadopoulos, N.A., Champsas, G., 2020. Non-melanoma skin cancer and cutaneous melanoma: Surgical treatment and reconstruction, *Non-Melanoma Skin*

Cancer and Cutaneous Melanoma: Surgical Treatment and Reconstruction. Springer

Nature, Switzerland. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-18797-2>

Perego, M., Maurer, M., Wang, J.X., Shaffer, S., Müller, A.C., Parapatics, K., Li, L., Hristova, D., Shin, S., Keeney, F., Liu, S., Xu, X., Raj, A., Jensen, J.K., Bennett, K.L., Wagner, S.N., Somasundaram, R., Herlyn, M., 2018. A slow-cycling subpopulation of melanoma cells with highly invasive properties. *Oncogene* 37, 302–312.

<https://doi.org/10.1038/onc.2017.341>

Petrachi, T., Romagnani, A., Albini, A., Longo, C., Argenziano, G., Grisendi, G., Dominici, M., Ciarrocchi, A., Dallaglio, K., 2017. Therapeutic potential of the metabolic modulator phenformin in targeting the stem cell compartment in melanoma. *Oncotarget* 8, .6914. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14321>

Puig, I., Tenbaum, S.P., Chicote, I., Arqués, O., Martínez-Quintanilla, J., Cuesta-Borrás, E., Ramírez, L., Gonzalo, P., Soto, A., Aguilar, S., Eguizabal, C., Caratù, G., Prat, A., Argilés, G., Landolfi, S., Casanovas, O., Serra, V., Villanueva, A., Arroyo, A.G., Terracciano, L., Nuciforo, P., Seoane, J., Recio, J.A., Vivancos, A., Dienstmann, R., Tabernero, J., Palmer, H.G., 2018. TET2 controls chemoresistant slow-cycling cancer cell survival and tumor recurrence. *J. Clin. Invest.* 128, 3887-3905.

<https://doi.org/10.1172/JCI96393>

Ratnikov, B.I., Scott, D.A., Osterman, A.L., Smith, J.W., Ronai, Z.A., 2017. Metabolic rewiring in melanoma. *Oncogene* 36, 147–157. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.198>

Ritchie, H., Roser, F.S.M., 2018. Causes of death. Publ. online OurWorldInData.org.

Retrieved. URL <https://ourworldindata.org/causes-of-death> (acessado 12.21.22).

Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E.C., Zabierowski, S.E., Brafford, P.A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T., Herlyn, M., 2010. A Temporarily Distinct Subpopulation of Slow-Cycling Melanoma Cells Is Required for Continuous Tumor

Growth. Cell 141, 583–594. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.020>

Roesch, A., Vultur, A., Bogeski, I., Wang, H., Zimmermann, K.M., Speicher, D.D., Körbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E.S.E., Krause, E., Pätzold, S., Villanueva, J., Krepler, C., Fukunaga-Kalabis, M., Hoth, M., Bastian, B.C., Vogt, T., Herlyn, M., Korbel, C., Laschke, M.W., Gimotty, P.A., Philipp, S.E.S.E., Krause, E., Patzold, S., Villanueva, J., Krepler, C., Fukunaga-Kalabis, M., Hoth, M., Bastian, B.C., Vogt, T., 2013. Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. Cancer Cell 23, 811–825. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.003>

Sachdeva, R., Wu, M., Johnson, K., Kim, H., Celebre, A., Shahzad, U., Graham, M.S., Kessler, J.A., Chuang, J.H., Karamchandani, J., Bredel, M., Verhaak, R., Das, S., 2019. BMP signaling mediates glioma stem cell quiescence and confers treatment resistance in glioblastoma. Sci. Rep. 9, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51270-1>

Saha, S.K., Jeong, Y., Cho, S., Cho, S.G., 2018. Systematic expression alteration analysis of master reprogramming factor OCT4 and its three pseudogenes in human cancer and their prognostic outcomes. Sci. Rep. 8, 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33094-7>

Sahoo, A., Sahoo, S.K., Joshi, P., Lee, B., Perera, R.J., 2019. MicroRNA-211 Loss Promotes Metabolic Vulnerability and BRAF Inhibitor Sensitivity in Melanoma. J. Invest. Dermatol. 139, 167–176. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.06.189>

Schmitt, R.J., Kreidler, S.M., Glueck, D.H., Amaria, R.N., Gonzalez, R., Lewis, K., Bagrosky, B.M., Kwak, J.J., Koo, P.J., 2018. Correlation between early FDG PET/CT response to BRAF and MEK inhibition and survival in patients with BRAF-mutant metastatic melanoma. Pathol. Melanocytic Tumors 37, 314–329. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-37457-6.00027-4>

- Siegel, R.L., Miller, K.D., 2020. Cancer Statistics , 2020. CA. Cancer J. Clin. 70, 7–30.
<https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., 2022. Cancer statistics, 2022. CA. Cancer J. Clin. 72, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Simmons, J.L., Pierce, C.J., Al-Ejeh, F., Boyle, G.M., 2017. MITF and BRN2 contribute to metastatic growth after dissemination of melanoma. Sci. Rep. 7, 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-11366-y>
- Steininger, J., Gellrich, F.F., Schulz, A., Westphal, D., Beisert, S., Meier, F., 2021. Systemic therapy of metastatic melanoma: On the road to cure. Cancers (Basel). 13, 1–28.
<https://doi.org/10.3390/cancers13061430>
- Stewart, B.W., Wild, C.P. (Eds.), 2014. World Cancer Report 2014. World Health Organization, Lyon.
- Vogel, F.C.E., Bordag, N., Zügner, E., Trajkovic-Arsic, M., Chauvistré, H., Shannan, B., Váraljai, R., Horn, S., Magnes, C., Thomas Siveke, J., Schadendorf, D., Roesch, A., Siveke, J., Schadendorf, D., Roesch, A., 2019. Targeting the H3K4 Demethylase KDM5B Reprograms the Metabolome and Phenotype of Melanoma Cells. J. Invest. Dermatol. 139, 2506-2516.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.06.124>
- Wadman, M., 2023. FDA no longer has to require animal testing for new drugs. Science (80-.). 379, 127–128. <https://doi.org/doi:10.1126/science.adg6264>
- Weiss, S.A., Wolchok, J.D., Sznol, M., 2019. Immunotherapy of melanoma: facts and hopes. Clin. Cancer Res. 25, 5191–5201. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-1550>
- Wu, F.H., Mu, L., Li, X.L., Hu, Y.B., Liu, H., Han, L.T., Gong, J.P., 2017. Characterization and functional analysis of a slow-cycling subpopulation in colorectal cancer enriched by cell cycle inducer combined chemotherapy. Oncotarget 8, 78466–78479.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.19638>

- Yang, C., Tian, C., Hoffman, T.E., Jacobsen, N.K., Spencer, S.L., 2020. Rapidly induced drug adaptation mediates escape from BRAF inhibition in single melanoma cells. *bioRxiv* 1–42. <https://doi.org/10.1101/2020.03.15.992982>
- Yin, T., Wei, H., Gou, S., Shi, P., Yang, Z., Zhao, G., Wang, C., 2011. Cancer stem-like cells enriched in Panc-1 spheres possess increased migration ability and resistance to gemcitabine. *Int. J. Mol. Sci.* 12, 1595–1604. <https://doi.org/10.3390/ijms12031595>
- Zhang, G., Frederick, D.T., Wu, L., Wei, Z., Krepler, C., Srinivasan, S., Chae, Y.C., Xu, X., Choi, H., Dimwamwa, E., Ope, O., Shannan, B., Basu, D., Zhang, D., Guha, M., Xiao, M., Randell, S., Sproesser, K., Xu, W., Liu, J., Karakousis, G.C., Schuchter, L.M., Gangadhar, T.C., Amaravadi, R.K., Gu, M., Xu, C., Ghosh, A., Xu, W., Tian, T., Zhang, J., Zha, S., Liu, Q., Brafford, P., Weeraratna, A., Davies, M.A., Wargo, J.A., Avadhani, N.G., Lu, Y., Mills, G.B., Altieri, D.C., Flaherty, K.T., Herlyn, M., 2016. Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors. *J. Clin. Invest.* 126, 1834–1856. <https://doi.org/10.1172/JCI82661>
- Zhao, L., Fan, J., Xia, S., Pan, Y., Liu, S., Qian, G., Qian, Z., Kang, H.B., Arbiser, J.L., Pollack, B.P., Kudchadkar, R.R., Lawson, D.H., Rossi, M., Abdel-Wahab, O., Merghoub, T., Khoury, H.J., Khuri, F.R., Boise, L.H., Lonial, S., Chen, F., Chen, J., Lin, R., 2017. HMG-CoA synthase 1 is a synthetic lethal partner of BRAFV600E in human cancers. *J. Biol. Chem.* 292, 10142–10152. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.788778>

ANEXO I

Capítulo de livro publicado:

**Reprogramações Metabólicas Em Melanomas Resistentes Ao Tratamento
Quimioterápico**

LIVRO: O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2

EDITORA: Atena

DOI: 10.22533/at.ed.35721280517

ISBN: 978-65-5983-135-7

O Fortalecimento Intensivo das Ciências Biológicas e suas Interfaces 2



Daniela Reis Joaquim de Freitas
(Organizadora)

Atena
Editora
Ano 2021

CAPÍTULO 17

REPROGRAMAÇÕES METABÓLICAS EM MELANOMAS RESISTENTES AO TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Data de aceite: 26/05/2021

Data de submissão: 08/03/2021

Camila Kehl Dias

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Departamento de Bioquímica, Laboratório de
Bioquímica Celular
Porto Alegre - RS
<http://lattes.cnpq.br/2701318858333475>

Ivi Juliana Bristot

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Departamento de Bioquímica, Laboratório de
Bioquímica Celular
Porto Alegre - RS
<http://lattes.cnpq.br/2707063407481261>

Fábio Klamt

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Departamento de Bioquímica, Laboratório de
Bioquímica Celular
Porto Alegre - RS
<http://lattes.cnpq.br/3256932358053453>

RESUMO: Tem sido amplamente discutido que o melanoma, um dos tipos mais letais de câncer, pode adaptar temporariamente seu fenótipo após ciclos de tratamento quimioterápico ou devido à pressão microambiental para um fenótipo que apresenta maior resistência ao tratamento e se torna mais invasivo. Os dados disponíveis sugerem que processos recorrentes de reprogramação metabólica estão ativos em células resistentes que são dependentes do metabolismo mitocondrial, apresentando

alterações na sua morfologia e dinâmica. Por um lado, há um fenótipo glicolítico baseado no efeito Warburg, caracterizado por células fermentadoras e com alta proliferação. Por outro lado, existe um fenótipo mais oxidativo, onde a principal fonte de produção de ATP é a fosforilação oxidativa mitocondrial. Este fenótipo pode ser representado por células com taxas de divisão lenta (também chamadas de células *slow-cycling*) e alta expressão do fator epigenético JARID1B (enzima histona lisina demetilase) e o regulador mestre da diferenciação de melanócitos (MITF). Aqui, revisamos aspectos da reprogramação metabólica do câncer, com foco no melanoma, e sua relação com a resistência à quimioterapia. **PALAVRAS-CHAVE:** Melanoma, adaptação metabólica, mitocôndria, OXPHOS, quimio-resistência.

METABOLIC REPROGRAMMING IN MELANOMA CHEMOTHERAPY- RESISTANT CELLS

ABSTRACT: It has been widely discussed that melanoma, one of the most lethal types of cancer, can temporarily adapt its phenotype after cycles of chemotherapy or due to micro-environmental pressure for a phenotype that is more resistant to treatment and becomes more invasive. The available data suggests that recurrent metabolic reprogramming processes are active in resistant cells, which are dependent on mitochondrial metabolism, with changes in their morphology and dynamics. On the one hand, there is a glycolytic phenotype based on the Warburg effect, characterized by fermenting cells with

high proliferation. On the other hand, there is a more oxidative phenotype, where the main source of ATP production is mitochondrial oxidative phosphorylation. This phenotype can be represented by cells with slow division rates (also called slow-cycling cells) and high expression of the epigenetic factor JARID1B (histone lysine demethylase) and of the master regulator of melanocyte differentiation (MITF). Here, we review aspects of metabolic reprogramming in cancer, with a focus on melanoma, and its relationship with resistance to chemotherapy.

KEYWORDS: Melanoma, metabolic adaptation, mitochondria, OXPPOS, chemotherapy-resistance.

1 | INTRODUÇÃO

O melanoma é a forma de câncer de pele mais agressiva. Originada dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina e derivadas da crista neural, que são encontradas principalmente na camada basal da epiderme e nos folículos capilares (LEONARDI *et al.*, 2018). O risco de desenvolvimento desta neoplasia é predominantemente ambiental, estando geralmente associado à exposição crônica da pele ao sol. O melanoma possui alta capacidade metastática e aproximadamente 10% dos pacientes são diagnosticados já no estágio avançado, o que implica em baixas taxas de sobrevida (LEONARDI *et al.*, 2018). Por isso há a necessidade de amplas campanhas de conscientização da população para estímulo do autoexame de pele, conhecido como ABCD, que busca a presença de nevos com **A**ssimetria, **B**ordas irregulares, heterogeneidade de **C**ores e com crescimento **D**inâmico (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Devido à eficiência limitada das quimioterapias convencionais, alguns biomarcadores vêm sendo utilizados para determinar a elegibilidade do paciente para tratamentos direcionados. As principais mutações genéticas presentes em melanomas estão relacionadas aos proto-oncogenes BRAF (B-Raf), NF1 (Neurofibromina 1) e NRAS (N-Ras), que resultam em células adictas à via de sinalização MAPK (RAF/MEK/ERK) (LEONARDI *et al.*, 2018). Em pacientes com a expressão do oncogene BRAF, que representa 37 a 50% dos casos, de melanoma portadores de uma mutação somática (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007). Foi demonstrado que os inibidores de BRAF, dabrafenibe (GSK2118436) ou vemurafenibe (PLX4032), e o inibidor de MEK, trametinibe (GSK1120212), em terapia combinada, melhoraram a sobrevida geral de pacientes de melanoma. No entanto, a regressão tumoral inicial é sucedida por uma recidiva rápida do tumor causada pela sobrevivência (e seleção) de células tumorais residuais com resistência à droga (SULLIVAN; FLAHERTY, 2013). Logo, a identificação dos mecanismos subjacentes de resistência à medicamentos tem sido foco de intensa pesquisa a nos últimos anos.

Surpreendentemente, as adaptações metabólicas nessas células cancerosas que são responsáveis pela recidiva do tumor não segue a concepção clássica do fenótipo celular dependente de altas taxas glicolíticas como principal fonte de energia, também conhecido como Efeito Warburg (CANTOR; SABATINI, 2012; VOGEL *et al.*, 2019).

Portanto, é amplamente aceito que as mutações em BRAF levam à uma reprogramação do metabolismo das células de melanoma de glicolíticas (fermentadoras) para oxidativas (dependentes da atividade da mitocôndria); e como consequência, os inibidores de BRAF também alteram profundamente o metabolismo dessas células (HAQ *et al.*, 2013; ROESCH *et al.*, 2013). Assim, este capítulo discutirá os processos de adaptação bioenergética relacionadas à resistência do melanoma, à terapia alvo e sua capacidade de desafiar o Efeito Warburg, apresentando um metabolismo oxidativo e dependente da mitocôndria.

2 I METABOLISMO ENERGÉTICO DO MELANOMA

Há quase um século, o bioquímico alemão Otto Warburg propôs que a dependência das células neoplásicas pela glicólise para obtenção de energia era causada por uma suposta disfunção mitocondrial. Estudos subsequentes mostraram que as células tumorais podem usar a respiração mitocondrial, entretanto há uma preferência metabólica por converter glicose em lactato, mesmo na presença de oxigênio, um fenômeno cunhado como glicólise aeróbica ou Efeito Warburg. Embora a glicólise produza uma menor quantidade de moles de ATP por mol de glicose, quando comparada com o processo de fosforilação oxidativa, esta via metabólica também permite o fornecimento de biomassa (na forma de derivados de carbono) para a biossíntese de macromoléculas, fundamentais para suportar a alta taxa de proliferação celular. Assim, a alta atividade da via glicolítica é responsável pela alta atividade mitótica de células cancerosas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Além disso, essa rota metabólica, juntamente com a via das pentoses fosfato (PPP), recicla os níveis de NADPH, que é fundamental para fornecer poder redutor essencial para os processos anabólicos necessários para sustentar essa alta replicação celular.

Por conseguinte, as células de melanoma com a mutação BRAF^{V600E} apresentam níveis elevados do fator de transcrição induzido por hipóxia 1 alfa (HIF1 α), molécula classicamente descrita por induzir a transcrição de genes envolvidos com proliferação, sobrevivência celular e metabolismo da glicose, principalmente pela hiperativação da via MAPK (Fig. 1a) (HAQ *et al.*, 2013; MARCHETTI *et al.*, 2018; YEUNG; PAN; LEE, 2008). Essa hiperativação não é exclusiva das células que contêm mutações BRAF, visto que até 90% dos melanomas apresentam um estado de ativação aberrante da via MAPK (LEONARDI *et al.*, 2018). A enzima piruvato desidrogenase cinase (PDK), que é um dos alvos de HIF1 α , contribui para a baixa atividade mitocondrial no melanoma. A PDK controla a utilização de carbono da glicose no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) via inibição da enzima piruvato desidrogenase (PDH). Essa inibição resulta em altos níveis de lactato sérico observados em pacientes de melanoma com mutação para BRAF (HAQ *et al.*, 2013; RATNIKOV, B. I. *et al.*, 2017). Também foi identificado no melanoma o aumento na expressão dos transportadores de glicose, bem como de vários genes glicolíticos, resultando em fenótipo classicamente Warburg devido à ativação aberrante da via MAPK (THEODOSAKIS *et al.*, 2015).

Esse fenômeno (hiperativação da via glicolítica) é tão pronunciado que pode ser utilizado para diagnóstico de áreas tumorais em imagens obtidas por tomografia por emissão de pósitrons/tomografia computadorizada com fluoro-deoxi-glicose (FDG-PET/CT). Assim, se identifica *in vivo* a enorme captação de glicose em diferentes tipos de câncer, quando comparada ao tecido saudável. Em melanoma, as imagens FDG-PET/CT de pacientes após o tratamento com inibidores BRAF e MEK mostram uma diminuição substancial na captação de FDG (SCHMITT *et al.*, 2018).

Alterações metabólicas no melanoma se estendem além da glicólise aeróbica; essas células também podem se tornar dependentes da glutamina, independentemente do histórico oncogênico (RATNIKOV *et al.*, 2015). A oncoproteína c-Myc regula positivamente a enzima glutaminase (GLS), que catalisa a conversão de glutamina em glutamato não apenas para abastecer o ciclo do TCA, mas também para induzir a biossíntese de prolina a partir da glutamina (LIU *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que células BRAF^{V600E} apresentam ativação de Oct-1 (POU classe 2 *homeobox* 1) para promover a regulação positiva das enzimas mitocondriais cetogênicas 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase 1 e liase (HMGCS1 e HMGCL, respectivamente), evidenciando um importante papel da cetogênese no câncer (Fig. 1a). A ativação de Oct1 aumenta os níveis intracelulares de aminoácidos e, especificamente, promove a ligação de BRAF^{V600E} a MEK1 e, subsequentemente, a fosforilação de MEK1 (KANG *et al.*, 2015). Além disso, Oct-1 diminui o metabolismo mitocondrial através da inibição do fator de transcrição PGC1 α (coativador de receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma 1), reforçando o Efeito Warburg (GIRNUN, 2012). O estado anabólico também é sustentado evitando a ativação da proteína cinase ativada por AMP (AMPK), um sensor essencial nas vias de estresse energético celular, que estimula a produção de ATP nas vias catabólicas. Em células BRAF^{V600E}, a serina/treonina cinase LKB, que fosforila e ativa diretamente a AMPK, é inibida pela atividade de ERK, favorecendo o uso de recursos energéticos por vias anaeróbicas (ZHENG *et al.*, 2009).

3 | MECANISMOS METABÓLICOS NO PROCESSO DE RESISTÊNCIA DO MELANOMA

Recentemente, muitos estudos relataram uma adaptação metabólica em resposta ao tratamento com inibidores BRAF/MEK/ERK relacionado a um aumento nas taxas metabólicas mitocondriais, o que leva à recorrência da doença (HAQ *et al.*, 2013; LEBLEU *et al.*, 2014; NAKAGAWA *et al.*, 2016; VOGEL *et al.*, 2019). Clinicamente, o aumento da expressão de genes relacionados à rede de biogênese mitocondrial foi observado em duas coortes independentes, tendo sido associadas a pior sobrevida geral de pacientes com melanoma (ZHANG *et al.*, 2016). A literatura apresenta indícios que a resistência à drogas, caracterizada por alto metabolismo oxidativo mitocondrial (OXPHOS, fosforilação oxidativa), pode estar relacionada a dois estados de diferenciação: (1) um fenótipo desdiferenciado

comumente caracterizado pela alta expressão da enzima histona lisina demetilase (KDM) JARID1B e baixa expressão do fator de transcrição indutor de melanócitos (MITF); ou (2) um fenótipo diferenciado caracterizado por alta expressão de MITF e de PGC1 α . Delgado-Goñi e colegas demonstraram que a reativação do metabolismo mitocondrial durante o tratamento com vemurafenibe não é uniforme. Em seu estudo, a inibição de BRAF deu origem a três clones de células de melanoma com diminuição do consumo de glicose; um com metabolismo OXPHOS por meio da atividade anaplerótica da enzima piruvato carboxilase; os outros dois clones se redirecionaram para o metabolismo lipídico e aumentaram a síntese de prostaglandina E2, sendo mais responsivos ao inibidor BRAF quando co-tratados com um inibidor de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico). Isso indica a importância do metabolismo lipídico e das vias EGFR na reativação de ERK nessas células (DELGADO-GOÑI *et al.*, 2019).

Os melanomas com JARID1B^{alto} são intrinsecamente resistentes à quimioterapia. Este fenótipo ocorre espontaneamente em baixa frequência na massa tumoral, mas a porcentagem desta subpopulação pode aumentar sob tratamentos como cisplatina, vemurafenibe ou temozolamida (ROESCH *et al.*, 2013). O perfil proteômico desse fenótipo revelou a regulação positiva de vários membros da cadeia transportadora de elétrons (CTE), como a NADH desidrogenase (Complexo I), ubiquinol citocromo *c* redutase (Complexo III), citocromo *c* oxidase (Complexo IV) e ATP sintase; assim com a regulação negativa de enzimas glicolíticas, como a hexoquinase I (HK1) e 2 (HK2) (ROESCH *et al.*, 2013). Nesse sentido, as células com superexpressão de JARID1B apresentam OXPHOS alta (Fig. 1b), dependente de glicose, glutamina e ácidos graxos, apresentando níveis intracelulares elevados de substratos da β -oxidação, concomitantemente a níveis reduzidos de lactato (HAQ *et al.*, 2013; VOGEL *et al.*, 2019).

Outro programa metabólico adaptativo que limita a eficácia dos inibidores de BRAF ocorre ao ativar o fator de transcrição MITF, que se transloca para o núcleo e ativa a expressão de PGC1 α (VAZQUEZ *et al.*, 2013). Esse fenótipo também parece ser um fator chave no processo de metástase, uma vez que as células cancerosas circulantes apresentaram dependência da expressão elevada de PGC1 α para desenvolver um potencial invasivo (LEBLEU *et al.*, 2014). Clinicamente, as biópsias de pacientes tratados com inibidores de BRAF mostraram expressão aumentada de MITF (HAQ *et al.*, 2013).

A reconexão metabólica em células de melanoma resistentes a inibidores de BRAF também é promovida pelo microRNA miR-211. Embora seja um alvo transcricional do MITF e haja uma correlação positiva de suas expressões, a atividade do miR-211 não é necessariamente devida ao MITF (DÍAZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2018). Mazar e colaboradores demonstraram que a expressão ectópica de miR-211 regula a respiração mitocondrial, aumentando a conversão de piruvato a acetil-CoA para alimentar o ciclo de TCA na linhagem celular A375 pela regulação negativa de PDK4 (MAZAR *et al.*, 2016). Como esperado, ocorre um aumento na taxa de consumo de oxigênio (OCR, do inglês *oxygen consumption*

rate), de intermediários TCA (citrato, a-ceto-glutarato, succinato, fumarato e malato), de expressão dos complexos respiratórios e diminuição da razão $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ (SAHOO *et al.*, 2019). Em contraste, a deficiência de miR-211 induzida pela deleção via CRISPR/Cas9 diminuiu a OCR sem modificar a taxa de acidificação extracelular ou massa mitocondrial (SAHOO *et al.*, 2019). Além disso, a deficiência de miR-211 diminuiu a capacidade de reserva respiratória, que é descrita como a capacidade de aumentar a transferência de elétrons pela CTE de acordo com a demanda de energia, sugerindo um comprometimento da capacidade de responder ao estresse bioenergético. É importante ressaltar que a deleção do miR-211 promove a sensibilidade de células de melanoma ao medicamento vemurafenibe (SAHOO *et al.*, 2019).

Como os tratamentos com inibidores de BRAF causam estresse celular, a autofagia foi descrita como um dos processos adaptativos em células resistentes (MARTIN *et al.*, 2017). Recentemente, foi descrito que alta expressão de MITF e miR-211 sustenta um sistema de amplificação da autofagia sob inibição de mTOR por inanição ou tratamento com Torin-1 (OZTURK *et al.*, 2019). Neste contexto, o MITF pode se translocar para o núcleo para ativar alvos relacionados à autofagia, bem como miR-211. Curiosamente, miR-211 reforça o processo autofágico ao diminuir o sinal de mTOR, estimulando a localização nuclear de MITF, bem como o regulador mestre de genes da biogênese lisossomal TFEB (fator de transcrição EB) (OZTURK *et al.*, 2019). A secreção de ATP mediada pela autofagia foi observada em células resistentes ao inibidor de BRAF e confirmada por *knockdown* de genes de autofagia, que atenuaram os níveis de ATP extracelular (eATP) (MARTIN *et al.*, 2017). Este eATP, por sua vez, é captado por meio do receptor purinérgico P2RX7, promovendo vias de invasão.

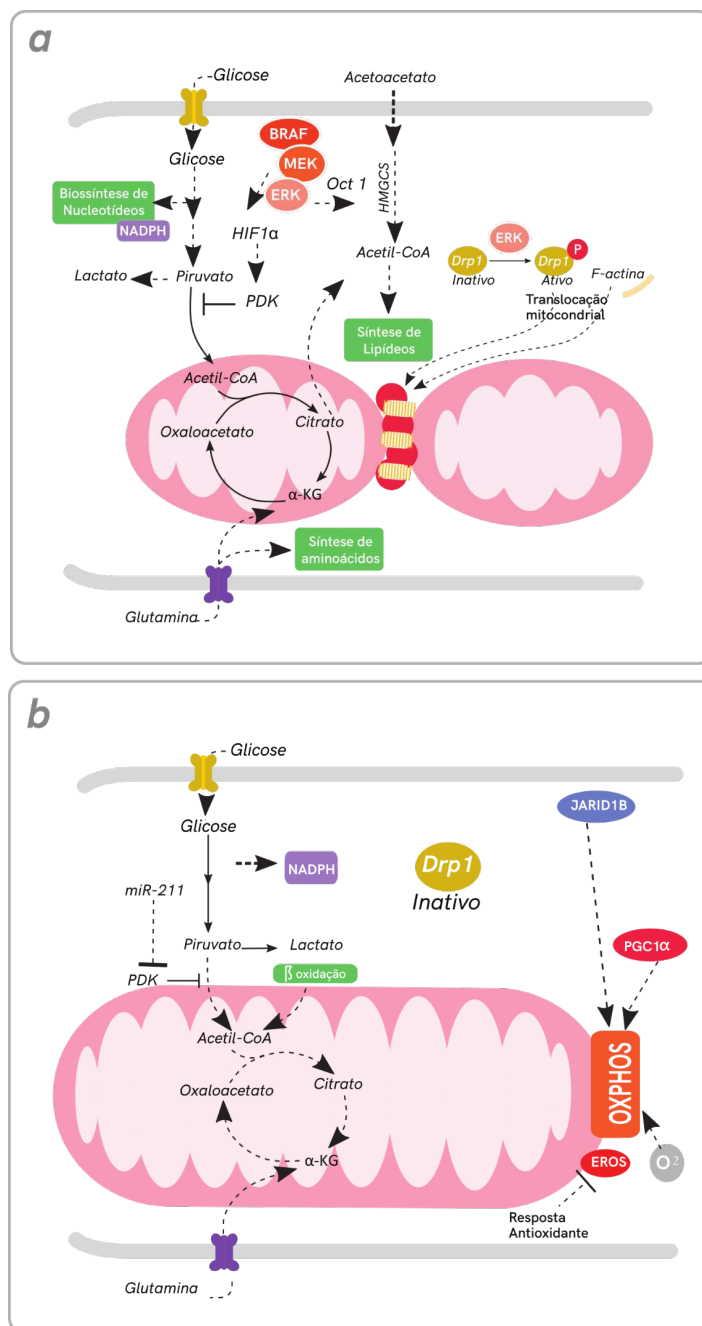


Figura 1: Esquematização de vias metabólicas que estão diferencialmente ativadas e inibidas nos diferentes fenótipos celulares em melanoma (a) células glicolíticas, onde há redirecionamento de carbono para as vias anapleróticas e, concomitantemente processos de fissão mitocondrial. (b) Células com metabolismo altamente oxidativo, que utilizam maior parte do carbono para oxidação total até CO₂, havendo alta produção de EROS e processos ativos de fusão mitocondrial.

4 | ESTRESSE OXIDATIVO, RESPOSTA ANTIOXIDANTE E MICROAMBIENTE ÁCIDO

O alto nível de estresse oxidativo devido a atividade mitocondrial é uma das características das células de melanoma resistentes, já que a maioria das EROs (espécies reativas de oxigênio) celulares são subproduto da respiração mitocondrial (CIERLITZA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). O nível de malondialdeído, um biomarcador de peroxidação lipídica dependente de EROs, encontra-se elevado no plasma de pacientes após um mês de tratamento com vemurafenibe (CORAZAO-ROZAS *et al.*, 2013). Embora EROs promovam muitos aspectos do desenvolvimento e progressão tumorais, a ativação do sistema de defesa antioxidante é uma estratégia das células tumorais para modular e controlar sua ação (Fig. 1b). O subconjunto de células MITF^{alto}/PGC1 α ^{alto} tem níveis aumentados da enzima superóxido dismutase mitocondrial (SOD2), e sua presença na membrana mitocondrial interna permite a dismutação imediata de ânions superóxido, produzidos pela atividade da OXPHOS, em peróxido de hidrogênio (VAZQUEZ *et al.*, 2013). Essas células também apresentam regulação positiva do fator respiratório nuclear (NRF2), que desempenha um papel fundamental na resposta antioxidante contra o estresse oxidativo (ZHANG *et al.*, 2016). O aumento da atividade do NRF2 leva à ativação da PPP e à produção de NADPH, que está envolvido na regeneração da glutatona reduzida (GSH), alterando o potencial redox dependente da glutatona (relação GSH/GSSG) (KHAMARI *et al.*, 2018). Consequentemente, essas rotas protegem as células resistentes MITF^{alto}/PGC1 α ^{alto} de sua própria alta produção de EROs por meio do aumento da atividade mitocondrial, além do estresse oxidativo induzido por moléculas como PEITC (isotiocianato de fenetil), H₂O₂, piperlongumina e vemurafenibe (VAZQUEZ *et al.*, 2013). Embora não haja nenhuma evidência clara de que o NRF2 é regulado positivamente nas células de melanoma JARID1B^{alto}, este fenótipo muda o uso de carbono da glicólise para um fluxo elevado através da PPP, reciclando o NADPH, que então contribui para uma capacidade antioxidante dependente de GSH aumentada (VOGEL *et al.*, 2019).

A plasticidade do melanoma permite que ele sobreviva em microambientes hostis. Sob microambiente ácido, a expressão de SOX2 é estimulada e contribui para o metabolismo OXPHOS. O *knockdown* de SOX2 em células de melanoma expostas a ambiente ácido inibe a atividade de PGC1 α e aumenta a expressão de transportadores de glicose (GLUTs), HK2, PDK1 e lactato desidrogenase A (LDHA) (ANDREUCCI *et al.*, 2018). Consequentemente, foi relatado que as linhagens celulares de melanoma A375 e SK-MEL-28 adquiriram resistência à cisplatina em condições de cultura em pH baixo (6 a 7) (NOGUCHI *et al.*, 2017).

5 | DINÂMICA MITOCONDRIAL NA AGRESSIVIDADE DO MELANOMA

Ao longo dos processos de progressão do melanoma e aquisição de resistência

ao tratamento quimioterápico, as alterações metabólicas estão diretamente associadas às diferenças morfológicas encontradas nas mitocôndrias, pelos processos de fusão e fissão mitocondriais (Fig. 1) (KASHATUS *et al.*, 2015). Enquanto a hiperativação da via BRAF/MAPK/ERK induz um fenótipo altamente glicolítico no melanoma, células resistentes aos inibidores BRAF/MAPK apresentam alterações no metabolismo para um perfil de OXPHOS (HAQ *et al.*, 2013; MARCHETTI *et al.*, 2018; YEUNG; PAN; LEE, 2008).

Essa readaptação metabólica é acompanhada por uma alta expressão de PGC1 α , que modula a biogênese mitocondrial (HAQ *et al.*, 2013). PGC1 α se liga a muitos fatores de transcrição associados à função respiratória mitocondrial, induzindo a expressão de genes envolvidos nestes processos, ao passo que os níveis de mtDNA se mantêm. Isso é seguido por ativação da fusão mitocondrial de forma rápida na grande maioria das células (FRIEDMAN; NUNNARI, 2014; SERASINGHE *et al.*, 2018).

Um estudo sobre a relação entre a produção de melanina e a dinâmica mitocondrial mostrou que ERK tem um efeito anti-melanogênico e induz fragmentação mitocondrial pela ativação de Drp1 (proteína 1 relacionada à dinamina) (KIM *et al.*, 2014). A Drp1 é uma GTPase que regula a fissão mitocondrial, sua fosforilação na serina 616 (S616) induz ativação e translocação para a mitocôndria, enquanto a fosforilação na serina 637 (S637) inibe ambos os processos (REHKLAU *et al.*, 2017). ERK1/ERK2 podem fosforilar S616 de Drp1, e esta atividade é um pré-requisito para tumorigênese induzida por alteração de MAPK. Assim, a expressão aberrante de proteínas da via de sinalização MAPK/ERK no melanoma aumenta a expressão de Drp1 e fosforilação de S616, levando à fissão mitocondrial, enquanto diminui a OCR (KASHATUS *et al.*, 2015; SERASINGHE *et al.*, 2015). A fosforilação Drp1^{S616} em nevos displásicos é um biomarcador promissor, juntamente com a mutação BRAF^{V600E}, para determinar quais lesões apresentam maior probabilidade de se transformar em melanoma (WIEDER *et al.*, 2015). No entanto, um exame qualitativo das mitocôndrias por microscopia eletrônica em células resistentes ao inibidor de BRAF mostrou alterações morfológicas, incluindo significativamente mais cristas com amplo espaço intracrista, quando comparadas às mitocôndrias de células sensíveis (CORAZAO-ROZAS *et al.*, 2013, 2016).

O mecanismo do recrutamento mitocondrial de Drp1, bem como sua oligomerização em torno da membrana mitocondrial externa (MME), parece ser conduzido pela polimerização da actina por estimulação da proteína INF2 (formina 2 invertida ligada ao ER) (CHAKRABARTI *et al.*, 2018). A atividade da actina na fissão mitocondrial depende de sua estabilização em sua forma filamentosa (F-actina), processo que é controlado pela proteína cofilina-1. Quando desfosforilada, a cofilina-1 se liga à F-actina e induz sua despolimerização em monômeros de actina livres (G-actina). Assim, a cofilina-1 diminui a atividade de Drp1 ao desmontar F- em G-actina, regulando negativamente a fissão mitocondrial (REHKLAU *et al.*, 2017). Uma rede mitocondrial notavelmente fusionada é uma característica nas células resistentes aos inibidores BRAF/MAPK devido à perda

da fosforilação em S616 de Drp1, enquanto em células sensíveis sua atividade causa fragmentação mitocondrial (KASHATUS *et al.*, 2015; SERASINGHE *et al.*, 2015). Embora existam evidências que apoiam a regulação da cofilina-1 sobre os processos de fissão mitocondrial dependentes de Drp1, essa relação em melanoma, especificamente, ainda é desconhecida. Além disso, a cofilina-1 foi relatada como reguladora da migração celular tardia e metástase em diferentes tipos de câncer (CASTRO *et al.*, 2010; HENSLEY *et al.*, 2016; IBAÑEZ *et al.*, 2019; POPOW-WOŹNIAK *et al.*, 2012). Em um trabalho de nosso grupo de pesquisa apresentamos um modelo celular de melanoma humano composto por sub- clones estáveis com características biológicas distintas, como produção de melanina e potencial metastático. Em um subclone metastático, encontramos maior expressão de cofilina-1, bem como elevada produção de ROS (BRACALENTE; SALGUERO; *et al.*, 2016). Curiosamente, níveis aumentados de ROS podem ser uma estratégia para sustentar a metástase por oxidação da proteína fosfatase *slingshot 1* (SSH-1L) que se libera de sua proteína reguladora e ativa a cofilina-1 por desfosforilação (BRACALENTE; SALGUERO; *et al.*, 2016).

A cofilina-1 desempenha um papel fundamental em vários processos celulares, e sua concentração ou localização subcelular pode influenciar sua função. Li e colaboradores mostraram que a exposição de células cancerosas ao composto Erucin promove não apenas a desfosforilação da cofilina-1, mas também a translocação da cofilina-1 e de Drp1 para a mitocôndria, levando à fissão e apoptose (LI *et al.*, 2015). Outro estudo mostrou que a fissão mitocondrial em resposta ao tratamento com estaurosporina/etoposídeo/CCCP são dependentes de cofilina-1 (LI *et al.*, 2018). Este estudo propôs que Drp1 e G-actina translocam para a mitocôndria para formar o anel helicoidal em locais de constricção no início do processo de fissão mitocondrial. Posteriormente, a cofilina-1 se transloca para a mitocôndria para despolimerizar a F-actina. Como resultado, há uma dissipação do potencial de membrana mitocondrial (LI *et al.*, 2018). Além disso, a cofilina-1 também pode apresentar localização subcelular nuclear sob estímulos químicos ou físicos específicos, estando correlacionados com resistência em adenocarcinomas pulmonares (BECKER *et al.*, 2013). Recentemente, o mesmo fenômeno foi observado em uma coorte de pacientes de melanoma, na qual a agressividade da doença foi correlacionada com a localização subcelular nuclear desta proteína (BRACALENTE *et al.*, 2018). Portanto, não é importante apenas a expressão de cofilina-1 elevada, mas também sua localização, que pode ser usada como um marcador de prognóstico no melanoma e na progressão da lesão (BRACALENTE *et al.*, 2018; BRACALENTE; IBAÑEZ; *et al.*, 2016; BRACALENTE; SALGUERO; *et al.*, 2016; IBAÑEZ *et al.*, 2019).

Além da morfologia mitocondrial e de sua distribuição celular, algumas proteínas que compõem a estrutura de membrana dupla dessa organela são responsáveis pela sobrevivência celular. Enquanto proteínas integrais da membrana mitocondrial interna (MMI) coordena a OXPHOS, proteínas que interagem com a MME controlam a abertura do

poro de permeabilidade transitória e a apoptose. A apoptose é ativada quando a família de proteínas pró-apoptóticas Bcl-2 desencadeia a liberação de citocromo *c* para o citoplasma. As atividades das proteínas da família Bcl-2 são mediadas por meio de interações com o canal aniônico dependente de voltagem 1 (VDAC1), que controla a permeabilidade mitocondrial (SERASINGHE *et al.*, 2018). O inibidor de BRAF induz a acumulação mitocondrial de ATF2, que por sua vez induz a dissociação de BIM (proteína pró-apoptótica associada a Bcl-2) do complexo BIM/Mcl-1 (Regulador de apoptose MCL1) resultando na ativação dos processos apoptóticos dependentes da mitocôndria. Finalmente, o BIM interage com VDAC1 para liberar o citocromo *c*, promovendo a apoptose. É relevante destacar que a oligomerização de VDAC1 é necessária para que ocorram as alterações mitocondriais. No entanto, células que adquiriram resistência ao inibidor de BRAF apresentam inibição da oligomerização de VDAC1 (GAO *et al.*, 2015). Outra proteína Bcl-2 pró-apoptótica envolvida em células resistentes ao inibidor de BRAF é a BIK (matador de interação com BCL2). A subpopulação de células resistentes, caracterizado por uma parada no ciclo celular, apresenta baixos níveis de mRNA codificante de BIK. A expressão ectópica de BIK em células resistentes leva à sensibilidade à exposição subsequente ao tratamento com vemurafenibe/trametinibe (BORST *et al.*, 2017). Em concordância, tumores contendo células com maiores níveis de sinalização pró-apoptótica tornam-se mais sensíveis (o chamado “*priming* para morte”), apresentando uma melhor resposta clínica a diferentes agentes quimioterápicos (MONTERO *et al.*, 2015).

Em resumo, as evidências de pesquisa apresentadas destacam o papel fundamental da mitocôndria no melanoma não apenas como fonte de energia celular, mas também como coordenadora dos processos de invasão, influenciando o seu arranjo morfológico e o destino celular, determinando em última instância a progressão tumoral ou apoptose.

6 | CONCLUSÃO

Coletivamente, existem na literatura muitos indícios de que uma subpopulação de células tumorais que compartilha o mesmo perfil metabólico pode ser responsável pela manutenção, metástase e recidiva do melanoma após o tratamento. Mesmo apresentando ampla diversidade genética, o fenótipo resistente converge para um conjunto de características semelhantes, em que células apresentam ciclo celular lento, aumento nas taxas metabólicas mitocondriais e morfologia mitocondrial fusionada. A existência desta subpopulação levanta a possibilidade de um alvo clínico valioso para tratamentos combinados com quimioterápicos e para terapia alvo. Portanto, é necessário um esforço coordenado para melhorar nossa compreensão da dinâmica desse fenótipo agressivo e sua relação com o metabolismo tumoral. Assim, será possível, alcançar um tratamento majoritariamente eficiente e que tenha como alvo várias das vantagens metabólicas apresentadas por células tumorais responsáveis pela recidiva.

REFERÊNCIAS

ANDREUCCI, Elena *et al.* **SOX2 as a novel contributor of oxidative metabolism in melanoma cells.** *Cell Communication and Signaling*, v. 16, n. 1, p. 87–100, 2018.

BECKER, Matheus *et al.* **High cofilin-1 levels correlate with cisplatin resistance in lung adenocarcinomas.** *TUMOR BIOLOGY*, v. 35, n. 2, p. 1233–8, 2013.

BORST, Andreas *et al.* **BIK is involved in BRAF/MEK inhibitor induced apoptosis in melanoma cell lines.** *Cancer Letters*, v. 404, p. 70–78, 2017.

BRACALENTE, Candelaria *et al.* **Cofilin-1 levels and intracellular localization are associated with melanoma prognosis in a cohort of patients.** *Oncotarget*, v. 9, n. 35, p. 24097–24108, 2018.

BRACALENTE, Candelaria; SALGUERO, Noelia; *et al.* **Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression : Reversion or promotion of malignancy by inducing melanogenesis or metastasis.** *Oncotarget*, v. 7, n. 27, p. 41142–41153, 2016.

BRACALENTE, Candelaria; IBAÑEZ, Irene L; *et al.* **Reprogramming human A375 amelanotic melanoma cells by catalase overexpression : Upregulation of antioxidant genes correlates with regression of melanoma malignancy and with malignant progression when downregulated.** *Oncotarget*, v. 7, n. 27, p. 41154–41171, 2016.

CANTOR, Jason R; SABATINI, David M. **Cancer cell metabolism: one hallmark, many faces.** *Cancer discovery*, v. 2, n. 10, p. 881–98, out. 2012.

CASTRO, Mauro Antonio Alves *et al.* **CFL1 expression levels as a prognostic and drug resistance marker in nonsmall cell lung cancer.** *Cancer*, v. 116, n. 15, p. 3645–3655, 2010.

CHAKRABARTI, Rajarshi *et al.* **INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division.** *Journal of Cell Biology*, v. 217, n. 1, p. 251–268, 2018.

CIERLITZA, Monika *et al.* **Mitochondrial oxidative stress as a novel therapeutic target to overcome intrinsic drug resistance in melanoma cell subpopulations.** *Experimental Dermatology*, v. 24, n. 2, p. 155–157, 2015.

CORAZAO-ROZAS, Paola *et al.* **Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors.** *Oncotarget*, v. 7, n. 26, p. 39473–39485, 2016.

CORAZAO-ROZAS, Paola *et al.* **Mitochondrial oxidative stress is the achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor.** *Oncotarget*, v. 4, n. 11, p. 1986–1998, 2013.

DELGADO-GOÑI, Teresa *et al.* **Increased in inflammatory lipid metabolism and anaplerotic mitochondrial activation follow acquired resistance to vemurafenib in BRAF -mutant melanoma cells.** *British Journal of Cancer*, v. 122, p. 72–81, 2019.

DÍAZ-MARTÍNEZ, Marta *et al.* **miR-204-5p and miR-211-5p contribute to BRAF inhibitor resistance in melanoma.** *Cancer Research*, v. 78, n. 4, p. 1017–1030, 2018.

FRIEDMAN, Jonathan R.; NUNNARI, Jodi. **Mitochondrial form and function.** *Nature*, v. 505, n. 7483, p. 335–343, 2014.

GAO, Zongwei *et al.* **Mitochondrial ATF2 translocation contributes to apoptosis induction and BRAF inhibitor resistance in melanoma through the interaction of Bim with VDAC1.** *Oncotarget*, v. 6, n. 34, p. 36338–36353, 2015.

GIRNUN, Geoffrey D. **The diverse role of the PPAR γ coactivator 1 family of transcriptional coactivators in cancer** Geoffrey. *Semin Cell Dev Biol.*, v. 23, n. 14, p. 381–388., 2012.

GRAY-SCHOPFER, Vanessa; WELLBROCK, Claudia; MARAIS, Richard. **Melanoma biology and new targeted therapy.** *Nature*, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert a. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HAQ, Rizwan *et al.* **Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF.** *Cancer Cell*, v. 23, n. 3, p. 302–315, 2013.

HENSLEY, Patrick J. *et al.* **Association of epithelial-mesenchymal transition and nuclear cofilin with advanced urothelial cancer.** *Human Pathology*, v. 57, p. 68–77, 2016.

IBAÑEZ, Irene L. *et al.* **Potential predictive value of cofilin-1 for metastasis occurrence in a small cohort of Argentinian patients with mid-low Breslow thickness melanoma.** *Pathology - Research and Practice*, n. August, p. 152582, 2019.

KANG, Hee Bum *et al.* **Metabolic Rewiring by Oncogenic BRAF V600E Links Ketogenesis Pathway to BRAF-MEK1 Signaling.** *Molecular Cell*, v. 59, n. 3, p. 345–358, 2015.

KASHATUS, Jennifer A. *et al.* **Erk2 phosphorylation of Drp1 promotes mitochondrial fission and MAPK-driven tumor growth.** *Molecular Cell*, v. 57, n. 3, p. 537–551, 2015.

KHAMARI, Raeeka *et al.* **Glucose metabolism and NRF2 coordinate the antioxidant response in melanoma resistant to MAPK inhibitors.** *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 3, p. 325–339, 2018.

KIM, Eun Sung *et al.* **Mitochondrial dynamics regulate melanogenesis through proteasomal degradation of MITF via ROS-ERK activation.** *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 27, n. 6, p. 1051–1062, 2014.

LEBLEU, Valerie S. *et al.* **PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis.** *Nature Cell Biology*, v. 16, n. 10, p. 992–1003, 2014.

LEONARDI, Giulia C. *et al.* **Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review).** *International Journal of Oncology*, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, 2018.

LI, Guobing *et al.* **Mitochondrial translocation and interaction of cofilin and Drp1 are required for erucin-induced mitochondrial fission and apoptosis.** *Oncogene*, v. 6, n. 3, p. 1834-49.

- LI, Guobing *et al.* **Mitochondrial fission and mitophagy depend on cofilin-mediated actin depolymerization activity at the mitochondrial fission site.** *Oncogene*, v. 37, n. 11, p. 1485–1502, 2018.
- LIU, W. *et al.* **Reprogramming of proline and glutamine metabolism contributes to the proliferative and metabolic responses regulated by oncogenic transcription factor c-MYC.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 23, p. 8983–8988, 2012.
- MARCHETTI, Philippe *et al.* **Melanoma metabolism contributes to the cellular responses to MAPK/ERK pathway inhibitors.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1862, n. 4, p. 999–1005, 2018.
- MARTIN, Shaun *et al.* **An autophagy-driven pathway of ATP secretion supports the aggressive phenotype of BRAFV600E inhibitor-resistant metastatic melanoma cells.** *Autophagy*, v. 13, n. 9, p. 1512–1527, 2017.
- MAZAR, Joseph *et al.* **MicroRNA 211 Functions as a Metabolic Switch in Human Melanoma Cells.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 36, n. 7, p. 1090–1108, 2016.
- MONTERO, Joan *et al.* **Drug-Induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy.** *Cell*, v. 160, n. 5, p. 977–989, 2015.
- NAKAGAWA, Hiroshi *et al.* **JARID1B Enables Transit between Distinct States of the Stem-like Cell Population in Oral Cancers.** *Cancer Research*, v. 76, n. 18, p. 5538–5549, 2016.
- NOGUCHI, Fumihito *et al.* **Calcium-Dependent Enhancement by Extracellular Acidity of the Cytotoxicity of Mitochondrial Inhibitors against Melanoma.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 16, n. 5, p. 936–947, 2017.
- OZTURK, Deniz Gulfem *et al.* **MITF-MIR211 axis is a novel autophagy amplifier system during cellular stress.** *Autophagy*, v. 15, n. 3, p. 375–390, 2019.
- POPOW-WOŹNIAK, Agnieszka *et al.* **Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells.** *Histochemistry and Cell Biology*, v. 138, n. 5, p. 725–736, 2012.
- RATNIKOV, B. I. *et al.* **Metabolic rewiring in melanoma.** *Oncogene*, v. 36, n. 2, p. 147–157, 2017.
- RATNIKOV, Boris *et al.* **Glutamate and asparagine cataplerosis underlie glutamine addiction in melanoma.** *Oncotarget*, v. 6, n. 10, p. 14–18, 2015.
- REHKLAU, Katharina *et al.* **Cofilin1-dependent actin dynamics control DRP1-mediated mitochondrial fission.** *Cell death & disease*, v. 8, n. 10, p. e3063, 2017.
- ROESCH, Alexander *et al.* **Overcoming Intrinsic Multidrug Resistance in Melanoma by Blocking the Mitochondrial Respiratory Chain of Slow-Cycling JARID1Bhigh Cells.** *Cancer Cell*, v. 23, n. 6, p. 811–825, 2013.
- SAHOO, Anupama *et al.* **MicroRNA-211 Loss Promotes Metabolic Vulnerability and BRAF Inhibitor Sensitivity in Melanoma.** *Journal of Investigative Dermatology*, v. 139, n. 1, p. 167–176, 2019.

SCHMITT, Ronald J *et al.* **Correlation between early FDG PET/CT response to BRAF and MEK inhibition and survival in patients with BRAF-mutant metastatic melanoma.** *Pathology of Melanocytic Tumors*, v. 37, n. 2, p. 314–329, 2018.

SERASINGHE, Madhavika N. *et al.* **Dual suppression of inner and outer mitochondrial membrane functions augments apoptotic responses to oncogenic MAPK inhibition.** *Cell Death and Disease*, v. 9, n. 2, p. 29, 2018.

SERASINGHE, Madhavika N. *et al.* **Mitochondrial division is requisite to RAS-induced transformation and targeted by oncogenic MAPK pathway inhibitors.** *Molecular Cell*, v. 57, n. 3, p. 521–536, 2015.

SHAIN, A. Hunter; BASTIAN, Boris C. **From melanocytes to melanomas.** *Nature Reviews Cancer*, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

SULLIVAN, Ryan J.; FLAHERTY, Keith T. **Resistance to BRAF-targeted therapy in melanoma.** *European Journal of Cancer*, v. 49, n. 6, p. 1297–1304, 2013.

THEODOSAKIS, Nicholas *et al.* **BRAF Inhibition Decreases Cellular Glucose Uptake in Melanoma in Association with Reduction in Cell Volume.** *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 14, n. 7, p. 1680–1692, 2015.

VAZQUEZ, Francisca *et al.* **PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress.** *Cancer Cell*, v. 23, n. 3, p. 287–301, mar. 2013.

VOGEL, Felix C.E. *et al.* **Targeting the H3K4 demethylase KDM5B reprograms the metabolome and phenotype of melanoma cells.** *Journal of Investigative Dermatology*, 2019.

WIEDER, Shira Y. *et al.* **Activation of the Mitochondrial Fragmentation Protein DRP1 Correlates with BRAFV600E Melanoma.** *J Invest Dermatol*, v. 135, n. 10, p. 2544–2547, 2015.

YEUNG, S. J.; PAN, J.; LEE, M. H. **Roles of p53, MYC and HIF-1 in regulating glycolysis - The seventh hallmark of cancer.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 24, p. 3981–3999, 2008.

ZHANG, Gao *et al.* **Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 126, n. 5, p. 1834–1856, 2016.

ZHENG, Bin *et al.* **Oncogenic B-RAF Negatively Regulates the Tumor Suppressor LKB1 to Promote Melanoma Cell Proliferation.** *Molecular Cell*, v. 33, n. 2, p. 237–247, 2009.

ANEXO II

Capítulo de livro publicado:

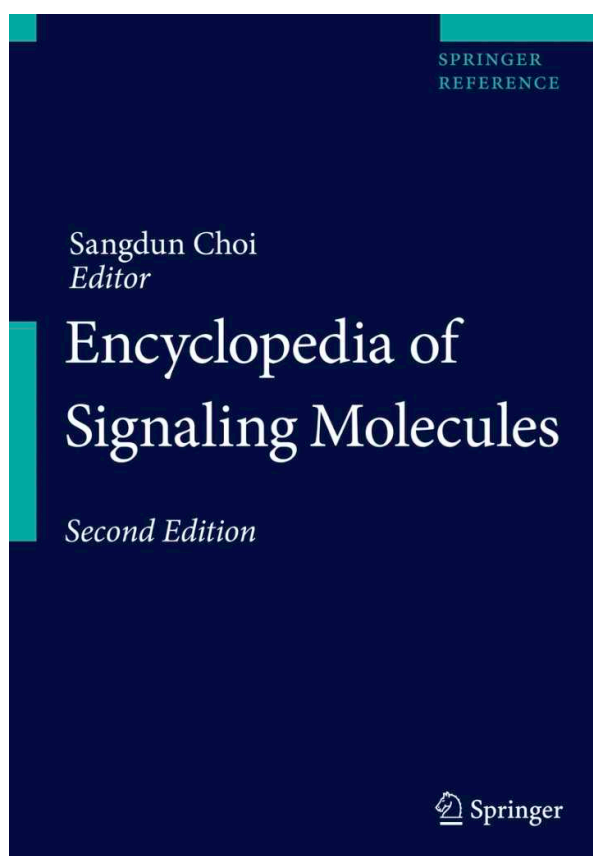
IDH1 (Isocitrate dehydrogenase 1)

LIVRO: Encyclopedia of Signaling Molecules

EDITORIA: Springer, Cham

DOI: 10.1007/978-3-319-67199-4_1016397

ISBN: 978-3-319-67199-4



ICR2B

- ▶ [ABCA Transporters](#)

ID4

- ▶ [Inhibitor of DNA Binding 4 \(ID4\)](#)

IDB4

- ▶ [Inhibitor of DNA Binding 4 \(ID4\)](#)

IDDM22

- ▶ [CCR5](#)

IDH1

- ▶ [IDH1 \(Isocitrate Dehydrogenase 1\)](#)

IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase 1)

Ivi Juliana Bristot, Fernanda Stapenhorst França and Fábio Klamt

Laboratory of Cellular Biochemistry, Department of Biochemistry, Institute of Basic Health Science (ICBS), Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Synonyms

Cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase; ICDC; ICDH; IDH1; IDP; IDPC; Oxalosuccinate decarboxylase; Peroxisomal decarboxylase dehydrogenase; PICD; Soluble NADP⁽⁺⁾-specific

Historical Background

The *IDH1* gene on chromosome 2 encodes the cytosolic isoenzyme of isocitrate dehydrogenase, enzyme that catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate into alpha-ketoglutarate (alpha-KG). Hogeboom and Schneider were researching the intracellular distribution of the enzymes responsible for the reactions of the Krebs tricarboxylic cycle when they first reported this enzyme in cytosol in 1950 (Hogeboom and Schneider 1950). Chen and collaborators found that IDH1 was consistent with a dimeric molecular structure, that the gene locus is probably autosomal, and it is different from the mitochondrial locus of isocitrate dehydrogenase (Chen et al. 1972). The single subunit of the enzyme is 414 amino acids long with an estimated molecular mass of 46.65 kDa and contains a C-terminal tripeptide, alanine-lysine-leucine, which is the type 1 peroxisomal targeting sequence (Nekrutenko et al. 1998). IDH1 is involved in many cellular processes such as maintaining cellular cholesterol and fatty acid homeostasis, participating in the redox balance, and in beta-cells it participates in the control of pancreatic glucose-stimulated insulin secretion (Lee et al. 2002; Ronnebaum et al. 2006; Shechter et al. 2003). Approximately 27% of the total IDH1 is associated with peroxisome that is the only NADPH provider (Geisbrecht and Gould 1999).

A gene expression analysis in 22 glioblastoma multiforme samples presented 12% of mutation on the *IDH1* gene and was associated with a prolonged patient survival (Parsons et al. 2008). This mutation was also found in acute myeloid leukemia, chondrosarcoma, intrahepatic cholangiocarcinoma, and angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients (Molenaar et al. 2014). Since then, this mutation has been studied as a prognostic marker as well as a therapeutic target.

Phylogenetic Tree

Several studies have been comparing the activity and function of the cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase between different

kingdoms. The IDH proteins seem to have a high degree of amino acid conservation. There are 157 identical amino acid positions among all eukaryotic IDH proteins, and 152 of these are also identical in the Proteobacteria *Sphingomonas yanoikuyae* polypeptide. One of these conserved amino acid residues are involved in the binding of the isocitrate-Mg²⁺ complex (Nekrutenko et al. 1998).

Eukaryotic cells express five isocitrate dehydrogenases that catalyze the oxidative decarboxylation of isocitrate into alpha-HG. There are three enzymes that utilize NAD as cofactor (NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase), and their location are all in the mitochondrial matrix (Geisbrecht and Gould 1999). Two enzymes utilize NADP as cofactor (NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase), one is located in mitochondria (IDH2) and the other is predominantly cytosolic (IDH1) (Geisbrecht and Gould 1999).

In contrast to eukaryotes, *Escherichia coli* does not present NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase and contains only one type NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (Gálvez and Gadal 1995). *E. coli* and mammals share about 14% of sequence identity of IDH, and its activity is controlled by the phosphorylation/dephosphorylation at a single serine residue (S113), where the phosphorylation prevents the isocitrate binding (Gálvez and Gadal 1995; Nekrutenko et al. 1998). However, the isocitrate dehydrogenase found in the Proteobacteria *S. yanoikuyae* shows 62% of identity with the human NADP-dependent cytosolic enzyme (Nekrutenko et al. 1998).

All mammalian cytosolic IDH contain a C-terminal tripeptide, alanine-lysine-leucine, which has been identified as a type I peroxisomal targeting signal (PTS1) (Nekrutenko et al. 1998). PTS1 is a tripeptide sequence, which is typically found at the C-terminus of peroxisomal proteins (Nekrutenko et al. 1998). PTS1 has also been described in yeast and some plants (Nekrutenko et al. 1998; Geisbrecht and Gould 1999).

The phylogenetic analysis of the *IDH* family suggested that the mitochondrial form is more closely related to the cytosolic form of the enzyme than the cytosolic forms between the kingdoms. Then, these genes arose through separate gene

duplication events and are not orthologous in animals, fungi, and plants (Nekrutenko et al. 1998). *Saccharomyces cerevisiae*, classified as members of the fungus kingdom, have 59% identical to human *IDH1* (Geisbrecht and Gould 1999).

Structure

IDH1 is an asymmetric homodimer in the cytoplasm. The coding regions encode a single subunit of the enzyme that is 414 amino acids long (Parsons et al. 2008). Each monomer consists of three domains: a large domain, a small domain, and a clasp domain.

According to Xu and collaborators, the large (residues 1 – 103 and 286 – 414) and small (104 – 136 and 186 – 285) domains are joined together by a beta-sheet and there are clefts flanked on each side of the beta-sheet, and the active site is localized in the deep cleft and is formed by the large and small domains of one subunit and the small domain of the adjacent subunit (Xu et al. 2004). The active cleft consists of a NADP-binding site and the isocitrate-metal ion-binding site (Parsons et al. 2008). The Arg¹³² residue forms hydrophilic interactions with the alpha-carboxylate of isocitrate (Parsons et al. 2008). The clasp (residues 137 – 185) domain holds the two subunits together (Xu et al. 2004).

In its structure, the IDH1 features the peroxisomal targeting PST-1 sequence (Ala-Lys-Leu-COOH), a subcellular peroxisomes localization (Shechter et al. 2003).

Physiological Function

IDH1 reaction converts isocitrate to alpha-HG and reduces NADP⁺ to NADPH, and in hypoxic contexts it can make the reverse reaction (Molenaar et al. 2014). IDH1 is the major cytosolic NADPH producer, 13- and 24-fold higher than that of glucose-6-phosphate dehydrogenase and malic enzyme, respectively (Koh et al. 2004). One possible explanation for this is that IDH1 has no negative feedback by NADPH such as the mentioned enzymes above.

NADPH is an essential cofactor for the regeneration of glutathione (GSH), which is an important nonenzymatic antioxidant. GSH is the reduced form, and this thiol group is able to donate a reducing equivalent to other molecules, such as reactive oxygen species to neutralize them, and it becomes the oxidized form glutathione disulfide (GSSG) (Lee et al. 2002). After oxidized to GSSG, GSH levels are restored by NADPH-dependent enzyme activity glutathione reductase (GR), which reduces GSSH to GSH (Jo et al. 2002). Furthermore, NADPH is required for the formation of active catalase tetramers, activity of cytochrome p450, and thioredoxins system (Molenaar et al. 2014). These are all involved with the cellular antioxidant balance. NADPH provided by IDH1 plays a key role in cellular protection against ultraviolet radiation-induced oxidative damage as well (Jo et al. 2002).

Despite its role in protecting against oxidative damage, IDH1 is susceptible to oxidative inactivation by nitric oxide, peroxyxynitrite, reactive oxygen species (ROS), and lipid peroxidation products (Batinic-Haberle and Benov 2008). Then, enzymes that maintain the cell redox balance are important in protecting IDH1 against inactivation, such as superoxide dismutase (SOD) (Batinic-Haberle and Benov 2008).

NADPH is required for the fat and cholesterol biosynthesis such as 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, acyl-CoA reductase, and 2,4-dienoyl-CoA reductase enzymes. It has been shown that IDH1 activity is positively correlated with the degree of these biosynthesis pathways in mice and human (Koh et al. 2004). Furthermore, the transcription factors SREBP1 e SREBP2 that upregulate the synthesis of several enzymes involved in cholesterol and fatty acid synthesis can activate the *IDH1* promoter genes (Shechter et al. 2003). In the peroxisome, IDH1 is the only NADPH supplier. In this organelle, NADPH and alpha-HG is required for the phytanoyl-CoA hydroxylase reaction which is necessary for alpha-oxidation of branched chain fatty acids (Shechter et al. 2003).

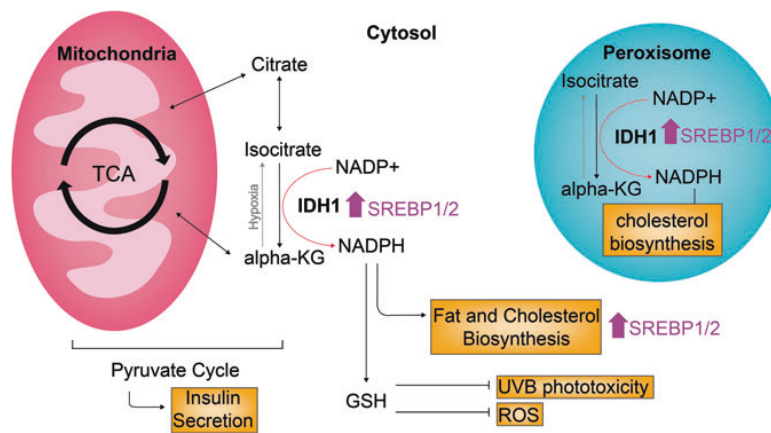
Another NADPH-dependent pathway is the movement of pyruvate between mitochondria

and cytosol, and this pyruvate cycle is involved in the regulation of insulin secretion in beta cells. In this sense, IDH1 play a critical role by supplying the cofactor and alpha-KG that can be converted into pyruvate (Ronnebaum et al. 2006) (Fig. 1).

Cancer

Genetics characterization in several cancer types has been carried out looking for new therapeutic targets. In this way, *IDH1* mutation was discovered in the glioblastoma multiforme, and now we know it can be present in acute myeloid leukemia, chondrosarcoma, intrahepatic cholangiocarcinoma, and angioimmunoblastic T-cell lymphoma (Molenaar et al. 2014). This mutation is heterozygous and occurs at a single residue of IDH1 in the active site, and it is more frequent at arginine 132 (R132) where R132 is replaced by histidine (R132H), cysteine (R132C), serine (R132S), glycine (R132G), leucine (R132L), or glutamine (R132Q) (Molenaar et al. 2014). The exchange of an amino acid with strong positively charged to lower electrical amino acids results in reorganization of the enzyme active site and appears to favor the active closed state of the enzyme (Molenaar et al. 2014). Consequently, *IDH1* mutation leads to a loss of normal enzyme function and confer a neoenzymatic gain of function for NADPH-dependent reduction of alpha-KG to *d*-2-hydroxyglutarate (2HG) (Dang et al. 2009).

This neoenzymatic function causes several changes in *IDH1*-mutated cells. The redox balance is affected by 2HG-induced oxidative stress and by decreasing NADPH which is a cofactor required in GSH reaction, a nonenzymatic antioxidant (Reitman and Yan 2010). Moreover, 2HG leads epigenetic dysregulation through competitive inhibitor of multiple alpha-KG-dependent dioxygenases such as TET2, EGLN, and Jumonji-C domain-containing histone demethylases and causing DNA hypermethylation and altered HIF intracellular concentrations, for example (Chan et al. 2015; Molenaar et al. 2014). In acute myeloid leukemia, *IDH1* mutation directly inhibits



IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase 1), Fig. 1 *IDH1* physiology in normal cell metabolism. IDH1 converts isocitrate to alpha-ketoglutarate and reduces NADP^+ to NADPH, and in hypoxic contexts it can make the reverse reaction. IDH1 is located in the cytosol and the peroxisomes. The NADPH contributes to the reduction of glutathione and because of this protects against reactive oxygen species and ultraviolet radiation-induced oxidative

damage. NADPH contributes to fatty acid and cholesterol synthesis. Furthermore, SREBP 1-2 classically known to activate genes involved in cholesterol synthesis and fatty acids also activate the *IDH1* gene. Another NADPH-dependent pathway is the movement of pyruvate between mitochondria and cytosol, and this pyruvate cycle is involved in the regulation of insulin secretion

cytochrome *c* oxidase through 2HG accumulation (Chan et al. 2015). All these alterations can range depending on the mutation in *IDH1* since each mutant has a percentage of 2HG production (Molenaar et al. 2014). The most frequent mutation in glioma and acute myeloid leukemia (AML) is the R132H, and this is the weak 2HG producer (Reitman and Yan 2010). R132H is associated with a relatively prolonged patient survival for glioblastoma but not for AML (Molenaar et al. 2014). In this way, just the kind of mutation is not sufficient to define the action of this mutation in cancer. It has been hypothesized that the intracellular 2HG concentration, which gives the largest growth advantage, varies depending on the tumor's cell type of origin.

Summary

In conclusion, several reports provide evidence that IDH1 plays an important role in cell

metabolism. This cytosolic NADP^+ -dependent isocitrate dehydrogenase is the major cytosolic NADPH producer, which is a cofactor in several biological reactions, and is required for regeneration of glutathione, fat, and cholesterol biosynthesis. This IDH isoform also plays a critical role by supplying the cofactor and alpha-KG for the pyruvate cycle between mitochondria and cytosol. In some types of cancer, it was demonstrated that heterozygous residue mutation of IDH1 in the active site leads to a loss of normal enzyme function and confers a neoenzymatic gain of function for NADPH-dependent reduction of alpha-KG to HG. The new function changes cell metabolism, and this is reflected in better or worse patient prognosis depending on the specific mutation in *IDH1* and the tumor's cell type of origin. Further experimental studies are required to improve the understanding of *IDH1* mutation in cancer cells, and how tumor types affect the action of this mutation.

References

- Batinic-Haberle I, Benov LT. An SOD mimic protects NADP⁺ – dependent isocitrate dehydrogenase against oxidative inactivation. *Free Radic Res.* 2008;42:618–24. doi:10.1080/10715760802209639.
- Chan SM, Thomas D, Corces-Zimmerman MR, Xavy S, Rastogi S, Hong WJ, Zhao F, Medeiros BC, Tyvoll DA, Majeti R. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations induce BCL-2 dependence in acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2015;21:178–84. doi:10.1038/nm.3788.
- Chen S, Fossum BLG, Giblett ER. Genetic variation of the soluble form of NADP-dependent isocitric dehydrogenase in man. *Amer J Hum Genet.* 1972; 325–9.
- Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liau LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature.* 2009;462:739–44. doi:10.1038/nature09132.
- Gálvez S, Gadal P. On the function of the NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isoenzymes in living organisms. *Plant Sci.* 1995;105:1–14.
- Geisbrecht BV, Gould SJ. The human PICD gene encodes a cytoplasmic and peroxisomal NADP⁺ – dependent isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1999;274: 30527–33.
- Hogeboom GH, Schneider WC. Cytochemical studies of mammalian tissues III. Isocitric dehydrogenase and triphosphopyridine nucleotide-cytochrome c reductase of mouse liver. *J Biol Chem.* 1950;186:417–27.
- Jo SH, Lee SH, Chun HS, Lee SM, Koh HJ, Lee S-E, Chun JS, Park JW, Huh TL. Cellular defense against UVB-induced phototoxicity by cytosolic NADP (+) – dependent isocitrate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;292:542–9. doi:10.1006/bbrc.2002.6667.
- Koh H-J, Lee S-M, Son B-G, Lee S-H, Ryoo ZY, Chang K-T, Park JW, Park DC, Song BJ, Veech RL, Song H, Huh TL. Cytosolic NADP⁺ – dependent isocitrate dehydrogenase plays a key role in lipid metabolism. *J Biol Chem.* 2004;279:39968–74. doi:10.1074/jbc.M402260200.
- Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW. Cytosolic NADP⁺ – dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med.* 2002;32:1185–96.
- Molenaar RJ, Radivoyevitch T, Maciejewski JP, van Noorden CJF, Bleeker FE. The driver and passenger effects of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in oncogenesis and survival prolongation. *Biochim Biophys Acta – Rev Cancer.* 2014;1846:326–41. doi:10.1016/j.bbcan.2014.05.004.
- Nekrutenko A, Hillis DM, Patton JC, Bradley RD, Baker RJ. Cytosolic isocitrate dehydrogenase in humans, mice, and voles and phylogenetic analysis of the enzyme family. *Mol Biol Evol.* 1998;15:1674–84.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu I, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SKN, Shinjo SMO, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science.* 2008;321:1807–12. doi:10.1126/science.1164382.
- Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102:932–41. doi:10.1093/jnci/djq187.
- Ronnebaum SM, Ilkayeva O, Burgess SC, Joseph JW, Lu D, Stevens RD, Becker TC, Sherry AD, Newgard CB, Jensen MV. A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2006;281:30593–602. doi:10.1074/jbc.M511908200.
- Shechter I, Dai P, Huo L, Guan G. IDH1 gene transcription is sterol regulated and activated by SREBP-1a and SREBP-2 in human hepatoma HepG2 cells: evidence that IDH1 may regulate lipogenesis in hepatic cells. *J Lipid Res.* 2003;44:2169–80. doi:10.1194/jlr.M300285-JLR200.
- Xu X, Zhao J, Xu Z, Peng B, Huang Q, Arnold E, Ding J. Structures of human cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase reveal a novel self-regulatory mechanism of activity. *J Biol Chem.* 2004;279: 33946–57. doi:10.1074/jbc.M404298200.

IDP

- ▶ IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase 1)

IDPC

- ▶ IDH1 (Isocitrate Dehydrogenase 1)

IER1

- ▶ Regulator of G-Protein Signaling 1 (RGS1)

ANEXO III

Publicações em Colaboração

DE CARVALHO, Néelson R. et al. Eugenia uniflora leaf essential oil promotes mitochondrial dysfunction in *Drosophila melanogaster* through the inhibition of oxidative phosphorylation. *Toxicology Research*, v. 6, n. 4, p. 526–534, 2017.

LOPES, Fernanda Martins et al. Mimicking Parkinson's Disease in a Dish: Merits and Pitfalls of the Most Commonly used Dopaminergic In Vitro Models. *NeuroMolecular Medicine*, v. 19, n. 2–3, p. 241–255, 2017.

MACEDO, Gabriel et al. Abstract 804: Energetic metabolism and DNA damage response in fibroblasts from Li-Fraumeni syndrome patients: new insights into the molecular mechanisms of the disease. *Cancer Research*, v. 75, n. 15_Supplement, p. 804, 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-804>>.

PARISI, Mariana Migliorini et al. Immunosenescence Induced by Plasma from Individuals with Obesity Caused Cell Signaling Dysfunction and Inflammation. *Obesity*, v. 25, n. 9, p. 1523–1531, 2017.

SCHONHOFEN, Patrícia et al. Cannabinoid-Based Therapies and Brain Development: Potential Harmful Effect of Early Modulation of the Endocannabinoid System. *CNS Drugs*, v. 32, n. 8, p. 697–712, 2018.

SCHÖNHOFEN, Patrícia et al. Cannabidiol Exposure During Neuronal Differentiation Sensitizes Cells Against Redox-Active Neurotoxins. *Mol Neurobiol*, v. 26–37, n. 1, p. 26–37, 2015.

STAPENHORST FRANÇA, Fernanda; BRISTOT, Ivi Juliana; KLAMT, Fábio. LDHA (Lactate Dehydrogenase A). *Encyclopedia of Signaling Molecules*, p. 2835–2839, 2018.

ANEXO IV



Comisión Nacional de Energía Atómica

March 28th, 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Bioquímica
Laboratório de Bioquímica Celular
Dr. Fabio Klamt

I certify that Ivi Bristot stayed at our Laboratory on March 27th and 28th. During these days, she gave us a seminar of her research project: "Energy metabolism of cancer cells and high resolution respirometry". She also participated in a presentation of our project related to studies of gene expression by microarrays experiments in a model of melanoma cells. We discussed about the interesting experiments that we will be able to perform in this model to study alteration in mitochondrial function in melanoma cells by using the respirometry. Her stay here was fruitful to continue collaborations in topics of interest to our both research groups in the framework of our Binational Project PICT-CABBIO 2014-0818, Argentina and MCTI/CNPQ/CBAB Cooperación Internacional em Biotecnologia (465113/2014-1), Brazil.

Hebe Durán
Gerencia de Investigación y Aplicaciones
Comisión Nacional de Energía Atómica

Dr. GUILLERMO V. MARTÍ
GERENTE
INVESTIGACIÓN Y APLICACIONES

Ayda. General Paz 1499 (1650) San Martín, Provincia de Buenos Aires - República Argentina
Tel. (+54 11) 6772-7000

ANEXO V



I Oficina de Respirometria de Alta Resolução

28 a 29 de setembro, UNIPAMPA São Gabriel

Cronograma de atividades (Carga horária: 15h teórico/prática)

28 de Setembro

- 13:00 – 14:30h Palestra de Abertura: *Respirometria de Alta Resolução e sua aplicabilidade*.
Prof. Fábio Klamt, PhD (Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS)
- 15:00 – 19:00h Atividade Prática: Instalação e calibração do Oxígrafo O2K OROBOROS
Ivi Juliana Bistrot, MSc (PEAC/UFRGS, Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS) / **Prof. Fábio Klamt**, PhD (Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS)

29 de Setembro

- 8:00 – 9:15h Atividade Teórica: Respirometria no dia-a-dia do Laboratório
Ivi Juliana Bistrot, MSc (PEAC/UFRGS, Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS) / **Prof. Fábio Klamt**, PhD (Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS)
- 9:30 – 12h Atividade Prática: Protocolo de Respirometria Basal em Células Integras
Ivi Juliana Bistrot, MSc (PEAC/UFRGS, Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS) / **Prof. Fábio Klamt**, PhD (Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS)
- Cuidado com a amostra
 - Titulação de amostra
 - Limpeza do equipamento
 - Análise de dados
- 12:00 – 13h Almoço
- 13:00 – 18h Atividade Prática: Protocolo Utilizando Amostras Permeabilizadas
Profa. Ivi Juliana Bistrot, MSc (PEAC/UFRGS, Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS) / **Prof. Fábio Klamt**, PhD (Laboratório de Bioquímica Celular/UFRGS)
- Apresentação do Protocolo
 - Utilização de Digitonina
 - Análise de dados
 - Dúvidas/Discussão Final
-