

Gabriela Fernandes De Toledo

Efeitos antineoplásicos do dicloroacetato de sódio (DCA) e omeprazol em linhagens de melanoma oral canino: estudo dos mecanismos de ação

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Programa de Pós-Graduação em Oncologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Zaidan Dagli

**São Paulo
2022**

Gabriela Fernandes De Toledo

Efeitos antineoplásicos do dicloroacetato de sódio (DCA) e omeprazol em linhagens de melanoma oral canino: estudo dos mecanismos de ação

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de Pós-Graduação em Oncologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lucia Zaidan Dagli

**São Paulo
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Toledo, Gabriela Fernandes de
Efeitos antineoplásicos do dicloroacetato de
sódio (DCA) e omeprazol em linhagens de melanoma
oral canino : estudo dos mecanismos de ação /
Gabriela Fernandes de Toledo. -- São Paulo, 2022.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Maria Lucia Zaidan Dagli.

Descritores: 1.Omeprazol 2.Moduladores
metabólicos 3.Neoplasias 4.Melanoma 5.Canino 6.Ácido
dicloroacético

USP/FM/DBD-524/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

“Às minhas heroínas Silvia e Carolina. À Donna e Romeo, e a todos os pacientes veterinários e humanos oncológicos, que perderam ou permanecem na luta contra a doença.”

Agradecimentos

Agradeço profundamente a minha querida orientadora Prof^a Dra Maria Lucia Zaidan Dagi, por toda a sua orientação e amizade. A quem sempre admirei e que sempre acreditou em meu potencial. Agradeço por ter me concedido a honrosa oportunidade de realizar o meu maior sonho. Àquela que me acolheu desde a primeira iniciação científica, e me incentivou a ser uma cientista e oncologista veterinária cada vez melhor. Que me ensina todos os dias a nunca desistir dos meus sonhos, mesmo em tempos difíceis e que me guiou em todos os momentos importantes durante minha trajetória na área científica.

Agradeço com todo meu coração, a minha querida amiga e colaboradora direta Dra. Márcia Kazumi Nagamine, por todos os conselhos e orientações. Por toda paciência e ensinamentos sobre a ciência e a vida. Pela sua amizade e seus conselhos, que desde a iniciação científica, com toda a paciência e carinho, me guiaram e guiam até hoje.

Dedico este trabalho a minha amada mãe, por ter me apoiado nesta jornada. Ela foi minha fonte de luz e apoio, me levantando após cada tropeço e me ensinando a nunca desistir dos meus sonhos, mesmo quando se pareciam impossíveis de alcançar. À minha amada irmã, por todo incentivo, apoio e amor nesta minha jornada, pelo exemplo de mulher forte e resiliente, do qual me espelho sempre. A elas, eu agradeço o exemplo de mulheres fortes e guerreiras, e por sempre estarem presentes nos momentos bons e difíceis que esta jornada me trouxe, juntas nós somos sempre fortes. À minha família, pelo apoio em todas as etapas deste processo.

Aos meus pets falecidos Donna, Romeo e Nikkie, que são os motivos por eu nunca desistir de ser uma Médica Veterinária cada vez melhor, e que me ensinaram o mais puro amor e quando é hora de deixar partir. Aos meus gatos Alice e Chess, que estão sempre presentes nas horas de estudos e inúmeras noites em claro, sempre transbordando amor e calma.

À minha querida amiga, presente que o mestrado me trouxe, Simone Palmeira, por todos os momentos de risadas, cafés, desabafos, descontração e acolhimento nos momentos difíceis.

Aproveito para agradecer todos meus colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada (LOEC), por partilhar todos estes anos de companheirismo e conhecimento.

Agradecimentos ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, à Prof^a Dra Cristina Oliveira Massoco de Salles Gomes pelo aceite de nossa colaboração e aos alunos Msc. Victor Nowash e Msc. Cassia Correa Yassumaru, pela colaboração e auxílio na realização das citometrias de fluxos que foram utilizadas neste projeto.

Agradeço grandiosamente a todos colegas do Laboratório de Genética Mitocondrial do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela recepção calorosa e especialmente a Prof^a Nadja Cristhina de Souza Pinto, por todo acolhimento, pelo aceite de nossa colaboração e por toda a orientação na realização do experimento SeaHorse. Meu muito obrigada ao aluno Msc. Felipe Truglio Machado, por todo o auxílio e colaboração na realização dos meus experimentos do SeaHorse, e a aluna de doutorado Laís Yoshie Morikawa Muta, pela colaboração na realização dos testes de PCR para micoplasma neste mesmo laboratório.

Ao programa de Pós-Graduação em Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, à Prof^a Dra^a Luisa Lina Villa, as secretarias e ao corpo docente da Instituição, agradeço a oportunidade de auxílio durante toda a realização desta pesquisa.

AGRADECIMENTO À FAPESP

Agradeço profundamente à FAPESP pela concessão da bolsa de Mestrado (Processo no 2018/16515-3.), a qual foi essencial para a realização deste projeto.

“Nós nunca descobriremos o que vem depois da escolha se não tomarmos uma decisão.
Por isso, entenda os seus medos, porém jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos.” –
Lewis Carroll.

Normalização adotada

Esta dissertação está de acordo com as normas em vigor no momento da publicação deste:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

Lista de Abreviações

DCA – Dicloroacetato de Sódio

OMP – Omeprazol

OCR – Oxygen Consumption Rate

MOC – Melanoma Oral Canino

WES – Whole Exome Sequencing

IHQ – Imunohistoquímica

COX-2 – Cyclooxygenase 2

KIT - tyrosine-protein kinase gene

EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor

SOX – SRY-related HMG-box Transcription factor family

WHO – World Health Organization

PDH – Piruvato Desidrogenase

PDK – Piruvato Desidrogenase Quinase

CPD – Complexo Piruvato Desidrogenase

GLUT – Transportador de glicose

ATP – Adenosina- ‘5-Fosfato

ADP – Adenosina Difosfato

H⁺ - Hidrogênio

HIF-1- α – Hypoxia Inducible Factor – 1 – Alpha

TCA – Ciclo Ácido Tri-carboxílico

OXFOS – Fosforilação Oxidativa

ROS – Espécies reativas de Oxigênio

NAD – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

NADPH – nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

Sumário

RESUMO	XIII
ABSTRACT	XV
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVOS GERAIS	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 A LIGAÇÃO ENTRE O CÃO E O HUMANO: A IMPORTÂNCIA DA ONCOLOGIA COMPARADA	4
3.2 MELANOMA ORAL CANINO	7
3.2.1 <i>Patogênese</i>	7
3.2.2 <i>Aspectos epidemiológicos do melanoma oral canino</i>	9
3.2.3 <i>Aspectos histopatológicos e clínicos do melanoma oral canino</i>	11
3.2.4 <i>Metabolismo adaptativo: marca registrada do câncer</i>	21
3.2.5 <i>O Metabolismo do câncer</i>	23
3.2.6 <i>Drug-Repurposing de moduladores metabólicos na Oncologia Veterinária e Comparada</i>	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1 LINHAGENS E CULTIVO CELULAR	32
4.2 DROGAS	33
4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA.....	33

4.4 ANÁLISE DE MORTE CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO COM USO DOS FLUORÓFOROS ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO	35
4.5 AVALIAÇÃO BIOENERGÉTICA PELO ENSAIO DE SEAHORSE XFe96.	37
4.5.1 <i>Teste de contaminação celular por micoplasma por ensaio PCR</i>	38
4.5.2 <i>Avaliação bioenergética das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 após 24 horas de monoterapia ou combinação de diferentes concentrações de DCA e OMP</i>	39
4.5.3 <i>Normalização proteica das células após leitura bioenergética por SeaHorse</i>	41
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
5 RESULTADOS	43
5.1 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO CRISTAL VIOLETA DAS LINHAGENS CMGD5 E SK-MEL-28.....	43
5.2 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR DAS LINHAGENS CMGD5 E SK-MEL-28 PELO MÉTODO DA ANEXINA V E IODETO DE PROPÍDEO POR CITOMETRIA DE FLUXO	47
5.3 AVALIAÇÃO BIOENERGÉTICA PELO ENSAIO DE SEAHORSE XFe96	50
5.3.1 <i>Teste PCR para verificar contaminação por micoplasma</i>	50
5.3.2 <i>Avaliação bioenergética das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 após tratamento com DCA e OMP em monoterapia ou associação pelo ensaio de SeaHorse XFe24.</i>	51
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÕES	60
ANEXO: CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS .	61
REFERÊNCIAS	63

Resumo

Toledo G.F. Efeitos antineoplásicos do dicloroacetato de sódio (DCA) e omeprazol em linhagens de melanoma oral canino: estudo dos mecanismos de ação. [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade De Medicina, São Paulo. 2022.

O dicloroacetato de sódio (DCA) é um inibidor da piruvato desidrogenase quinase (PDK), e o omeprazol (OMP) é um inibidor da bomba de prótons. Neste trabalho, investigamos a hipótese de que DCA e OMP possuam efeitos antineoplásicos sinérgicos desencadeados a partir da modulação metabólica da via glicolítica, e seus mecanismos de ação em células de melanoma oral canino (MOC) e melanoma cutâneo humano. Para tanto, as linhagens celulares CMGD5 (melanoma oral canino) e SK-MEL-28 (melanoma humano) foram cultivadas e tratadas com diferentes concentrações de DCA e OMP individualmente ou em associação. Uma triagem inicial para determinação da viabilidade celular após o uso das duas drogas individualmente ou em associação foi realizada por meio do ensaio de cristal violeta. A morte celular por apoptose ou necrose foi estudada por citometria de fluxo, utilizando os marcadores fluorescentes anexina V e iodeto de propídeo. A análise bioenergética das células tratadas ou não com DCA e/ou OMP foi realizada por meio do ensaio de SeaHorseXF, avaliando os níveis de consumo de oxigênio (OCR) de ambas as linhagens após o tratamento com DCA e/ou OMP. O uso da combinação dos dois fármacos produziu redução significativa na viabilidade das linhagens de melanoma oral canino e melanoma humano. A combinação entre DCA e OMP na linhagem CMGD5 acarretou maiores índices de morte por apoptose precoce, enquanto na linhagem SK-MEL-28 os dois tipos de morte predominantes foram apoptose precoce e necrose. Na avaliação de OCR, DCA ou OMP não produziram efeitos bioenergéticos significativos nas células CMGD5 e SK-MEL-28; seus efeitos foram similares aos das células não tratadas. Em conclusão, por apresentarem redução de viabilidade celular e morte por apoptose, DCA e OMP podem ser considerados drogas de reaproveitamento para o tratamento de melanoma. Quanto aos mecanismos de ação, DCA e OMP parecem não interferir em uma perspectiva metabólica

glicolítica nas concentrações testadas nas células CMGD5 e SK-MEL-28. Mais estudos são necessários para determinar os mecanismos metabólicos que levam aos efeitos antineoplásicos de DCA e OMP em melanoma oral canino e melanoma humano para considerar as drogas no uso da rotina de pacientes com melanoma.

Palavras-chave: Omeprazol. Moduladores metabólicos. Neoplasias. Melanoma. Canino. Ácido dicloroacético.

Abstract

Toledo G.F. Antineoplastic effects of dichloroacetate sodium and omeprazole in canine oral melanoma cell lines: a study of the mechanisms of action. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade De Medicina, São Paulo. 2022.

Sodium dichloroacetate (DCA) is a pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) inhibitor, and omeprazole (OMP) is a proton pump inhibitor. In this work, we investigated the hypothesis that DCA and OMP have synergistic antineoplastic effects triggered by the metabolic modulation of the glycolytic pathway, and their mechanisms of action in canine oral melanoma (MOC) and human cutaneous melanoma cells. Therefore, the cell lines CMGD5 (canine oral melanoma) and SK-MEL-28 (human melanoma) were cultivated and treated with different concentrations of DCA and OMP individually or in association. An initial screening to determine cell viability after the use of the two drugs individually or in combination was performed using the crystal violet assay. Cell death by apoptosis or necrosis was studied by flow cytometry, using the fluorescent markers annexin V and propidium iodide. Bioenergetic analysis of cells treated or not with DCA and/or OMP was performed using the SeaHorseXF assay, evaluating the levels of oxygen consumption (OCR) of both strains after treatment with DCA and/or OMP. The use of the combination of the two drugs produced a significant reduction in the viability of the canine oral melanoma and human melanoma strains. The combination of DCA and OMP in the CMGD5 strain resulted in higher death rates by early apoptosis, while in the SK-MEL-28 strain the two predominant types of death were early apoptosis and necrosis. In the evaluation of OCR, DCA or OMP did not produce significant bioenergetic effects on CMGD5 and SK-MEL-28 cells; its effects were similar to those of untreated cells. In conclusion, as they present reduced cell viability and death by apoptosis, DCA and OMP can be considered reusage drugs for the treatment of melanoma. As for the mechanisms of action, DCA and OMP do not seem to interfere in a glycolytic metabolic perspective at the concentrations tested in CMGD5 and SK-MEL-28 cells. More studies are

needed to determine the metabolic mechanisms leading to the antineoplastic effects of DCA and OMP in canine oral melanoma and human melanoma, and if they are eligible drugs to treat canines with oral melanoma.

Keywords: Enzyme inhibitors. Omeprazole. Metabolic modulators. Neoplasms. Melanoma. Canine. Dichloroacetic acid.

1 INTRODUÇÃO

O melanoma oral canino (MOC) é a neoplasia maligna mais comum de cavidade oral nessa espécie. É uma neoplasia de caráter extremamente agressivo e metastático, pouco responsiva a modalidades terapêuticas disponíveis atualmente, o que ocasiona altos índices de recidiva, metástases e baixo tempo de sobrevida após o diagnóstico, mesmo após associação de diversas modalidades terapêuticas. Ao longo dos anos, diversos estudos vêm sendo propostos na Oncologia Veterinária a fim de se determinar terapias efetivas para o tratamento de MOC, no intuito de promover melhor qualidade de vida aos pacientes e um maior tempo de sobrevida após o diagnóstico da doença.

Devido à escassez de novas moléculas com atividades antineoplásicas efetivas, atualmente, o “reuso” ou “*repurposing*” de compostos já utilizados para o tratamento de outras doenças vem sendo amplamente investigado, com uma perspectiva de uso em terapias para o tratamento de diversos tipos de cânceres em seres humanos. O dicloroacetato de sódio (DCA) e o omeprazol (OMP) são duas moléculas que vêm se destacando nas últimas décadas por apresentarem efeitos antineoplásicos promissores no tratamento de diversos tipos de cânceres em seres humanos e em animais experimentais. Em estudos prévios realizados no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP, o tratamento com DCA e OMP de linhagens celulares de melanoma oral canino não só determinou efeitos inibitórios do crescimento das células tumorais, mas quando usados em associação, apresentaram um efeito sinérgico. O mecanismo de ação e eventos subcelulares de DCA e OMP ainda não foram bem elucidados na literatura veterinária, e estudos do uso associado destas duas drogas em linhagens tumorais celulares caninas ainda não foi descrito. Este é o primeiro estudo em que visa aprofundar a investigação pré-clínica dos efeitos do tratamento de linhagens celulares de melanoma oral canino com DCA e OMP *in vitro*. Com diferentes concentrações de DCA e

OMP individual ou em associação, investigamos seus efeitos na viabilidade celular, morte e apoptose e efeito bioenergético sobre o tratamento de células de linhagem de melanoma oral canino CMGD5 em comparação com células de linhagem de melanoma cutâneo humano SK-MEL-28, e assim, temos como objetivo elucidar mais profundamente as alterações metabólicas e os mecanismos de ação que estas duas drogas apresentam individualmente ou em associação sobre estas linhagens celulares.

Propusemo-nos a estudar se o uso de moduladores metabólicos seria interessante para promover ações antineoplásicas no tratamento de MOC. É sabido que alguns moduladores metabólicos privam as células cancerígenas de importantes fatores para sua sobrevivência, crescimento e invasão, e podem atuar como drogas possivelmente sinérgicas a quimioterapias atualmente utilizadas na rotina em indivíduos portadores de melanoma. As linhagens celulares de melanoma humano e oral canino foram tratadas com DCA e OMP e as respostas foram comparadas das duas linhagens foram comparadas entre si, a fim de determinar alguns de seus mecanismos de ação antineoplásicos, e determinar a possibilidade do uso das duas drogas no tratamento de MOC. A viabilidade celular, morte celular e respiração mitocondrial foram avaliadas para esclarecer o mecanismo de ação destes fármacos, seja em uso individual ou em associação. Estes fármacos já são amplamente reconhecidos e utilizados para o tratamento de outras doenças metabólicas, são seguros e de baixo-custo, sendo clinicamente relevantes para maiores estudos na associação destes ao tratamento de pacientes portadores de MOC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Avaliar os efeitos do tratamento com DCA e OMP isoladamente ou em associação em linhagens de melanoma oral canino e melanoma cutâneo humano visando elucidar as respostas celulares e os mecanismos subjacentes.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1** Realizar triagem de concentrações de DCA e OMP e seus efeitos sobre a viabilidade celular após o tratamento das linhagens CMGD5 e SK-MEL 28 utilizando o ensaio cristal violeta;
- 2.2.2** Avaliar o tipo de morte celular nas linhagens CMGD5 e SK-MEL 28 acarretada pelo uso das drogas DCA e OMP em associação, por meio de citometria de fluxo utilizando os fluoróforos anexina V e iodeto de propídeo,
- 2.2.3** Avaliação bioenergética do consumo de oxigênio das linhagens CMGD5 e SK-MEL 28 após o tratamento com DCA e OMP em monoterapia ou em associação, pelo ensaio de SeaHorse XFe96.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A ligação entre o cão e o humano: a importância da oncologia comparada

A proximidade entre o cão doméstico e os seres humanos é um evento reportado há milhares de anos. A evolução da forte ligação entre as duas espécies criou uma espécie de dependência entre elas, que se perpetua e se fortalece no decorrer dos séculos (1, 2). Evidências indicam que os cães foram os primeiros animais a serem domesticados por seres humanos. Após sua domesticação, os cães ajudaram os seres humanos a sobreviverem e evoluírem devido à sua agilidade, ferocidade e força, e se tornaram ferramentas indispensáveis de caça e de proteção do território, defendendo seus tutores e família de inimigos e animais selvagens (1,2). Ao longo dos anos, houve um debate intenso a respeito da ancestralidade das raças caninas domésticas atuais e, através de inúmeras evidências da era paleozoica, foi comprovada a ancestralidade dos cães domésticos a um único ancestral, o lobo cinzento (*canis lupus*) (3–5). Com o rápido crescimento desta forte interação entre humano e cão, muitas raças foram criadas, não somente por conta de sua funcionalidade, mas também caráter estético que agrada seus tutores e características comportamentais (1,3). Nos dias atuais, já existem mais de 400 raças de cães diferentes conhecidas (5). Com esta seleção de características rigorosas e *inbreeding*, foi favorecido o surgimento de doenças hereditárias (Figura 1).



Figura 1 – Variabilidade genética e fenotípica de diferentes padrões de raças caninas. Alguns animais possuem predisposição à incidência de diferentes tipos de tumores, comportamento e prognósticos diferentes. Foto: <https://br.freepik.com/fotos-vetores-gratis/animais-de-estimacao>>Animais de estimação foto criado por wirestock – br.freepik.com.

O perfil genético de algumas raças puras pode predispor ao surgimento de alguns tipos específicos de tumores malignos e até mesmo apresentar tumores malignos semelhantes, porém com comportamentos totalmente divergentes (2,4). Um exemplo disto são os mastocitomas cutâneos em cães da raça Pug. Geralmente nesta raça o prognóstico é mais favorável e o comportamento menos agressivo quando comparados a outras raças que também possuem predisposição a desenvolverem mastocitoma, mas que apresentam um comportamento mais agressivo, de difícil controle e tratamento como é no caso dos cães da raça Shar-pei (Figura 2) (1,6,7).

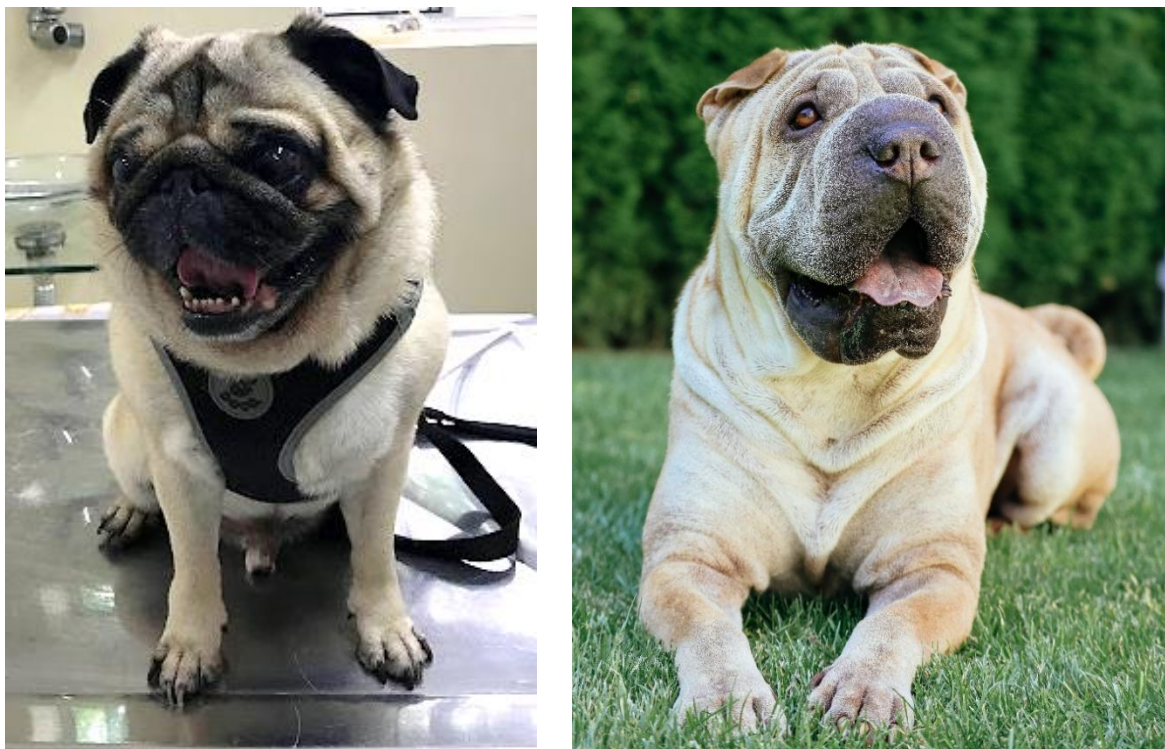


Figura 2 – À esquerda, paciente da raça Pug portador de mastocitoma grau II baixo grau. À direita, cão da raça Shar Pei, que pode apresentar a forma mais agressiva do tumor de mesma origem, ilustrando a interferência da variabilidade genética para cada raça canina. (Foto a esquerda: repertório pessoal MV. Gabriela F. Toledo, 2022/ a direita: <https://www.pexels.com/pt-br/foto/cao-adoravel-deitado-no-prado-verde-5205386/>)

Com o decorrer dos anos, foi notada uma impressionante similaridade de doenças crônicas e tumores entre os cães domésticos (*canis lupus familiaris*) e seres humanos, tornando os cães domésticos um modelo essencial no estudo comparativo de diversas doenças crônicas e principalmente do câncer (3).

Com o aumento destas novas pesquisas, tendo o cão doméstico como modelo, novas terapias e evidências genéticas vem beneficiando tanto os pacientes oncológicos humanos quanto os pacientes caninos, e mostrando cada vez mais a forte importância na união da medicina humana e da medicina veterinária para o avanço da oncologia como um todo (1).

Devido ao compartilhamento do mesmo ambiente e rotina semelhante a dos seres humanos, é possível que a etiologia de certas doenças seja semelhante entre as duas espécies (2,3). Exposição a fatores ambientais como poluentes, tabaco, e fatores não ambientais como pesticidas, dietas, e também devido ao desenvolvimento de padrões divergentes de raças

conferem alterações genômicas e maior incidência de doenças relacionadas às neoplasias (2–4). Os cânceres caninos compartilham diversas alterações genômicas que também são encontradas nos cânceres da espécie humana, além de similaridades na iniciação e progressão da carcinogênese (1,8).

O câncer é uma das doenças mais frequentemente relatadas em cães, o que tem gerado grande preocupação no meio médico veterinário e aumento da necessidade de pesquisas sobre etiologia, diagnóstico e novas alternativas de tratamento (3).

3.2 Melanoma Oral Canino

3.2.1 Patogênese

Os melanócitos são células dendríticas originárias de melanoblastos da neuroectoderme que durante a sua embriogênese migraram para diferentes locais como epiderme e derme (8,9). É sabido que todo tumor maligno se utiliza de três principais etapas para se diferenciarem de uma célula normal para uma maligna: iniciação, promoção e progressão (10). A diferenciação de um melanócito normal em maligno não é diferente, e da mesma forma, respeita um longo processo de carcinogênese (10) (Figura 3).

Diferentemente dos seres humanos que possuem a exposição a raios UVA e UVB como o principal fator da etapa de iniciação da transformação em melanoma cutâneo, os cães, de forma geral, não apresentam a interferência desta exposição como um fator de iniciação para o desenvolvimento de melanoma, devido ao fato da pele ser recoberta por pelos, que serve como uma barreira protetora a incidência de raios solares. O melanoma de cavidade oral não é suscetível a radiação solar, e seus fatores de risco e etiologia ainda são desconhecidos (8,9) .

Até o momento, não se concluiu quais fatores ativam a iniciação e mutações de melanócitos para sua transformação em melanoma maligno nos cães, entretanto, alguns autores mencionam mutação de genes regulatórios de fatores de crescimento, predisposição racial e pigmentação cutânea escura como fatores críticos para a transformação neoplásica dos melanócitos (8,9).

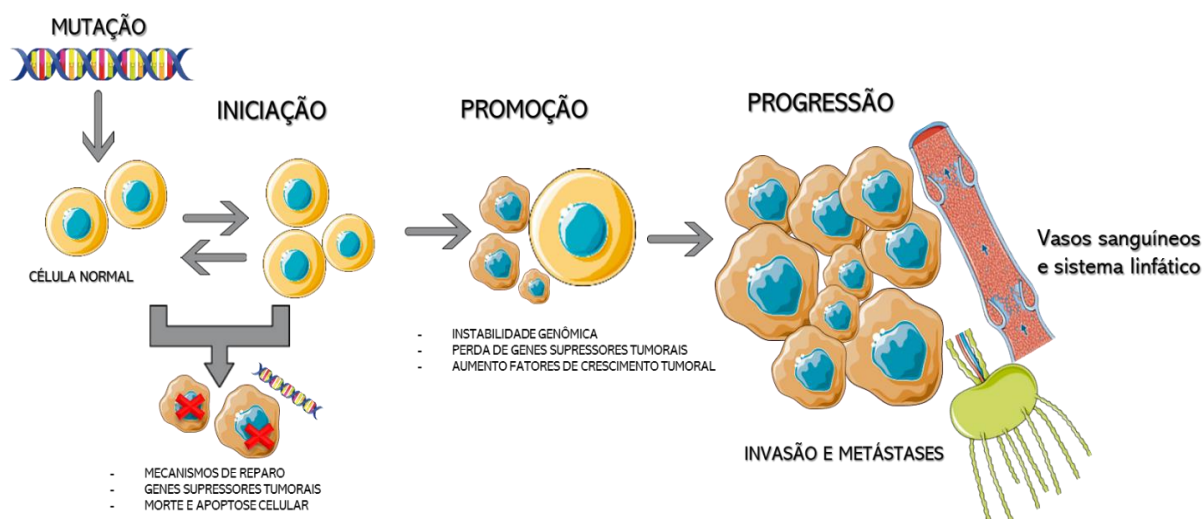


Figura 3 – Desenho ilustrativo das diferentes etapas da carcinogênese. Em um primeiro momento, na etapa de iniciação, uma célula normal passa por mutação genômica. Devido à detecção de mutações, mecanismos de reparo de ciclo celular, genes supressores e apoptose celular são ativados na tentativa de reverter o processo de mutação. Entretanto, com a persistência da mutação em proto-oncogenes e genes supressores tumorais, além de instabilidade genômica, ocorrem perdas de genes supressores tumorais e aumento de fatores de crescimento tumoral, beneficiando assim um processo proliferativo intenso de células mutadas, sendo denominada esta fase como promoção, já irreversível. Por fim, ocorre a etapa de progressão tumoral, invasão tecidual, capilar e linfática promovendo o destacamento das células tumorais de seu sítio primário e disseminação (metástases) para outros órgãos.

A segunda etapa do ciclo de carcinogênese requer a atuação de agentes promotores tumorais. A mutação de proto-oncogenes e genes supressores tumorais são considerados facilitadores do desenvolvimento neoplásico (10). Os proto-oncogenes são genes que codificam proteínas que por sua vez, promovem a progressão do ciclo celular e proliferação. Os genes supressores tumorais codificam proteínas que inibem ou impedem a proliferação e o ciclo celular. Em uma célula normal, o equilíbrio destes genes promove um controle eficaz no ciclo celular (9,10). A mutação nos proto-oncogenes e nos genes supressores tumorais possui

um efeito direto no desenvolvimento neoplásico (9). Algumas mutações em genes supressores tumorais, como a ausência do *p21/Waf-1* e *Rb-1* já foram descritas em melanoma oral canino (9). Em um estudo recente, cientistas sequenciaram através de *whole-exome sequencing* (WES) diversos tumores caninos. No melanoma oral foi detectada a amplificação da proteína MDM2 (regulador negativo do gene supressor tumoral p53) e alteração na via do gene p53 (11). Alteração direta no gene p53 é amplamente descrita em melanomas cutâneos humanos, porém em cães, a mutação direta no gene ainda é controversa (8,11). Mutações de proto-oncogenes para oncogenes em melanoma também já foram descritos *in vivo*, como é o caso dos oncogenes *c-myc*, *c-erb-B-2*, *c-yes*, *c-kit* e *ras* (8).

Invasão e metastatização são etapas da progressão da carcinogênese e ocorrerão após a transformação das células neoplásicas e proliferação descontrolada do tumor (10). De maneira resumida, a metástase tumoral apenas acontecerá quando as células perderem a adesão de sua massa primária (Figura 2). As células neoplásicas então conseguem ultrapassar o endotélio e percorrem vasos linfáticos e sanguíneos, se aderindo e percorrendo pelo endotélio vizinho, onde irão se anexar em um local secundário e manter a proliferação descontrolada e progressão (8).

3.2.2 Aspectos epidemiológicos do melanoma oral canino

O melanoma é uma neoplasia relativamente comum na espécie canina. Sua incidência consiste em 3-7% de todas as neoplasias nos cães, além de cerca de 9-20% de todos os tumores cutâneos desta espécie (9,12). De todas as neoplasias de cavidade oral, o melanoma oral canino (MOC) tem se destacado em sua incidência com números exorbitantes em literatura científica ao redor do mundo (9,12,13). Em diversos estudos, o melanoma oral canino foi relatado como

a malignidade oral mais comum na espécie, seguida de carcinoma de células escamosas e fibrossarcoma (9,12,14,15).

A predisposição racial para a incidência de MOC ainda é muito discutível. A popularidade de raças naquele determinado momento, ou alguns aspectos culturais e sociais de cada país de estudo é um fator limitante para determinar a real incidência de MOC em determinada raça de cães. Nos Estados Unidos, reportam-se uma alta incidência de MOC em cães das raças: Schnauzers, Doberman Pinschers, Golden Retrievers, Setter Irlandês e Setter Gordon, Scottish Terrier (9).

Em um estudo no Brasil, houve maior incidência de melanoma em cães mestiços, machos, de pelagem escura. Somente 3,6% felinos domésticos foram acometidos pela doença neste estudo epidemiológico (8,16). Neste mesmo estudo, realizado por autores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, a localização dos melanomas orais caninos é frequentemente relatada na gengiva e mucosa labial, porém a localização pode ser variada podendo acometer mandíbula, maxila e palato (16).

MOC é uma doença que atinge em grande maioria cães idosos, entretanto, cães mais jovens também podem ser acometidos (9,12,16). A localização do tumor pode predizer a invasão e o prognóstico da doença, mas não é o único fator a ser considerado. Tumores pequenos, localizados na pele coberta por pelos, normalmente tendem a se comportar forma benigna quando comparados a tumores maiores, localizados em regiões de mucosa, ungueal, oral, digital e plantar. Apesar disso, metástases e morte devidas à progressão tumoral de pacientes caninos com melanoma cutâneos histologicamente classificados como “benignos” são relatados em literatura científica (12,17).

3.2.3 Aspectos histopatológicos e clínicos do melanoma oral canino

O melanoma oral canino é uma das doenças neoplásicas mais comuns na espécie e está altamente relacionada com um prognóstico ruim devido ao seu alto índice de invasão local e metastático. Em se tratando de uma doença tão agressiva, é de extrema importância definir o prognóstico da doença através de critérios de malignidades específicos, para se definir a melhor abordagem terapêutica para aquele paciente (18).

A avaliação histopatológica é o método diagnóstico padrão ouro para MOC. O MOC pode se apresentar ao exame histopatológico com diversos padrões morfológicos: epitelióide, fusiforme, misto, em “casca de cebola”, com células em balões, células em anel de sinete, células claras e tipos celulares adenóides, e assim, serem facilmente confundidas com outros tipos tumorais da cavidade oral (19).

Diferenciar melanoma maligno de lesões benignas ou tumores similares, como a forma amelanica do melanoma, é primordial para que se possa estadiar a doença como um todo e definir a abordagem terapêutica mais adequada para aquele paciente. Quando o método histopatológico convencional não é confirmativo, a ferramenta imuno-histoquímica é de grande valia e pode ser utilizada com grande especificidade para a tomada de decisão diagnóstica. Um painel imuno-histoquímico (IHQ) de marcadores melanocíticos que incluem os anticorpos Anti MELAN-A, TRP-1, TRP-2, PNL2 tem se mostrado com 100% de especificidade e 93,9% de sensibilidade para o diagnóstico de MOC (20). Curiosamente, o diagnóstico de melanomas amelanicos por meio do método IHQ mostra-se mais dificultoso quando comparado a lesões melânicas. Um estudo recente utilizou expressão gênica adicionada a técnica de IHQ para aumentar a acurácia na diferenciação de melanoma oral canino amelanico do tipo fusiforme de sarcomas de partes moles da cavidade oral (19,20). Os índices de expressão de Ki-67 têm sido considerado como um importante fator para definição prognóstica

de melanomas orais tanto em humanos quanto em cães (21,22). Estudos relacionando melanomas orais caninos que expressam COX-2, KIT, metaloproteinases, EGFR, SOX e proteínas relacionadas a transição epitélio-mesênquima, correlacionam-se a comportamento mais agressivos da doença (18,23–25).

O estadiamento utilizado para MOC segue o esquema da Organização Mundial da Saúde (WHO -World Health Organization), o sistema TNM, sendo T: para o tamanho do tumor primário, N: acometimento de linfonodos regionais ou sentinela e M: invasão metastática para outros órgãos (Quadro 1) (26). Entretanto, diversos autores questionam as limitações do esquema de estadiamento para prever o prognóstico de cães com melanoma oral. Importantes critérios histológicos, tais como índices mitóticos, invasão vascular e invasão e/ou lise óssea do tumor primário, localização do tumor primário e adequação de margens cirúrgicas após a ressecção, são fatores sabidamente importantes e que interferem diretamente na sobrevida dos pacientes e estes fatores não eram considerados no esquema, levando a grandes inseguranças quanto à precisão do estadiamento da doença através deste esquema (12,27).

Um recente consenso reuniu diversos estudiosos do meio da oncologia veterinária para proposição de um novo esquema para estabelecimento do prognóstico para o MOC. Neste esquema, além da adição de características histopatológicas foi proposta a inclusão de fatores como atipias nucleares, invasão vascular e índices mitóticos para definição prognóstica (18).



Figura 4 – Paciente canino portador de melanoma oral melânico em região gengival de incisivos superiores. Foto gentilmente cedida pela MV. Msc. Joyce Carvalho.

O melanoma oral canino pode se apresentar nas formas melânicas e amelânicas. O grau de pigmentação das células melanocíticas malignas também foi um critério incluído como fator determinante de prognóstico e sobrevida destes animais. Animais que possuíam melanomas orais com maior grau de pigmentação foram correlacionados com maiores expectativas de vida quando comparados a animais que possuíam o tipo amelânico (com pouca ou sem presença de pigmentação celular) da doença (Figuras 4, 5 e 6) (18,20).

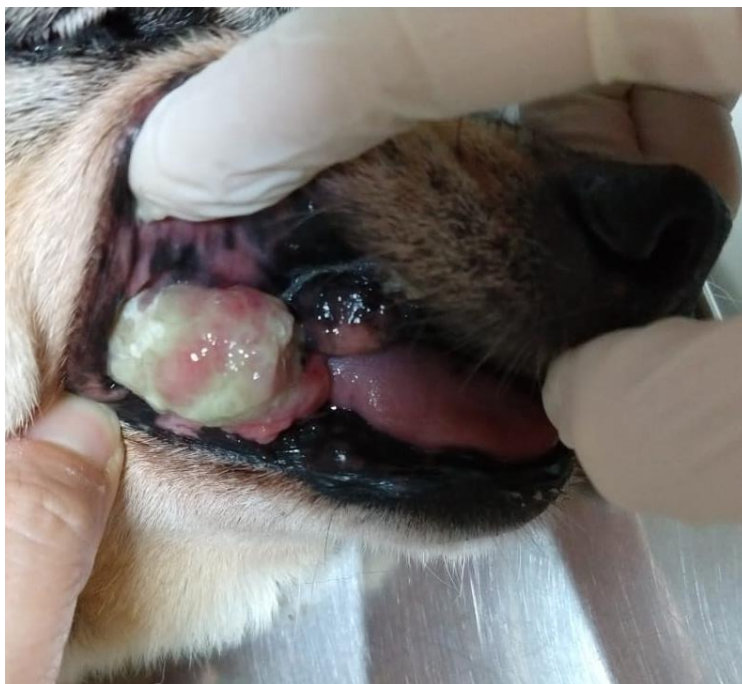


Figura 5 – Paciente canino portando melanoma oral amelanico e melânico misto em gengiva maxilar. O tumor apresenta-se supurado tomando grandes proporções e extensão da maxila. Foto gentilmente cedida pela MV.Msc. Cássia C. Yasumarú.

O melanoma oral é a forma mais agressiva de melanoma em cães. Devido à dificuldade de visualização pelos tutores dos pacientes, sua detecção tardia muitas vezes já envolve metástases na ocasião do diagnóstico. Por isso, é de extrema importância a inspeção de cavidade oral de todos os pacientes veterinários.

É um tumor altamente refratário à maioria dos tratamentos disponíveis relacionando-se assim a uma curta sobrevida do animal. As metástases de melanoma oral normalmente ocorrem para linfonodos regionais e tecidos vizinhos, como linfonodos mandibulares, retrofaríngeos, tecidos adjacentes e pulmões. Metástases em formas multicêntricas de melanoma oral canino, na medula óssea, cérebro, coração e baço já foram relatadas em literatura científica (9,12,28) .

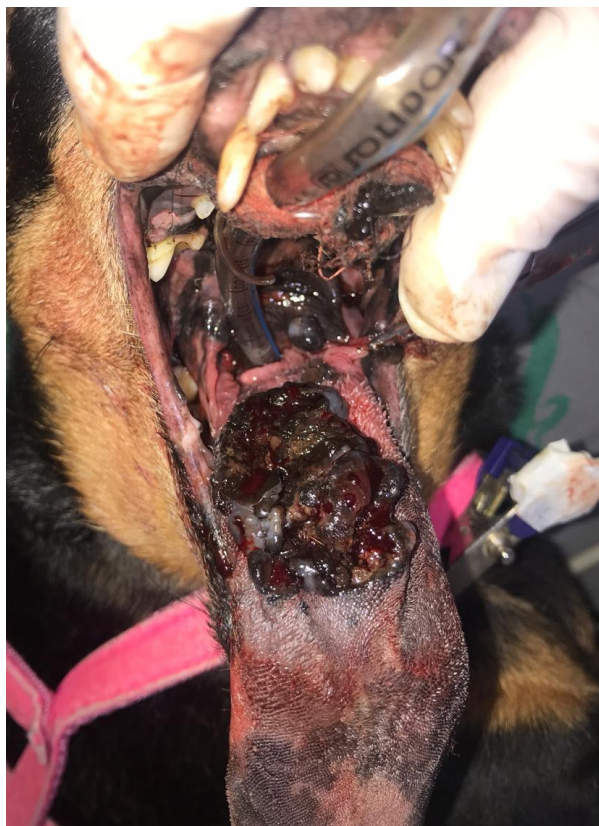


Figura 6 – Paciente canino com melanoma oral melânico, acometendo a região da língua e palato. Foto gentilmente cedida pela MV. Msc. Joyce Carvalho.

O tratamento de eleição para todas as formas de melanoma em cães é a ressecção cirúrgica, porém na maioria das vezes não é curativo. Um estudo demonstrando a importância da ressecção cirúrgica com margens amplas, de 2-3 cm, incluindo margens ósseas e 1cm de ressecção de tecido mole, demonstrou um intervalo médio livre de doença de >567 dias e tempo médio de sobrevida >874 dias com somente 10% dos casos estudados tendo recidivas locais (29). A análise histopatológica de linfonodos regionais e/ou sentinelas em cães com melanoma oral fornece informações importantes sobre disseminação linfática da doença. Animais com linfonodo macroscopicamente normais ainda assim, podem apresentar disseminação linfática. A linfadenectomia é uma forma de determinar o estágio clínico da doença e auxiliar no melhor planejamento terapêutico e é altamente recomendada como parte do tratamento para MOC (18,29,30).

Quadro 1 – Quadro mostrando o estadiamento baseado em TNM da Organização Mundial da Saúde para cães com melanoma oral

T: Tumor primário			
T1	Tumor ≤ 2 cm de diâmetro		
T2	Tumor 2-4cm de diâmetro		
T3	Tumor > 4 cm de diâmetro		
N: Linfonodos regionais			
N0	Sem evidência de envolvimento de linfonodo regional		
N1	Citologia/histologia com evidência de envolvimento em linfonodo regional		
N2	Linfonodos aderidos		
M: Metástases a distância			
M0	Sem evidências de metástases		
M1	Evidências de metástases		
Estadio I=	T1	N0	M0
Estadio II=	T2	N0	M0
Estadio III=	T2	N1	M0 ou T3 N0 M0
Estadio IV=	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Owen, 1980 (26)

Como forma de tratamento local, a radioterapia é uma boa opção principalmente para tumores dos quais as margens cirúrgicas foram incompletas ou da impossibilidade de ressecção cirúrgica do tumor, seja pela opção do próprio tutor ou devido a tumores com grande invasão local e não ressecáveis, como forma paliativa de controle local. A maioria dos protocolos de radioterapia para MOC são baseados em protocolos hipofracionados (de 3 a 6 a frações semanais ou duas vezes por semana) que incluem no campo linfonodos regionais. Alguns fatores limitantes para escolha da radioterapia como terapia única seria a alta taxa de metástases após o tratamento. Estudos sugerem cerca de 44-58% de taxa de metástases após o tratamento de radioterapia em cães com melanoma oral, além de ser uma terapia ainda de alto custo. Entretanto, pode ser uma boa alternativa em casos paliativos com uma média de sobrevida de 234 – 363 dias (18,31).

Uma nova alternativa de controle local vem sendo amplamente utilizada principalmente na América do Sul e Europa, a eletroquimioterapia. Ela se baseia na aplicação de um campo magnético em um tumor ou leito cirúrgico após a excisão tumoral para que ocorra aumento da permeabilidade do quimioterápico bleomicina localmente nas células tumorais ainda persistentes após a cirurgia ou diretamente ao tumor, em doses reduzidas aplicado por via endovenosa (Figura 7). Um estudo recente neste assunto encontrou um bom controle local em pacientes com MOC nos estádios I e II da doença, em cães que não passaram por ressecção cirúrgica ou qualquer tratamento adjuvante, entretanto, por se tratar de nova modalidade terapêutica, mais estudos necessitam ser realizados para se avaliar os benefícios do uso como monoterapia em MOC (18,32).

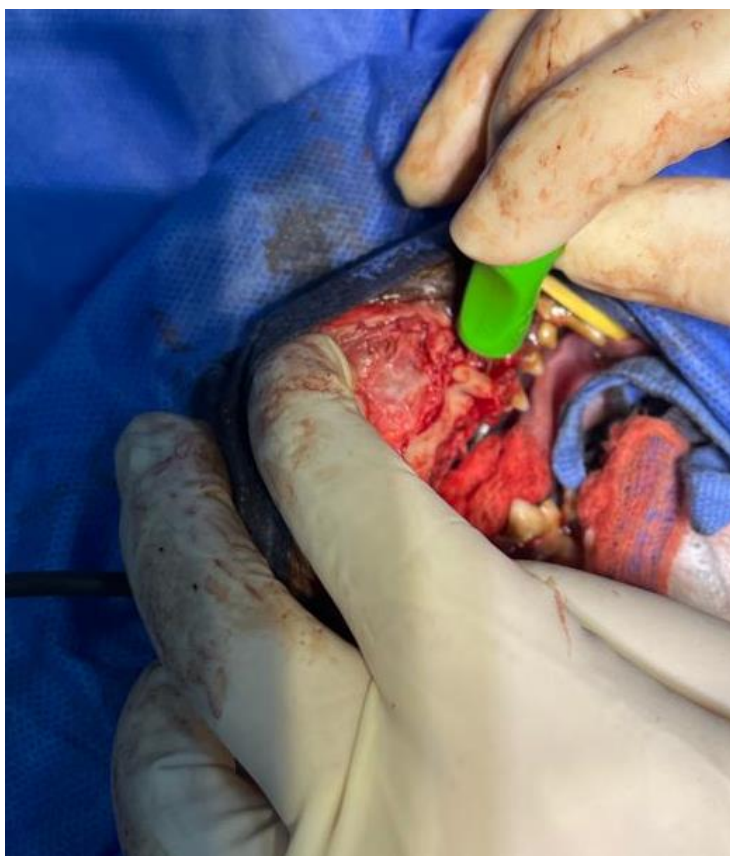


Figura 7 – Foto ilustrativa mostrando paciente canino com melanoma oral, recebendo tratamento por eletroporação após administração de Bleomicina por via endovenosa. Foto de repertório: MV. MSc. Dra. Simone Crestoni Fernandes.

Uma outra modalidade terapêutica muito utilizada na oncologia veterinária é a quimioterapia adjuvante para o tratamento de diversos tipos de cânceres (Figura 8). É de extrema importância que cada paciente receba um estadiamento apropriado e completo da doença neoplásica para que possa ser indicado ou não o uso de quimioterapia adjuvante, ou qualquer outra intervenção como forma de tratamento.

O uso da quimioterapia adjuvante para o controle da recidiva e de metástases de melanoma oral canino ainda é um assunto controverso. Um estudo retrospectivo em 2012 avaliou o tratamento adjuvante de 17 cães com o agente quimioterápico platinado carboplatina após excisão cirúrgica de MO, com ou sem tratamento por radioterapia (33). Os pacientes que receberam o tratamento adjuvante com carboplatina com ou sem tratamento radioterápico, tiveram uma média de tempo livre de doença de 259 dias e sobrevida média de 440 dias. Neste estudo, relatou-se ainda que cães que receberam tratamento cirúrgico conservativo, sem excisão com margem, resultaram em uma sobrevida média (SM) bem menor, de 90-120 dias. Cães com cirurgias agressivas com pelo menos 1cm de margem excisada (inclusive retirada de osso quando necessária) apresentaram uma SM de 273-297 dias (33). Os animais do estudo que receberam radiação hipofracionada em tumores orais não ressecáveis, possuíram 237 dias de SM. A proporção de recorrência local dos tumores orais em cães que não receberam tratamento com radioterapia, apenas modalidade de quimioterapia adjuvante após a cirurgia, foi de 67% enquanto os pacientes que receberam radioterapia concomitante para controle de margens tiveram taxa recidiva local menor de 27%. Isso sugere que a radiação pode ser útil no controle local da doença. No estudo, metástase pulmonar foi limitante para determinação da terapia. Cerca de 29% dos cães apresentaram-se com metástases pulmonares mesmo após o tratamento adjuvante com quimioterapia. (33).



Figura 8 – Paciente canino da raça Rhodesian Ridgeback recebendo quimioterapia endovenosa para o tratamento de Linfoma Multicêntrico de células grandes de alto grau. Foto de repertório: MV. Gabriela F. Toledo, 2022.

Outro estudo demonstrou que cães que possuem melanoma oral tratados apenas com cirurgia, apresentaram sobrevida média de 17 a 18 meses, 5 a 6 meses e 3 meses para cães com estádios I, II e III, respectivamente (12). Em outro estudo, pacientes com MOC em estádios I e II que passaram por ressecção cirúrgica incompleta, receberam protocolo hipofracionado de radioterapia adjuvante sendo tratados com cisplatina ($10\text{-}30\text{mg}/\text{m}^2$) ou carboplatina ($90\text{mg}/\text{m}^2$) 60 minutos antes da exposição à radiação. Destes animais, 15% dos pacientes apresentaram recidiva tumoral em 139 dias, 51% apresentaram doença metastática em média de 311 dias após o tratamento e a SM destes animais foi de 363 dias (34). Cães com melanomas em dígitos, sem acometimento de linfonodos ou metástases à distância, quando tratados com amputação possuem uma SM de ~12 meses com 42–57% vivos em até 1 ano, e 11–13% vivos em 2 anos (35,36).

A descoberta de que células do sistema imunológico interagem com células tumorais no propósito de eliminá-las é um assunto que vem ganhando força nos últimos 20 anos e se mostrado cada vez mais benéfica em estudos com tumores imunogênicos, como é o caso do MOC. Recentemente, o Laboratório de Vetores Virais do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, desenvolveu uma vacina, ainda em estudos pré-clínicos de vetor viral adenovírus não replicante AdRGD-PG que tem como princípio reativar p53 e agir como uma proteína supressora tumoral em células de melanoma cutâneo humano e canino (18). Além disso, o Laboratório de Imunologia e Oncologia Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, vem desenvolvendo estudos clínicos de vacinas dendríticas de pacientes caninos portadores de melanoma oral, tendo como princípio a utilização autóloga do próprio tumor do indivíduo a ponto de criar uma resposta imuno-alvo àquele específico tumor (18). Uma outra perspectiva em fase de desenvolvimento de terapia imunomoduladora vem sendo estudada com benefícios a alguns pacientes portadores de melanoma oral canino. Oncotherad® é designada nanoimunoterapia que exhibe efeitos antitumorais e imunomodulatórios. Oncotherad® desenvolve uma resposta imune inata mediada pelos receptores *toll-like* (TLRs), desencadeando uma cadeia de resposta imunológica mediada através de células dendríticas, natural killers e macrófagos contra o tumor (18). Estes estudos são de extrema importância na Oncologia Comparada, levando em conta de que os cães são excelentes modelos para melanoma em humanos, e da necessidade de novas alternativas de tratamento beneficiando tanto os pacientes humanos quanto pacientes veterinários.

Mais estudos sobre terapias alternativas e novas abordagens para o tratamento de melanoma oral canino são extremamente necessárias na tentativa de promover boa qualidade de vida aos pacientes portadores de MOC.

3.2.4 Metabolismo adaptativo: marca registrada do câncer

O conceito de que células normais se utilizam de diferentes vias para transformarem-se em neoplásicas não é novo. Em 2000 e 2011, Hanahan e Weinberg publicaram revisões que revolucionaram as pesquisas em oncologia. Na primeira, os autores citaram 6 marcas registradas (*hallmarks*) das neoplasias malignas (Figura 9). Fatores como a independência de fatores de crescimento para a proliferação celular, insensibilidade a fatores supressores do crescimento, evasão de morte celular programada (apoptose), potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase, demonstraram a eficiência destas adaptações na carcinogênese (37,38).

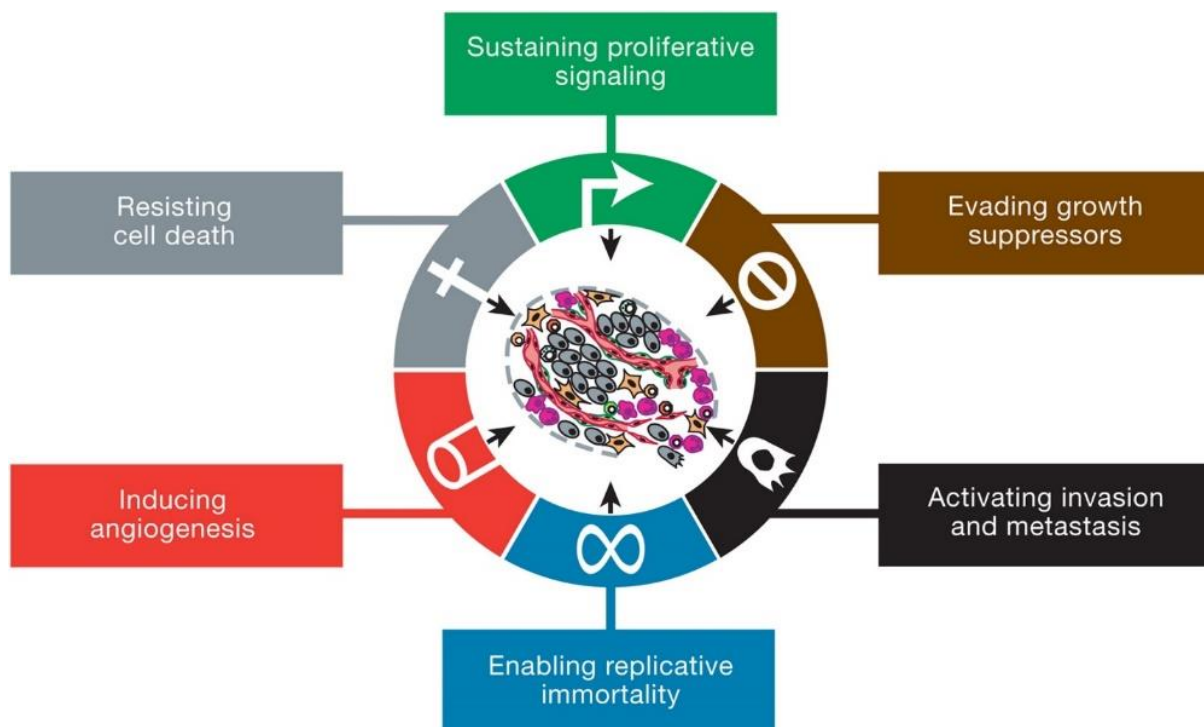


Figura 9 – As 6 marcas registradas (*hallmarks*) de adaptações adquiridas da célula tumoral maligna. (Figura adquirida do artigo “Hallmarks of Cancer: The Next Generation” <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>).

Em artigo subsequente, os autores adicionaram às originais marcas registradas, mais 4 importantes fatores facilitadores da carcinogênese (Figura 10). Entre elas, a capacidade de reprogramação metabólica, que promove a célula tumoral maligna importante fatores de replicabilidade, o que se tornou uma das marcas registradas mais importantes na progressão tumoral. A instabilidade genômica tumoral, promove diversas mutações aleatórias em seu DNA (rearranjo cromossomal, translocações entre outras) o que implica na promoção destes fatores de progressão tumoral. (38).

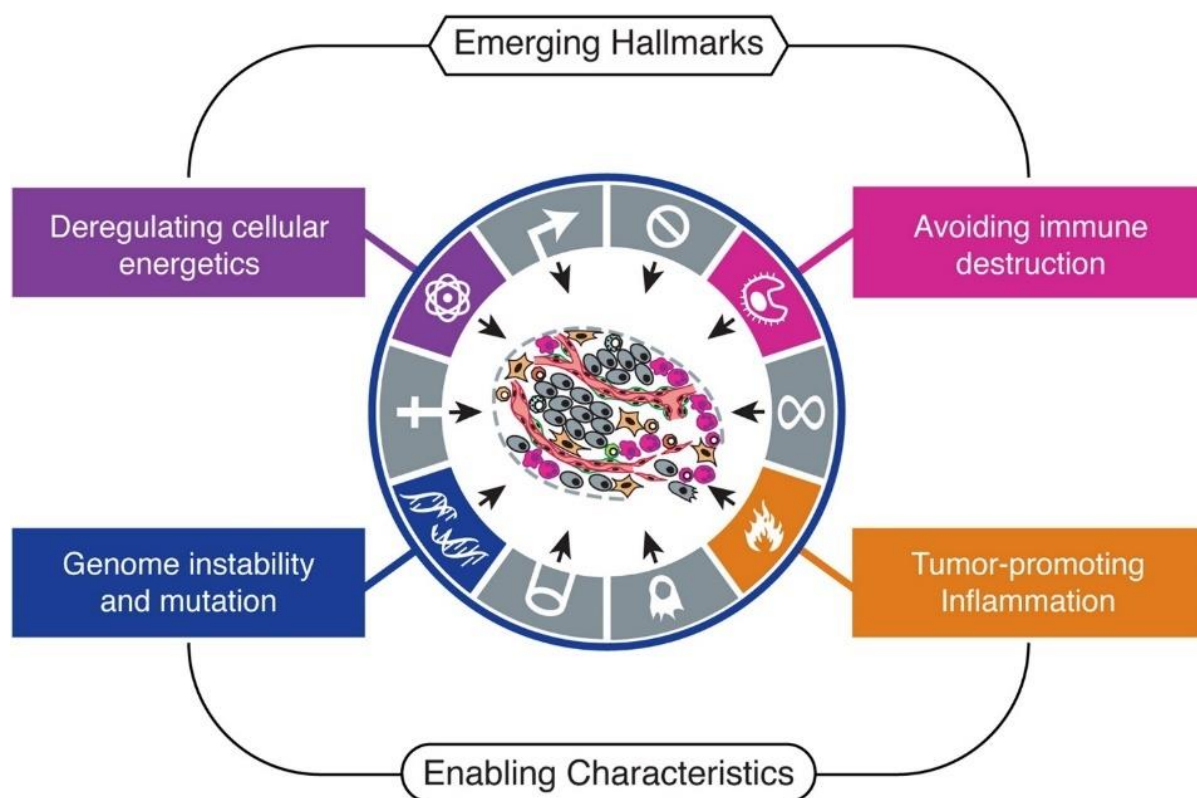


Figura 10 – Ilustração das duas marcas registradas importantes do câncer, adicionadas pelos autores em 2011. A habilidade e modificação e/ou reprogramação do metabolismo celular bioenergético utilizado a favor da carcinogênese e a capacidade do tumor de evadir destruição imunológica. (Figura adquirida do artigo “Hallmarks of Cancer: The Next Generation” <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>).

Além disso, o estado inflamatório do microambiente das lesões malignas promove um ambiente favorável para a progressão tumoral fornecendo moléculas bioativas às células tumorais que por sua vez irão sustentar uma sinalização proliferativa exacerbada, sinalização

para a sobrevivência celular e inibição de morte, fatores pró-angiogênicos, enzimas que degradam a matriz extracelular vão facilitar a angiogênese, invasão e metástases e outros fatores que possibilitam a progressão do tumor em um ambiente inóspito, tal como a desregulação bioenergética da célula tumoral (38).

Nos últimos anos, a modulação do microambiente tumoral vem sendo alvo de muito estudo devido à perspectiva de utilização do metabolismo tumoral como alvo terapêutico para alguns tipos de cânceres.

3.2.5 O Metabolismo do câncer

As células tumorais malignas apresentam diversas formas de se adaptarem para sobrevivência, crescimento e invasão, conforme descritas anteriormente neste trabalho de revisão. O conceito de metabolismo tumoral não é novo e vem tomando grande expansão devido a possibilidade de intervenções bioenergéticas antitumorais (39).

Em 1920, o pesquisador alemão Dr. Otto Warburg, contemplado com o Premio Nobel, caracterizou uma importante mudança metabólica fenotípica denominada nas células tumorais de “*efeito Warburg*”. Estudando as observações de Louis Pasteur aplicadas à fermentação de glicose para produção de etanol, Warburg descobriu que diferentemente de células normais bem diferenciadas, as células cancerosas tendem a “fermentar” glicose em lactato mesmo na presença de oxigênio suficiente para suportar a fosforilação mitocondrial oxidativa, ou seja, as células tumorais possuem preferência em gerar energia através da via glicolítica (40,41). Para melhor elucidar a alteração metabólica realizada pelas células tumorais é necessário visualizar a atuação metabólica de uma célula normal como um todo.

Na presença de oxigênio, a maior parte das células bem diferenciadas vão metabolizar glicose a partir do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou ciclo de Krebs. A reação produz NAD^+ reduzido, NADH (adenina nicotinamida dinucleotídeo) que vai alimentar a via de fosforilação oxidativa e maximizar a produção de ATP com produção mínima de lactato. Nestas células, é somente sob condições anaeróbicas que produzirão grandes quantidades de lactato (40). De maneira oposta, a maior parte das células tumorais malignas produzem altos níveis de lactato independente da presença de oxigênio disponível em seu meio, referindo-se ao termo de “*glicólise aeróbica*”. Durante um tempo, esta alteração metabólica em células tumorais foi confundida como uma disfunção mitocondrial, até mesmo pelo próprio autor Dr. Warburg. Entretanto, estudos recentes demonstram que as células tumorais não possuem um déficit mitocondrial e mantêm preferência pela via adaptativa para beneficiar sua carcinogênese de outras maneiras (40,42) (Figura 11).

Apesar de somente produzir duas moléculas de adenosina trifosfato (*ATP*) por glicose metabolizada, comparando-se à produção de 36–38 moléculas de *ATP* formadas pelas células normais em condições de normóxia, as células malignas mantêm a preferência pela via de glicólise aeróbica, mesmo que ocorra baixa produção de *ATP*. Células em altas taxas de proliferação utilizam-se maiores níveis de glicose para biossíntese de precursores macromoleculares, como acetil-CoA para síntese de ácidos graxos, que são intermediadores na via glicolítica para amino ácidos, ribose e nucleotídeos, essenciais para mitose, por exemplo. Além disso, a glicose e glutamina fornecem uma grande parcela de carbono, nitrogênio e energia livre para sustentar divisão e crescimento celular constante (40).

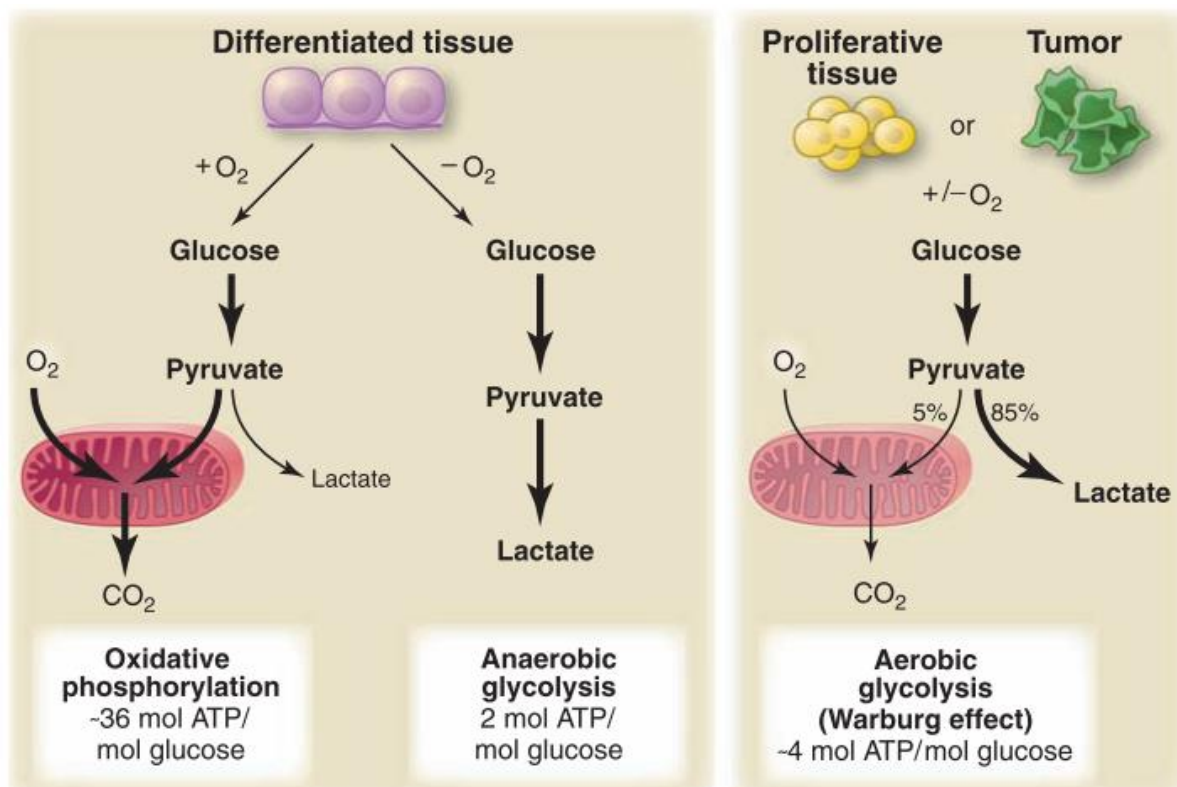


Figura 11 – Esquema adaptado demonstrando diferenças entre o metabolismo de fosforilação oxidativa, glicólise anaeróbica e glicólise aeróbica (*efeito Warburg*). As células normais não-proliferativas, quando na presença de oxigênio, metabolizam glicose em piruvato a partir da via glicolítica e posteriormente oxidam completamente grande parte do piruvato presente na mitocôndria em CO_2 durante o processo de fosforilação oxidativa. Oxigênio é uma molécula indispensável e atua como finalizador de elétrons para oxidar completamente a glicose. Somente se existe indisponibilidade de oxigênio é que as células diferenciadas podem redirecionar moléculas de piruvato geradas a partir da glicólise para geração de lactato (seguindo a via de glicólise anaeróbica), que vai permitir que a glicólise persista (mantendo a circulação de NADH de volta a NAD^+) mas por outro lado, resultando em mínima produção de ATP quando comparada a via tradicional de oxidação fosforilativa. As células tumorais ou células bem diferenciadas em constante proliferação, tendem a converter grande parte de glicose em lactato independente dos níveis de oxigênio disponíveis em seu meio. A mitocôndria destas células permanece funcional e existe continuidade da fosforilação oxidativa. Entretanto, glicólise aeróbica é menos eficiente na produção de ATP do que oxidação fosforilativa (40). Figura: adquirida do artigo: “Understanding the Warburg Effect The Metabolic Requirements of Cell Proliferation - DOI: 10.1126/science.1160809 Fuel.

A adaptação metabólica é mediada por meio de inúmeras intervenções de oncogenes, fatores de transcrição e genes supressores tumorais. É muito provável que em tumores malignos, a superexpressão do fator de transcrição HIF-1- α (Hypoxia Inducible Factor – 1-Alpha), seja o fator *driver* para o início do aumento da via glicolítica (42). HIF-1- α pode ser ativado em aerobiose por citocinas, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico ou pelo piruvato, lactato e oxalacetato. HIF-1- α é somente detectado em tumores malignos, pois tecidos normais ou tumores benignos impedem a ação do fator de transcrição

devido a ação de genes supressores tumorais. HIF-1- α nas células tumorais malignas estimula o fluxo glicolítico através da promoção de diversos fatores estimulantes da via glicolítica (42). É capaz de aumentar a expressão do complexo piruvato desidrogenase (PDK) quinase, que por sua vez inibe diretamente a fosforilação diminuindo o influxo de piruvato para a retroalimentação do ciclo de Krebs (42). Além de estimular a expressão de transportadores de membrana específicos para o aumento da absorção de glicose pela célula (transportadores de glicose da família GLUT), é também um ativador da PDK. A enzima PDK, quando ativada, inibe a piruvato desidrogenase (PDH), que é responsável pela conversão de piruvato em acetil-CoA e conseqüente entrada do acetil-CoA na mitocôndria através do *complexo piruvato desidrogenase* (CPD) (43).

A alteração metabólica por meio de fatores de crescimento também é conhecida em células tumorais malignas. Alguns fatores de crescimento aumentam a expressão de oncogenes como PI3K/AKT, que atuam no aumento de expressão de transportadores de glicose na membrana celular, e c-myc estimulando a glutaminólise para produção de NADPH e que também é correlacionado com o aumento da estimulação de transportador de glicose 1 (GLUT1) (40,42,44).

Alguns autores mencionam que o déficit energético é compensado por meio do aumento de absorção de glicose pela célula através dos transportadores de glicose, principalmente das famílias GLUT 1 e GLUT 3 (44). Curiosamente, uma das hipóteses para o acontecimento desta adaptação fenotípica metabólica é devido ao microambiente hostil durante a carcinogênese em suas fases iniciais, que por sua vez acaba selecionando células tumorais capazes de sobreviverem nestas condições inadequadas para células normais (45). Além disso, o ambiente hipóxico criado pelo rápido crescimento e rápida expansão de tumores sólidos é um outro fator que vem a contribuir diretamente com o *efeito Warburg*. Células tumorais em rápido crescimento causa rápida expansão da massa tumoral como um todo, criando partes do tumor

pouco irrigadas pela neovascularização, o que limita a disponibilidade de oxigênio para a respiração mitocondrial e síntese de ATP, obrigando as células tumorais a aumentar a via glicolítica como via principal de produção energética (40,45).

A geração energética via glicólise aeróbica exibe diversas vantagens na carcinogênese: o aumento da fermentação de glicose em lactato no citoplasma e efluxo de lactato e íons H^+ para o meio extracelular (MEC), o aumento do transporte de prótons através de significativo aumento na quantidade de bombas e transportadores de prótons para o MEC, e consequentemente a redução de pH do microambiente tumoral estão relacionados à resistência apoptótica, escape imunológico, quimiorresistência e caráter metastático em diversos tumores considerados agressivos (46–49).

Devido a isto, novas propostas de tratamento tendo como alvo o metabolismo desregulado de alguns tumores malignos em humanos vem atraindo diversos grupos de pesquisa. Nosso propósito é estudar o benefício de utilizar-se do metabolismo bioenergético desregulado em tumores de melanoma oral canino.

3.2.6 *Drug-Repurposing* de moduladores metabólicos na Oncologia Veterinária e Comparada

Com a escassez de novas terapias efetivas contra o câncer, o alto custo de pesquisas e longo tempo de adequação de uma nova molécula para ser testada e aprovada cientificamente para uso no mercado, a recolocação de drogas antigas utilizadas para o tratamento de outras doenças e reutilização delas para o tratamento de doenças neoplásicas vem sendo cada vez mais aceito na comunidade científica (50).

Um fármaco conhecido tem chamado a atenção de pesquisadores ao redor do mundo. O dicloroacetato de sódio (DCA), fármaco antigamente utilizado para o tratamento de distúrbios

como acidose láctica, vem sendo estudado *in vitro* em neoplasias humanas e *in vivo* em modelos experimentais (48,51–55). O DCA é um análogo do ácido acético, no qual dois de três átomos de hidrogênio de um grupo metila são substituídos por átomos de cloro, e seus sais e ésteres são chamados dicloroacetato (56,57). Na célula tumoral, o DCA atua como um “*modulador metabólico*” redirecionando o metabolismo de glicólise aeróbica para oxidação de glicose pela via mitocondrial. O DCA age estimulando o complexo de multienzimas CPD (*complexo piruvato desidrogenase*), complexo este responsável pela descarboxilação oxidativa de piruvato em acetil-CoA no citosol, co-enzima que atua diretamente no ciclo de Krebs, direcionando a produção energética para oxidação fosforilativa (OXFOS). O estímulo do CPD acontece através da inibição da atividade de piruvato desidrogenase quinase (PDK). Como citado anteriormente, PDK é uma enzima quinase que inibe a transformação de piruvato em acetil-CoA e leva ao acúmulo de lactato no citosol (48,51–53,56,58).

Além de reduzir drasticamente a produção de lactato e prótons pela célula, o DCA utiliza-se de duas vias apoptóticas importantes, sendo uma delas a despolarização mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerando assim apoptose dependente da ação mitocondrial. Sua outra via é a ativação de canais Kv1.5 onde o potássio intracelular (K^+)_i é diminuído e assim sinalizando a ativação de caspases através da inibição do fator nuclear de células T (NFAT1), um fator de transcrição que está diretamente relacionado com a redução de apoptose de células tumorais (48).

Ultimamente, diversas publicações relatam seu potencial terapêutico em diversos tipos de cânceres em seres humanos. Em 2013, foi investigada a atividade antitumoral do DCA em células de glioma *in vitro* e *in vivo*. O DCA foi capaz de inibir a proliferação destas células, além de induzirem apoptose *in vitro*. *In vivo*, os autores mostraram a habilidade do DCA de diminuir drasticamente o tumor em ratos e camundongos carreadores de tumores cerebrais tratados por gavagem, com doses variando entre 25–125mg/kg de DCA (53). Um relato em

literatura cita uma paciente humana com câncer de colón em estágio 4 que manteve doença estável por 4 anos sendo tratada apenas com DCA por via oral diariamente (59). O uso do DCA como terapia única após falha de resposta a outras modalidades terapêuticas, manteve a doença estável por um período de 5 anos em um paciente humano portador de melanoma (60). Uma pesquisa realizada no Laboratório de Oncologia Experimental e Comparada da FMVZ-USP determinou efeitos antineoplásicos *in vitro* e *in vivo* utilizando-se o DCA em melanoma murino. O tratamento de células de melanoma B16-F10 *in vitro* reduziu drasticamente a viabilidade destas células. Camundongos portadores de melanoma B16-F10 no subcutâneo apresentaram diminuição do volume tumoral após o tratamento oral com diferentes concentrações de DCA, com nenhum efeito adverso detectável (61).

O fato de algumas células tumorais realizarem glicólise aeróbica faz com que ocorra acúmulo intracelular de ácido lático e prótons. Uma das adaptações de células tumorais para se evitar este acúmulo intracelular letal, é a elevada quantidade de bombas e transportadores de prótons, o que acaba por acidificar o meio extracelular (MEC) da célula tumoral, carregando prótons para o MEC (48,62–65).

Esse microambiente ao redor da célula tumoral com maior acidificação confere benefícios de sobrevivência ao tumor, maior resistência a quimioterápicos e está relacionado a um mecanismo de escape imunológico, assim como um comportamento mais agressivo e invasivo das células neoplásicas (46,63,64).

Alguns dos agentes antineoplásicos utilizados atualmente na oncologia humana e veterinária são diretamente afetados pelo pH ácido do microambiente tumoral, o que confere um aumento na probabilidade de resistência tumoral ao tratamento antineoplásico de escolha. Normalmente, em uma célula tumoral, o pH_i (pH intracelular) é alto e o pH_e (extracelular) é baixo, conferindo à célula maligna uma adaptação em meios ácidos e o surgimento de resistência a múltiplas drogas (MDR, Multi Drug Resistance) e isso ocorre por meio de

proteínas transmembranais tais como os transportadores ABC (ATP-binding cassette). Uma outra hipótese de resistência tumoral é a presença de vesículas ácidas capazes de absorver prótons e transportar H^+ para o MEC. A superexpressão de V-ATPase na membrana celular e hiper-regulação da atividade destes transportadores já foi amplamente relacionado com quimiorresistência e a atividade metastática de diversos tumores malignos em seres humanos (65). Estratégias de modulação de pH_i e pH_e tumorais vem sendo discutidas ao longo dos anos como uma possibilidade de intensificar a resposta de terapias antineoplásicas (63,64).

O omeprazol (OMP) é um fármaco bastante conhecido, pertencente ao grupo de inibidores da bomba de prótons (PPI), utilizada com grande frequência no tratamento de diversas doenças relacionadas com refluxos gastroesofágicos, gastrites entre outras alterações patológicas gastrointestinais, tanto na medicina humana quanto veterinária. OMP é uma pró-droga (inativada), que age diretamente nas células parietais na mucosa gástrica, sendo acumulada e reduzida em um metabólito ativo que interage diretamente com $H^+-K^+-ATPase$, que por sua vez, causa uma inativação irreversível desta bomba e neutralização do pH (66). A segurança do uso a longo prazo do omeprazol foi descrita anteriormente em uma pesquisa que administrou OMP na dose de 0,17mg/kg uma vez ao dia, diariamente em cães saudáveis da raça Beagle por 7 anos (67). O uso deste fármaco pode resultar na redução da acidificação tumoral, inibindo as bombas de prótons das células cancerosas alvo, e assim, diminuindo o pH_i e neutralizando o pH_e , conferindo um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e desencadeando processos sinalizadores pró-apoptóticos nas células malignas. O OMP em outros estudos já foi correlacionado com aumento dos níveis de apoptose celular pelo aumento da atividade de caspases e acúmulo de ROS dentro da célula maligna. E, já foi relatado seu efeito de modulação da autofagia em células cancerosas, inibição da atividade $H^+-ATPase$ do tipo vacuolar com conseqüente aumento no pH_e e pH lisossomal, inibição da sinalização de mTOR, um regulador de crescimento celular promovendo redução do crescimento celular e

levando a célula a morte celular através de apoptose. Outros relatos na literatura relacionam a capacidade do OMP em agir especificamente em células-alvo cancerosas pelo seu microambiente ácido, poupando os riscos de citotoxicidade em tecidos saudáveis e reduzindo assim chances de efeitos colaterais severos (68).

Um estudo demonstrou que o OMP inibe a proliferação e modula a autofagia de células de câncer pancreático humano através de diversos mecanismos, e aumenta o efeito *in vitro* do quimioterápico 5-fluorouracil (69). A multirresistência a drogas (MDR) antitumorais é também um fator importante que pode ser correlacionado com a acidificação do microambiente tumoral, conforme mencionado anteriormente. Níveis altos de prótons e lactato induzem a protonação e neutralização de drogas quimioterápicas, impedindo a sua ação nas células tumorais. Este microambiente tumoral ácido dispõe de expressão exacerbada de bombas de prótons na sua membrana celular, potencializando o efeito MDR e interferindo na eficácia da maioria dos tratamentos quimioterápicos em alguns tipos de cânceres. Uma via da MDR pode ser revertida com o uso de alguns inibidores da bomba de prótons devido à sua ação inibitória nas bombas V-ATPases e aumentando a absorção e metabolização dos antineoplásicos dentro da célula cancerígena. Além disso, diversos relatos complementam a potencialização do efeito de drogas quimioterápicas e até mesmo do tratamento com quimio-radioterapia com o uso concomitante de OMP (63,64,69–73).

4 Material e Métodos

4.1 Linhagens e cultivo celular

Células de melanoma oral canino CMGD5 foram adquiridas da empresa Kerast (Kerast Inc.– Estados Unidos), e são provenientes de um cão macho orquiectomizado de 13 anos da raça Poodle Miniatura (<https://www.kerast.com/item/1079/canine-melanoma-cell-line-cmgd-5>).

Células da linhagem SK-MEL-28, provenientes de um indivíduo *homo sapiens* de 51 anos, foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro – BRJ, Rio De Janeiro, Brasil (<https://bcrl.org.br/celula/Sk-Mel-28-Melanoma-Human>).

As células comercialmente adquiridas já possuíam certificação de autenticidade e testes para micoplasma negativos na ocasião da compra.

Todas as linhagens celulares foram mantidas em garrafas de cultivo celular com meio Dulbecco's Eagle Modified Medium High Glucose (DMEM alta glicose Gibco, USA) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco, USA) e quando necessário suplementou-se com 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco, USA) antes do uso em experimentação. Foram mantidas em incubadora a 37°C em 5% de CO₂ em atmosfera úmida. O acompanhamento diário por microscopia foi realizado para a avaliação de possíveis contaminações por fungos ou bactérias e avaliação da confluência (Figura 12).

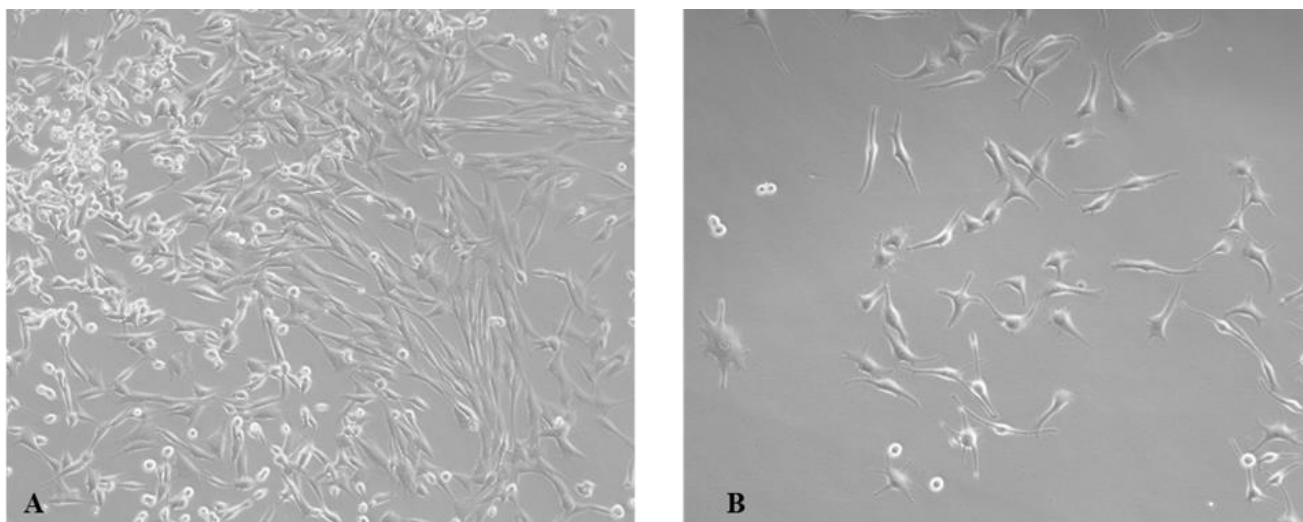


Figura 12 – Fotomicrografia de cultivo celular 2D (monocamada aderente) das linhagens de melanoma oral canino: **A)** CMGD5, **B)** SK-MEL-28, no aumento 10x. Toledo, G.F, 2020.

4.2 Drogas

O dicloroacetato de sódio (*Sodium Dichloroacetate* - DCA) foi adquirido da empresa Sigma Aldrich, USA. Antes de cada experimento, o DCA foi dissolvido em meio de cultura DMEM suplementado com 10% SFB na concentração desejada e filtrado com filtro de porosidade de 0.2 micrômetro para sua esterilização.

O omeprazol foi adquirido da Sigma Aldrich, USA (*Omeprazole* 100mg) e foi diluído em veículo dimetilsulfóxido (DMSO) para preparo de solução estoque a 0.25M, mantido sob congelamento em temperatura de -20°C . A partir da solução estoque de 0.25M foram preparadas as concentrações desejadas e filtradas com um filtro de 0.2 μm .

4.3 Ensaio de citotoxicidade pelo método cristal violeta

Inicialmente, 0.4×10^6 células por poço foram plaqueadas em placas de 96 poços de fundo chato com as linhagens celulares CMGD5 e SK-MEL-28. O design de placas era feito da seguinte maneira para as duas linhagens (Figura 13):

Placa 1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,5 + 44,44	2,5 + 44,44	2,5 + 44,44	2,5 + 44,44	5+44,44	5+44,44	5+44,44	5+44,44	10+44,44	10+44,44	10+44,44	10+44,44
B	2,5+66,66	2,5+66,66	2,5+66,66	2,5+66,66	5+66,66	5+66,66	5+66,66	5+66,66	10+66,66	10+66,66	10+66,66	10+66,66
C	2,5+100	2,5+100	2,5+100	2,5+100	5+100	5+100	5+100	5+100	10+100	10+100	10+100	10+100
D	2,5+150	2,5+150	2,5+150	2,5+150	5+150	5+150	5+150	5+150	10+150	10+150	10+150	10+150
E	2,5+225	2,5+225	2,5+225	2,5+225	5+225	5+225	5+225	5+225	10+225	10+225	10+225	10+225
F	20+44,44	20+44,44	20+44,44	20+44,44	20+66,66	20+66,66	20+66,66	20+66,66	20+100	20+100	20+100	20+100
G	20+150	20+150	20+150	20+150	20+225	20+225	20+225	20+225				
H											Branco	Branco

Placa 2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,5	2,5	2,5	2,5	44,44	44,44	44,44	44,44	40+44,44	40+44,44	40+44,44	40+44,44
B	5	5	5	5	66,66	66,66	66,66	66,66	40+66,66	40+66,66	40+66,66	40+66,66
C	10	10	10	10	100	100	100	100	40+100	40+100	40+100	40+100
D	20	20	20	20	150	150	150	150	40+150	40+150	40+150	40+150
E	40	40	40	40	225	225	225	225	40+225	40+225	40+225	40+225
F												
G												
H	Ctrl Meio	Ctrl Meio	Ctrl Meio	Ctrl Meio	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO				

Figura 13 – Figura representativa do design das placas de 96 poços para os ensaios de citotoxicidade e análise de dose-efeito pelo ensaio colorimétrico do cristal violeta. Ambas as linhagens obedeceram a mesma formatação de placa em cada repetição experimental.

Após 24 horas do plaqueamento, as células foram tratadas com as diferentes concentrações de DCA e OMP conforme mostradas no quadro a seguir (Quadro 2). A incubação com as drogas se deu por 48 horas. Após o período de incubação, seguiu-se com o ensaio do cristal violeta: foram adicionados 10uL de solução de cristal violeta por poço e após incubação por 10 minutos em temperatura ambiente, o sobrenadante foi desprezado, a placa vertida e cuidadosamente lavada em água corrente. Em seguida, as placas foram colocadas para secagem protegidas de sujidades do meio externo. Após secagem, 100uL/poço de metanol puro (Synth, Brasil) foram adicionados em cada poço e seguiu-se com a leitura das placas em espectrofotômetro a 570nm.

Foram definidas as combinações de tratamento conforme demonstradas no quadro a seguir (Quadro 2):

Quadro 2 – Concentrações e combinações utilizadas nos experimentos de avaliação de citotoxicidade e sinergismo.

Individual DCA (mM)	Individual OMP(μM)	Combinação DCA (mM) + OMP (μM)
2,5	44,44	2,5 + 44,44 ou 66,66 ou 100 ou 150 ou 225
5	66,66	5,0 + 44,44 ou 66,66 ou 100 ou 150 ou 225
10	100	10 + 44,44 ou 66,66 ou 100 ou 150 ou 225
20	150	20 + 44,44 ou 66,66 ou 100 ou 150 ou 225
40	225	40 + 44,44 ou 66,66 ou 100 ou 150 ou 225

O ensaio foi repetido por 3 vezes. Os dados foram analisados e a estatística realizada a partir do software GraphPad Prism5 pelo cálculo estatístico ANOVA de uma via, sendo $p < 0,05$ considerado estatisticamente relevante e utilizando-se pós-teste de Dunnett's como teste múltiplo para comparação entre os tratamentos e o controle (veículo).

4.4 Análise de morte celular por citometria de fluxo com uso dos fluoróforos anexina V e iodeto de propídeo

Para análise de morte celular após o tratamento das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 com DCA e OMP, optou-se pela análise por meio da marcação com anexina V e iodeto de propídeo e posterior análise em citometria de fluxo utilizando-se o kit Alexa fluor 488 annexinV/Dead cell Apoptosis Kit – Alexa fluor 488 annexin V and PI for Flow Cytometry (Invitrogen, USA). Cada linhagem foi submetida ao mesmo desenho experimental para análise de ciclo celular conforme descrito a seguir na Figura 14.

Neste ensaio, 6×10^4 células/poço foram plaqueadas em placas de 6 poços (Alemanha, Starstedt). Determinou-se os seguintes grupos de tratamento conforme ilustrada na figura 14 a seguir:

- DCA 10mM + OMP 100 μ M;
- DCA 10mM + 200 μ M;

- DCA 20mM + OMP 100µM;
- DCA 20mM + OMP 200µM;
- Controle (DMSO);
- Controle Sem Iodeto de Propídeo (PI);
- Controle Sem Anexina 5 (anx);
- Controle sem nenhuma marcação (Branco)

SKMEL-28										
10 + 100	10 + 100	10 + 100		20 + 100	20 + 100	20 + 100		Ctrl DMSO	Ctrl DMSO	Ctrl DMSO
10 + 200	10 + 200	10 + 200		20 + 200	20 + 200	20 + 200		Sem PI	Sem Anx	Branco
PLACA 1				PLACA 2				PLACA 3		

CMGD5										
10 + 100	10 + 100	10 + 100		20 + 100	20 + 100	20 + 100		Ctrl DMSO	Ctrl DMSO	Ctrl DMSO
10 + 200	10 + 200	10 + 200		20 + 200	20 + 200	20 + 200		Sem PI	Sem Anx	Branco
PLACA 1				PLACA 2				PLACA 3		

Figura 14 – Figura representativa do design das placas de 6 poços para os ensaios de morte celular com anexina V e iodeto de propídeo detectados por citometria de fluxo.

Após 24 horas do plaqueamento, o meio foi desprezado, os poços lavados com 2 ml de PBS 1x. Após lavagem, foi adicionado 4 ml de meio *starving* (DMEM High glucose + 2% soro fetal bovino) com intuito de manter as células na mesma etapa de ciclo celular, prévio ao tratamento. Após 24 horas de incubação em incubadora de células, dividiu-se as placas em seus respectivos grupos de tratamento e o grupo controle foi tratado com DMSO no mesmo volume equivalente utilizado para dissolução do OMP. As concentrações foram pré-definidas baseando-se nos resultados médios adquiridos no ensaio de citotoxicidade e viabilidade por cristal violeta anteriormente.

As placas foram tratadas em dose única por um período de 48 horas. Após 48 horas de incubação com o tratamento, o meio de cada poço foi descartado, as placas foram lavadas delicadamente com PBS 1 x por uma vez, e tripsinizadas, a fim de adquirir o máximo conteúdo de células provenientes de cada poço de tratamento para leitura no citômetro de fluxo. A solução celular foi reservada em tubos de leitura de citometria de fluxo, e coradas de acordo com manual de usuário do kit Alexa Fluor 488 annexinV/Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen, USA). A leitura foi realizada em colaboração com o laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, com o auxílio

da Prof^a Dra Cristina de Oliveira Massoco de Salles Gomes. O citômetro de fluxo utilizado foi o FACSCalibur, e a leitura foi realizada em no máximo 10 minutos após as células terem sido coradas e filtradas para eliminação de grumos. Foram salvos no mínimo 10000 eventos para análise e adquiridos pelo software FlowJo 10.

4.5 Avaliação bioenergética pelo ensaio de SeaHorse XFe96.

O aparelho SeaHorse XFe96 quantifica em tempo real a respiração mitocondrial e glicólise das células tumorais. O aparelho possui cartuchos com sensores para fluoróforos diferentes, um que se incorpora com O₂ e outro que possui sensibilidade a alterações no pH do meio, quantificando de forma real-time o consumo de oxigênio (OCR) – respiração mitocondrial e os níveis de acidificação extracelular (ECAR) – glicólise.

Além da quantificação dos níveis basais de OCR das células, foram adicionados reagentes moduladores da respiração mitocondrial, que inibem ou estimulam os complexos da via de fosforilação oxidativa de forma a revelar parâmetros essenciais de sua função mitocondrial. Para isso, foram utilizadas 3 diferentes injeções de inibidores ou estimulantes dos complexos respiratórios. A primeira mensuração é do nível basal das células. A primeira injeção, a oligomicina, é um inibidor do complexo V – ATP sintase, da qual inibirá a liberação de ATP e reduz o OCR a um valor mínimo. Esta redução de OCR está diretamente relacionada à produção de ATP celular. A segunda injeção, o carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) atua como um desacoplador químico do transporte de elétrons da fosforilação oxidativa e permite que os prótons retornem para a matriz mitocondrial sem passar pela ATP-sintase, fazendo com que a cadeia fosforilativa atue na sua capacidade máxima e, portanto, aumentando OCR ao seu maior nível. Esta capacidade máxima de

respiração define a capacidade média em que a célula é capaz de responder a demandas energéticas maiores ou quando está sob estresse. A terceira e última injeção é uma mistura de dois compostos, a rotenona (um inibidor do complexo I) e a antimicina A (que inibe o complexo III). A combinação delas desliga a respiração mitocondrial e providencia a quantificação de respiração não mitocondrial, que é mediada por meio de processos externos à mitocôndria (Figura 15).

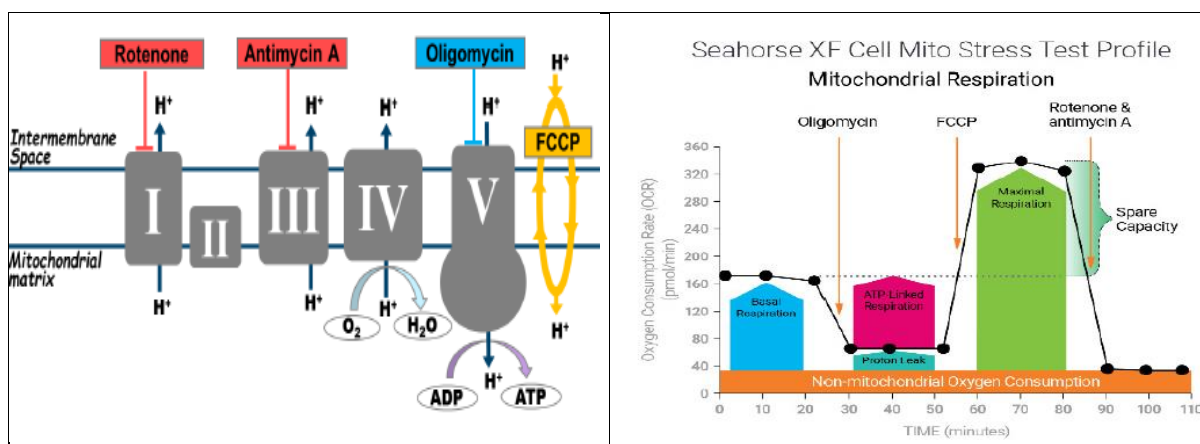


Figura 15 – Ilustrações das injeções dos inibidores de respiração mitocondrial e suas ações em cada complexo da cadeia de fosforilação oxidativa. (Imagens adaptadas do manual Agilent Seahorse XFp Cell Mito Stress Test Kit).

Para a realização do ensaio se fez necessária uma etapa antecedente para a definição da concentração ideal de FCCP para a densidade celular das linhagens de melanoma canino e humana utilizadas neste projeto (dados de ensaios de padronizações não demonstrados).

4.5.1 Teste de contaminação celular por micoplasma por ensaio PCR

Já previamente testadas para micoplasma na ocasião da compra das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 de seus respectivos bancos de células, realizamos novamente o teste para micoplasma antes da realização dos ensaios no laboratório colaborador de Genética

Mitocondrial do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. O teste foi realizado por meio de reação em cadeia polimerase (PCR) em gel de poliacrilamida em TBE 10% adaptando o protocolo da reação de Mcgarrit G.J, 1975.

4.5.2 Avaliação bioenergética das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 após 24 horas de monoterapia ou combinação de diferentes concentrações de DCA e OMP

Devido a inúmeros estudos corroborando a capacidade dos fármacos DCA e OMP de interferirem diretamente no efeito Warburg e na alteração de pH do meio extracelular de diversas células tumorais *in vitro*, utilizamos o ensaio SeaHorse XFe96 (Agilent, USA) a fim de determinarmos a resposta do uso destes fármacos na respiração celular mitocondrial das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28, e se o tratamento realmente afeta a via metabólica nestas linhagens. Para isto, 3×10^3 células de cada linhagem foram plaqueadas em duas diferentes placas de 24 poços de SeaHorse XFe96 (Agilent, USA) com 200uL de meio completo (DMEM High Glucose com adição de 10% de soro fetal bovino). O design de placa foi planejado de acordo com a Figura 16 abaixo. Após 24 horas de adesão das células às placas, os grupos de tratamento foram definidos da seguinte maneira:

- Grupo 1: DCA 10mM;
- Grupo 2: OMP 100uM;
- Grupo 3: DCA 10mM + OMP 100uM;
- Grupo controle veículo (DMSO)

Após o término do tratamento, as placas foram mantidas em estufa de oxigênio e CO₂ a fim de mimetizar as condições normais de acidificação no organismo.

PLACA SeaHorse XF 24 SK-MEL-28						
	1	2	3	4	5	6
A		10 mM DCA	10 mM DCA	10 mM DCA	10 mM DCA	10 mM DCA
B	100uM OMP	100uM OMP	100uM OMP		100uM OMP	100uM OMP
C	10+100	10+100		10+100	10+100	10+100
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	
PLACA SeaHorse XF 24 CMGD5						
	1	2	3	4	5	6
A		10 mM DCA	10 mM DCA	10 mM DCA	10 mM DCA	10 mM DCA
B	100uM OMP	100uM OMP	100uM OMP		100uM OMP	100uM OMP
C	10+100	10+100		10+100	10+100	10+100
D	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	

Figura 16 – Desenho das placas de tratamento SeaHorseXF com diferentes concentrações de DCA e OMP em monoterapia ou uso combinado. A definição das concentrações foi desenvolvida após *screening* de concentrações em teste de viabilidade celular por cristal violeta e morte celular por citometria de fluxo, e após repetidos experimentos pilotos de ambas as linhagens nestas concentrações.

Após 24 horas do tratamento, as placas foram retiradas da estufa celular convencional, os poços foram lavados com meio adaptado para a leitura do SeaHorse (sem a adição de tampão contendo bicarbonato de sódio e soro fetal bovino para não interferir com as trocas metabólicas). Os poços foram lavados cuidadosamente com o novo meio por 3 vezes consecutivas. Após as lavagens, as placas foram embaladas em papel alumínio com furos e mantidas em estufa a 37C° sem CO₂, por exatamente 1 hora, até a leitura no equipamento SeaHorse XFe96. A primeira leitura realizada foi dos níveis basais de OCR de cada poço, seguida de injeções de oligomicina [1mM], FCCP [1,5mM], rotenona [0,5uM] e antimicina A [0,5uM]. Após a leitura, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante de cada poço, adicionou-se 100uL de TCA 10% (Ácido Tricloroacético 10%) para fixação, as placas foram então seladas com papel filme e armazenadas em geladeira convencional até a realização da normalização. Este ensaio foi repetido diversas vezes (mais de 7 repetições) até sua padronização, com diferentes concentrações dos fármacos e design de placa, para se estabelecer a melhor concentração que foi demonstrada neste estudo. Após definidas as concentrações dos grupos (Grupo 1: DCA 10mM, Grupo 2: OMP 100uM, Grupo 3: DCA 10mM + OMP 100uM, Grupo 4: DMSO), o experimento foi realizado em 3 replicações independentes (3 placas para cada

linhagem com as mesmas definições de densidade celular e grupos de tratamento). Os dados brutos sem normalização das leituras foram adquiridos pelo Software Wave® do próprio fabricante da máquina (Agilent, USA). Após a realização da leitura bruta, realizou-se a normalização das placas.

4.5.3 Normalização das células após leitura bioenergética por SeaHorse

Na ocasião da normalização, as células foram lisadas com 200uL/poço de solução de hidróxido de sódio (NaOH) na concentração de 1M após a retirada do TCA e lavagem com PBS 1X. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37C° por 1 hora. Após o período de incubação, com um micropipetador de 1000uL foi-se homogeneizado bem cada poço a fim de destacar todas as células lisadas de cada poço. Com as células lisadas em suspensão, mensuramos a absorbância em espectrofotômetro a 260nm com o equipamento que aceita a dimensão da própria placa de SeaHorse XFe96 para leitura. A quantidade de DNA em cada poço, é linearmente correlacionada com o número de células, então, os valores de absorbância a 260nm (A260) foram utilizados para normalizar as medidas de consumo de O² pelas células de cada grupo de tratamento.

4.6 Análise estatística

Para o estudo de viabilidade celular, os valores de leitura de densidade óptica de cada grupo de tratamento foram transformados em porcentagem em relação ao controle. Foi utilizado o software GraphPad Prism5 para a transformação dos dados e cálculo estatístico. O

teste estatístico utilizado foi a Análise de Variância (ANOVA) de 1 via seguido do pós teste de Dunnet de múltipla comparação. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de p quando $p < 0.05$.

No estudo de morte celular avaliados por citometria de fluxo, a média amostral de cada tratamento foi analisada pelo teste estatístico ANOVA de 2 vias. Foram considerados estatisticamente relevantes os valores de $p < 0.05$.

Na avaliação do consumo de oxigênio, os dados adquiridos pelo aparelho SeaHorse XFe96 foram normalizados através de espectrofotometria a 260nm (A260) conforme descritos no material e métodos anteriormente. Após adquiridos os valores de A260, estes foram transferidos a uma planilha no Excel, e foi-se utilizada a seguinte fórmula para definição do consumo de O^2 de cada poço normalizado:

$$CON = (OCR/A260)$$

Sendo: CON: consumo de O^2 Normalizado, OCR: consumo de oxigênio da leitura bruta, A260: leitura da absorbância a 260nm.

Após o cálculo da normalização de cada poço, foi calculada a média das leituras das três placas de cada grupo de tratamento. Após isso, seguiu-se com o cálculo do desvio padrão. Obtendo os dados de desvio padrão, inserimos os valores no software GraphPad Prism para o cálculo da estatística de cada linhagem usando-se o teste estatístico Kruskal-Wallis. Foi determinada a significância estatística quando $p < 0.05$.

5 Resultados

5.1 Ensaio de citotoxicidade pelo método cristal violeta das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28

Primeiramente, foram avaliados os efeitos isolados do DCA e OMP nas células de melanoma oral canino CMGD5 pelo ensaio colorimétrico do cristal violeta, previamente descrito.

Foi detectado que o DCA produz um efeito do tipo “*hormese*” quando utilizado como monoterapia nas linhagens CMGD5, devido ao estímulo no crescimento celular em concentrações mais baixas, como de 2.5mM e inibição do crescimento nas concentrações mais altas de 20 e 40mM (Figura 17A).

Em seguida, avaliamos a resposta da linhagem CMGD5 ao OMP como monoterapia e demonstramos que OMP produz um efeito inibitório concentração-dependente a partir da concentração intermediária de 66.66 uM (Figura 17B).

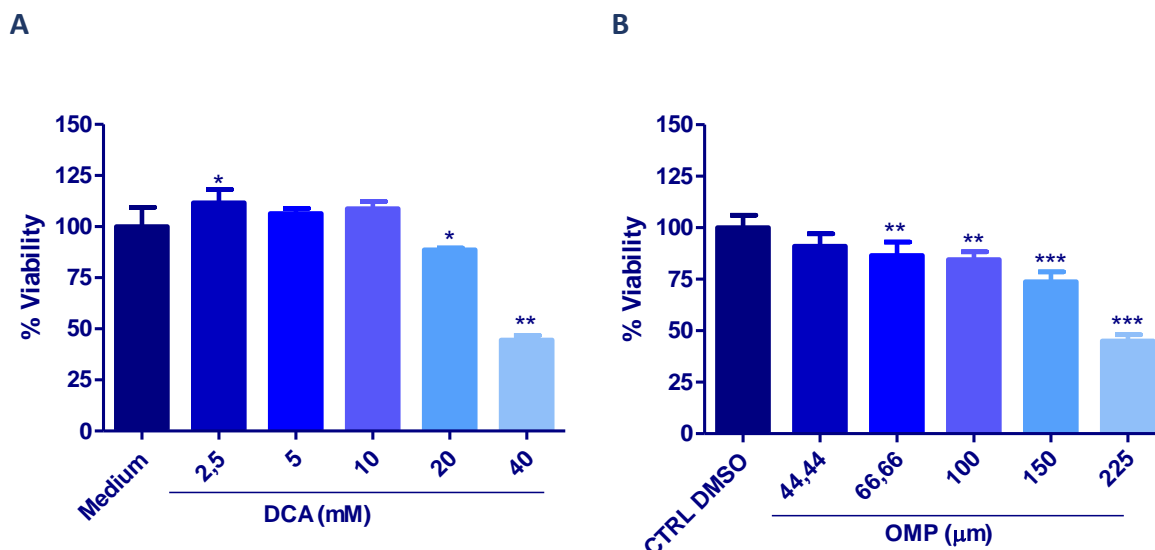


Figura 17 – Efeitos de DCA e OMP na linhagem de melanoma oral canino CMGD5. A) Resposta do tratamento com diferentes concentrações de DCA (2.5 – 40mM) após 48 horas de tratamento. B) Resposta do tratamento com diferentes concentrações de OMP (44.44 – 225uM) após 48 horas de tratamento. (Relevância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Quando associamos as duas drogas e suas concentrações, foi possível demonstrar um efeito importante de redução da viabilidade celular de forma concentração-dependente, em todas as combinações testadas DCA 2.5 – 40mM com OMP 44.44 – 225uM (Figuras 18A-E).

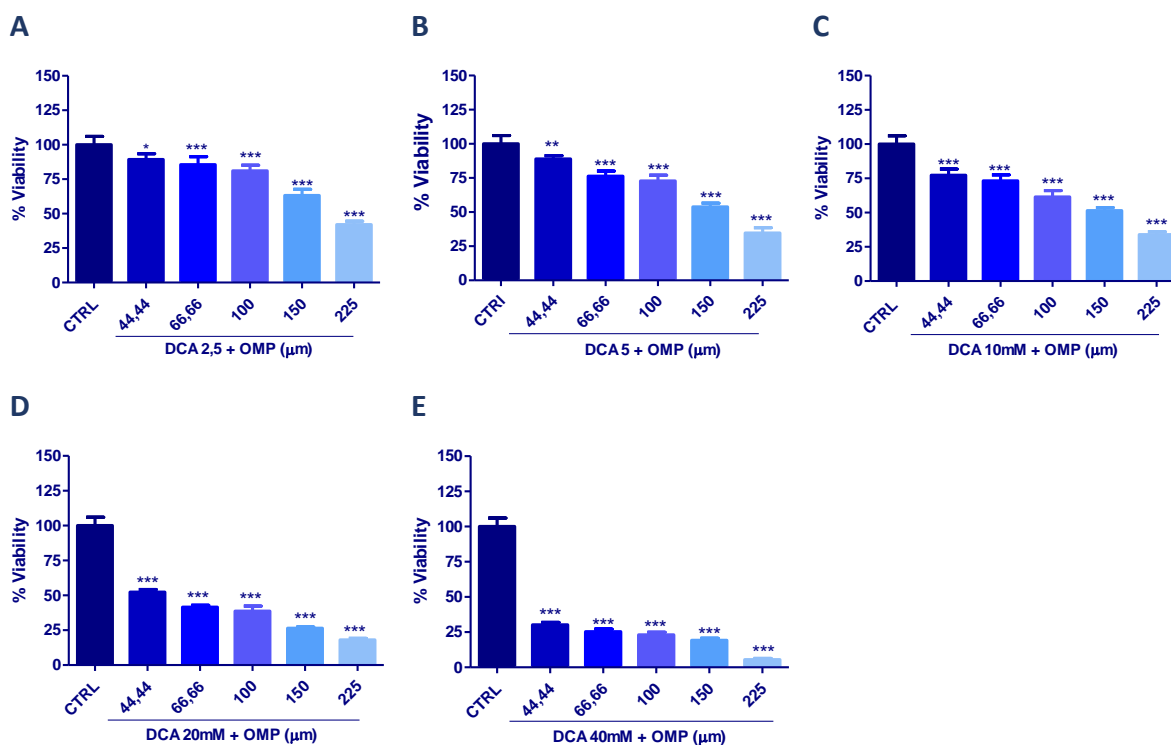


Figura 18 – Tratamento das células CMGD5 com DCA e OMP em associação. A-E) *Screening* de concentrações de DCA (2.5 – 40mM) e omeprazol (44.44 – 225uM) em associação exibem um efeito inibitório de viabilidade celular avaliado pelo método cristal violeta (Significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Da mesma forma, avaliamos os efeitos isolados e em combinação do DCA e OMP na linhagem de melanoma humano SK-MEL-28. A linhagem SK-MEL-28 apresentou um efeito de estimulação da viabilidade celular com ambos os tratamentos individuais de DCA e OMP, quando comparados ao grupo controle (Figura 19 A e B). Hipotetizamos que a linhagem SK-MEL-28 seja mais resistente aos efeitos das duas drogas quando em monoterapia.

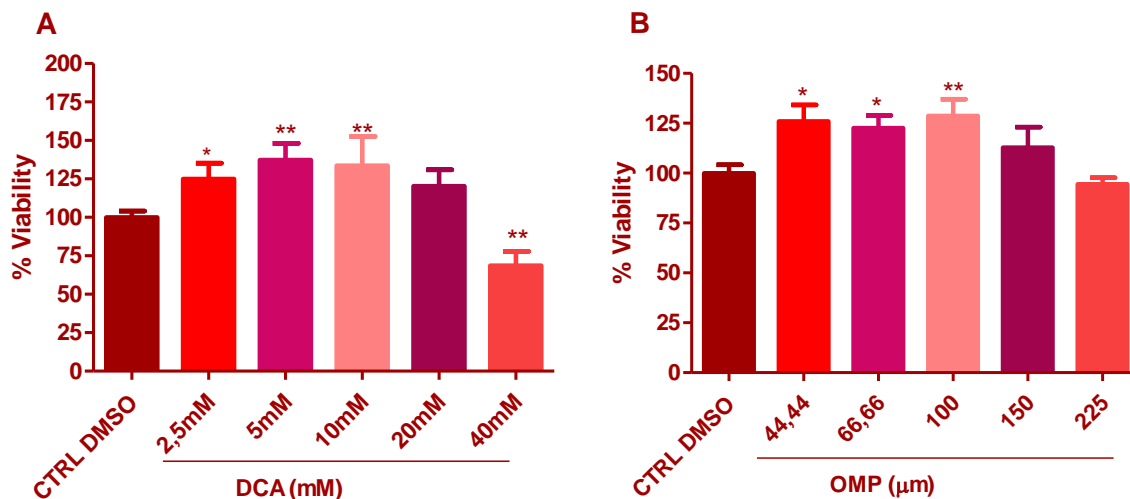


Figura 19 – Efeitos de DCA e OMP na linhagem de melanoma cutâneo humano SK-MEL-28. A) Resposta das diferentes concentrações de DCA (2.5 – 40mM) após 48 horas de tratamento. B) Resposta das diferentes concentrações de OMP (44.44 – 225uM) após 48 horas de tratamento. (Significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Quando utilizados os dois fármacos em associação, a linhagem SK-MEL-28 respondeu de forma concentração-dependente somente a partir das concentrações mais altas de DCA 20mM e 40mM e OMP 100 - 225 uM (Figura 20A – E).

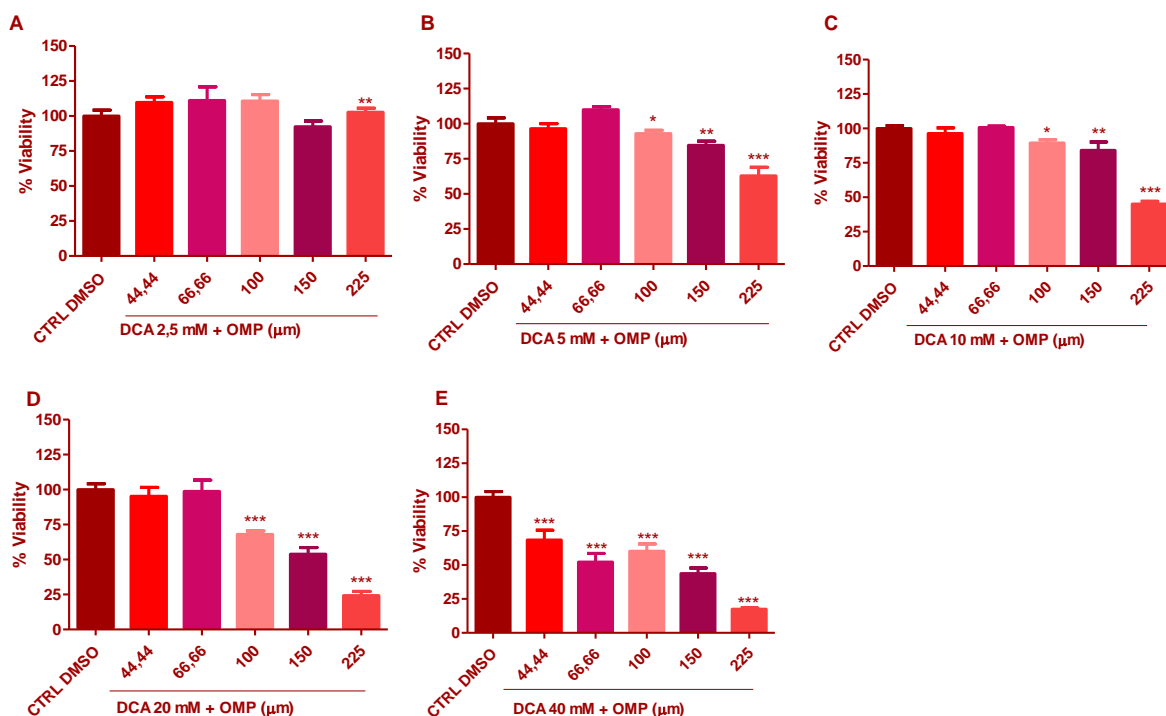


Figura 20 – Tratamento das células SK-MEL-28 com DCA e OMP em associação. A-E) *Screening* de concentrações de DCA (2.5 – 40mM) e omeprazol (44.44 – 225uM) em associação exibem um efeito inibitório da viabilidade celular a partir das maiores concentrações de DCA associado ao OMP, avaliado pelo método cristal violeta. (Significância estatística * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

5.2 Avaliação de morte celular das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 pelo método da anexina V e iodeto de propídeo por citometria de fluxo

Quando avaliadas as combinações de tratamento de DCA e OMP na indução de morte celular, podemos notar que a linhagem canina CMGD5 apresenta maiores índices de morte celular concentração-dependentes quando em comparação com o seu próprio controle. Todas as combinações apresentam níveis crescentes tanto de morte celular por apoptose quanto por necrose, entretanto, morte celular por apoptose parece ser maior (Figura 21A). A linhagem humana SK-MEL-28 apresenta resultados variáveis de morte celular induzida pelas diferentes concentrações, sendo que quando comparadas ao controle, as combinações DCA 10mM +

OMP100uM e DCA20mM + OMP200uM mostraram maiores níveis de morte por necrose (Figura 21B).

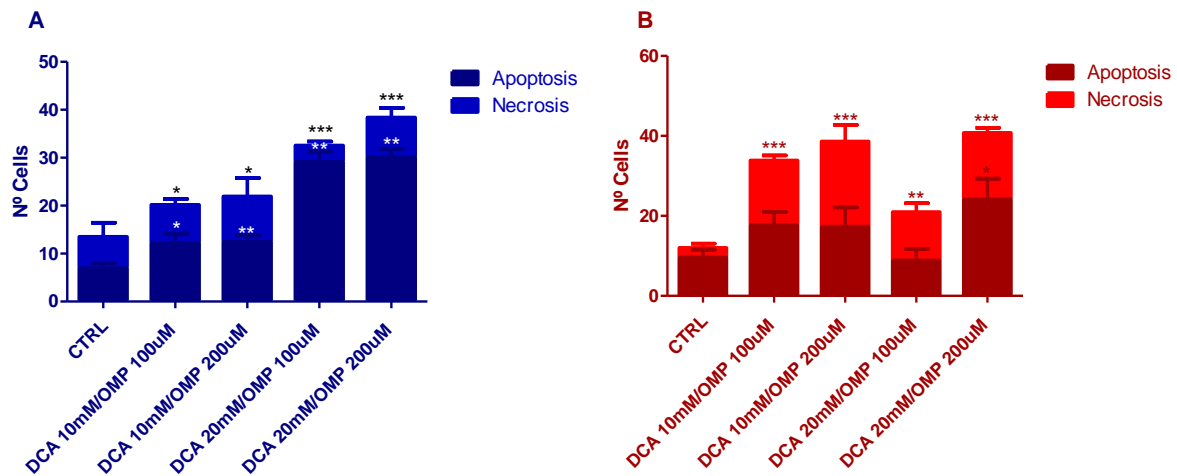


Figura 21 – A) Avaliação da morte celular da linhagem CMGD5 após 48 horas de tratamento com as combinações determinadas de DCA e OMP. B) Avaliação da morte celular da linhagem SK-MEL-28 após 72 horas de tratamento com as combinações determinadas de DCA e OMP. (Significância estatística: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

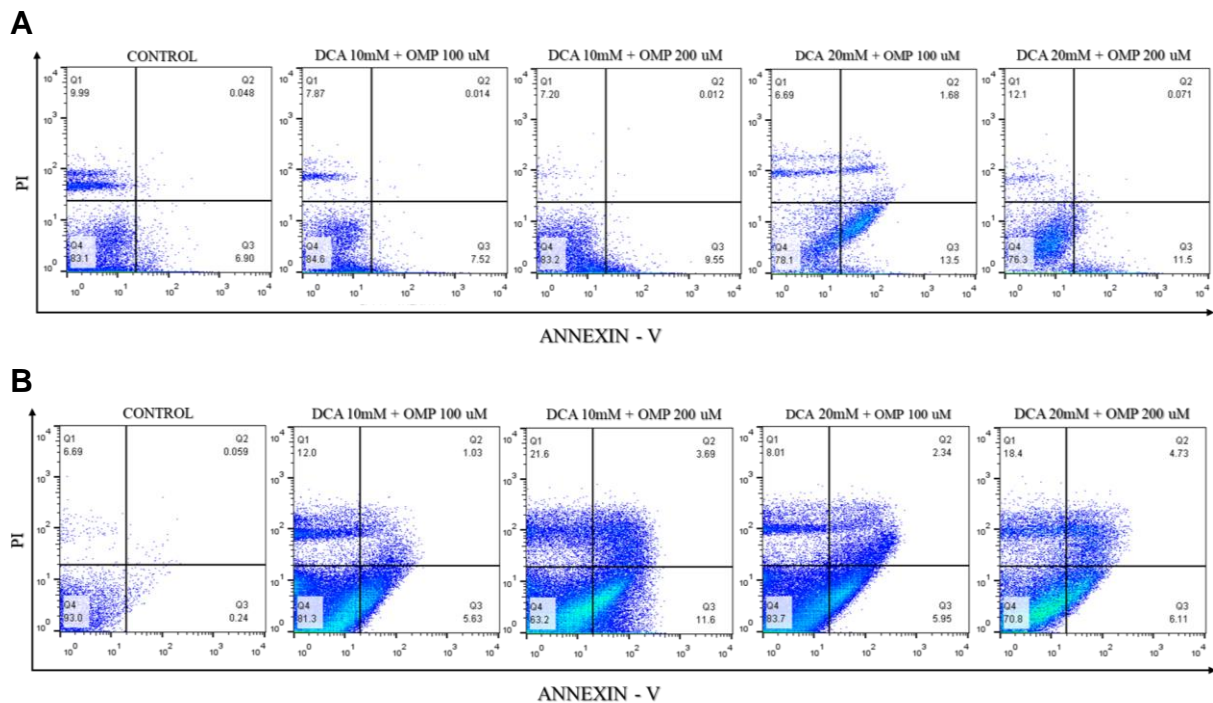


Figura 22 – DCA e OMP causam morte celular em diferentes porcentagens nas linhagens de CMGD5 (A) e SK-MEL-28 (B) após 48 horas de tratamento com as combinações determinadas de DCA e OMP. A determinação da média foi calculada a partir de triplicatas e quadruplicatas em uma repetição experimental.

Aprofundando mais a análise de morte celular, determinamos as populações de células que apresentaram apoptose precoce (Q3), apoptose tardia (Q2), necrose (Q1) e àquelas que se mantiveram-se viáveis (Q4) após as 48 horas de tratamento com as diferentes concentrações de DCA e OMP, conforme demonstrado na figura 22A para a linhagem CMGD5 e 22B para a linhagem humana SK-MEL-28. Podemos notar um aumento gradual de células em apoptose precoce conforme se aumenta a concentração das duas drogas na linhagem CMGD5(Figura 22A). Já na linhagem humana SK-MEL-28, foi detectada morte por apoptose precoce e também morte por necrose (Figura 22B).

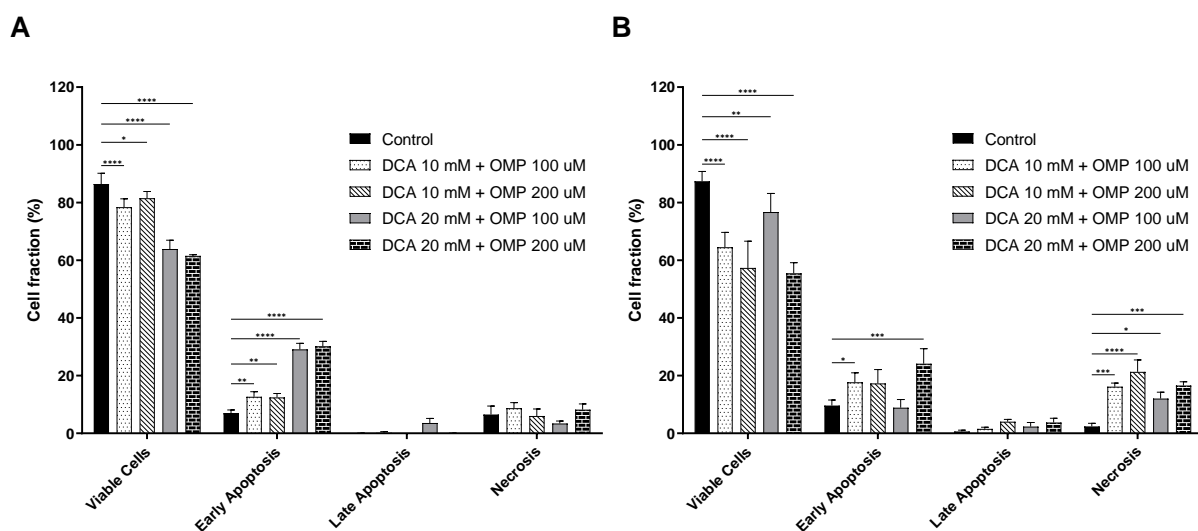


Figura 23 – Determinação da porcentagem de células viáveis, e porcentagem de células apresentando morte por apoptose precoce, apoptose tardia e necrose das linhagens CMGD5 (A) e SK-MEL-28 (B), após 48 horas de tratamento com as determinadas combinações de DCA e OMP. A porcentagem foi definida a partir da média das triplicatas ou quadruplicatas em uma repetição experimental. Relevância estatística em relação ao controle: α = apoptose precoce ($p < 0.01$), β = apoptose precoce ($p < 0.001$), γ = apoptose precoce ($p < 0.5$), κ = necrose ($p < 0.05$), ψ = necrose ($p < 0.001$). Gráficos do ensaio de Anexina V e PI no eixo Y mostrando a porcentagem de células viáveis e no eixo X os diferentes tipos de morte celular detectados de cada linhagem celular: apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. A mensuração foi realizada após 72 horas de tratamento com diferentes combinações de DCA em associação com OMP. A porcentagem das células foi determinada através da média de 3 amostras de cada tratamento. Relevância estatística comparada ao grupo controle: ANOVA 2-vias seguido do teste Bonferroni post-hoc: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Para equiparar os gráficos visuais em dotplot com as porcentagens populacionais das duas linhagens e seu comportamento em relação a morte celular com o tratamento das duas drogas,

foi calculada a porcentagem de cada uma das populações, conforme demonstradas na Figura 23A e 23B, para as linhagens CMGD5 e SK-MEL-28, respectivamente. Na linhagem de melanoma oral canina CMGD5, observa-se uma porcentagem maior de células em apoptose precoce, onde nas combinações DCA 20mM + OMP 100 uM e DCA 20 mM + OMP 200 uM a fração de células em apoptose precoce foi maior (Figura 23A). Células que se apresentaram em necrose ou em apoptose tardia não foram estatisticamente relevantes. A linhagem humana de melanoma cutâneo SK-MEL-28 apresentou uma resposta diferente, onde foi possível detectar populações apresentando necrose e apoptose precoce (23B). As únicas combinações de SK-MEL-28 que não apresentaram apoptose precoce em uma porcentagem estatisticamente relevante foram as combinações: DCA 10 mM + OMP 200 uM e DCA 20 mM + OMP 100 uM, porém demonstraram uma população significativa de células em necrose.

5.3 Avaliação bioenergética pelo ensaio de SeaHorse XFe24

5.3.1 Teste PCR para verificar contaminação por micoplasma

Após o teste para micoplasma por PCR, não foi detectada nenhuma contaminação de nas linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 (Figura 24).

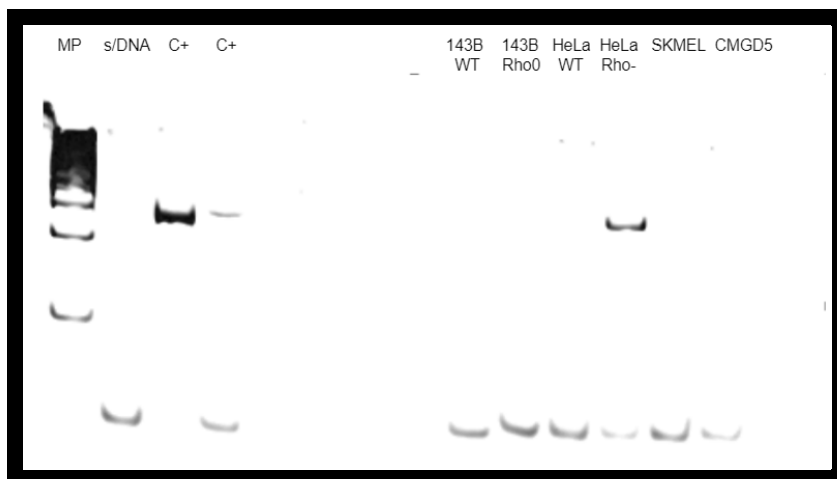


Figura 24 – Gel de poliacrilamida em TBE 10% para PCR para detecção de contaminação com micoplasma nas linhagens celulares CMGD5 e SK-MEL-28 (SKMEL).

Após a testagem negativa para infecção de micoplasma nas culturas celulares, retomamos os ensaios de bioenergética.

5.3.2 Avaliação bioenergética das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 após tratamento com DCA e OMP em monoterapia ou associação pelo ensaio de SeaHorse XFe96.

O comportamento inibitório de DCA em PDK é amplamente relacionado, em diversas publicações, com a redução de lactato e reestabelecimento da oxidação fosforilativa e produção energética através da respiração mitocondrial. OMP de uma maneira, já foi relacionado com a alteração de pH em células tumorais, levando à ativação da cascata apoptótica através do aumento de espécies reativas de oxigênio, entretanto, seu mecanismo em células tumorais ainda não foi bem elucidado. Para avaliarmos a resposta bioenergética de células de melanoma oral canina e células de melanoma cutâneo humanas, realizamos o experimento SeaHorse XF para avaliação do consumo de O_2 exatamente 24 horas após o tratamento das linhagens CMGD5 e

SK-MEL-28 com as concentrações de DCA 10mM, OMP 100uM e a combinação DCA 100mM + OMP 100uM, conforme descrito anteriormente no material e métodos.

No presente estudo, não houve diferença estatística quando avaliados os níveis de consumo de oxigênio basal (figura 25 A) e máximo (Figura 25 B) entre o controle e as células da linhagem CMGD5 e SK-MEL-28. Portanto, nestas concentrações definidas, conclui-se que não houve alteração no consumo de oxigênio com o uso em monoterapia ou em associação de DCA e OMP em ambas as linhagens, canina e humana.

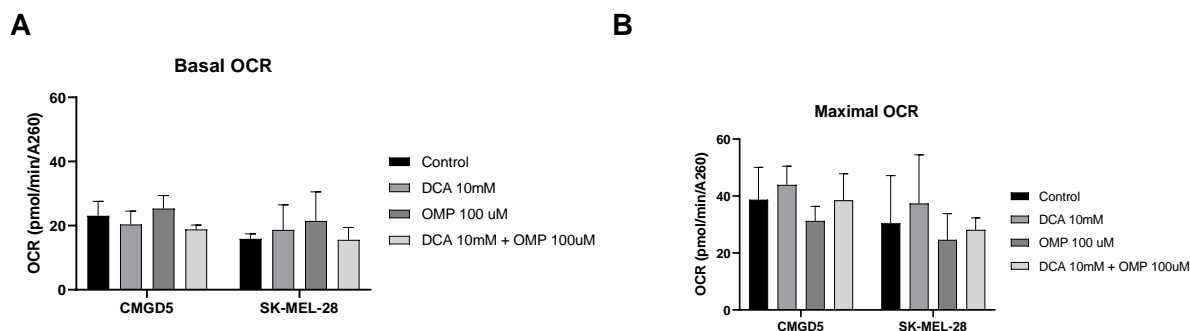


Figura 25 – Os níveis de consumo de oxigênio (OCR) foram mensurados em tempo real nas células da linhagem CMGD5 e SK-MEL-28 tratadas ou não com DCA e OMP, em associação ou não. O grupo controle foi tratado com DMSO. Foi determinada (A) a respiração mitocondrial basal (basal OCR) e (B) a respiração mitocondrial máxima (maximal OCR), após as injeções de 1 μ M FCCP. Os resultados apresentados são a média \pm SD de 3 experimentos independentes, realizados em quadruplicatas.

6 Discussão

Nas últimas décadas, a escassez de descoberta de novas moléculas eficazes para o tratamento de câncer tem gerado muitas pesquisas utilizando-se fármacos de “*repurposing*” (ou reaproveitamento). Fatores como o conhecimento da farmacodinâmica destas drogas, toxicidade e doses pré-estabelecidas para uso em outras doenças além do menor tempo para disponibilização de seu uso no mercado, vêm aumentando o interesse de cientistas ao redor do mundo a moléculas já conhecidas que possuem ações antineoplásicas. Na oncologia veterinária também não é diferente. O uso de drogas conhecidas com efeitos antineoplásicos é um tema que tem chamado a atenção de muitos pesquisadores para o uso em tratamentos veterinários (50).

A **reprogramação** metabólica é uma adaptação de células neoplásicas bastante reconhecida, o forte impacto dela com a carcinogênese tornou esta adaptação uma das marcas registrada do câncer (38,57,74). O fato de que a maioria dos tumores sólidos apresentam mecanismos metabólicos alterados, tornou a utilização da via metabólica como alvo terapêutico e tem gerado muito interesse entre os grupos de pesquisa nos últimos anos (45).

O mecanismo do DCA em células tumorais, conforme descrito anteriormente em revisão literária, envolve a inibição da piruvato desidrogenase quinase (PDK), retomada do metabolismo celular de glicólise aeróbica para fosforilação oxidativa, aumento de superóxidos mitocondriais e ativação dos canais Kv, levando à morte celular por apoptose e redução de proliferação celular em tumores sólidos (48,57). Além disso, as células tumorais apresentam um aumento exuberante de bombas de prótons, além de exibirem um microambiente ácido, o que promove resistência a diversos quimioterápicos e evasão do sistema de vigilância imunológica, beneficiando a carcinogênese e a progressão tumoral. A ação do OMP toma uma

via diferente do DCA, porém de uma forma complementar. OMP é capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio acionando uma cascata apoptótica nas células tumorais, além de aumentar o pH extracelular no microambiente tumoral, beneficiando a ação de drogas terapêuticas e imunovigilância (63,71). Com este raciocínio, propomos por meio deste estudo avaliar a ação destes dois moduladores metabólicos, DCA e OMP, em células de melanoma oral canino e células de melanoma cutâneo humanas. Ambas as drogas já foram amplamente descritas com ações antineoplásicas em diversos tumores de forma experimental (57,75).

Outro objetivo em nosso estudo foi avaliar a possibilidade destes dois fármacos apresentarem ação antineoplásica em células de melanoma oral canino e comparar os efeitos adquiridos nesta linhagem ao melanoma cutâneo humano, ou seja, avaliar se as mesmas respostas aos fármacos são obtidas em melanomas de espécies diferentes (cães e humanos). Para isso, primeiramente avaliamos como ambas as drogas agem sobre a viabilidade celular das duas linhagens diferentes sob perspectiva de local de origem (um melanoma oral e outro cutâneo) e de espécie. Estudamos a princípio como estes fármacos atuam quando utilizados em monoterapia. O DCA nas células da linhagem canina CMGD5 apresenta um efeito inibitório da viabilidade celular apenas nas maiores concentrações 20 e 40 mM. Já na concentração de 2.5mM notamos um aumento da viabilidade quando comparada ao controle. O aumento desta viabilidade é um fenômeno denominado efeito hormese. Este efeito já foi anteriormente descrito em outros estudos *in vitro*. No estudo de Harting *et al.* com células mamárias caninas tratadas com DCA demonstrou-se que em concentrações menores do que 10mM, as células demonstraram um maior estímulo de sua viabilidade em (58). Por este ser um estudo inédito avaliando a resposta do OMP em linhagens de melanoma canino e humano, até o momento desta publicação, não encontramos relatos na literatura para que possamos associar um comparativo da resposta de diminuição de viabilidade das células CMGD5 a partir da

concentração de 66,66 uM de OMP demonstradas. Por isso, concluímos que as células CMGD5 são mais sensíveis ao tratamento de OMP em monoterapia quando comparadas ao DCA nas concentrações testadas.

Com isso, comparamos os efeitos do tratamento com as drogas DCA e OMP na viabilidade celular de células de melanoma humano, para avaliar se a resposta se representaria de forma igualitária. As mesmas concentrações de DCA e OMP utilizadas na linhagem CMGD5 foram usadas na linhagem SK-MEL28 e verificamos um efeito de estímulo da viabilidade celular quando comparado ao controle, tanto no tratamento das células com DCA quanto com OMP em monoterapia. Hipotetizamos que a linhagem SK-MEL-28 seja mais resistente aos efeitos das duas drogas quando em monoterapia. Por meio da comparação entre as células, mostramos a individualidade de resposta de cada linhagem aos fármacos testados. Podemos considerar que melanomas de diferentes espécies (humana e animal), localizações e até o mesmo tipo histológico podem apresentar respostas divergentes aos fármacos, ou seja, a possibilidade de resposta individual de cada paciente deve ser levada em consideração, levando em conta a espécie e até mesmo estadiamento da doença. Um estudo *in vitro* semelhante utilizando inibidores da bomba de prótons esomeprazol e OMP também mostrou redução da viabilidade celular dose-dependente em células de melanoma humano metastático, e indicou que o efeito de citotoxicidade foi muito maior em um pH baixo (68).

Tendo em vista a ação inibitória de viabilidade nas células CMGD5 e resistência de resposta da linhagem SK-MEL-28, questionamos se a associação das duas drogas afetaria de forma diferente ou sinérgica, a viabilidade das duas linhagens. De forma surpreendente, a associação das duas drogas sobre o tratamento da linhagem canina mostrou efeitos inibitórios sinérgicos em todas as concentrações associadas, exceto na combinação DCA 2.5mM e OMP 44.44uM. Quando avaliamos a combinação das drogas no tratamento da linhagem de melanoma humano, combinações a partir de DCA 5mM + 100uM de OMP mostraram uma

redução de viabilidade pelo teste de cristal violeta, porém mesmo assim, demonstraram uma certa resistência à associação das duas drogas quando comparadas aos efeitos da linhagem CMGD5, confirmando mais uma vez nossa hipótese de resposta heterogênea entre as duas linhagens. Reiteramos que as concentrações utilizadas neste estudo, são altas para uso *in vivo*, entretanto nosso objetivo neste estudo foi de entender melhor o mecanismo de ação do uso destes fármacos sobre linhagens de melanoma canino em comparação com linhagem de melanoma humano. Determinamos que as linhagens de melanoma possuem uma resposta sinérgica de redução da viabilidade celular, e sugerimos que mais estudos deverão ser realizados para que possamos determinar se DCA e OMP podem ser efetivos no tratamento de melanoma oral canino. Nossos resultados demonstraram resposta indireta de sinergismo das duas drogas sobre o tratamento de MOC e melanoma cutâneo humano, sendo assim, candidatos interessantes para as próximas etapas de estudos pré-clínicos e clínicos.

Salvo maior juízo, só existe um estudo avaliando os efeitos do uso da combinação de DCA e OMP. Este estudo foi realizado com células de fibrossarcoma *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, a combinação de DCA com OMP exibiu um efeito antitumoral mais potente quando comparado ao uso das drogas isoladas. Nesse estudo, foi demonstrado que a redução da viabilidade celular das células malignas, foi maior quando o uso associado das concentrações de DCA e OMP, e as drogas foram capazes de poupar fibroblastos normais, o que demonstra de forma indireta, que DCA e OMP tem como alvo células tumorais malignas (52).

Visto que DCA e OMP apresentam efeitos inibitórios nas linhagens de melanoma canino e humana, testamos a externalização da fosfatidilserina, um fosfolípídeo exclusivamente encontrado na face interna da membrana celular em células saudáveis e que é exposta durante o processo de morte programada (apoptose). Questionamos se a morte celular apresentada ocorria a partir de necrose e/ou apoptose. Para isso, utilizamos o ensaio de morte celular e apoptose e avaliação por citometria de fluxo, conforme descrito nos materiais e métodos acima.

As células da linhagem CMGD5 apresentaram maiores níveis de morte celular por apoptose sendo que os índices de apoptose precoce predominaram nesta linhagem em todas as combinações (Figura 23A). Já a linhagem humana SK-MEL-28 apresentou maiores índices de morte celular por necrose do que apoptose precoce ou tardia (Figura 23B). Até o momento, não encontramos nenhum trabalho que associa a combinação das duas drogas em células de tumores melanocíticos, sendo este um estudo pioneiro das duas drogas em associação em tumores melanocíticos. Um estudo investigou a ação de DCA individualmente sobre as células de glioma C6 *in vitro* nas doses de 5, 20 e 40mM, concentrações próximas às utilizadas neste atual trabalho; o autor demonstrou um aumento dose-dependente de morte celular por apoptose (53). Já foi relatado que o Omeprazol determina morte celular programada (apoptose) em células de linfoma B humanas através de via de ROS (65). Até o momento, não encontramos relatos de que as drogas possam apresentar morte celular por necrose, entretanto, um estudo relatou que em células de carcinoma mamário canino, DCA não induziu apoptose e sim apenas inibição da proliferação destas células (58). Hipotetizamos que a sensibilidade às drogas, entre as duas espécies canina e humana inter-espécies e de tumores diferentes possam expressar uma heterogeneidade em suas respostas. Mais estudos são necessários para que possamos afirmar o real mecanismo de morte celular no uso destes fármacos sobre linhagens de melanoma maligno.

Como ambas as drogas atuam em vias metabólicas diferentes, estudamos a possibilidade de DCA e OMP e seu uso em monoterapia ou politerapia poderem interferir na via glicolítica e aumentar os níveis de consumo de oxigênio pelas células de melanoma oral canino e melanoma cutâneo humano, sugerindo assim uma reprogramação da via glicolítica através do desbalanceamento do efeito Warburg. As células da linhagem canina CMGD5 e SK-MEL-28 não apresentaram níveis representativos de aumento no consumo de oxigênio, mantendo-se em níveis muito parecidos das células controle não tratadas, com o uso em monoterapia de DCA e

OMP nas concentrações de 10mM e 100uM respectivamente ou a associação das duas drogas nestas concentrações. Isto pode sugerir que estas concentrações não foram suficientes para reprogramar o metabolismo bioenergético das duas linhagens. Sugerimos mais estudos com maior *variedade* de concentrações para avaliar a possibilidade de ambas as drogas possuírem um efeito direto na bioenergética destas linhagens. Outra possibilidade é que, nestas linhagens, o mecanismo de ação das drogas pode não ter como alvo o metabolismo celular glicolítico, o que contradiz a maior parte dos estudos envolvendo DCA em células tumorais malignas. Nenhum outro estudo, utilizando o SeaHorseXF e a associação de ambas as drogas foi realizado no nosso conhecimento até o momento, para que possamos equiparar os resultados. Alguns estudos utilizando o DCA em diferentes tipos de tumores avaliaram a bioenergética como um fator alvo importante no mecanismo de ação do DCA. Um recente estudo associando o uso de DCA e metformina, um antidiabético inibidor do complexo I da cadeia fosforilativa, demonstrou que DCA em monoterapia sobre células de glioblastoma humano aumentou o consumo de oxigênio nestas células, que foi reduzido após a associação da metformina ao tratamento (76). Em células mamárias caninas, DCA na concentração de 10mM não afetou a expressão de PDK-1, entretanto, em ensaio indireto de mensuração de ROS, DCA aparentemente aumentou os níveis de ROS e produção de ATP via ATP sintase (58), sugerimos que talvez DCA em alguns tipos celulares não interfira diretamente com o metabolismo glicolítico como forma única. Futuramente, propomos estudar se existe algum tipo de relação do aumento de acúmulo de lactato e alteração do pH microambiente tumoral após o tratamento das linhagens de melanoma com DCA e OMP, para que possamos determinar se o OMP atua realmente alterando o funcionamento das bombas de prótons, e por sua vez, aumentando os níveis de pH do microambiente tumoral, o que corroboraria com a expectativa de que o mecanismo do OMP nas células tumorais também envolve a alcalinização e modulação do microambiente tumoral.

Outros estudos com mais concentrações e em diferentes linhagens devem ser realizados para que possamos entender como estas drogas reagem em uma perspectiva metabólica.

Apesar de mais estudos serem necessários para a determinação do mecanismo de ação das duas drogas sobre o tratamento de melanoma oral canino, obtivemos resultados promissores de redução da viabilidade celular e morte por apoptose e necrose das células das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28. Propomos então que DCA e OMP podem ser drogas promissoras para o uso no tratamento de pacientes veterinários portadores de melanoma oral canino. Um estudo mais aprofundado destas drogas se faz necessário, e poderá significar uma nova modalidade terapêutica para estes animais.

7 Conclusões

- DCA e OMP isoladamente, e em diferentes concentrações, determinaram a diminuição da viabilidade de células CMGD5.

- Isoladamente, DCA e OMP não reduziram significativamente a viabilidade de células de melanoma cutâneo humano (SK-MEL-28).

- DCA e OMP quando em associação, atuam significativamente de forma sinérgica na inibição da viabilidade celular em células de melanoma oral canino porém menos intensas nas células de melanoma cutâneo humano.

- Em associação, ambos os fármacos determinam morte celular nas linhagens CMGD5 e SK-MEL-28, entretanto, o tipo de morte celular difere entre as duas linhagens.

- Na perspectiva bioenergética, DCA e OMP não aumentam o consumo de oxigênio das células das linhagens CMGD5 e SK-MEL-28 nas concentrações utilizadas, portanto, nas concentrações utilizadas DCA e OMP não atuam como reprogramadores do metabolismo glicolítico destas linhagens.

Anexo: Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 30 de junho de 2022
CEUax N 8292290119

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Maria Lúcia Zaidan Dagli

Área: Oncologia

Equipe envolvida: Gabriela Fernandes De Toledo - (executante); Márcia Kazumi Nagamine - (colaborador); Maria Lucia Zaidan Dagli - (orientador); Nadja Crsthina De Souza Pinto - (colaborador);

Título do projeto: "EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DO DICLOROACETATO DE SÓDIO (DCA) E OMEPRAZOL (OMP) EM LINHAGENS DE MELANOMA ORAL CANINO: ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO."

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 24/01/2020, **ANALISOU** e **APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 30th June 2022

CERTIFIED

We certify that the Research "ANTINEOPLASTIC EFFECTS OF SODIUM DICHLOROACETATE (DCA) AND OMEPRAZOL (OMP) IN CANINE ORAL MELANOMA LINES: STUDY OF MECHANISMS OF ACTION.", protocol number CEUAx 8292290119 (ID 001294), under the responsibility Maria Lúcia Zaidan Dagli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day January 24, 2020.

Certificamos que o protocolo do Projeto de Pesquisa intitulado "EFEITOS ANTINEOPLÁSICOS DO DICHLOROACETATO DE SÓDIO (DCA) E OMEPRAZOL (OMP) EM LINHAGENS DE MELANOMA ORAL CANINO: ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO.", protocolado sob o CEUAx nº 8292290119, sob a responsabilidade de Maria Lúcia Zaidan Dagli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 24 de janeiro de 2020.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

REFERÊNCIAS

1. Schiffman JD, Breen M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. Available from: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0231>
2. Pinello Derneka KD. Linfomas caninos-Portugal x Brasil O papel do ambiente.
3. Starkey MP, Scase TJ, Mellersh CS, Murphy S. Dogs really are man's best friend - Canine genomics has applications in veterinary and human medicine! *Briefings Funct Genomics Proteomics*. 2005;4(2):112–28.
4. Boyko AR. The domestic dog: man's best friend in the genomic era. *Genome Biol*. 2011;12(2).
5. Galibert F, Quignon P, Hitte C, André C. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. Vol. 334, *Comptes Rendus - Biologies*. Elsevier Masson SAS; 2011. p. 190–6.
6. McNeil EA, Prink AL, O'Brien TD. Evaluation of risk and clinical outcome of mast cell tumours in pug dogs. *Vet Comp Oncol*. 2006 Mar;4(1):2–8.
7. De Nardi AB, Dos Horta RS, Fonseca-Alves CE, De Paiva FN, Linhares LCM, Firmo BF, et al. Diagnosis, Prognosis and Treatment of Canine Cutaneous and Subcutaneous Mast Cell Tumors. *Cells*. 2022 Feb 1;11(4).
8. Smith SH, Goldschmidt MH, Mcmanus PM. A Comparative Review of Melanocytic Neoplasms. Vol. 39, *Veterinary Pathology*. 2002. p. 651–78.
9. Modiano JF, Ritt MG, Wojcieszyn J, J.F. M, M.G. R, J. W, et al. The molecular basis of canine melanoma: pathogenesis and trends in diagnosis and therapy. *J Vet Intern Med* [Internet]. 1999;13(3):163–74. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L129438047>
10. Hoenerhoff MJ, Boyle M, Minocherhomji S, Pandiri AR. Carcinogenesis: Mechanisms and Evaluation. In: Haschek and Rousseaux's *Handbook of Toxicologic Pathology*. Elsevier; 2022. p. 205–54.
11. Alsaihati BA, Ho K-LL, Watson J, Feng Y, Wang T, Dobbin KK, et al. Canine tumor mutational burden is correlated with TP53 mutation across tumor types and breeds. *Nat Commun* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Jun 1];12(1). Available from: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24836-9>
12. Bergman PJ. Canine Oral Melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2007 May;22(2):55–60.
13. Bergman PJ, Mcknight J, Novosad A, Charney S, Farrelly J, Craft D, et al. Long-Term Survival of Dogs with Advanced Malignant Melanoma after DNA Vaccination with Xenogeneic Human Tyrosinase: A Phase I Trial. 2003.

14. Bonfanti U, Bertazzolo W, Gracis M, Roccabianca P, Romanelli G, Palermo G, et al. Diagnostic value of cytological analysis of tumours and tumour-like lesions of the oral cavity in dogs and cats: A prospective study on 114 cases. *Vet J.* 2015 Aug 1;205(2):322–7.
15. penta. Retrospective Study of 338 Canine Oral Melanomas with Clinical, Histologic, and Immunohistochemical Review of 129 Cases. 2016;608:1–12. Available from: papers3://publication/uuid/1E6918F3-D18F-4B13-A2C1-8B8F233585A2
16. Nishiya AT, Massoco CO, Felizzola CR, Perlmann E, Batschinski K, Tedardi MV, et al. Comparative aspects of canine melanoma. *Vet Sci.* 2016 Mar 1;3(1):1–22.
17. Spangler WL, Kass PH. The Histologic and Epidemiologic Bases for Prognostic Considerations in Canine Melanocytic Neoplasia.
18. Fonseca-Alves CE, Ferreira Ê, de Oliveira Massoco C, Strauss BE, Fávoro WJ, Durán N, et al. Current Status of Canine Melanoma Diagnosis and Therapy: Report From a Colloquium on Canine Melanoma Organized by ABROVET (Brazilian Association of Veterinary Oncology). *Front Vet Sci.* 2021 Aug 16;8.
19. Tsoi MF, Thaiwong T, Smedley RC, Noland E, Kiupel M. Quantitative Expression of TYR, CD34, and CALD1 Discriminates Between Canine Oral Malignant Melanomas and Soft Tissue Sarcomas. *Front Vet Sci.* 2021;8(August):1–12.
20. Smedley RC, Bongiovanni L, Bacmeister C, Clifford CA, Christensen N, Dreyfus JM, et al. Diagnosis and Histopathologic Prognostication of Canine Melanocytic Neoplasms: A Consensus of the Oncology-Pathology Working Group. *Vet Comp Oncol.* 2022 May 6;
21. Bergin IL, Smedley RC, Esplin DG, Spangler WL, Kiupel M, Bergin IL. Prognostic evaluation of ki67 threshold value in canine oral melanoma. *Vet Pathol [Internet].* 2011 Jan;48(1):41–53. Available from: <http://vet.sagepub.com>
22. Ma X, Wu Y, Zhang T, Song H, Jv H, Guo W, et al. Ki67 proliferation index as a histopathological predictive and prognostic parameter of oral mucosal melanoma in patients without distant metastases. *J Cancer.* 2017;8(18):3828–37.
23. Veloso ES, Gonçalves INN, Silveira TL, Espirito Santo JT, Figueiredo LV, Varaschin MS, et al. ZEB and Snail expression indicates epithelial-mesenchymal transition in canine melanoma. *Res Vet Sci.* 2020 Aug 1;131:7–14.
24. Silveira TL, Veloso ES, Gonçalves INN, Costa RF, Rodrigues MA, Cassali GD, et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with infiltration of inflammatory cells in oral and skin canine melanomas. *Vet Comp Oncol.* 2020 Dec 1;18(4):727–38.
25. Schmid F, Brodesser D, Reifinger M, Forte S, Semp P, Eberspächer-Schweda MC, et al. Canine oral primary melanoma cells exhibit shift to mesenchymal phenotype and phagocytic behaviour. *Vet Comp Oncol.* 2019;17(October 2018):1–10.
26. Owen L. TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Heal Organ [Internet].* 1980;80(20):1–52. Available from: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19812266568.html>

27. Hahn KA, DeNicola DB, Richardson RC, Hahn EA. Canine oral malignant melanoma: Prognostic utility of an alternative staging system. *J Small Anim Pract.* 1994;35(5):251–6.
28. Kim DY, Royal AB, Villamil JA. Disseminated Melanoma in a Dog with Involvement of Leptomeninges and Bone Marrow.
29. Tuohy JL, Selmic LE, Worley DR, Ehrhart NP, Withrow SJ. Outcome following curative-intent surgery for oral melanoma in dogs:70 cases (1998–2011). *J Am Vet Med Assoc.* 2014;245(11):1266–73.
30. Williams LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 Cases (1987-2001). *J Am Vet Med Assoc.* 2003;222(9):1234–6.
31. Bateman KE, Catton PA, Pennock PW, Kruth SA. 0–7–21 Radiation Therapy for the Treatment of Canine Oral Melanoma. *J Vet Intern Med.* 1994;8(4):267–72.
32. Tellado MN, Maglietti FH, Michinski SD, Marshall GR, Signori E. Electrochemotherapy in treatment of canine oral malignant melanoma and factors influencing treatment outcome. *Radiol Oncol [Internet].* 2020 [cited 2022 May 30];54(1):68–78. Available from: www.radioloncol.com
33. Dank G, Rassnick KM, Sokolovsky Y, Garrett LD, Post GS, Kitchell BE, et al. Use of adjuvant carboplatin for treatment of dogs with oral malignant melanoma following surgical excision. *Vet Comp Oncol.* 2014 Mar;12(1):78–84.
34. Freeman KP, Hahn KA, Harris FD, King GK. Treatment of Dogs with Oral Melanoma by Hypofractionated Radiation Therapy and Platinum-Based Chemotherapy (1987-1997). Vol. 17, *J Vet Intern Med.* 2003.
35. Henry CJ, Jr WGB, Whitley EM, Tyler JW, Ogilvie GK, Norris Ai, et al. Canine Digital Tumors: A Veterinary Cooperative Oncology Group Retrospective Study of 64 Dogs. *J Vet Intern Med.* 2005 Sep;19(5):720–4.
36. Conrad D, Kehl A, Beitzinger C, Metzler T, Steiger K, Pfarr N, et al. Molecular Genetic Investigation of Digital Melanoma in Dogs. *Vet Sci [Internet].* 2022;9(2). Available from: <https://doi.org/10.3390/vetsci9020056>
37. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre. Vol. 100, *Cell.* 2000.
38. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell [Internet].* 2011 Mar 4;144(5):646–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
39. Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. Cancer metabolism: A therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(1):11–31.
40. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation [Internet]. Available from: <https://www.science.org>

41. Warburg O. On the Origin of Cancer Cells. Vol. 123, Source: Science, New Series. 1956.
42. Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Saavedra E, Moreno-Sánchez R, Rodríguez-Enríquez S, et al. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J*. 2007 Mar;274(6):1393–418.
43. Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. *Cancer Cell*. 2008 Jun 10;13(6):472–82.
44. Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis? [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Cancer*. 2004 [cited 2019 Jul 7]. p. 891–9. Available from: www.nature.com/reviews/cancer
45. Xu R-HH, Pelicano H, Zhou Y, Carew JS, Feng L, Bhalla KN, et al. Inhibition of glycolysis in cancer cells: A novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res* [Internet]. 2005;65(2):613–21. Available from: www.aacrjournals.org
46. Huber V, Camisaschi C, Berzi A, Ferro S, Lugini L, Triulzi T, et al. Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2017 Apr 1 [cited 2018 Jun 12];43:74–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.001>
47. Raghunand N, Gillies RJ. pH and drug resistance in tumors. *Drug Resist Updat*. 2000;3(1):39–47.
48. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, et al. A Mitochondria-K⁺ Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell*. 2007;11(1):37–51.
49. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Cancer metabolism: looking forward. Vol. 21, *Nature Reviews Cancer*. *Nature Research*; 2021. p. 669–80.
50. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Dec 28;18(1):41–58.
51. Vella S, Conti M, Tasso R, Cancedda R, Pagano A. Dichloroacetate inhibits neuroblastoma growth by specifically acting against malignant undifferentiated cells. *Int J Cancer*. 2012 Apr 1;130(7):1484–93.
52. Ishiguro T, Ishiguro M, Ishiguro R, Iwai S. Cotreatment with dichloroacetate and omeprazole exhibits a synergistic antiproliferative effect on malignant tumors. *Oncol Lett* [Internet]. 2012 Mar 3 [cited 2018 Jul 7];3(3):726–8. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.552>
53. Duan Y, Zhao X, Ren W, Wang X, Yu KF, Li D, et al. Antitumor activity of dichloroacetate on C6 glioma cell: In vitro and in vivo evaluation. *Onco Targets Ther*. 2013;6:189–98.
54. Michelakis ED, Webster L, Mackey JR. Dichloroacetate (DCA) as a potential metabolic-targeting therapy for cancer. *Br J Cancer*. 2008 Oct 7;99(7):989–94.

55. Ruggieri V, Agriesti F, Scrima R, Laurenzana I, Perrone D, Tataranni T, et al. Dichloroacetate, a selective mitochondria-targeting drug for oral squamous cell carcinoma: a metabolic perspective of treatment. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Jan 20 [cited 2018 May 20];6(2):1217–30. Available from: <http://www.oncotarget.com/fulltext/2721>
56. Kankotia S, Stacpoole PW. Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer* [Internet]. 2014 Dec 1;1846(2):617–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.08.005>
57. Tataranni T, Piccoli C. Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019.
58. Harting TP, Stubbendorff M, Hammer SC, Schadzek P, Ngezahayo A, Escobar HM, et al. Dichloroacetate affects proliferation but not apoptosis in canine mammary cell lines. Lebedeva I V., editor. 2017 Jun [cited 2018 May 20];12(6):e0178744. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0178744>
59. Khan A, Andrews D, Blackburn AC. Long-term stabilization of stage 4 colon cancer using sodium dichloroacetate therapy. *World J Clin Cases*. 2016;4(10):336.
60. Khan A, Andrews D, Shainhouse J, Blackburn AC. Long-term stabilization of metastatic melanoma with sodium dichloroacetate. *World J Clin Oncol*. 2017 Aug 10;8(4):371–7.
61. Do Nascimento RS, Nagamine MK, De Toledo GF, Chaible LM, Tedardi M V., Del-Grande MP, et al. Sodium dichloroacetate attenuates the growth of B16-F10 melanoma in vitro and in vivo: An opportunity for drug repurposing. *Anticancer Drugs*. 2021 Feb 1;32(2):111–6.
62. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res*. 2006;66(13):6699–707.
63. Walsh M, Fais S, Spugnini EP, Harguindey S, Abu Izneid T, Scacco L, et al. Proton pump inhibitors for the treatment of cancer in companion animals. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Sep 4;34(1):93. Available from: <http://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-015-0204-z>
64. Fais S. Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism: Symposium. *J Intern Med*. 2010 May;267(5):515–25.
65. De Milito A, Iessi E, Logozzi M, Lozupone F, Spada M, Marino ML, et al. Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2007 Jun 1;67(11):5408–17.
66. Oosterhuis B, Jonkman JHG. Omeprazole pharmacology pharmacokinetics and interactions. *Digestion*. 1989;44:9–17.
67. Effect of 7 years daily oral administration of omeprazole to beagle dogs.
68. De Milito A, Canese R, Marino ML, Borghi M, Iero M, Villa A, et al. PH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by

- inhibition of tumor acidity. *Int J Cancer*. 2010 Jul 1;127(1):207–19.
69. Wang X, Liu C, Wang J, Fan Y, Wang Z, Wang Y. Proton pump inhibitors increase the chemosensitivity of patients with advanced colorectal cancer. *Oncotarget* [Internet]. 2017;8(35):58801–8. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget/
 70. Udelnow A, Kreyes A, Ellinger S, Landfester K, Walther P, Klapperstueck T, et al. Omeprazole inhibits proliferation and modulates autophagy in pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2011;6(5).
 71. Spugnini EP, Baldi A, Buglioni S, Carocci F, Milesi de Bazzichini G, Betti G, et al. Lansoprazole as a rescue agent in chemoresistant tumors: A phase I/II study in companion animals with spontaneously occurring tumors. *J Transl Med* [Internet]. 2011;9(1):221. Available from: <http://www.translational-medicine.com/content/9/1/221>
 72. Azzarito T, Lugini L, Spugnini EP, Canese R, Gugliotta A, Fidanza S, et al. Effect of modified alkaline supplementation on syngenic melanoma growth in CB57/BL mice. *PLoS One*. 2016 Jul 1;11(7).
 73. Zhang JL, Liu M, Yang Q, Lin SY, Shan HB, Wang HY, et al. Effects of omeprazole in improving concurrent chemoradiotherapy efficacy in rectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2017 Apr 14;23(14):2575–84.
 74. Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Vol. 23, *Cell Metabolism*. Cell Press; 2016. p. 27–47.
 75. Spugnini E, Fais S. Proton pump inhibition and cancer therapeutics: A specific tumor targeting or it is a phenomenon secondary to a systemic buffering? *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2017 Apr 1;43:111–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.01.003>
 76. Korsakova L, Krasko JA, Stankevicius E. Metabolic-targeted combination therapy with dichloroacetate and metformin suppresses glioblastoma cell line growth in vitro and in vivo. *In Vivo (Brooklyn)*. 2021 Jan 1;35(1):341–8.