



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **Tiazolidinedionas como estratégia terapêutica no melanoma: revisão sistemática**

Ana Patrícia Galego Pinto

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas**

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Margarida Espírito Santo e  
Professora Doutora Ana Luísa De Sousa Coelho

2019



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

# **Tiazolidinedionas como estratégia terapêutica no melanoma: revisão sistemática**

Ana Patrícia Galego Pinto

**Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas**

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Margarida Espírito-Santo e  
Professora Doutora Ana Luísa De Sousa Coelho

2019

## Tiazolidinedionas como estratégia terapêutica no melanoma: revisão sistemática

### Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Ana Patrícia Galego Pinto

© 2019 Ana Patrícia Galego Pinto

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho, através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Durante 5 anos a Universidade do Algarve e a cidade de Faro foram a minha segunda casa, onde vivi aqueles que foram sem dúvida os melhores anos da minha vida. Um dos maiores ensinamentos que levo para sempre é que o apoio dos que nos rodeiam é fundamental, pelo que deixo aqui um especial agradecimento a todos aqueles que partilharam esta aventura comigo.

Às minhas orientadoras, Professora Doutora Margarida Espírito-Santo e Professora Doutora Ana Luísa De Sousa Coelho, por toda a disponibilidade, dedicação e apoio, essenciais para a realização desta dissertação.

Aos professores do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve, por todos os ensinamentos transmitidos.

À minha madrinha Patrícia Silva, por ter sido a minha melhor escolha.

À minha afilhada, Carolina Afonso, por estar sempre comigo e demonstrar que há coisas que não se explicam.

À minha família algarvia por todas as gargalhadas, lágrimas e histórias partilhadas. Em especial à Inês Candeias e Margarida Moniz, por estarem sempre comigo desde o primeiro dia. Ao Pedro Guiomar, por ser o melhor irmão que poderia ter. À Clara Guerreiro, Carlota Letras, Filipa Neves, João Pereira, Margarida Silvestre, Telma Lourenço e Anna Struk pela amizade que nos une.

Aos meus amigos de sempre, João, Catarina, Patrícia e Rita, por mesmo depois de 5 anos de ausência continuarem ao meu lado.

Aos meus pais e em particular à minha irmã, por ser o meu pilar em todos os momentos da minha vida.

Um grande obrigada a todos os que fizeram parte do meu percurso académico e tornaram esta viagem incrível. Obrigada Faro por me teres acolhido tão bem.

## Resumo

O melanoma é uma doença mundial com incidência e mortalidade crescente, representando a forma mais agressiva de cancro da pele, e sendo responsável por 80% das mortes atribuídas a todas as neoplasias cutâneas. A resistência adquirida pelos doentes ao longo do tratamento constitui uma barreira ao sucesso da terapêutica, suscitando assim a necessidade de identificação de novos fármacos e novas opções terapêuticas. Além da potencial utilização da Metformina como fármaco anticancerígeno, surgem cada vez mais evidências de que as Tiazolidinedionas (TZDs), classe de fármacos antidiabéticos ligandos do recetor PPAR $\gamma$ , Recetor ativado de Proliferadores do Peroxisoma gama, podem ser igualmente eficazes para o tratamento do melanoma.

Esta monografia apresenta uma revisão sistemática acerca da potencial utilização das TZDs nesta patologia, o seu mecanismo de ação e vias envolvidas, e os resultados terapêuticos observados, visando identificar novas perspetivas de tratamento. Para o seu desenvolvimento, após formulação da questão de investigação, foi elaborado o protocolo de investigação com a definição dos termos de pesquisa (*melanoma AND thiazolidinediones; rosiglitazone; pioglitazone; troglitazone; ciglitazone*) e bases de dados (PubMed, Cochrane Library, *Web of Science*, *B-on*, *ClinicalTrials.gov*, *RCAAP*, e Open Grey) a utilizar. Após a pesquisa da literatura e seleção dos estudos através da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a recolha e síntese dos dados, e interpretação dos resultados, incidiu sobre 24 estudos publicados entre 2002 e 2018.

Os resultados obtidos indicam que numa ampla variedade de células de melanoma, tanto de humanos como de ratinhos, as TZDs parecem diminuir a proliferação celular, induzir a apoptose, bem como a paragem do ciclo celular. Além disso, a regulação dos níveis de MITF (Fator de transcrição associado a microftalmia) pelas TZDs, fator importante que regula a transcrição dos genes envolvidos na síntese de melanina, parece estar implicada nos potenciais efeitos anticancerígenos. Deste modo, os resultados obtidos nesta revisão sistemática permitem sustentar a possibilidade da aplicação terapêutica das TZDs no melanoma.

**Palavras-chave:** melanoma; Tiazolidinedionas; proliferação celular; apoptose; paragem do ciclo celular

## Abstract

Melanoma is a worldwide disease with increasing incidence and mortality, representing the most aggressive form of skin cancer, and accounting for 80% of deaths attributed to all skin cancers. Resistance acquired by patients throughout treatment is a barrier to successful therapy, thus raising the need for identification of new drugs and new therapeutic options. In addition to the potential use of metformin as an anticancer drug, there is increasing evidence that Thiazolidinediones (TZDs), a class of PPAR $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma), receptor ligand antidiabetic drugs, may be equally effective for treating melanoma.

This monograph presents a systematic review about the potential use of TZDs in this pathology, their mechanism of action and pathways involved, and the therapeutic results observed, aiming to identify new treatment perspectives. For its development, after formulating the research question, the research protocol was elaborated with the definition of the search terms (*melanoma AND thiazolidinediones; rosiglitazone; pioglitazone; troglitazone; ciglitazone*) and databases (PubMed, Cochrane Library, *Web of Science*, *B-on*, *ClinicalTrials.gov*, *RCAAP*, and Open Grey) to be used. After searching the literature and selecting studies by applying the inclusion and exclusion criteria, data collection and synthesis, and interpretation of results, focused on 24 studies published between 2002 and 2018.

The results obtained indicate that in a wide variety of human and mouse melanoma cells, TZDs appear to decrease cell proliferation, induce apoptosis as well as cell cycle arrest. In addition, the regulation of MITF (microphthalmia-associated transcription factor) levels by TZDs, an important factor regulating the transcription of genes involved in melanin synthesis, appears to be implicated in potential anticancer effects. Thus, the results obtained in this systematic review support the possibility of therapeutic application of TZDs in melanoma.

**Keywords:** melanoma; Thiazolidinediones; cell proliferation; apoptosis; cell cycle arrest

## Índice

Índice de Figuras.....	IX
Índice de Tabelas .....	X
Lista de abreviaturas .....	XII
1. Introdução.....	1
1.1 Melanoma.....	1
1.2 Terapêutica atual no melanoma.....	4
1.2.1 Quimioterapia.....	6
1.2.2 Terapêutica dirigida a pequenas moléculas.....	7
1.2.2.1 Inibidores BRAF.....	8
1.2.2.2 Inibidores MEK.....	8
1.2.2.3 Resistência à terapêutica .....	9
1.2.2.4 Combinação terapêutica de inibidores BRAF e MEK .....	10
1.2.3 Imunoterapia .....	11
1.2.3.1 Inibidores do Antígeno de linfócito T-citotóxico-4 (CTLA-4) .....	11
1.2.3.2 Inibidores de PD-1 .....	11
1.2.4 Administração de citocinas .....	12
1.2.4.1 Interleucina 2 (IL-2) .....	12
1.2.4.2 Interferão-alfa (IFN- $\alpha$ ) .....	12
1.2.5 Terapia viral oncolítica .....	13
1.2.5.1 Talimogene laherparepvec (T-VEC) .....	13
1.3 Antidiabéticos orais no tratamento do melanoma.....	14
1.3.1 Mecanismo de ação da Metformina .....	14
1.4 Mecanismo de ação das Tiazolidinedionas .....	17
1.5 Tiazolidinedionas no melanoma .....	19

2.	Objetivos.....	21
3.	Métodos .....	21
3.1	Formulação da questão de investigação .....	21
3.2	Elaboração do protocolo de investigação .....	22
3.2.1	Definição dos termos de pesquisa e bases de dados .....	22
3.2.2	CrITÉrios de inclusão e exclusão.....	23
3.2.3	Pesquisa da literatura.....	23
3.2.4	Seleo dos Estudos .....	23
3.2.5	Extrao e sÍntese dos dados.....	24
4.	Resultados .....	25
4.1	Seleo dos estudos .....	25
4.1.1	Artigos irrelevantes .....	26
4.1.2	Artigos de revisão .....	30
4.1.3	CaracterÍsticas dos estudos incluÍdos.....	31
4.1.4	Distribuio temporal das publicaoes .....	34
4.2	Tipo de amostra utilizada.....	35
4.2.1	Células e linhas celulares humanas .....	35
4.2.2	Células e linhas celulares de ratinho .....	37
4.2.3	Culturas celulares em modelos de ratinho .....	37
4.2.4	Estudos de Coorte .....	37
4.2.5	Linhas celulares mais utilizadas .....	38
4.3	Expressão de PPAR $\gamma$ .....	40
4.4	Rosiglitazona no melanoma.....	41
4.4.1	Ao anticancerÍgena: Efeitos antiproliferativos .....	41
4.4.2	Ao anticancerÍgena: Induo da apoptose .....	42
4.4.3	Ao anticancerÍgena: Paragem do Ciclo celular .....	42

4.5 Troglitazona no melanoma .....	43
4.5.1 Ação anticancerígena: Efeitos antiproliferativos .....	43
4.5.2 Ação anticancerígena: Indução da apoptose .....	44
4.5.3 Ação anticancerígena: Paragem do ciclo celular .....	44
4.6 Ciglitazona no melanoma.....	44
4.6.1 Ação anticancerígena: Efeitos antiproliferativos .....	44
4.6.2 Ação anticancerígena: Indução da apoptose .....	46
4.6.3 Ação anticancerígena: Paragem do ciclo celular .....	47
4.7 Pioglitazona no melanoma.....	48
4.7.1 Ação anticancerígena: Efeitos antiproliferativos .....	48
4.7.2 Ação anticancerígena: Indução da apoptose .....	48
4.8 Ativação e/ou expressão de proteínas .....	48
4.9 Indução da Pigmentação.....	51
4.10 Combinação terapêutica com outros fármacos .....	51
4.10.1 Ação na proliferação .....	51
4.10.2 Ação na paragem do ciclo celular .....	54
4.11 Estudo <i>in vivo</i> .....	55
4.12 Avaliação da resposta a novas terapêuticas .....	55
4.13 Risco de desenvolvimento de cancro associado à utilização de TZDs.....	56
5. Discussão .....	58
5.1 Ação antiproliferativa das TZDs .....	58
5.2 Ação apoptótica das TZDs .....	60
5.3 Ação das TZDs no ciclo celular .....	60
5.4 Ação das TZDs na ativação e/ou expressão de proteínas .....	61
5.4.1 Expressão de MITF e atividade da Tirosinase .....	61
5.4.2 Expressão de p53 e Bcl-2.....	62

5.4.3 Expressão de Klotho .....	63
5.4.5 TZDs como indutoras da pigmentação .....	63
5.6 Expressão de PPAR $\gamma$ .....	64
5.7 Combinações terapêuticas.....	64
6. Conclusão .....	67
7. Bibliografia.....	68

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> - Melanoma extensivo superficial.	2
<b>Figura 1.2</b> - Melanoma nodular.	2
<b>Figura 1.3</b> - Melanoma lentigo maligno.	3
<b>Figura 1.4</b> - Melanoma acral lentiginoso.	3
<b>Figura 1.5</b> - Ilustração esquemática dos mecanismos de ação dos fármacos utilizados na terapêutica do melanoma.	5
<b>Figura 1.6</b> - Representação esquemática da via de sinalização MAPK.	7
<b>Figura 1.7</b> - Mecanismos de ação direta e indireta da metformina nas células cancerígenas.	16
<b>Figura 1.8</b> - Representação esquemática do mecanismo de ação das TZDs nos adipócitos.	18
<b>Figura 1.9</b> - Efeito das TZDs na apoptose, migração, invasão, proliferação celular e inflamação.	20
<b>Figura 3.1</b> - Resumo do processo da metodologia.	24
<b>Figura 4.1</b> - Diagrama do processo de seleção das publicações.	26
<b>Figura 4.2</b> - Distribuição temporal das publicações incluídas e de revisão.	35
<b>Figura 4.3</b> - Frequência de utilização das linhas celulares analisadas.	39

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> - Terapêuticas sistêmicas para o melanoma em estado avançado.	5
<b>Tabela 1.2</b> - Ação das TZDs no tecido adiposo, músculo-esquelético e fígado.	18
<b>Tabela 3.1</b> - Estruturação da questão de investigação através da aplicação da metodologia PICO.	21
<b>Tabela 3.2</b> - Bases de dados utilizadas na seleção dos estudos.	22
<b>Tabela 4.1</b> - Estudos encontrados nas bases de dados selecionadas.	25
<b>Tabela 4.2</b> - Número de estudos sobrepostos em cada base de dados.	25
<b>Tabela 4.3</b> - Características e justificações dos artigos irrelevantes à temática.	27
<b>Tabela 4.4</b> - Características dos estudos de revisão excluídos da revisão sistemática.	31
<b>Tabela 4.5</b> - Características dos estudos selecionados.	32
<b>Tabela 4.6</b> - Células e linhas celulares humanas usadas nos estudos analisados.	36
<b>Tabela 4.7</b> - Células e linhas celulares de ratinho usadas nos estudos analisados.	37
<b>Tabela 4.8</b> – Culturas celulares usados nos estudos analisados.	37
<b>Tabela 4.9</b> - Estudos de coorte analisados na revisão sistemática.	38
<b>Tabela 4.10</b> - Linhas celulares utilizadas e respetiva publicação.	38
<b>Tabela 4.11</b> - Resultados relativos à análise da expressão de PPAR $\gamma$ nas células do melanoma.	40
<b>Tabela 4.12</b> – Resultados da ação da Rosiglitazona na proliferação.	41
<b>Tabela 4.13</b> - Resultados da ação da Rosiglitazona na indução da apoptose.	42
<b>Tabela 4.14</b> - Resultados da ação da Rosiglitazona na paragem do ciclo celular.	43
<b>Tabela 4.15</b> - Resultados da ação da Troglitazona na proliferação.	43
<b>Tabela 4.16</b> - Resultados da ação da Troglitazona na indução da apoptose.	44
<b>Tabela 4.17</b> - Resultados da ação da Troglitazona na paragem do ciclo celular.	44
<b>Tabela 4.18</b> - Resultados da ação da Ciglitazona na proliferação.	46
<b>Tabela 4.19</b> - Resultados da ação da Ciglitazona na indução da apoptose.	47
<b>Tabela 4.20</b> - Resultados da ação da Ciglitazona na paragem do ciclo celular.	47
<b>Tabela 4.21</b> - Resultados da ação da Pioglitazona na proliferação celular.	48
<b>Tabela 4.22</b> - Resultados da ação da Pioglitazona na indução da apoptose.	48

<b>Tabela 4.23</b> - Resultados da ação das TZDs na expressão de proteínas e enzimas.	50
<b>Tabela 4.24</b> - Resultados da ação das TZDs na indução da pigmentação.	51
<b>Tabela 4.25</b> - Resultados da combinação terapêutica Bortezomib + Rosiglitazona na proliferação celular.	52
<b>Tabela 4.26</b> - Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + ML-I na proliferação celular.	52
<b>Tabela 4.27</b> - Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + LGD1069 na proliferação celular.	53
<b>Tabela 4.28</b> - Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + PLX4720 na proliferação celular em ratinho idoso.	53
<b>Tabela 4.29</b> - Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + PLX4720 na proliferação celular em rato jovem.	53
<b>Tabela 4.30</b> - Resultados da combinação terapêutica Ciglitazona + Isotretinoína (retinóide) na proliferação celular.	54
<b>Tabela 4.31</b> - Resultados da combinação terapêutica Ciglitazona + IIF na proliferação celular.	54
<b>Tabela 4.32</b> - Resultados da combinação Ciglitazona + Isotretinoína na paragem do ciclo celular.	55
<b>Tabela 4.33</b> - Resultados de estudos de avaliação de resposta à terapêutica combinada com TZDs.	56
<b>Tabela 4.34</b> - Resultados de estudos de avaliação do risco de desenvolvimento de cancro associado a Antidiabéticos orais.	56

## Lista de abreviaturas

ADO	Antidiabéticos orais
Ag	Antigénio
ATP	Adenosina trifosfato (do inglês <i>Adenosine triphosphate</i> )
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP (do inglês <i>AMP-activated protein kinase</i> )
Bcl-2	Proteína antiapoptótica
BHE	Barreira hematoencefálica
BRAF	Gene que codifica a proteína B-RAF
CTLA-4	Antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês <i>Cytotoxic- T Lymphocyte Antigen 4</i> )
DTIC	Dacarbazina
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
DMSO	Sulfóxido de dimetilo (do inglês <i>Dimethyl sulfoxide</i> )
EF2	Fator de alongação 2 (do inglês <i>Elongation factor 2</i> )
EMA	Agência Europeia do Medicamento (do inglês <i>European Medicines Agency</i> )
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular (do inglês <i>Extracellular signal-regulated kinase</i> )
FATP	Proteína transportadora de ácidos gordos (do inglês <i>Fatty acid transport protein</i> )
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GLUT4	Transportador de glucose 4
iBRAF	Inibidores de BRAF
iMEK	Inibidores de MEK
IFN	Interferão-alfa (IFN- $\alpha$ )

<b>IIF</b>	6-OH-11-O-hidroxiifenantreno
<b>IL</b>	Interleucina
<b>GTPase</b>	Guanosina trifosfatase (do inglês <i>Guanosine triphosphatase</i> )
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipase
<b>MAPK</b>	Proteína cinase ativada por mitógeno (do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i> )
<b>MEK</b>	Proteína envolvida na via de sinalização MAPK
<b>MITF</b>	Fator de transcrição associado a microftalmia (do Inglês <i>Microphthalmia-associated transcription factor</i> )
<b>ML1</b>	Do inglês <i>Mistletoe Lectin-I</i>
<b>mTORC1</b>	Complexo 1 da rapamicina (do inglês <i>Mechanistic target of rapamycin complex 1</i> )
<b>p21</b>	Proteína reguladora do ciclo celular
<b>p53</b>	Gene supressor de tumor
<b>PD-1</b>	Recetor de morte programada 1 (do inglês <i>Programmed cell death-1</i> )
<b>PD-L1</b>	Recetor de ligando PD-1 (do inglês <i>Programmed death-ligand 1</i> )
<b>PFS</b>	Sobrevivência livre de progressão (do inglês <i>Progression-free survival</i> )
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i> )
<b>PPAR</b>	Recetor ativado de proliferadores do eroxisoma (do Inglês <i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> )
<b>PPRE</b>	Elemento de resposta do proliferador do peroxissoma (do inglês <i>PPAR-response element</i> )
<b>RAG</b>	Gene ativador da recombinação (do inglês <i>Recombination-activating gene</i> )
<b>Ragulator</b>	Regulador da sinalização celular

<b>RAPTOR</b>	Proteína reguladora associada a mTOR (do inglês <i>Regulatory-associated protein of mTOR</i> )
<b>TSC1/TSC2</b>	Proteínas 1 e 2 de Esclerose Tuberosa
<b>T-VEC</b>	Vírus de herpes modificado (do inglês <i>Modified herpes virus</i> )
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
<b>VHS-1</b>	Vírus herpes simplex do tipo 1 (do inglês <i>Herpes vírus simplex 1</i> )

# 1. Introdução

## 1.1 Melanoma

O melanoma é uma doença mundial que representa a forma mais agressiva de cancro da pele e é responsável por 80% das mortes atribuídas a todas as neoplasias cutâneas. A sua incidência e mortalidade estão em contínuo aumento, sendo que em 2018, foram diagnosticados 287723 novos casos de melanoma em todo o Mundo (1).

Esta neoplasia resulta da transformação maligna dos melanócitos, células responsáveis pela síntese de melanina, pigmento que confere a cor natural da pele, olhos e cabelo (2-3).

O seu surgimento ocorre frequentemente na pele, obtendo a designação de melanoma cutâneo (10). No entanto, mais raramente, pode ocorrer transformação maligna dos melanócitos não cutâneos que revestem a camada coróide do olho, a cavidade oral e nasal, o trato geniturinário ou gastrointestinal, o sistema respiratório ou as meninges envolventes do sistema nervoso central (4,11–13).

Apesar de ser uma das neoplasias mais associadas a alterações genéticas, existem variados fatores de risco predisponentes. A história familiar ou pessoal de melanoma, a idade, a pigmentação da pele, a existência de múltiplos nevos melanocíticos benignos ou atípicos, a exposição à radiação UV, a sensibilidade ao sol e a imunossupressão constituem os principais fatores de risco ao seu desenvolvimento (4, 14–17).

Esta neoplasia é mais frequente em homens do que em mulheres e a sua incidência aumenta com a idade, facto que permite considerar o envelhecimento populacional como um dos principais fatores de risco na atualidade (18).

O desenvolvimento do melanoma ocorre em 5 estadios: o estadio 0 em que não há interação do melanoma com a corrente sanguínea estando restrito à epiderme; o estadio I ou fase de crescimento radial, onde ocorre proliferação das células tumorais na epiderme; o estadio II ou fase de crescimento vertical, que envolve a invasão da derme; o estadio III, que corresponde à fase de metastização para os nódulos linfáticos e o estadio IV onde ocorre disseminação das metástases para locais distantes (2).

Esta progressão para melanoma metastático ocorre em cerca de 20% a 25% dos casos e é responsável por mais de 80% da mortalidade associada ao cancro da pele (3). A

disseminação pode ocorrer para os nódulos linfáticos ou para os órgãos viscerais, sendo incurável neste último caso e apresentando uma média de sobrevivência de aproximadamente 6 a 12 meses (14,15).

De acordo com as suas características histopatológicas, esta doença cutânea é dividida em diferentes subtipos: melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma acral lentiginoso e melanoma lentigo maligno. Existem ainda outras variantes menos comuns como melanoma desmoplásico e melanoma nevíde (5).

### Melanoma extensivo superficial

Representa o tipo mais comum de melanoma cutâneo, abrangendo cerca de 70% dos melanomas. Pode ocorrer em qualquer local do corpo, sendo mais comum nas extremidades inferiores na mulher e no tronco nos homens, tendo o seu pico de incidência entre os 40 e os 60 anos. O seu desenvolvimento surge do crescimento de nevos pré-existentes e é caracterizado por múltiplos pontos castanhos, assimétricos e de contorno irregular (Figura 1.1) (16,17).



**Figura 1.1** - Melanoma extensivo superficial. (16)

### Melanoma nodular

Representa o segundo tipo mais comum de melanoma cutâneo (21,4%) e é caracterizado pelo seu rápido crescimento. Tem o seu pico de incidência na idade adulta e ocorre frequentemente no tronco, cabeça e pescoço. Geralmente não está associado à pré-existência de nevos e é caracterizado por glóbulos individuais de cor variada e contorno irregular (Figura 1.2) (17,18).



**Figura 1.2** – Melanoma nodular. (16)

### Melanoma lentigo maligno

Ocorre frequentemente em idosos e está associado à exposição solar intermitente. Verifica-se principalmente na face e no pescoço e em qualquer outra zona danificada pela exposição solar. É caracterizado por folículos individuais assimétricos e hiperpigmentados (Figura 1.3) (16,17,19).



**Figura 1.3** - Melanoma lentigo maligno. (16)

### Melanoma acral lentiginoso

Representa o tipo menos comum de melanoma cutâneo (4%) e surge nas palmas das mãos, pés e sobre a placa ungueal. Tem o seu pico de incidência por volta dos 60 anos e é caracterizado por folículos cinzentos irregulares (Figura 1.4) (17,18).



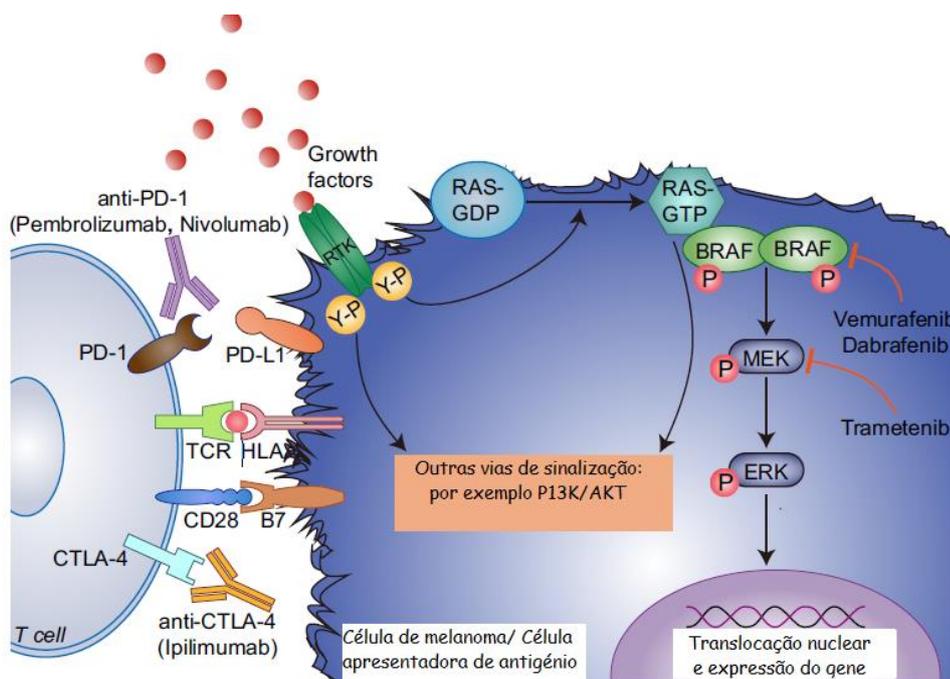
**Figura 1.4** – Melanoma acral lentiginoso. (16)

## 1.2 Terapêutica atual no melanoma

O objetivo do tratamento inclui o controlo local da doença e prevenção, quando possível, da sua disseminação, sendo o diagnóstico precoce e a cirurgia primária fatores determinantes (20). Atualmente, apenas o diagnóstico nos estadios iniciais da doença (I-III) permite a sua resseção cirúrgica e elevada probabilidade de cura. Após a progressão do melanoma ao estado metastático, este apresenta um prognóstico mais reservado, sendo necessário considerar terapêuticas sistémicas quando existem metástases inoperáveis, metástases distantes ou numerosas lesões não passíveis de cirurgia (20) (21).

Até 2011, as opções de tratamento para o melanoma em estado avançado incluíam a quimioterapia com Dacarbazina e a imunoterapia com a Interleucina-2 e Interferão-alfa (IFN-  $\alpha$ ), sendo a sobrevivência dos doentes de apenas 9 meses (22).

Após alguns avanços na investigação da genómica do cancro, a terapêutica clínica para o melanoma em estado avançado melhorou significativamente com o desenvolvimento de inibidores de BRAF (Gene que codifica a proteína B-RAF), como o Vemurafenib, Dabrafenib e Encorafenib, usados em monoterapia ou em combinação com inibidores de MEK (Proteína envolvida na via de sinalização MAPK), como o Trametinib, Cobimetinib e Binimetinib, anticorpos dirigidos a linfócitos T citotóxicos (anti-CTLA-4), como o Ipilimumab, anticorpos bloqueadores da proteína de morte celular 1 (anti-PD-1), como o Nivolumab e Pembrolizumab, e um vírus herpes oncolítico modificado (T-VEC) (22,23). Os mecanismos de ação dos distintos fármacos encontram-se esquematizados na Figura 1.5 e detalhados nas secções seguintes.



**Figura 1.5** - Ilustração esquemática dos mecanismos de ação dos fármacos utilizados na terapêutica do melanoma. (CTLA-4 – antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico; PD-1 – receptor de morte programada 1; PD-L1 – Ligando de PD-1; RAS, BRAF, MEK e ERK são constituintes da via de sinalização MAPK). Adaptado de (24).

Na Tabela 1.1 encontram-se representadas as terapêuticas sistêmicas atuais aprovadas pela FDA e EMA para o tratamento do melanoma em estado avançado.

**Tabela 1.1** - Terapêuticas sistêmicas para o melanoma em estado avançado. (CTLA-4 – antígeno associado a linfócitos T citotóxicos; PD-1 – proteína de morte celular 1) Adaptado de (23).

<b>Quimioterapia</b>	Citotóxicos	Dacarbazina (DTIC) Temozolamida Carboplatina/cisplatina Vincristina/vinblastina Carmustina/Fotemustina Paclitaxel/Docetaxel
<b>Terapia dirigida a pequenas moléculas</b>	Inibidores BRAF (iBRAF)	Vemurafenib Dabrafenib Encorafenib
	Inibidores MEK (iMEK)	Trametinib Cobimetinib Binimetinib
	iBRAF + iMEK	Dabrafenib + Trametinib Vemurafenib + Cobimetinib Encorafenib + Binimetinib
<b>Imunoterapia</b>	Inibidores CTLA-4	Ipilimumab
	Inibidores PD-1	Nivolumab Pembrolizumab
	Imunoterapia combinada	Nivolumab + Ipilimumab
<b>Outras terapêuticas</b>	Administração de citocinas	Interleucina-2 Interferão alfa
	Terapia viral oncolítica	Talimogene laherparepvec (T-VEC)

### 1.2.1 Quimioterapia

Antes do desenvolvimento da terapêutica dirigida e imunoterapia, a quimioterapia foi a base do tratamento do melanoma metastático. Atualmente, pode ser considerada como terapêutica de segunda e terceira linha em doentes com resistência à imunoterapia e terapia dirigida (21).

Os agentes citotóxicos utilizados incluem a Dacarbazina (DTIC), Temozolamida, Carboplatina, Cisplatina, Vincristina, Vinblastina, Carmustina, Fotemustina, Paclitaxel e Docetaxel (21).

A Dacarbazina (DTIC) foi o primeiro fármaco aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em 1975, e EMA (Agência Europeia do Medicamento) em 2002 para o tratamento desta patologia, sendo ainda atualmente, considerado o fármaco de referência (25,26). Este é um agente alquilante que necessita de ativação metabólica, sendo incapaz de passar a barreira Hematoencefálica (BHE) e por isso ineficaz nas metástases cerebrais (27). No entanto, embora as suas taxas de resposta não sejam muito elevadas, não excedendo os 12%, continua a ser único citotóxico aprovado para o tratamento de doentes com melanoma maligno metastático (21).

Vários estudos foram já realizados envolvendo a combinação de agentes, com o objetivo de tentar aumentar a eficácia da Dacarbazina, incluindo quimioterapia e imunoterapia (IFN e IL-2), mas não revelando resultados satisfatórios (28).

A Temozolomida, um análogo da Dacarbazina, é igualmente um agente alquilante mas apesar de atravessar a BHE não demonstra melhores taxas de resposta e sobrevivência da doença relativamente à DTIC (25).

Outros agentes citotóxicos como os alcalóides da vinca (Vincristina e Vinblastina), taxanos (Paclitaxel e Docetaxel), nitrosoureas (Carmustina, Lomustina e Fotemustina) e análogos de platina (Cisplatina e Carboplatina) não apresentaram melhores resultados para o tratamento do melanoma em estadio IV, quando comparados à monoterapia com Dacarbazina (25,29,30). Um dos problemas associados aos agentes anticancerígenos prende-se com o facto de estes atuarem tanto nas células malignas como nas células sãs, traduzindo-se numa toxicidade elevada para o doente (25).

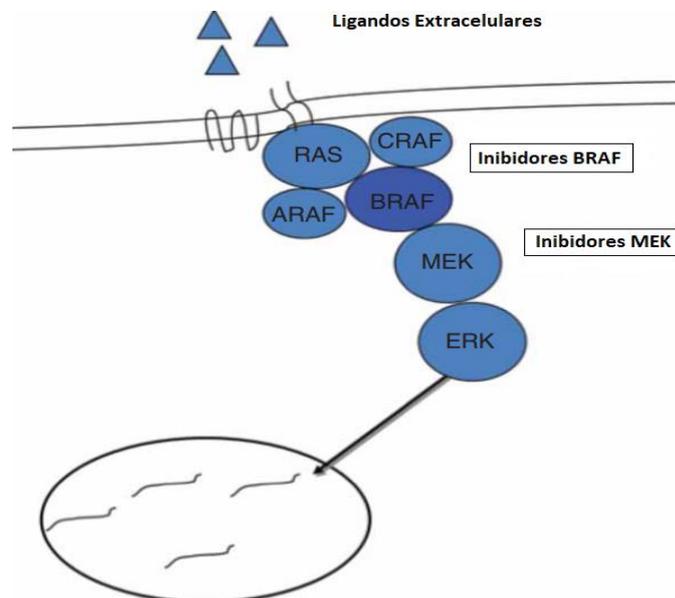
## 1.2.2 Terapêutica dirigida a pequenas moléculas

Um dos principais objetivos das investigações na terapêutica do melanoma é identificar alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (31).

A via de sinalização MAPK (Proteína cinase ativada por mitógeno), esquematizada na Figura 1.6, constitui um importante regulador do crescimento e proliferação celular, sendo a existência de mutações nesta via a base da gênese da maioria dos melanomas. Deste modo, fármacos direcionados à inibição desta via constituem importantes estratégias terapêuticas (32,33).

### Mecanismo de ação:

Ligandos extracelulares ligam-se a receptores específicos associados à membrana. O recrutamento e ativação de GTPase RAS (Guanosina trifosfatase) resulta numa cascata de eventos de fosforilação envolvendo as serina-treonina-quinases RAF que leva à ativação do seu substrato ERK (Cinase regulada por sinal extracelular). Esta ativação constitutiva garante a proliferação das células cancerígenas e fuga da apoptose (32,33).



**Figura 1.6** - Representação esquemática da via de sinalização MAPK (ERK – Cinase regulada por sinalização extracelular; GTPase – Guanosina trifosfatase; RAS, BRAF, MEK e ERK são constituintes da via de sinalização MAPK. Adaptado de (34).

### 1.2.2.1 Inibidores BRAF (iBRAF)

A terapêutica direcionada à proteína BRAF surgiu com a descoberta de que aproximadamente 50% dos melanomas expressam mutações nesta proteína, um componente da via de sinalização MAPK (Figura 1.6), resultando na sua ativação constitutiva e conseqüente proliferação desregulada, contribuindo para o crescimento do tumor. A mutação mais comum é a BRAFV600E, que consiste numa substituição de valina por ácido glutâmico no codão 600 e é responsável por aproximadamente 90% das mutações BRAF (15,35,36).

Outras mutações nesta proteína consistem em substituições de aminoácidos na mesma posição, como BRAFV600K (valina pela lisina), BRAFV600D (valina por ácido aspártico) ou BRAFV600R (valina por arginina) e resultam igualmente na ativação constitutiva da via MAPK e conseqüente proliferação desregulada (37).

O Vemurafenib surge como o primeiro inibidor BRAF aprovado pela FDA (2011) e EMA (2012), seguido do Dabrafenib [FDA e EMA (2013)] e mais recentemente o Encorafenib em combinação com Binimetinib (inibidor de MEK) para o melanoma metastático [FDA e EMA (2018)] (38–40).

No entanto, verificou-se nalguns casos que após semanas de tratamento os doentes desenvolvem resistência à terapêutica com estes inibidores, possibilitando a recaída e o crescimento metastático. Deste modo, foi proposta a combinação terapêutica com inibidores MEK (41,42) .

### 1.2.2.2 Inibidores MEK (iMEK)

Com a descoberta da importância da via celular MAPK para o crescimento, diferenciação, migração e apoptose das células e, sendo BRAF e MEK, proteínas consecutivas nesta via (Figura 1.6), o desenvolvimento de inibidores MEK tornou-se uma prioridade (34). O Trametinib foi o primeiro a ser aprovado [FDA (2013) e EMA (2014)] para o melanoma metastático com a mutação BRAFV600E ou BRAFV600K, em monoterapia ou combinação com Dabrafenib (15,37,38).

O Cobimetinib [EMA (2015)] e Binimetinib [EMA (2018)] foram aprovados para o melanoma avançado em combinação com Vemurafenib e Encorafenib (inibidores de BRAF), respetivamente (43,44).

### 1.2.2.3 Resistência à terapêutica

Embora o desenvolvimento de inibidores BRAF tenha sido um importante avanço no tratamento do melanoma, o desenvolvimento de resistências continua a ser uma limitação à sua utilização na terapêutica (29,45).

A resistência ao tratamento pode ser intrínseca, em que os doentes não respondem à terapia desde o início, ou adquirida, em que os doentes respondem inicialmente à terapêutica mas durante o tratamento observam regressão nos resultados. Embora a resistência intrínseca aos inibidores de BRAF seja rara e ocorra em menos de 10% dos pacientes com melanoma BRAFV600E, a resistência adquirida é quase universal, sendo que embora a maioria dos doentes alcance alguma redução no tamanho do tumor, aproximadamente 90% demonstram a regressão da doença nos 12 meses após o início do tratamento (46)(47).

Assim, embora quase todos os doentes tenham alguma regressão inicial do tumor com o tratamento de inibidores BRAF e uma rápida melhoria nos sintomas, grande parte desenvolve resistência durante o primeiro ano da terapêutica, sendo o controlo da doença raro além dos 2 anos (46).

A resistência aos inibidores de MEK é igualmente documentada em ensaios clínicos, sendo que aproximadamente 70% dos doentes com melanoma metastático com mutação BRAF tiveram progressão da doença dentro de um ano após o início da monoterapia com Trametinibe (46).

O facto de mais de 80% dos doentes que apresentam falha na terapêutica com os inibidores BRAF não responderem igualmente aos inibidores MEK, sugere a hipótese de mecanismos de resistência cruzada ou o rápido surgimento de mecanismos de resistência adicionais provenientes de mudanças bruscas entre estas classes de fármacos (48).

Estudos têm vindo a ser realizados para explicar quais os mecanismos responsáveis por esta resistência, observando-se que a reativação da via MAPK ocorre entre 70%-80% dos melanomas que regrediram no tratamento (47)(49).

Algumas variantes genéticas no gene BRAF mutado, verificadas entre 8% e 30% dos casos de resistência, diminuem a afinidade pelos inibidores BRAF, desencadeando consequentemente a ativação de ERK, mesmo na presença de iBRAF ou iMEK (50,51).

Foi também demonstrado que as células cancerígenas podem ativar qualquer uma das 3 isoformas de BRAF, contribuindo para a ativação da via de sinalização MAPK (47,52).

Mutações que ativam MEK1 e MEK2 (Proteínas envolvida na via de sinalização MAPK) de modo independente de BRAF, verificadas em 7% dos melanomas resistentes a iBRAF ou a reativação de PI3K (Fosfatidilinositol 3-cinase), podem igualmente conferir resistência adquirida à terapêutica (47).

#### **1.2.2.4 Combinação terapêutica de inibidores BRAF e MEK**

Dados sugeriram que alguma da resistência associada à inibição do BRAF pode ser atenuada através da conjugação com um inibidor de MEK, atrasando o início da resistência ao tratamento e aumentando a morte celular, garantindo uma maior eficácia terapêutica comparativamente à monoterapia com iBRAF (42,53,54).

Foram aprovadas pela FDA e EMA 3 combinações terapêuticas com iBRAF e iMEK para o melanoma metastático com as mutações BRAFV600E e BRAFV600K: Dabrafenib e Trametinib (aprovada pela FDA 2013 e EMA em 2014); Vemurafenib e Cobimetinib (aprovada pela FDA e EMA em 2015); Encorafenib e Binimetinib (aprovada pela FDA e EMA em 2018) (55,56).

Num estudo realizado em linhas celulares de melanoma, verificou-se que o tratamento prolongado com Vemurafenib (inibidor de BRAF) levou à recuperação da sinalização de ERK e consequente reativação da via MAPK. No entanto, com a adição de um inibidor da MEK houve um decréscimo significativo no crescimento do melanoma e um aumento de PFS (Sobrevivência livre de progressão) (52).

### 1.2.3 Imunoterapia

Além da resistência à terapêutica, as células do melanoma têm a capacidade de escapar à resposta imunitária, sendo necessário investir em terapêuticas que ativem o sistema imunitário para induzir a morte das células cancerígenas (57).

A resposta imunitária é essencial no tratamento de qualquer tipo de cancro, pelo que deficiências no sistema imunitário estão associadas a uma maior incidência da doença (58).

A aplicação de imunoterapia baseia-se na estimulação ou supressão do sistema imunitário de modo a favorecer a eliminação de células cancerígenas e consequente regressão do tamanho do tumor. As abordagens a este tratamento consistem na inibição de CTLA-4 (Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico) e PD-1 (Recetor de morte programada 1) expressas pelos linfócitos (58).

#### 1.2.3.1 Inibidores do Antígeno de linfócito T-citotóxico-4 (CTLA-4)

O antígeno linfócito T-citotóxico-4 (CTLA-4) é uma glicoproteína expressa nas células T que através da ligação ao CD80/86 em células apresentadoras de antígenos, diminui a expressão das células T impedindo o surgimento de uma resposta imunitária (59,60).

O Ipilimumab, aprovado em 2011 pela FDA e EMA, é um anticorpo monoclonal que atua no bloqueio dessa expressão. Através da ligação a CTLA-4, inibe a sua atividade promovendo a ativação e proliferação das células T e consequente eliminação das células cancerígenas (38,58,59,61). Este anticorpo foi aprovado para o tratamento do melanoma metastático em adultos e crianças com idade superior a 12 anos e como terapêutica adjuvante para o melanoma em estadios III (38, 59).

#### 1.2.3.2 Inibidores de PD-1

O recetor de morte programada PD-1 é responsável pela regulação do sistema imunológico e é expresso e ativado nas células T (62). Este, através da sua ligação ao ligando do PD-1 (PD-L1) presente nas células cancerígenas, impede o surgimento de uma

resposta imunitária antitumoral. Deste modo, inibidores de PD-1 vão atuar no bloqueio da interação entre PD-1 e PD-L1, despertando a função citotóxica das células T e causando uma resposta do sistema imunitário (58).

Os anticorpos monoclonais Nivolumab, aprovado pela FDA e EMA em 2015 e o Pembrolizumab, aprovado pela FDA em 2014 e pela EMA em 2015, são exemplos desses inibidores de PD-1 e são utilizados para o tratamento do melanoma metastático (62–65).

A FDA e EMA aprovaram em 2018, a combinação de Nivolumab (anti-PD-1) e Ipilimumab (anti CTLA-4) como terapêutica de primeira linha no melanoma avançado BRAF-negativo (42,63).

## **1.2.4 Administração de citocinas**

### **1.2.4.1 Interleucina 2 (IL-2)**

A Interleucina 2 (IL-2) foi aprovada pela FDA em 1998, e pela EMA em 2002, para o tratamento do melanoma metastático (22). Esta é uma glicoproteína que estimula a proliferação e atividade das células T citotóxicas e T reguladoras, causando assim uma resposta antitumoral (22,40,66).

A sua administração é recomendada como terapêutica de primeira linha no melanoma em estadio IV independente da existência de mutação BRAF e como terapêutica de segunda linha em doentes com a mutação (67).

### **1.2.4.2 Interferão-alfa (IFN- $\alpha$ )**

Interferão-alfa (IFN- $\alpha$ ) é uma proteína antriproliferativa, antiangiogénica e pro-apoptótica. Esta promove uma mudança na célula T Helper, aumentando a citotoxicidade contra as células tumorais (68).

IFN- $\alpha$  atua melhorando a resposta das células dendríticas ao tumor e regulando a apresentação dos antígenos às células T, contribuindo assim para a imunidade antitumoral (69–71). Foi aprovado pela FDA em 1995 e pela EMA em 2000 como terapêutica adjuvante em doentes com melanoma tratados cirurgicamente (42,72,73).

## 1.2.5 Terapia viral oncolítica

### 1.2.5.1 Talimogene laherparepvec (T-VEC)

O vírus de herpes modificado (T-VEC) é um dos agentes mais recentemente aprovado pela FDA e EMA (2015) para o tratamento do melanoma metastático. O Talimogene laherparepvec (T-VEC) é um vírus oncolítico pertencente à classe do vírus herpes simplex do tipo I (VHS-1), injetado diretamente nas metástases cutâneas que conduz ao aumento da apresentação dos antígenos aos macrófagos, destruindo seletivamente as células malignas e exercendo efeitos mínimos nas células normais (72).

Deste modo, o objetivo deste vírus é induzir o reconhecimento das células T do tumor infectado e desencadear uma resposta do sistema imunitário (73,74).

### 1.3 Antidiabéticos orais no tratamento do melanoma

A Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) é uma patologia mundial crescente, afetando milhões de pessoas em todo o mundo (75).

Devido à sua eficácia comprovada, e alto nível de tolerância, a Metformina é o fármaco de 1ª linha no tratamento da DM2, sendo desde a sua aprovação em 1958 pela EMA e 1990 pela FDA o fármaco mais prescrito para esta patologia (38, 76).

Evidências emergentes de estudos retrospectivos a doentes diabéticos e estudos pré-clínicos usando células cancerígenas, demonstraram que os antidiabéticos orais, Metformina e Fenformina (Biguanidas), além da sua ação na redução da produção hepática de glucose também possuem atividade antitumoral (77).

Além disso, estudos retrospectivos realizados em doentes diabéticos tratados com Metformina, demonstraram a redução de incidência de cancro face à terapêutica com outro antidiabético (78).

#### 1.3.1 Mecanismo de ação da Metformina

Estudos *in vivo* demonstraram a eficácia da Metformina na indução de efeitos antitumorais nas células cancerígenas por 2 mecanismos: o efeito direto e o efeito indireto da sua ação (79).

##### Efeito indireto

Em doentes diabéticos, a Metformina inibe a gluconeogénese no fígado e aumenta a captação de glucose nas células do músculo-esquelético, diminuindo assim os níveis de glucose e insulina em circulação. Uma vez que a insulina atua como fator de crescimento nas células cancerígenas, esta diminuição conduz à inibição do crescimento tumoral (80).

##### Efeito direto

Os efeitos diretos da Metformina podem ser obtidos por via dependente ou independente da AMPK (proteína cinase ativada por AMP) (81,82).

Geralmente, a Metformina provoca a inibição do complexo 1 da rapamicina (mTORC1), que é um complexo proteico composto por cinco proteínas frequentemente ativado nas células cancerígenas. mTORC1 é essencial para o crescimento celular uma vez que atua na regulação da síntese proteica (81,82).

A Metformina atua principalmente na mitocôndria, onde inibe o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, interrompendo a produção de ATP (Adenosina Trifosfato) na célula e induzindo a ativação de AMPK (83). Quando ocorre a ativação de AMPK é inibida a expressão de mTOR, através da ativação TSC1 e TSC2 (Proteínas 1 e 2 de Esclerose Tuberosa), que induzem a desregulação da síntese proteica, inibindo assim a proliferação celular das células cancerígenas. AMPK pode ainda inibir RAPTOR (Proteína reguladora associada a mTOR), um regulador positivo de mTOR (84).

AMPK pode também fosforilar diretamente p53 (Gene supressor de tumor), aumentando a expressão de p21 (Proteína reguladora do ciclo celular) e induzindo a paragem do ciclo celular (85). A inibição do fator EF2 (Fator de alongação 2) pela AMPK também contribui para a diminuição da síntese proteica (86).

Além deste mecanismo, a Metformina pode inibir o complexo mTORC1 por efeitos independentes da AMPK (87). Assim, a Metformina pode inibir diretamente o Ragulator (Regulador da sinalização celular), a proteína GTPase (Guanosina trifosfatase) e RAG (Gene ativador de recombinação), levando à inibição de mTORC1 (88).

A inibição de mTORC1 conduz assim à ativação de mecanismos que levam à autofagia e apoptose celular (88).

Na Figura 1.7 encontram-se representados os mecanismos de ação direta e indireta da Metformina nas células cancerígenas (77).

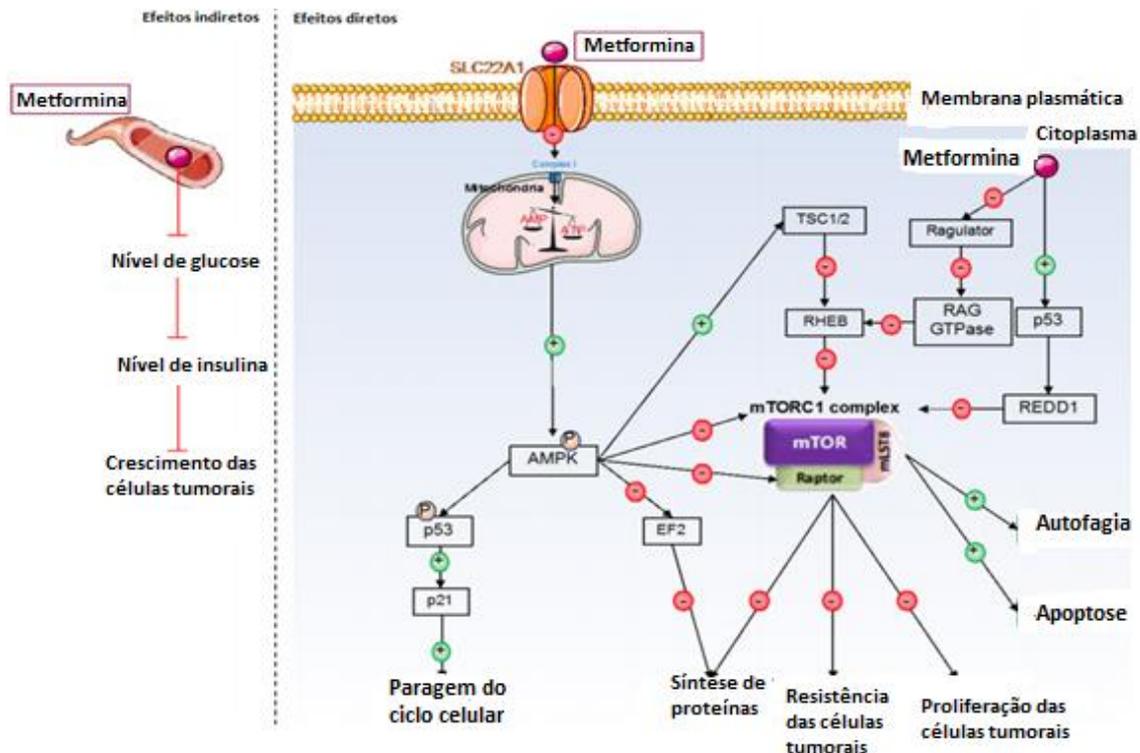


Figura 1.7 - Mecanismos de ação direta e indireta da metformina nas células cancerígenas. (p53: proteína supressora de tumor; p21: proteína reguladora do ciclo celular; EF2: fator de alongação da transcrição; TSC1/2: genes supressores de tumor; RHEB: proteína de ligação GTP; RAG: gene ativador recombinante; GTPase: enzimas que se ligam a GTP; Ragulator: regulador da sinalização lisossômica; REDD1: regulador negativo mTOR). Adaptado de (76).

Estes dados sugerem assim que a Metformina além da sua aplicação terapêutica na DM2 (*Diabetes mellitus* tipo 2), poderá também atuar no melanoma (78,89–91).

## 1.4 Mecanismo de ação das Tiazolidinedionas

As Tiazolidinedionas (TZDs) são uma classe de antidiabéticos orais que melhoram o controle glicêmico em doentes com Diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) (92).

Dentro desta classe encontram-se a Troglitazona, Rosiglitazona, Pioglitazona e Ciglitazona. Atualmente, a única TZD aprovada para o tratamento de DM2 pela FDA e EMA é a Pioglitazona, sendo que as restantes foram revogadas devido aos seus efeitos hepatotóxicos e cardiovasculares (93–96).

As TZDs são agonistas específicos de PPAR $\gamma$ , membro da família dos PPARs (*Peroxisome proliferator-activated receptor*), que são fatores de transcrição, pertencentes à família dos recetores nucleares. Estes apresentam um padrão distinto de distribuição e são expressos em vários tecidos, incluindo as células melanocíticas, tanto nos tumores benignos como malignos, e compreendem três subtipos com funções distintas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e PPAR  $\beta/\delta$  (97–103).

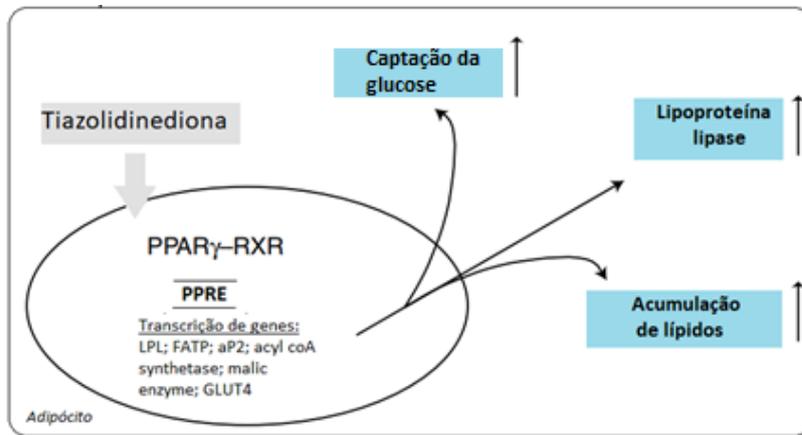
PPAR $\alpha$  é maioritariamente expresso no fígado, coração, músculo-esquelético, rins, e está implicado na regulação dos genes envolvidos na oxidação de ácidos gordos e metabolismo de lipoproteínas. Este atua na regulação da homeostase exercendo uma importante função no desenvolvimento da barreira cutânea. PPAR  $\beta/\delta$  tem expressão ubíqua e é o isótopo mais predominante na pele, atuando na regulação do metabolismo dos ácidos gordos (99). PPAR $\gamma$  existe em duas isoformas (PPAR $\gamma$ 1 e PPAR $\gamma$ 2), sendo PPAR $\gamma$ 1 expresso no fígado, tecido adiposo, queratinócitos e células inflamatórias incluindo macrófagos, linfócitos e células dendríticas; PPAR $\gamma$ 2 é expresso principalmente nos adipócitos provocando a sensibilização à insulina, aumentando o metabolismo da glucose e contribuindo para a diferenciação dos adipócitos (100,102,104).

As TZDs apresentam uma elevada afinidade para o recetor PPAR $\gamma$ , que induz a regulação positiva de genes específicos que diminuem a resistência à insulina, inflamação, angiogénese induzida por VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular) e diferenciação dos adipócitos (105,106).

O efeito antidiabético das TZDs resulta da sensibilização dos tecidos-alvo, como os adipócitos, à ação da insulina (107,108).

Nos adipócitos, quando há a ação de uma Tiazolidinediona, o PPAR $\gamma$  heterodimiza com o recetor retinoide X (RXR), dando-se uma alteração conformacional no

heterodímero, promovendo a ligação do complexo PPAR $\gamma$ -RXR ao elemento de resposta do proliferador do peroxissoma (PPRE). Este consiste em sequências de DNA presentes em regiões reguladoras da expressão de genes que controlam a proliferação, diferenciação, apoptose e angiogénese (109–114). Estes PPREs encontram-se também em genes envolvidos no metabolismo lipídico. Deste modo, as TZDs aumentam a expressão de genes sensíveis à insulina, como os que codificam a lipoproteína lípase (LPL), a proteína transportadora de ácidos gordos (FATP), a proteína de ligação dos ácidos gordos aos adipócitos (aP2), acyl-CoA synthase (ACS), malato desidrogenase (MDH) e o transportador de glucose GLUT4. Como consequência, ocorre o aumento da absorção de lípidos e a lipogénese, contribuindo para a sensibilização à insulina (Figura 1.8) (115).



**Figura 1.8** – Representação esquemática do mecanismo de ação das TZDs nos adipócitos (PPRE: elemento de resposta a PPAR $\gamma$ ; RXR – recetor retinoide X). Adaptado de (116).

Além de provocarem esta redução da resistência à insulina, as TZDs também auxiliam significativamente na redução da produção de glucose hepática e no aumento da utilização periférica da glucose. Estas promovem a absorção de ácidos gordos e o seu armazenamento no tecido adiposo, resultando assim na diminuição da sua acumulação nos tecidos não-adiposos como o fígado, músculo e pâncreas (Tabela 1.2) (117).

**Tabela 1.2** - Ação das TZDs no tecido adiposo, músculo-esquelético e fígado. Adaptado de (118).

Ação das Tiazolidinedionas		
Tecido adiposo	Músculo-esquelético	Fígado
↑ Captação da glucose	↑ Captação da glucose	↓ Gliconeogénese
↑ Captação de ácidos gordos	↑ Glicólise	↓ Glicogenólise
↑ Lipogénese	↑ Oxidação da glucose	↑ Captação da glucose
↑ Oxidação da glucose	↑ Glicogénese	↑ Lipogénese

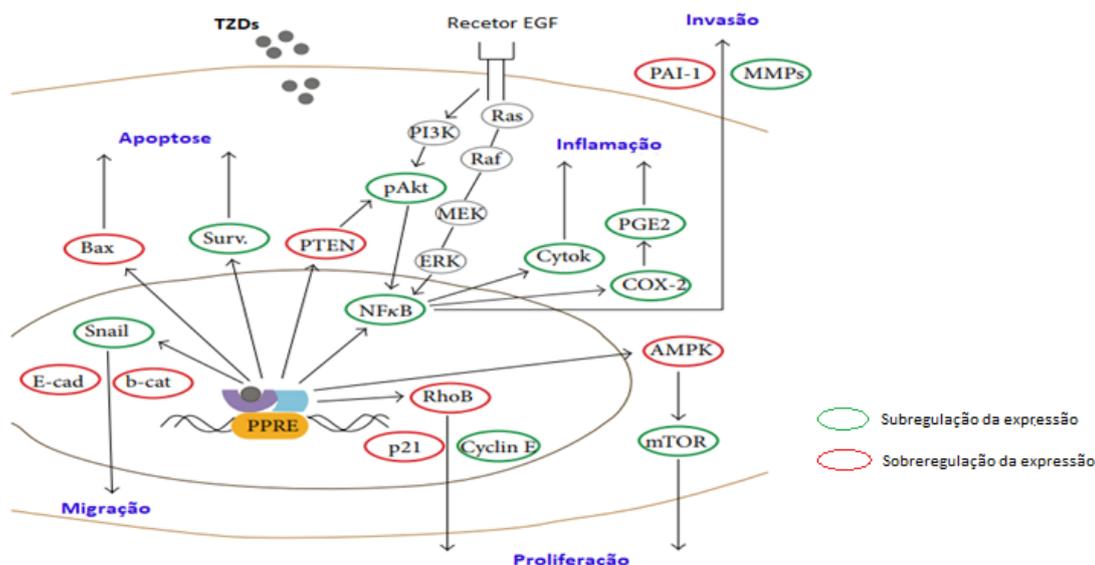
## 1.5 Tiazolidinedionas no melanoma

Estudos demonstraram que a ativação de PPAR $\gamma$  exerce efeitos na regulação da diferenciação, inibição da proliferação celular, e indução da apoptose numa variedade de células cancerígenas (97,119–121). Além disso, os ligandos de PPAR $\gamma$  são potentes inibidores da angiogênese do tumor, o processo que conduz à formação de novos vasos sanguíneos, que constituem um pré-requisito para o crescimento, invasão e metástase do tumor (122–125).

Deste modo, além do tratamento para a Diabetes *mellitus* tipo 2, as TZDs, agonistas dos recetores PPAR $\gamma$ , poderão constituir uma opção terapêutica para o tratamento do melanoma. Esta classe de fármacos tem vindo assim a ser estudada devido ao seu potencial papel como agente anticancerígeno, sendo que já foram demonstrados *in vitro* e *in vivo* promissores efeitos citostáticos contra as células cancerígenas (119,126,127).

Apesar dos mecanismos associados à ação das TZDs no melanoma ainda não estarem bem esclarecidos, visões emergentes sugerem que alguns efeitos antitumorais são total ou parcialmente dependentes de PPAR $\gamma$ , enquanto outros são independentes da sua ativação (128).

A Figura 1.9 ilustra as vias influenciadas pela ativação de PPAR $\gamma$  por TZDs, resultando na regulação negativa da migração, proliferação, inflamação, invasão e na regulação positiva da apoptose (129).



**Figura 1.9** - Efeito das TZDs na apoptose, migração, invasão, proliferação celular e inflamação. Bax e p53 reagem de maneira semelhante, tal como p27 e p21; ciclina E representa ciclina D1, ciclina B1, CDK2 e CDK4. (EGF: recetor do fator de crescimento epitelial; PPRE: elemento responsivo ao PPAR $\gamma$ ; E-cad:  $\beta$ -catenin, Cytok: citocinas). Adaptado de (130).

Quando se dá a ação da TZD sobre a célula é promovida a ligação do complexo PPAR $\gamma$ -RXR ao respetivo elemento de resposta (PPRE), iniciando-se a transcrição de determinados genes. A ativação da transcrição pode resultar na diminuição da proliferação, migração, inflamação e aumento da diferenciação e apoptose. Os efeitos inflamatórios são geralmente mediados pela transrepressão de genes implicados nas vias pro-inflamatórias (129).

As TZDs podem aumentar os níveis de inibidores da cinase dependente das ciclinas, como p21 e p27, interrompendo assim a progressão do ciclo celular (131).

Deste modo, as Tiazolidinedionas, além de melhorarem a sensibilidade das células à insulina e estimularem a diferenciação de adipócitos na DM2, também regulam importantes funções celulares da pele, incluindo a proliferação e diferenciação celular, bem como a resposta inflamatória, através da diminuição da produção de citocinas (92). Estas funções sugerem assim que as TZDs podem constituir possíveis opções terapêuticas numa ampla variedade de doenças de pele, incluindo não só o melanoma cutâneo mas também doenças inflamatórias como a psoríase e a dermatite atópica (92).

## 2. Objetivos

Esta monografia tem como objetivo a elaboração de uma revisão sistemática acerca da potencial utilização de fármacos antidiabéticos orais no tratamento do melanoma, evidenciando a possível aplicação das Tiazolidinedionas nesta patologia, o seu mecanismo de ação, vias envolvidas e resultados terapêuticos observados, visando identificar novas perspectivas de tratamento.

## 3. Métodos

Esta revisão sistemática trata-se de uma investigação científica, constituída por uma síntese de estudos relevantes publicados como resposta a uma questão de investigação. Para que seja possível uma avaliação rigorosa e imparcial da literatura, esta segue uma metodologia específica.

### 3.1 Formulação da questão de investigação

A formulação da questão de investigação é o primeiro passo no desenvolvimento de uma revisão sistemática. Foi utilizada a metodologia PICO de modo a estruturar a questão e definir explicitamente a orientação da revisão (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1-** Estruturação da questão de investigação através da aplicação da metodologia PICO.

<b>P</b>	<b>Population</b>	Linhas celulares de melanoma humano e de ratinho; pacientes.
<b>I</b>	<b>Intervention</b>	Tratamento com antidiabéticos orais (Tiazolidinedionas).
<b>C</b>	<b>Comparasion</b>	Eficácia relativamente à terapêutica atual do melanoma; comparação com os controlos não tratados (células).
<b>O</b>	<b>Outcome</b>	Sucesso no tratamento do melanoma; acção anticancerígena.

A questão principal desta revisão sistemática foi: “Qual a eficácia da aplicação das Tiazolidinedionas na terapêutica do melanoma e quais os mecanismos de ação implicados?”

## 3.2 Elaboração do protocolo de investigação

### 3.2.1 Definição dos termos de pesquisa e bases de dados

Para a seleção dos artigos científicos as fontes de informação utilizadas foram o PubMed/Medline, Cochrane Library, *Web of Science*, B-on (Biblioteca do conhecimento online) e Scielo (Tabela 3.1). Como fonte para os ensaios clínicos recorreu-se à base de dados ClinicalTrials.gov. Foi considerada ainda a *grey literature* obtida a partir da consulta dos repositórios científicos RCAAP (Repositório Científico de Acesso Aberto em Portugal) e Open Grey. A *grey literature* considera relatórios técnicos ou de pesquisa, artigos de conferências, teses e dissertações académicas, ensaios clínicos em progresso e algumas publicações oficiais.

Os termos de pesquisa utilizados foram *melanoma AND thiazolidinediones*; *melanoma AND rosiglitazone*; *melanoma AND pioglitazone*, *melanoma AND troglitazone* e *melanoma AND ciglitazone*.

**Tabela 3.2** - Bases de dados utilizadas na seleção dos estudos.

Bases de dados	Link/Website	Tipo de dados
Web of Science	www.webofknowledge.com	Artigos científicos Artigos de revisão
PubMed/Medline	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed	Artigos de investigação em biomedicina
Cochrane Library	www.cochranelibrary.com	Artigos de investigação em medicina e outras especialidades de saúde
B-on (Biblioteca do conhecimento online)	www.b-on.pt	Artigos científicos Artigos de revisão Portais Catálogos
Scielo	www.scielo.org	Artigos científicos
Clinical trials	ClinicalTrials.gov	Ensaio clínicos
RCAAP (Repositório Científico de Acesso Aberto em Portugal)	www.rcaap.pt	Informação científica não publicada em revistas científicas
Open Grey	www.opengrey.eu	Relatórios técnicos ou de pesquisa Dissertações Artigos de conferências Ensaio clínicos em progresso Publicações oficiais

### 3.2.2 Critérios de inclusão e exclusão

Foram considerados os estudos publicados a partir de 2002 publicados em Inglês e Português, realizados em humanos e animais, incluindo os trabalhos realizados em culturas celulares. Foram excluídos estudos de revisão e artigos originais cujo acesso completo à sua leitura não fosse permitido. Foram igualmente excluídos artigos que, após a leitura do seu resumo, se tenham revelado irrelevantes para o tema da atual revisão, devido à não inclusão dos termos de pesquisa.

### 3.2.3 Pesquisa da literatura

A pesquisa da literatura foi realizada entre 10 e 14 de agosto de 2019, nas bases de dados selecionadas, utilizando os termos de pesquisa em Inglês e Português.

### 3.2.4 Seleção dos Estudos

Após a realização da pesquisa os estudos com relevância para a revisão pretendida foram selecionados através da execução das seguintes etapas:

1. Remoção dos duplicados;
2. Avaliação dos títulos e resumos, e posterior remoção dos documentos irrelevantes;
3. Obtenção dos textos integrais de todos os artigos potencialmente relevantes;
4. Avaliação da presença dos critérios de inclusão nos artigos selecionados;
5. Organização dos estudos selecionados num programa de gestão de referências.

### 3.2.5 Extração e síntese dos dados

Após a identificação de todos os estudos relevantes os dados foram reunidos e tratados. Realizou-se a análise descritiva de cada estudo, evidenciando informação detalhada como o ano de publicação, autor, dimensão e tipo de amostra, os métodos utilizados e os resultados obtidos. Na Figura 3.1 encontra-se esquematizado o processo da metodologia.

**Questão de investigação:** Qual a eficácia da aplicação de Tiazolidinedionas na terapêutica do melanoma e quais os mecanismos de ação implicados?

#### Metodologia:

**Bases de dados:** PubMed/Medline; Cochrane Library; *Web of Science*; B-on (Biblioteca do conhecimento online); Scielo; Clinicaltrials; RCAAP (Repositório Científico de Acesso Aberto em Portugal); Open Grey

**Termos de pesquisa:** *melanoma AND thiazolidinediones; melanoma AND rosiglitazone; melanoma AND pioglitazone, melanoma AND troglitazone; melanoma AND ciglitazone.*

#### Critérios de inclusão:

- Estudos publicados a partir de 2002 em Inglês e Português;
- Estudos realizados em humanos e animais, incluindo os trabalhos realizados em culturas celulares;
- Artigos originais cujo acesso completo à sua leitura fosse permitido.

#### Critérios de exclusão:

- Artigos de revisão;
- Artigos que, após a leitura do seu resumo, se tenham revelado irrelevantes.

#### Pesquisa e seleção dos Estudos

Aplicação dos critérios de inclusão/exclusão.

#### Recolha de informação em tabelas com:

- Ano de publicação
- Autor
- Dimensão e tipo de amostra
- Métodos utilizados
- Resultados obtidos

Figura 3.1 – Resumo do processo da metodologia.

## 4. Resultados

Da pesquisa efetuada obteve-se um total de 112 resultados em Inglês, em todas as bases de dados consultadas, não tendo sido obtidas quaisquer publicações em Português (Tabela 4.1).

**Tabela 4.1-** Estudos encontrados nas bases de dados selecionadas.

Base de dados	Nº de estudos encontrados
Web of Science	58
PubMed/Medline	46
Cochrane Library	5
B-on	3
Clinical trials	1
Scielo	0
RCAAP	0
Open Grey	0
	<b>Total = 112</b>

### 4.1 Seleção dos estudos

De entre os estudos obtidos, alguns apresentavam-se em duplicado nas diferentes bases de dados. Na Tabela 4.2 encontram-se detalhados os resultados sobrepostos.

**Tabela 4.2-** Número de estudos sobrepostos em cada base de dados.

	Web of Science	PubMed/MedLine	Cochrane Library	B-on	Clinical trials
Web of Science	58	35	2	1	0
PubMed/MedLine	35	46	2	1	0
Cochrane Library	2	2	5	0	1
B-on	1	1	0	3	0
Clinical trials	0	0	1	0	1

Após remoção de 39 artigos que estavam em duplicado nas diferentes bases de dados, a aplicação dos critérios de exclusão levou à eliminação de 49 publicações, de entre as quais, 11 tratavam-se de artigos de revisão, 34 foram excluídos por serem temas irrelevantes para a temática, 3 não foi possível o seu acesso na íntegra, e 1 por ser um ensaio clínico ainda sem resultados (Figura 4.1).

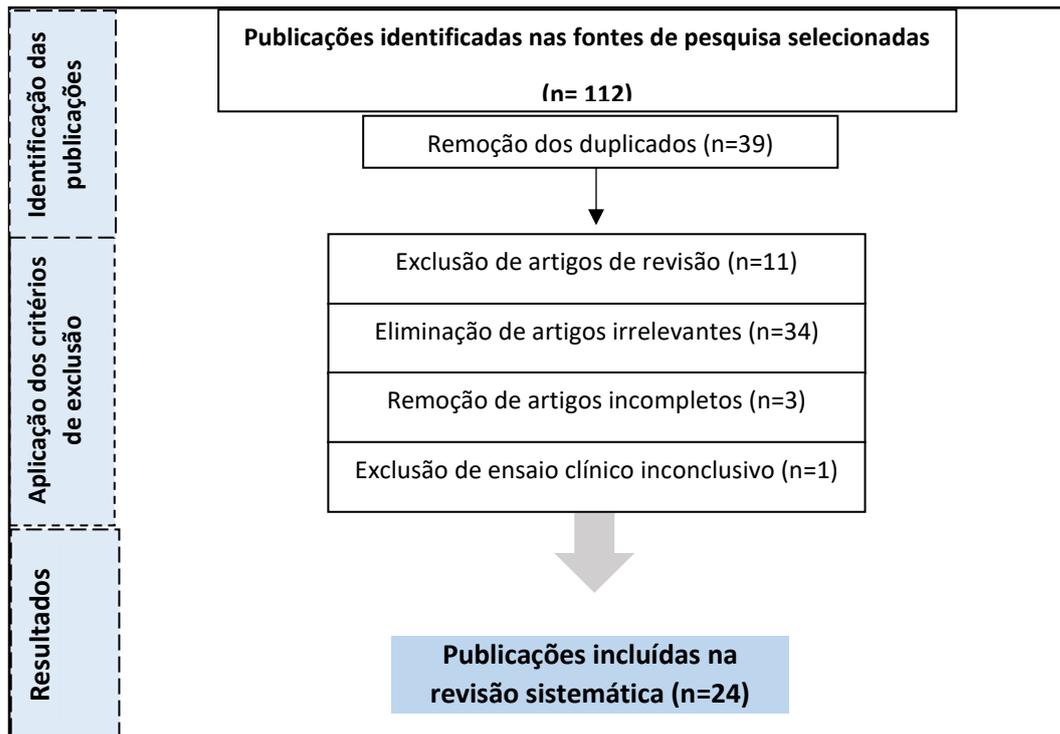


Figura 4.1 - Diagrama do processo de seleção das publicações.

#### 4.1.1 Artigos irrelevantes

No processo de aplicação dos critérios de exclusão, foram removidos da amostra 34 estudos considerados irrelevantes para a revisão em curso, maioritariamente devido à não utilização de TZDs, mas sim derivados ou outros fármacos (132–144), e ao facto de não serem estudos realizados em melanoma (145–156), ou ambos os casos (157–164). Na Tabela 4.3 encontram-se detalhadas as publicações e as respetivas justificações inerentes à sua exclusão e conseqüente denominação como artigos irrelevantes à temática.

**Tabela 4.3** - Características e justificações dos artigos irrelevantes à temática.

Título	Revista (ano)	Autor	Referência	Justificação
Metronomic Antiangiogenic Therapy with Capecitabine and Celecoxib in Advanced Tumor Patients – Results of a Phase II Study	Oncology Research and Treatment (2007)	Steinbild <i>et al.</i>	(157)	Incide na utilização de fármacos na terapêutica de vários tipos de cancro, não referenciando o melanoma.
Synthesis of O-prenylated and O-geranylated derivatives of 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones and evaluation of their free radical scavenging activity as well as effect on some phase II antioxidant/detoxifying enzyme	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007)	Hossain <i>et al.</i>	(132)	Estudam a síntese de novas moléculas derivadas de TZDs.
Discovery and Optimization of N-(4-(3-Aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide as a Novel Scaffold Active against Sensitive and Resistant Cancer Cells	Journal of Medicinal Chemistry (2016)	Millet <i>et al.</i>	(133)	
Anti-melanogenic effect of (Z)-5-(2,4-dihydroxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione, a novel tyrosinase inhibitor	Archives of Pharmacal Research (2013)	Hee Kim <i>et al.</i>	(137)	
Synthesis of 5-(4-(1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione as promising DNA and serum albumin-binding agents and evaluation of antitumor activity	European Journal of Medicinal Chemistry (2019)	Singh <i>et al.</i>	(138)	
Synthesis and biological activities of some new thiazolidine derivatives containing pyrazole ring system	Journal of Heterocyclic Chemistry (2012)	Nishida <i>et al.</i>	(139)	
5-Arylidene(chromenyl-methylene)-thiazolidinediones: Potential New Agents against Mutant Oncoproteins K-Ras, N-Ras and B-Raf in Colorectal Cancer and Melanoma	Medicina (2019)	Nastasă <i>et al.</i>	(165)	
Structural modifications of (Z)-3-(2-aminoethyl)-5-(4-ethoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione that improve selectivity for inhibiting the proliferation of melanoma cells containing active ERK signaling	Organic & Biomolecular Chemistry (2013)	Junge <i>et al.</i>	(140)	Estuda as modificações estruturais em moléculas derivadas das TZDs e a sua aplicação no melanoma.

**Tabela 4.3** - Características e justificações dos artigos irrelevantes à temática (continuação).

Título	Revista (ano)	Autor	Referência	Justificação
IL-24 Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Engaged into the Cell Cycle through Dephosphorylation of STAT3 and Stabilization of p53 Expression	The Journal of Immunology (2008)	Sainz-Perez <i>et al.</i>	(158)	Incide na ação de IL-24 na leucemia Linfocítica crônica e a expressão de p53 no cancro.
Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchangers and RhoA Regulate Acidic Extracellular pH-Induced Lysosome Trafficking in Prostate Cancer Cells	Traffic (2009)	Steffan <i>et al.</i>	(156)	Trata o impacto da regulação do pH na secreção da protease e regulação da exocitose dos lisossomas nas células cancerígenas da próstata.
Thiazolidinediones Induce Rab7–RILP–MAPK Dependent Juxtannuclear Lysosome Aggregation and Reduce Tumor Cell Invasion	Traffic (2010)	Steffan <i>et al.</i>	(145)	Incidem na ação terapêutica das TZDs noutras patologias, não referenciando a sua aplicação no melanoma.
The investigation of Mitogen-Activated Protein kinase Phosphatase-1 as a potential pharmacological target in non-small cell lung carcinomas, assisted by non-invasive molecular imaging	BMC Cancer (2010)	Tai <i>et al.</i>	(146)	
Inverse association of PPAR $\gamma$ agonists use and high grade glioma development	Journal of Neuro-Oncology (2010)	Grommes <i>et al.</i>	(149)	
Miscellaneous	Macular Edema (2010)	Creuzot-Garcher <i>et al.</i>	(150)	
Differentially regulated microRNAs during human sebaceous lipogenesis	Journal of Dermatologica I Science (2013)	Schneider <i>et al.</i>	(151)	
Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ ligands inhibit VEGF-mediated vasculogenic mimicry of prostate cancer through the AKT signaling pathway	Molecular Medicine Reports (2014)	Qin <i>et al.</i>	(152)	
Aldo-keto reductase 1C3 is overexpressed in skin squamous cell carcinoma (SCC) and affects SCC growth via prostaglandin metabolism	Experimental Dermatology (2014)	Mantel <i>et al.</i>	(153)	
Ciglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ , exerts potentiated cytostatic/cytotoxic effects against tumor cells when combined with lovastatin	International Journal of Oncology (2007)	Mrówka <i>et al.</i>	(154)	

**Tabela 4.3** - Características e justificações dos artigos irrelevantes à temática (continuação).

Título	Revista (ano)	Autor	Referência	Justificação
PPAR $\gamma$ -dependent pathway in the growth-inhibitory effects of K562 cells by carotenoids in combination with rosiglitazone	Biochimica et Biophysica Acta (2014)	Zhao <i>et al.</i>	(155)	Incide na ação terapêutica das TZDs noutras patologias, não referenciando a sua aplicação no melanoma.
Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms	Cell Death & Disease (2011)	Tomic <i>et al.</i>	(141)	Incidem na ação terapêutica de outros fármacos nas células cancerígenas do melanoma, não referenciando a utilização das TZDs.
Fenofibrate suppresses melanogenesis in B16-F10 melanoma cells via activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway	Chemico-Biological Interactions (2013)	Huang <i>et al.</i>	(142)	
E2F1 inhibition mediates cell death of metastatic melanoma	Cell Death & Disease (2018)	Rouaud <i>et al.</i>	(143)	
Cloxiquine, a traditional antituberculosis agent, suppresses the growth and metastasis of melanoma cells through activation of PPAR $\gamma$	Cell Death & Disease (2019)	Zhang <i>et al.</i>	(144)	
A Potent Tyrosinase Inhibitor, (E)-3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one, with Anti-Melanogenesis Properties in $\alpha$ -MSH and IBMX-Induced B16F10 Melanoma	Molecules (2018)	Kim <i>et al.</i>	(134)	
Compounds Triggering ER Stress Exert AntiMelanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance	Cancer Cell (2016)	Cerezo <i>et al.</i>	(135)	
Novel benzenesulfonylureas containing thiophenylpyrazoline moiety as potential antidiabetic and anticancer agentes	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2014)	Kharbanda <i>et al.</i>	(160)	Trata a síntese de benzenossulfonilureias e a sua aplicabilidade como antidiabético e anticancerígeno.
Epidermal PPAR $\gamma$ influences subcutaneous tumor growth and acts through TNF- $\alpha$ to regulate contact hypersensitivity and the acute photoresponse	Oncotarget (2017)	Konger <i>et al.</i>	(156)	Trata a ação das TZDs na expressão de TNF-alfa e imunossupressão.

**Tabela 4.3** - Características e justificações dos artigos irrelevantes à temática (continuação).

Título	Revista (ano)	Autor	Referência	Justificação
The inhibitory effect of a synthetic compound, (Z)-5-(2,4-dihydroxybenzylidene) thiazolidine-2,4-dione (MHY498), on nitric oxide-induced melanogenesis	Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2013)	Kim <i>et al.</i>	(161)	Trata a síntese de um novo composto e a sua ação na síntese de melanina.
Immunotherapy with PI3K Inhibitor and Toll-Like Receptor Agonist Induces IFN- +IL-17+ Polyfunctional T Cells That Mediate Rejection of Murine Tumors	Cancer Research (2012)	Marshall <i>et al.</i>	(162)	Trata a inibição de P13k e dos ligantes do recetor Toll-like (TLR) na supressão tumoral.
Severe pulmonary metastasis in obese and diabetic mice	International Journal of Cancer (2006)	Mori <i>et al.</i>	(163)	Estuda o impacto da diabetes e obesidade no surgimento de metástases pulmonares.
The $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone/ peroxisome proliferator activated receptor pathway down-regulates proliferation in melanoma cell lines	Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (2017)	Flori <i>et al.</i>	(136)	Trata novas vias terapêuticas no melanoma, relativas à inibição ou estimulação de enzimas e hormonas.
Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of a Dyslipidemic Therapy in Mexican Population	U.S National Library of Medicine (2018)	Valdez <i>et al.</i>	(164)	Ensaio clínico que aborda a terapêutica dislipidémica nas células anticancerígenas.
Peroxisome proliferator-activated receptors in squamous cell carcinoma and its precursors	Journal of Cutaneous Pathology (2005)	Nijsten <i>et al.</i>	(147)	Trata a ativação de PPAR no carcinoma das células escamosas.
Rosiglitazone may reduce non-melanoma skin cancer risk in Taiwanese	BMC Cancer (2015)	Tseng <i>et al.</i>	(148)	Trata a ação da rosiglitazona na redução do risco de incidência de cancro de pele não-melanoma.

#### 4.1.2 Artigos de revisão

No processo de seleção dos artigos excluíram-se 11 publicações por se tratarem de artigos de revisão, independentemente da análise da sua relevância para a temática (descrita em 4.1.1). As suas características encontram-se detalhadas na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4** - Características dos estudos de revisão excluídos da revisão sistemática.

Título	Revista (ano)	Autor	Referência
Thiazolidinediones in dermatology	International Journal of Dermatology (2007)	Boyd	(98)
Systems Biology: A Therapeutic Target for Tumor Therapy	Cancer Microenvironment (2008)	Reichle <i>et al.</i>	(166)
Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and the Human Skin	American Journal of Clinical Dermatology (2008)	Sertznig <i>et al.</i>	(167)
Peroxisome Proliferator-Activating Receptors: A New Way to Treat Melanoma?	Journal of Investigative Dermatology (2009)	Schadendorf <i>et al.</i>	(168)
Targeting the Tumor Stroma with Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) Agonists	Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (2009)	Bundscherer <i>et al.</i>	(169)
Akt enzyme: new therapeutic target in cancer and diabetes?	Orvosi Hetilap (2009)	Áron <i>et al.</i>	(170)
Pioglitazone and Cancer: Angel or Demon?	Current Pharmaceutical Design (2013)	Kostapanos <i>et al.</i>	(171)
Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones	BioMed Research International (2015)	Fröhlich <i>et al.</i>	(130)
Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: the 'future' in dermatology therapeutics?	Archives of Dermatological Research (2015)	Gupta <i>et al.</i>	(172)
Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions	Bioorganic & Medicinal Chemistry (2015)	Chadha <i>et al.</i>	(173)
The Janus face of rosiglitazone	Oncotarget (2018)	Piche <i>et al.</i>	(174)

### 4.1.3 Características dos estudos incluídos

Após a aplicação dos critérios de exclusão, obteve-se um total de 24 publicações a incluir na revisão sistemática. Na Tabela 4.5 encontram-se detalhadas as suas características e o objetivo principal de cada estudo, ordenados por ano de publicação.

**Tabela 4.5** - Características dos estudos selecionados.

Título	Revista (Ano)	Autores	Objetivo	Referência
Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$ Inhibit Cell Growth in Malignant Melanoma	Journal of Experimental & Clinical Research (2002)	Mössner <i>et al.</i>	Estudar o papel dos agonistas de PPAR $\gamma$ no controle do crescimento do melanoma maligno.	(175)
The effect of PPAR $\gamma$ ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells	Melanoma Research (2003)	Placha <i>et al.</i>	Estudar a expressão de PPAR $\gamma$ nas células de melanoma humano e a sua ação na proliferação e apoptose.	(176)
Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptors in human melanocytes	British Journal of Dermatology (2003)	Kang <i>et al.</i>	Estudar a expressão dos PPARs nos melanócitos humanos e os efeitos dos seus ativadores na proliferação e pigmentação.	(177)
Pioglitazone and Rofecoxib Combined with Angiostatically Scheduled Trofosfamide in the Treatment of Far-Advanced Melanoma and Soft Tissue Sarcoma	American Cancer Society (2004)	Reichle <i>et al.</i>	Avaliar a eficácia da terapêutica combinada da Pioglitazona com Rofecoxib e Trofosfamida no tratamento do melanoma avançado.	(178)
PPAR $\gamma$ ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer	Cancer Letters (2005)	Núñez <i>et al.</i>	Investigar os efeitos dos ligandos de PPAR $\gamma$ e da privação de aminoácidos no melanoma.	(179)
Growth Inhibition and Differentiation Induced by Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Ligand Rosiglitazone in Human Melanoma Cell Line A375	Medical Oncology (2006)	Li <i>et al.</i>	Investigar o efeito e mecanismos da Rosiglitazona na inibição do crescimento e diferenciação nas células cancerígenas do melanoma.	(180)
Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ agonists on human malignant melanoma cells in vitro	Anti-cancer Drugs (2006)	Freudlsperger <i>et al.</i>	Estudar o papel dos agonistas de PPAR $\gamma$ no controle do crescimento do melanoma maligno.	(181)
PPAR-gamma agonist, ciglitazone, increases pigmentation and migration of human melanocytes	Experimental Dermatology (2006)	Lee <i>et al.</i>	Estudar a ação da Ciglitazona na pigmentação e migração dos melanócitos humanos.	(182)
The Proteasome Inhibitor Bortezomib Augments Anti-Proliferative Effects of Mistletoe Lectin-I and the PPAR- $\gamma$ Agonist Rosiglitazone in Human Melanoma Cells	Anticancer Research (2007)	Freudlsperger <i>et al.</i>	Estudar o efeito combinado da Rosiglitazona e Bortezomib na proliferação e apoptose das células do melanoma humano.	(183)
Targeted combined anti-inflammatory and angiostatic therapy in advanced melanoma: a randomized phase II trial	Melanoma Research (2007)	Reichle <i>et al.</i>	Estudar o efeito da terapêutica com Pioglitazona, Rofecoxib e Trofosfamida no melanoma avançado.	(184)
PPAR $\alpha$ / $\gamma$ Expression and Activity in Mouse and Human Melanocytes and Melanoma Cells	Pharmaceutical Research (2007)	Eastham <i>et al.</i>	Investigar a expressão de PPAR $\alpha$ e PPAR $\gamma$ e a proliferação nas células do melanoma e melanócitos humanos e de rato.	(185)

**Tabela 4.5** - Características dos estudos selecionados (continuação).

Título	Revista (Ano)	Autores	Objetivo	Referência
<i>PPAR <math>\gamma</math> regulates MITF and <math>\beta</math>-catenin expression and promotes a differentiated phenotype in mouse melanoma S91</i>	Pigment Cell & Melanoma Research (2008)	Grabacka <i>et al.</i>	Estudar o efeito da ativação de PPAR $\gamma$ pelas TZDs na expressão de MITF e $\beta$ -catenina, e o impacto destas proteínas nos diferentes fenótipos.	(186)
PPAR $\gamma$ agonists attenuate proliferation and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in melanoma cells	The International Journal of Biochemistry & Cell Biology (2008)	Smith <i>et al.</i>	Investigar o papel dos agonistas de PPAR $\gamma$ na modulação de Wnt/ $\beta$ -catenina e proliferação das células do melanoma.	(187)
Retinoid and thiazolidinedione therapies in melanoma: an analysis of differential response based on nuclear hormone receptor expression	Molecular Cancer (2009)	Klopper <i>et al.</i>	Investigar os efeitos da terapêutica de Tiazolidinedionas e Retinóides no melanoma.	(188)
Enhanced effects of PPAR $\gamma$ ligands and RXR selective retinoids in combination to inhibit migration and invasiveness in cancer cells	Oncology Reports 2008	Papi <i>et al.</i>	Investigar os efeitos antitumorais da combinação terapêutica de agonistas de PPAR $\gamma$ com Retinóides nas células de glioblastoma e melanoma.	(189)
In Vitro and In Vivo Anti-Melanoma Effects of Ciglitazone	Journal of Investigative Dermatology (2009)	Botton <i>et al.</i>	Investigar os efeitos da Ciglitazona no melanoma.	(190)
Experience of malignancies with oral glucose-lowering drugs in the randomised controlled ADOPT (A Diabetes Outcome Progression Trial) and RECORD (Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes and Regulation of Glycaemia in Diabetes) clinical trials	Diabetologia (2009)	Home <i>et al.</i>	Comparar a ocorrência de neoplasias em doentes diabéticos tratados com Rosiglitazona, Metformina e Sulfonilureias.	(191)
Mistletoe Lectin-I Augments Antiproliferative Effects of the PPAR $\gamma$ Agonist Rosiglitazone on Human Malignant Melanoma Cells	Phytotherapy Research (2009)	Freudlsperger <i>et al.</i>	Avaliação do efeito antiproliferativo da combinação da Rosiglitazona com ML-I nas células malignas de melanoma humano.	(192)
Ciglitazone negatively regulates CXCL1 signaling through MITF to suppress melanoma growth	Cell Death and Differentiation (2011)	Botton <i>et al.</i>	Investigar a ação da Ciglitazona na regulação de CXCL1 e MITF e consequente inibição do crescimento do melanoma.	(193)
Cohort Study of Pioglitazone and Cancer Incidence in Patients with Diabetes	Diabetes Care (2011)	Ferrara <i>et al.</i>	Investigar se o tratamento com Pioglitazona está associado ao risco de desenvolvimento de cancro, incluindo o melanoma.	(194)

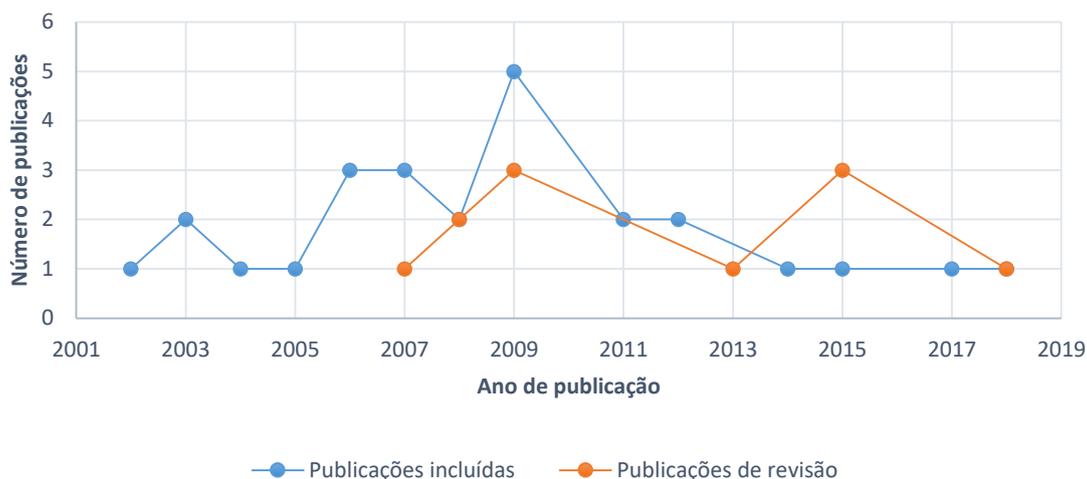
**Tabela 4.5** - Características dos estudos selecionados (continuação).

Título	Revista (Ano)	Autores	Objetivo	Referência
Proteome Analysis Identified the PPAR $\gamma$ Ligand 15d-PGJ2 as a Novel Drug Inhibiting Melanoma Progression and Interfering with Tumor-Stroma Interaction	Plos One (2012)	Paulitschke <i>et al.</i>	Investigar a expressão de PPAR $\gamma$ e a sua ativação por 15d-PGJ2 na progressão do melanoma e interferência na ação com o estroma.	(195)
Pioglitazone Use and Risk of Bladder Cancer and Other Common Cancers in Persons with Diabetes	American Medical Association (2015)	Lewis <i>et al.</i>	Estudar se o uso de Pioglitazona em doentes diabéticos está relacionado com o risco de desenvolver melanoma e outros tipos de cancro.	(196)
Inhibition of age-related therapy resistance in melanoma by rosiglitazone-mediated induction of Klotho	American Association for Cancer Research (2017)	Behera <i>et al.</i>	Estudar a ação da Rosiglitazona na proteína Klotho e a sua aplicação na terapêutica do melanoma em ratinhos idosos.	(197)
Induction of paracrine signaling in metastatic melanoma cells by PPAR $\gamma$ agonist rosiglitazone activates stromal cells and enhances tumor growth	American Association for Cancer Research (2018)	Piche <i>et al.</i>	Estudar a ação da Rosiglitazona na ativação das células do estroma e na proliferação celular do melanoma.	(198)

#### 4.1.4 Distribuição temporal das publicações

Dos 24 artigos incluídos, 15 foram publicados entre os anos de 2006 e 2011 (62,5%), e dos 11 artigos de revisão obtidos, 6 foram publicados entre os anos de 2008 e 2013 (54,5%).

A sobreposição das suas distribuições temporais (Figura 4.2) destaca o ano de 2009 como o de maior número de publicações relativas à temática, tanto de artigos originais (n=5) como de artigos de revisão (n=3). No entanto, desde 2012 que apenas é publicado 1 artigo original por ano, facto igualmente verificado desde 2015 para os artigos de revisão.



**Figura 4.2** - Distribuição temporal das publicações incluídas e de revisão.

## 4.2 Tipo de amostra utilizada

Nos vários estudos analisados, foram utilizadas vários tipos de amostras: células e linhas celulares humanas, células e linhas celulares de ratinho, culturas celulares injetados em ratinhos, e doentes incluídos em estudos de coorte para avaliação da terapêutica.

### 4.2.1 Células e linhas celulares humanas

Dos 17 estudos realizados em linhas celulares humanas de melanoma (Tabela 4.6), 17,5% incidem na análise da ação das TZDS na expressão de PPAR $\gamma$ , (176,180,190), 82,4% na proliferação celular (175–177,179–181,183,185–187,189,190,192,193), 17,7% na paragem do ciclo celular (175,180,186), 23,5% na indução da apoptose (176,179,181,183), 29,4% na expressão de proteínas (180,182,186,187,193) e 11,8% na indução da pigmentação dos melanócitos (177,182). Além da utilização de células de melanoma, células humanas de outros tipos de cancro (próstata, mama) também foram analisadas e sujeitas aos estudos (179) sustentando as teorias que fundamentam a possível aplicação desta classe de fármacos em variadas neoplasias.

Como controlo dos vários estudos, foram utilizadas células de melanoma (da mesma linha celular) não expostas a TZDs e tratadas com sulfóxido de dimetilo (DMSO) ou etanol, ou outros veículos utilizados para a dissolução do(s) fármaco(s).

Na Tabela 4.6 encontram-se discriminados os estudos que utilizaram como amostra células de melanoma humano e o seu objeto de avaliação, ordenados por ano de publicação.

**Tabela 4.6** - Células e linhas celulares humanas usadas nos estudos analisados.

<b>Células de melanoma</b>	<b>O que avalia</b>	<b>Referência</b>
<i>MM-358, MM-201, MM-254, KAll</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular; paragem do ciclo celular.	(175)
<i>WM35, A375</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular; indução da apoptose.	(176)
<i>Melanócitos humanos</i>	Expressão dos PPARs; proliferação celular; pigmentação dos melanócitos.	(177)
<i>A375</i>	Proliferação celular; indução da apoptose.	(179)
<i>A375</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular; diferenciação celular; paragem do ciclo celular; expressão de p53 e BCL-2.	(180)
<i>UIISO-Mel6, G361, LMV3, MeWo, Lox e FemX-1</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular; indução da apoptose.	(181)
<i>Melanócitos humanos</i>	Pigmentação e migração dos melanócitos; atividade da tirosinase e de MITF.	(182)
<i>MV3, FemX-1, G361</i>	Proliferação celular; indução da apoptose.	(183)
<i>SK-mel28, A375 Melanócitos humanos: HEMn-LP</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular.	(185)
<i>Melanócitos humanos</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular; paragem do ciclo celular; atividade de MITF e tirosinase.	(186)
<i>MM96L, A2058, HT144, D32</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular; bloqueio Wnt3A/ $\beta$ -catenina; expressão de MITF.	(187)
<i>G361</i>	Proliferação celular.	(189)
<i>WM35, 501mel, A375, melanócitos humanos</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; proliferação celular.	(190)
<i>MV3, G361, FemX-1</i>	Proliferação celular	(192)
<i>A375, SK-Mel-28, MeWo, melanócitos humanos</i>	Proliferação celular; expressão de CXCL1; expressão de MITF.	(193)
<i>M24met, 1205Lu, A375, Mel Juso</i>	Expressão de PPAR $\gamma$	(195)
<i>A375, SKmel28, 1205Lu, WM115, WM35, WM793, melanócitos humanos, M13</i>	Expressão de PPAR $\gamma$	(198)

#### 4.2.2 Células e linhas celulares de ratinho

Além de linhas celulares de melanoma humano, também foram utilizadas linhas celulares de melanoma e melanócitos de ratinho. As células de controlo são igualmente tratadas com sulfóxido de dimetilo (DMSO) e não expostas a TZDs (Tabela 4.7).

**Tabela 4.7** - Células e linhas celulares de ratinho usadas nos estudos analisados.

<b>Células de melanoma</b>	<b>O que avalia</b>	<b>Referência</b>
<i>B16 e melan-a</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ e proliferação celular.	(185)
<i>S91 e B16F10</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ ; paragem do ciclo celular; atividade de MITF e tirosinase.	(186)

#### 4.2.3 Culturas celulares em modelos de ratinho

Dois dos estudos incluídos analisam a expressão de PPAR $\gamma$  e a proliferação celular de culturas de células de melanoma humano injetadas em modelos de rato, quando sujeitas à ação das TZDs (188)(190). O estudo realizado por *Behera et al.* (2017) incide na análise de células resistentes de melanoma de ratinho, injetadas noutros ratinhos (Tabela 4.8) (197).

**Tabela 4.8** – Culturas celulares usados nos estudos analisados.

<b>Células de melanoma</b>	<b>O que avalia</b>	<b>Referência</b>
<i>A375</i> <i>M14</i>	Expressão de PPAR $\gamma$ e proliferação celular.	(188)
<i>A375</i>	Proliferação celular.	(190)
<i>Yumm1.7</i>	Proliferação celular e expressão da proteína Klotho.	(197)

#### 4.2.4 Estudos de Coorte

Cinco dos estudos analisados tratam-se de estudos de coorte realizados a doentes com melanoma aos quais foi instituída uma nova terapêutica (178)(184) e doentes diabéticos tratados com TZDs aos quais foi avaliado o risco de incidência de neoplasias, incluindo o melanoma (Tabela 4.9) (191) (194) (196).

**Tabela 4.9** - Estudos de coorte analisados na revisão sistemática.

<b>Amostra</b>	<b>O que avalia</b>	<b>Métodos utilizados</b>	<b>Referência</b>
19 doentes com melanoma em estado IV	Resultados a nova terapêutica.	Administração diária de 45 mg de Pioglitazona + 25 mg de Rofecoxib durante 14 dias e a partir do 15º dia combinação com 50 mg 3x/dia de Trofosfamida.	(178)
76 doentes com melanoma em estado IV		Comparação de resultados terapêuticos: Braço A – 50 mg Trofosfamida 3x/dia Braço B – 50 mg Trofosfamida + 60 mg Pioglitazona + 25mg Rofecoxib 1x/dia	(184)
Doentes tratados com Metformina, Rosiglitazona e Glibenclamida	Ocorrência de neoplasias.	Recolha de todos os efeitos adversos ocorridos.	(191)
252467 doentes diabéticos tratados com Pioglitazona	Risco de desenvolvimento de cancro associado ao tratamento com Pioglitazona.	Recolha de todas as características dos doentes, medicação prescrita e neoplasias ocorridas.	(194)
193099 doentes diabéticos, 34181 tratados com Pioglitazona e 158918 nunca expostos à TZD		Recolha de todas as características dos doentes, medicação instituída, duração da terapêutica, tempo de exposição à terapêutica com Pioglitazona.	(196)

#### 4.2.5 Linhas celulares mais utilizadas

Entre os artigos selecionados, verificam-se algumas linhas celulares utilizadas mais frequentemente em relação a outras.

Na Tabela 4.10, encontram-se discriminadas as linhas celulares utilizadas nas várias publicações, por ordem alfabética.

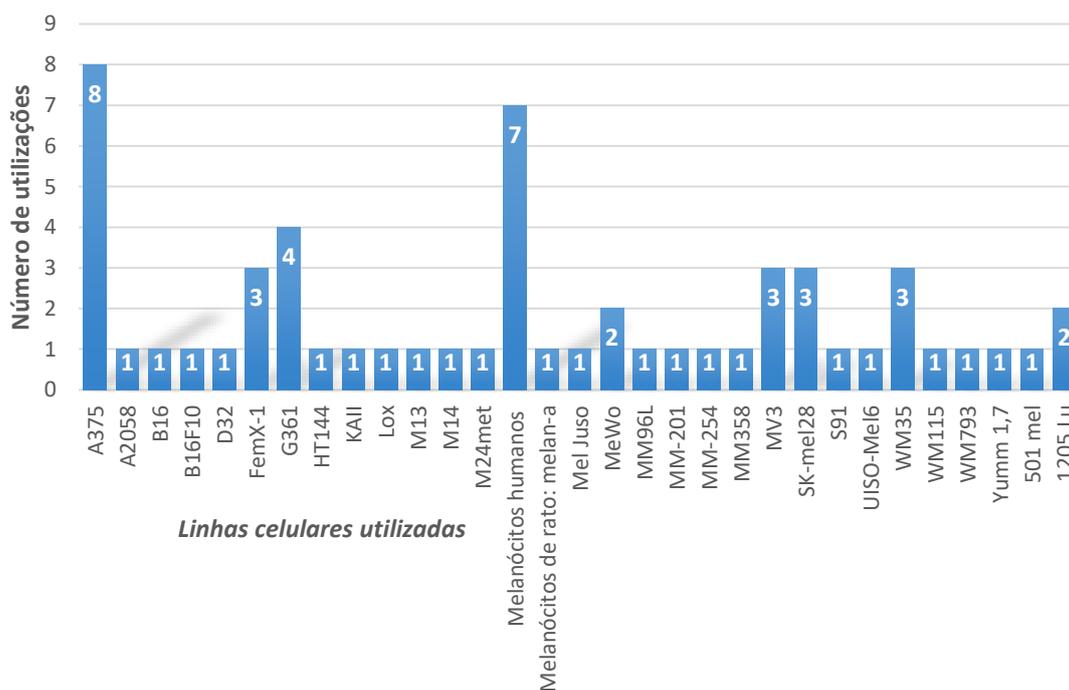
**Tabela 4.10** – Linhas celulares utilizadas e respetiva publicação.

<b>Linhas celulares</b>	<b>Estudos (Referência)</b>
A375	(176)(180)(179)(190)(193)(195)(198) (188)
A2058	(187)
B16	(185)
B16F10	(186)
D32	(187)
FemX-1	(181)(183)(192)
G361	(181)(183)(189)(192)
HT144	(187)
KAI1	(175)
Lox	(181)
M13	(198)
M14	(188)
M24met	(195)
Melanócitos humanos	(177) (182)(186)(190)(193)(198) (185)
Melanócitos de rato: melan-a	(185)
Mel Juso	(195)
MeWo	(181)(193)
MM96L	(187)
MM-201	(175)

**Tabela 4.10** – Linhas celulares utilizadas e respectiva publicação (continuação).

Linhas celulares	Estudos (Referência)
MM-254	(175)
MM358	(175)
MV3	(181)(183)(192)
SK-mel28	(185) (193)(198)
S91	(186)
UIISO-Mel6	(181)
WM35	(176)(190)(198)
WM115	(198)
WM793	(198)
Yumm 1.7	(197)
501 mel	(190)
1205Lu	(195)(198)

A Figura 4.3 representa a sua frequência de utilização, onde se verifica que as células mais repetidamente utilizadas foram A375, melanócitos humanos e G361 utilizadas em 8, 7 e 4 artigos, respetivamente.



**Figura 4.3** - Frequência de utilização das linhas celulares analisadas.

### 4.3 Expressão de PPAR $\gamma$

Sendo as TZDs agonistas do recetor PPAR $\gamma$ , a avaliação dos seus níveis de expressão nas diferentes linhas celulares foi um ponto fundamental nalguns destes estudos. Deste modo, foi analisada a expressão de PPAR $\gamma$  em 12 dos artigos incluídos, tanto em linhas celulares de melanoma e melanócitos humanos, como de ratinho (Tabela 4.11).

Os métodos de deteção e quantificação desta expressão foram essencialmente a realização de testes imuno-histoquímicos com anticorpos anti-PPAR $\gamma$ , Western blot, e RT-PCR (Tabela 4.11).

Com exceção da linha celular A2058 (187), verificou-se expressão de PPAR $\gamma$ , independente do tratamento com TZD, tanto nos melanócitos humanos benignos como malignos, em todas as linhas celulares de melanoma humano estudadas, e nas linhas celulares de melanoma e melanócitos de rato. Em 2 dos 3 estudos em que foi analisada a influência da exposição a TZDs na expressão de PPAR $\gamma$ , verificou-se o seu aumento de modo dependente da dose(180) (190), enquanto que no estudo de *Placha et al* (2003), essa expressão se mostrou independente do tratamento com Ciglitazona (176).

**Tabela 4.11** – Resultados relativos à análise da expressão de PPAR $\gamma$  nas células do melanoma

<b>Amostra</b>	<b>Linhas celulares</b>	<b>Método</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Melanócitos benignos, malignos e linhas celulares de melanoma</i>	MM-258,MM-201,MM-254, KAI1	Imuno-histoquímica	Expressão de PPAR $\gamma$ em todas as linhas celulares e melanócitos.	(175)
<i>Linhas celulares de melanoma humano</i>	WM35 A375	RT-PCR, Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ independente do tratamento com Ciglitazona.	(176)
<i>Linha celular de melanoma humano</i>	A375	RT-PCR; Western blot; Imuno-histoquímica	Aumento da expressão de PPAR $\gamma$ nas células tratadas com Rosiglitazona de modo dose dependente.	(180)
<i>Linhas celulares de melanoma humano</i>	UISO-Mel6, G361, MV3, MeWo, Lox FemX-1	Imuno-histoquímica; Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ em todas as linhas celulares.	(181)
<i>Linhas celulares de melanoma humano</i>	SK-mel28, A375	RT-PCR, Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ em ambas linhas celulares.	(185)
<i>Linhas celulares de melanoma de rato</i>	B16	RT-PCR, Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ .	(185)
<i>Melanócitos de rato</i>	Melan-a	RT-PCR, Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ .	(185)

**Tabela 4.11** - Resultados relativos à análise da expressão de PPAR $\gamma$  nas células do melanoma (continuação).

<b>Amostra</b>	<b>Linhas celulares</b>	<b>Método</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Células de melanoma de rato</i>	S91; B16F10	RT-PCR, Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ em ambas linhas celulares.	(186)
<i>Linhas celulares de melanoma humano</i>	MM96L, A2058, HT144, D32	RT-PCR, Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ em todas as linhas celulares, exceto em A2058.	(187)
<i>Linhas celulares de melanoma humano</i>	A375	Western blot	Aumento da expressão de PPAR $\gamma$ de modo dose-dependente da Ciglitazona e Pioglitazona.	(190)
<i>Linhas celulares de melanoma humano</i>	M24met, 1205Lu, A375, MelJuso	Western blot	Expressão de PPAR $\gamma$ em todas as linhas celulares.	(195)
<i>Linhas celulares de melanoma humano e melanócitos humanos normais</i>	A375, SKmel28, 1205Lu, WM115, WM35, WM793	Western blot	Maior expressão de PPAR $\gamma$ em A375, SKmel28 e 1205Lu (tumores metastáticos), seguidos de WM793, WM115, M13, melanócitos humanos normais e WM35.	(198)

## 4.4 Rosiglitazona no melanoma

### 4.4.1 Ação anticancerígena: Efeitos antiproliferativos

Verificaram-se efeitos de inibição da proliferação em todos os estudos em que foi avaliada a exposição da Rosiglitazona nas linhas celulares de melanoma, sendo que esses efeitos aumentaram com a concentração de TZD e o seu tempo de exposição (Tabela 4.12) (174, 179, 180, 186).

**Tabela 4.12** - Resultados da ação da Rosiglitazona na proliferação.

<b>Linhas celulares</b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>MM-201 MM-254 MM-358 KAI1</i>	0,1 $\mu$ M	96h	Inibição da proliferação entre 0% e 25%, em todas as linhas celulares.	(175)
	1 $\mu$ M		Inibição da proliferação entre 0% e 25%, em todas as linhas celulares.	
	10 $\mu$ M		Inibição da proliferação entre 20% e 50%, em todas as linhas celulares.	
	20 $\mu$ M		Inibição da proliferação entre 80% e 85%, em todas as linhas celulares.	
	50 $\mu$ M		Inibição da proliferação entre 85% e 90%, em todas as linhas celulares.	
A375	6,0 $\mu$ M	72h	Redução de 42,7% da proliferação.	(180)
	30 $\mu$ M		Redução de 60,2% da proliferação.	
	150 $\mu$ M		Redução de 81,3% da proliferação.	

**Tabela 4.12** - Resultados da ação da Rosiglitazona na proliferação (continuação).

<b>Linhas celulares</b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>UIISO-Mel6</i> <i>G361</i> <i>MV3</i> <i>MeWo</i> <i>Lox</i> <i>FemX-1</i>	0,3 µM	48 h	Inibição de 5%-10% da proliferação em todas as linhas celulares.	(181)
	3 µM		Inibição da proliferação até 20% em todas as linhas celulares.	
	30 µM		Inibição da proliferação até 30% em todas as linhas celulares.	
	300 µM		Inibição da proliferação até 40% em todas as linhas celulares.	
<i>MM96L</i>	5 µM	0 - 7 dias	Redução da proliferação, de modo tempo-dependente.	(187)

#### 4.4.2 Ação anticancerígena: Indução da apoptose

Duas linhas celulares de melanoma humano (MV3 e A375) foram expostas à Rosiglitazona de modo a testar os seus efeitos apoptóticos (181,190). Nas células A375 verificou-se um decréscimo de 15% no número de células viáveis, quando a concentração de Rosiglitazona foi máxima e a duração do tratamento de 24h. Em MV3, a Rosiglitazona não exerceu indução da apoptose (Tabela 4.13).

**Tabela 4.13** - Resultados da ação da Rosiglitazona na indução da apoptose.

<b>Linhas celulares</b>	<b>Máxima concentração utilizada</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>MV3</i>	0,1 µM	48h	Não se verifica aumento das células apoptóticas.	(181)
<i>A375</i>	10 µM	24h	Redução de 15% no número de células viáveis.	(190)

#### 4.4.3 Ação anticancerígena: Paragem do Ciclo celular

A linha celular de melanoma humano A375, exposta a diferentes concentrações de Rosiglitazona durante o mesmo período de tempo (72h), demonstrou que esta induz a paragem do ciclo celular de modo dose-dependente (180). Isto é, existe uma acumulação de células na fase G1 do ciclo celular e conseqüente diminuição do seu número na fase S (fase de replicação), impedindo a proliferação das células cancerígenas, sendo esta ação intensificada com o aumento da dose de Rosiglitazona (Tabela 4.14).

**Tabela 4.14** - Resultados da ação da Rosiglitazona na paragem do ciclo celular.

<b>Linha celular</b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
A375	12 µM	72h	Acumulação de 79,9% das células na fase G1 e 4,5% na fase S do ciclo celular.	(180)
	60 µM		Acumulação de 83,9% das células na fase G1 e 4,6% na fase S do ciclo celular.	
	300 µM		Acumulação de 87,6% das células na fase G1 e 3,9% na fase S do ciclo celular.	

## 4.5 Troglitazona no melanoma

### 4.5.1 Ação anticancerígena: Efeitos antiproliferativos

A exposição de linhas celulares de melanoma e melanócitos humanos e de ratinhos à Troglitazona demonstraram uma inibição da proliferação celular, sendo estes efeitos antiproliferativos intensificados de modo dose e tempo dependente (Tabela 4.15).

**Tabela 4.15** - Resultados da ação da Troglitazona na proliferação.

<b>Linhas celulares</b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
MM-201 MM-254 MM-358 KAI1	0,1 µM	96h	Inibição da proliferação entre 20%-25%, em todas as linhas celulares.	(175)
	1 µM		Inibição da proliferação entre 25%-30%, em todas as linhas celulares.	
	10 µM		Inibição da proliferação entre 30%-35%, em todas as linhas celulares.	
	20 µM		Inibição da proliferação entre 50%-60%, em todas as linhas celulares.	
	50 µM		Inibição da proliferação entre 80%-90%, em todas as linhas celulares.	
UIISO-Mel6 G361 MV3 MeWo Lox FemX-1	0,3 µM	48h	Inibição de 10%-20% da proliferação em todas as linhas celulares, sendo mais significativa em FemX-1 (30%) e MeWo (20%)	(181)
	3 µM		Inibição da proliferação até 30% em todas as linhas celulares.	
	30 µM		Inibição da proliferação até 40% em todas as linhas celulares.	
	300 µM		Inibição da proliferação até 80% em todas as linhas celulares.	
B16 HEMn-LP A375	1 µM	48h	Inibição de 25% em A375 e 10% em HEMn-LP e B16.	(185)
	5 µM		Inibição de 30% em A375 e 20% em HEMn-LP e B16.	
	10 µM		Inibição de 40% em A375 e 30% em HEMn-LP e B16.	
MM96L	10 µM	0 - 7 dias	Inibição da proliferação de modo tempo-dependente, atingindo os 40% ao 7º dia de incubação.	(187)

#### 4.5.2 Ação anticancerígena: Indução da apoptose

A exposição da linha celular de melanoma humano A375 à Troglitazona demonstrou uma redução do número de células viáveis em 60% (190). Esta redução pode ser indicativa de efeitos apoptóticos induzidos pela Troglitazona (Tabela 4.16).

**Tabela 4.16** - Resultados da ação da Troglitazona na indução da apoptose.

<b><i>Linhas celulares</i></b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
A375	10 $\mu$ M	24h	Redução de 60% no número de células viáveis.	(190)

#### 4.5.3 Ação anticancerígena: Paragem do ciclo celular

Na linha celular de melanoma humano MM-201, após a exposição de 3 dias a 50  $\mu$ M de Troglitazona, verificou-se uma acumulação de aproximadamente 80% das células na fase G1 do ciclo celular, revelando uma paragem do ciclo celular e consequente inibição da replicação das células cancerígenas (Tabela 4.17) (175).

**Tabela 4.17** - Resultados da ação da Troglitazona na paragem do ciclo celular.

<b><i>Linhas celulares</i></b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do Tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
MM-201	50 $\mu$ M	6 h – 72h	(6h) Acumulação de 40% de células na fase G1.	(175)
			(24h) Acumulação de 50% de células na fase G1.	
			(48h) Acumulação de 60% de células na fase G1.	
			(72h) Acumulação de 80% de células na fase G1.	

### 4.6 Ciglitazona no melanoma

#### 4.6.1 Ação anticancerígena: Efeitos antiproliferativos

Nas linhas celulares de melanoma humano WM35 e A375 expostas a variadas concentrações de Ciglitazona (5  $\mu$ M - 15  $\mu$ M) observou-se um aumento nos efeitos antiproliferativos a doses mais altas e durante um maior tempo de exposição, sendo que à concentração de 5  $\mu$ M não foram revelados efeitos antiproliferativos (176). Outro

estudo complementou ainda que a privação de aminoácidos específicos como a tirosina e a fenilalanina intensificam os efeitos antiproliferativos da Ciglitazona, podendo inibir até 90% da proliferação celular de modo dose-dependente (179).

A inibição da proliferação pela Ciglitazona de modo dose dependente a mais de 5  $\mu\text{M}$  foi igualmente verificada nas linhas celulares UISO-Mel6, G361, MV3, MeWo, Lox, FemX-1, WM35, 501-mel e A375 (176,181,190).

Nos melanócitos humanos expostos a concentrações de Ciglitazona entre 0,1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$  entre 60 e 96h não foram verificados efeitos antiproliferativos (190,193), no entanto, quando estes são expostos a concentrações superiores (50  $\mu\text{M}$ ) durante um maior período de tempo (6 dias) é verificada a redução da proliferação celular (177).

As células de melanoma e melanócitos de ratinho expostas a Ciglitazona demonstraram igualmente efeitos antiproliferativos de modo dose dependente (Tabela 4.18) (185).

**Tabela 4.18** – Resultados da ação da Ciglitazona na proliferação.

<b>Linhas celulares</b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
WM35 A375	5 µM	24h	Não há inibição da proliferação.	(176)
	10 µM – 15 µM		Inibição da proliferação entre 10%-20%.	
	5 µM	48h	Não há inibição da proliferação.	
	10 µM – 15 µM		Inibição da proliferação em 55%.	
	5 µM	72h	Inibição de 70% da proliferação em A375 e sem ação em WM35.	
	10 µM – 15 µM		Inibição da proliferação entre 70%-80%, em ambas as linhas celulares.	
<i>Melanócitos humanos</i>	50 µM	144h	Inibição de 37% da proliferação.	(177)
<i>UIISO-Mel6 G361 MV3 MeWo Lox FemX-1</i>	0,3 µM	48h	Inibição de 20%-25% da proliferação em todas as linhas celulares, sendo mais significativa em FemX-1 (35%) e MeWo (40%)	(181)
	3 µM		Inibição da proliferação até 40% em todas as linhas celulares.	
	30 µM		Inibição da proliferação até 50% em todas as linhas celulares.	
	300 µM		Inibição da proliferação até 90% em todas as linhas celulares.	
<i>Células de melanoma de rato: B16 Células de melanócitos de rato: melan-a</i>	1 µM	48h	Sem inibição em B16. Inibição de 15% em melan-a.	(185)
	5 µM		Inibição de 10% em B16. Inibição de 25% em melan-a.	
	10 µM		Inibição de 20% em B16. Inibição de 30% em melan-a.	
<i>Células de melanoma humano: WM35, 501 mel, A375</i>	0,1 µM	60h	Inibição da proliferação quase nula.	(190)
	1 µM		Inibição de 30% da proliferação em A375.	
	10 µM		Inibição de 40 % da proliferação em WM35 e 60% em 501 mel.	
<i>Melanócitos humanos</i>	0,1 µM – 10 µM	60h	Não há inibição da proliferação.	(190)
<i>Melanócitos humanos</i>	10 µM	96h	Não há inibição da proliferação.	(193)
A375	50 µM de Ciglitazona + Privação de tirosina e fenilalanina	24h	Inibição de 90% da proliferação celular.	(179)

#### 4.6.2 Ação anticancerígena: Indução da apoptose

A exposição da linha celular de melanoma A375 a concentrações de Ciglitazona entre 0,1 µM – 10 µM, durante 24 horas de tratamento, revelou um decréscimo no número de células viáveis, de modo dose dependente (190). Paralelamente a esta redução da viabilidade celular, observaram-se alterações morfológicas nas células, indicativas da sua progressão para a apoptose (190). Relativamente ao tempo de

exposição, não há comparação da sua influência nos efeitos apoptóticos induzidos pela Ciglitazona (Tabela 4.19).

Outro estudo realizado na linha celular de melanoma humano A375, demonstrou que a Ciglitazona, em conjunto com a privação de aminoácidos específicos como a tirosina e fenilalanina, contribui para a indução da apoptose, reduzindo o número de células viáveis face ao tratamento exclusivo com Ciglitazona e sem esta restrição alimentar (Tabela 4.19) (179).

**Tabela 4.19** - Resultados da ação da Ciglitazona na indução da apoptose.

<b>Linhas celulares</b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
A375	10 $\mu$ M	24h	Alterações morfológicas nas células.	(176)
A375	0,1 $\mu$ M – 10 $\mu$ M		Decréscimo no número de células viáveis de modo dose-dependente, atingindo os 63% aos 10 $\mu$ M.	(190)
A375	50 $\mu$ M	48h	Reduz moderadamente as células viáveis.	(179)
	50 $\mu$ M Ciglitazona + Privação de tirosina e fenilalanina		Redução de 80% das células viáveis.	

#### 4.6.3 Ação anticancerígena: Paragem do ciclo celular

A linha celular de melanoma humano A375 exposta a concentrações de Ciglitazona entre 0,1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M durante 24h, revelou um aumento da acumulação de células na fase G0/G1 e decréscimo na fase S, indicativo de paragem da fase replicativa e consequente paragem do ciclo celular. Este efeito é intensificado de modo dependente da dose (Tabela 4.20) (190).

**Tabela 4.20** - Resultados da ação da Ciglitazona na paragem do ciclo celular.

<b>Linha celular utilizada</b>	<b>Concentrações utilizadas</b>	<b>Duração do Tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
A375	0,1 $\mu$ M – 10 $\mu$ M	24h	Aumento da acumulação de células na fase G0/G1 e decréscimo na fase S, de modo dependente da dose. Aumento de 38% das células na fase G0/G1 quando tratadas com 10 $\mu$ M de ciglitazona.	(190)

## 4.7 Pioglitazona no melanoma

### 4.7.1 Ação anticancerígena: Efeitos antiproliferativos

Linhas celulares de melanoma humano UISO-Mel6, G361, MV3, MeWo, Lox e FemX-1 foram expostas a concentrações de Pioglitazona entre 0,3  $\mu\text{M}$  – 300  $\mu\text{M}$ , revelando inibição da proliferação celular de modo dependente da dose em todas as linhas celulares (Tabela 4.21) (181).

**Tabela 4.21** - Resultados da ação da Pioglitazona na proliferação celular.

Linhas celulares	Concentrações utilizadas	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<i>UISO-Mel6</i> <i>G361</i> <i>MV3</i> <i>MeWo</i> <i>Lox</i> <i>FemX-1</i>	0,3 $\mu\text{M}$	48h	Inibição de 5% da proliferação, em todas as linhas celulares.	(181)
	3 $\mu\text{M}$		Inibição da proliferação até 10%, em todas as linhas celulares.	
	30 $\mu\text{M}$		Inibição da proliferação até 20% em todas as linhas celulares.	
	300 $\mu\text{M}$		Inibição da proliferação até 30% em todas as linhas celulares.	

### 4.7.2 Ação anticancerígena: Indução da apoptose

A exposição da linha celular de melanoma humano A375 a concentrações entre 0,1  $\mu\text{M}$  – 10  $\mu\text{M}$  de Pioglitazona demonstrou um decréscimo no número de células viáveis de modo dose dependente (190).

**Tabela 4.22** - Resultados da ação da Pioglitazona na indução da apoptose.

Linhas celulares	Concentrações utilizadas	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<i>A375</i>	0,1 $\mu\text{M}$ – 10 $\mu\text{M}$	24h	Redução de 30% no número de células viáveis.	(190)

## 4.8 Ativação e/ou expressão de proteínas

Além das ações antiproliferativas, apoptóticas e indutivas da paragem do ciclo celular, as TZDs também atuam na expressão de algumas proteínas essenciais na viabilidade celular (Tabela 4.23).

A Rosiglitazona e Ciglitazona demonstraram aumentar a atividade da Tirosinase de modo dependente da dose tanto na linha celular de melanoma A375 como nos melanócitos humanos (179,185). Nestes últimos, o aumento de expressão é intensificado quando se combina Ciglitazona com Isotretinoína (retinóide) (186).

A Ciglitazona demonstrou aumentar a expressão de MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) de modo dependente da dose em melanócitos humanos, no entanto, na linha celular S91 esse aumento verificou-se apenas após 4h de exposição ao fármaco, verificando posteriormente um declínio na sua expressão às 48h (186). Pelo contrário, a ação da Ciglitazona na linha celular de melanoma SK-Mel e em A375, e a ação de Troglitazona nas células MM96L resultaram na diminuição da expressão de MITF de modo dose dependente (182) (187) (193).

Nas células A375, a exposição à Rosiglitazona resultou ainda num aumento da expressão de p53 (Gene supressor de tumor) e inibição da expressão de BCL-2 (Proteína anticancerígena) de modo proporcional ao aumento da dose (180).

Após tratamento com Rosiglitazona da linha celular Yumm1.7 de ratinho resistentes a PLX4720, injetadas em ratinho de maior idade, verificou-se um aumento da expressão da proteína Klotho, em contraste com a sua ação nessa mesma linha celular injetada em rato jovem, em que a expressão de Klotho foi diminuída.

**Tabela 4.23** - Resultados da ação das TZDs na expressão de proteínas e enzimas.

<b>Amostra</b>	<b>TZD utilizada</b>	<b>Concentração</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Linha celular de melanoma humano A375</i>	Rosiglitazona	0,4 µM	72h	Aumento da atividade de Tirosinase em cerca de 70%.	(180)
<i>Linha celular de melanoma humano A375</i>	Rosiglitazona	2 µM – 10 µM	72h	Aumento da expressão de p53.	(180)
<i>Linha celular de melanoma humano A375</i>	Rosiglitazona	2 µM – 50 µM	72h	Decréscimo na expressão de Bcl-2 de modo dependente da dose	(180)
<i>Melanócitos humanos</i>	Ciglitazona	0,1 µM - 50 µM	120h	Aumento da atividade da Tirosinase de modo dose-dependente.	(182)
<i>Melanócitos humanos</i>	Ciglitazona	50 µM	120h	Aumento da expressão de MITF.	(182)
<i>Melanócitos humanos</i>	Ciglitazona	25 µM	72h	Aumento da atividade da Tirosinase.	(186)
	Ciglitazona + Isotretinoína	25 µM + 1 µM	72h	Elevado aumento da ativação da Tirosinase.	(186)
	Isotretinoína	1 µM	72h	Não interfere na atividade da Tirosinase.	(186)
<i>Linha celular de melanoma: S91</i>	Ciglitazona	25 µM	48h	Aumento da expressão de MITF após 4h de tratamento e posterior decréscimo até às 48h.	(186)
<i>Linha celular de melanoma humano: MM96L</i>	Troglitazona	10 µM	96h	Redução da expressão de MITF.	(187)
<i>Linha celular de melanoma humano: MM96L</i>	Rosiglitazona	5 µM	96h	Não provoca alteração na expressão de MITF.	(187)
<i>Linhas celulares de melanoma: A375 e SK-Mel-28</i>	Ciglitazona	10 µM	24h	Redução na expressão de MITF, de modo dose-dependente.	(193)
<i>Yumm1.7 resistentes a PLX4720 em ratinho jovem</i>	Rosiglitazona	0,02mg/Kg a cada 2 dias e depois 10mg/Kg	10 dias	Expressão de Klotho diminuída.	(197)
<i>Yumm1.7 resistentes a PLX4720 em ratinho envelhecido</i>	Rosiglitazona		15 dias	Expressão de Klotho aumentada.	(197)

## 4.9 Indução da Pigmentação

Tanto nos melanócitos humanos como na linha celular de melanoma A375, a ação das TZDs Ciglitazona e Rosiglitazona resultaram no aumento do teor de melanina de modo dose dependente (179, 181). A Troglitazona nos melanócitos humanos provocou um ligeiro aumento no teor de melanina apenas quando foram utilizadas as concentrações mais elevadas (Tabela 4.24) (182).

**Tabela 4.24** - Resultados da ação das TZDs na indução da pigmentação.

<b>Amostra</b>	<b>TZD utilizada</b>	<b>Concentrações</b>	<b>Duração</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>Linha celular de melanoma humano A375</i>	Rosiglitazona	1,0 µM	72h	Aumento do teor de melanina em 50,92 %.	(180)
<i>Melanócitos humanos</i>	Ciglitazona	0,1 µM - 50 µM	120h	Aumento do teor de melanina de modo dose-dependente.	(182)
<i>Melanócitos humanos</i>	Troglitazona	0,1 µM - 50 µM	120h	Apenas a concentração mais alta provocou um ligeiro aumento no teor de melanina.	(182)

## 4.10 Combinação terapêutica com outros fármacos

Além da ação terapêutica das TZDs em monoterapia, algumas das publicações analisadas também incluem combinações terapêuticas com outros fármacos que podem potenciar os efeitos antiproliferativos, apoptóticos e indutores da paragem do ciclo celular das TZDs (183,186,188,189,192,197).

### 4.10.1 Ação na proliferação

Foram referidas 7 combinações terapêuticas com TZDs cuja ação exerce efeitos antiproliferativos nas células cancerígenas, 4 delas com a Rosiglitazona e 3 com a Ciglitazona (183,186,188,189,192,197).

A combinação terapêutica *Rosiglitazona + Bortezomib* (antineoplásico) estudada nas linhas celulares de melanoma humano MV3, G361 e FemX-1 demonstrou valores de

inibição da proliferação superiores aos obtidos com ambos os fármacos em monoterapia (Tabela 4.25) (183).

**Tabela 4.25** - Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + Bortezomib na proliferação celular.

		Linhas celulares	Concentrações utilizadas	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<b>Fármaco</b>	Bortezomib	MV3 G361 FemX-1	0,01 µg/ml	48h	Inibição da proliferação entre 27%-39%, em todas as linhas celulares.	(183)
<b>TZD</b>	Rosiglitazona		0,01 µg/ml		Inibição da proliferação entre 1%-11%, em todas as linhas celulares.	
<b>TZD + Fármaco</b>	Rosiglitazona + Bortezomib		0,01 µg/ml + 0,01 µg/ml		Inibição da proliferação entre 63%-71%, em todas as linhas celulares.	

Nas mesmas linhas celulares, a combinação terapêutica *Rosiglitazona + ML-I* (*Mistletoe Lectin-I*), conjugado biológico de uma enzima e lectina, exerce igualmente amplos efeitos antiproliferativos, face ao tratamento em monoterapia (Tabela 4.26) (192).

**Tabela 4.26** - Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + ML-I na proliferação celular.

		Linhas celulares	Concentrações utilizadas	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<b>Fármaco</b>	ML-I (Mistletoe Lectin-I)	MV3 G361 FemX-1	0,1 µg/mL	48h	Inibição da proliferação entre 9%-32%.	(192)
<b>TZD</b>	Rosiglitazona		0,1 µg/mL		Inibição da proliferação entre 2%-9%.	
<b>TZD + Fármaco</b>	Rosiglitazona + ML-I (Mistletoe Lectin-I)		0,1 µg/mL + 0,1 µg/mL		Inibição da proliferação entre 51%-79%.	

A combinação terapêutica *Rosiglitazona + LGD1069* (antineoplásico), estudada na linha celular A375, demonstrou ser eficaz na inibição da proliferação celular, obtendo-se uma redução de cerca de 85% dos efeitos proliferativos face aos 50% e 20% conseguidos com Rosiglitazona e LGD1069 em monoterapia, respetivamente (Tabela 4.27) (188).

**Tabela 4.27-** Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + LGD1069 na proliferação celular.

		Linhas celulares	Concentrações utilizadas	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<i>Fármaco</i>	LGD1069	A375	1 µM	9 dias	Redução de 20% da proliferação.	(188)
<i>TZD</i>	Rosiglitazona		1 µM		Redução de 50% da proliferação celular.	
<i>TZD + Fármaco</i>	Rosiglitazona + LGD1069		1 µM + 1 µM		Redução de 85% da proliferação celular.	

Nas linhas celulares Yumm1.7 resistentes a PLX4720 injetadas em ratinho envelhecido, a combinação terapêutica *Rosiglitazona + PLX4720* (inibidor BRAF) resultou na maior inibição da proliferação celular e consequente redução do crescimento do tumor, comparativamente à monoterapia com Rosiglitazona (Tabela 4.28) (197). A combinação terapêutica num ratinho jovem resultou igualmente na redução do crescimento do tumor (Tabela 4.29).

**Tabela 4.28-** Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + PLX4720 na proliferação celular em ratinho envelhecido.

		Linhas celulares	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<i>Fármaco</i>	PLX4720	Yumm1.7 resistentes a PLX4720 em ratinho envelhecido	15 dias	Não interfere no crescimento do tumor.	(197)
<i>TZD</i>	Rosiglitazona			Reduz o crescimento do tumor.	
<i>TZD + Fármaco</i>	Rosiglitazona + PLX4720			Reduz o crescimento do tumor.	

**Tabela 4.29 -** Resultados da combinação terapêutica Rosiglitazona + PLX4720 na proliferação celular em ratinho jovem.

		Linhas celulares	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<i>Fármaco</i>	PLX4720 (antineoplásico)	Yumm1.7 resistentes a PLX4720 em ratinho jovem	10 dias	Redução no crescimento do tumor.	(197)
<i>TZD</i>	Rosiglitazona			Aumento do crescimento do tumor.	
<i>TZD + Fármaco</i>	Rosiglitazona + PLX4720			Elevada redução no crescimento do tumor.	

A combinação terapêutica *Ciglitazona + Isotretinoína (retinóide)* demonstrou inibir eficazmente a proliferação de modo tempo-dependente, comparativamente à monoterapia com ambos os fármacos (Tabela 4.30) (186).

**Tabela 4.30** - Resultados da combinação terapêutica Ciglitazona + Isotretinoína (retinóide) na proliferação celular.

		Linha celular	Concentrações utilizadas	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<i>Fármaco</i>	Isotretinoína	S91 de melanoma de ratinho	1 µM	0h - 72h	Inibição da proliferação celular em até 8 vezes, de modo tempo dependente.	(186)
<i>TZD</i>	Ciglitazona		25 µM		Inibição da proliferação celular em até 3 vezes, de modo tempo dependente.	
<i>TZD + Fármaco</i>	Ciglitazona + Isotretinoína		25 µM de Ciglitazona + 1 µM de Isotretinoína		Inibição da proliferação até 13 vezes menos, de modo tempo-dependente.	

Na linha celular G361 de melanoma humano, a combinação terapêutica *Ciglitazona + IIF (6-OH-11-O-hydroxyphenantrene)*, um hidroxifenantreno, resultou numa elevada inibição da proliferação face ao tratamento em monoterapia (Tabela 4.31) (189).

**Tabela 4.31** - Resultados da combinação terapêutica Ciglitazona + IIF na proliferação celular.

		Linhas celulares	Concentrações utilizadas	Duração do tratamento	Resultados	Referência
<i>Fármaco</i>	IIF	G361	30 µM	6 dias	Inibição de 50% da proliferação.	(189)
<i>TZD</i>	Ciglitazona		30 µM		Inibição de 20% da proliferação.	
<i>TZD + Fármaco</i>	Ciglitazona + IIF		30 µM de Ciglitazona + 30 µM de IIF		Inibição de 70% da proliferação.	

#### 4.10.2 Ação na paragem do ciclo celular

A combinação terapêutica *Ciglitazona + Isotretinoína* além dos seus efeitos antiproliferativos, revelou também efeitos na indução da paragem do ciclo celular. Esta combinação testada em linhas celulares S91 de melanoma de rato resultou na acumulação de células na fase G0/G1 do ciclo celular e conseqüente decréscimo na fase S (Tabela 4.32) (186).

**Tabela 4.32** - Resultados da combinação Ciglitazona + Isotretinoína na paragem do ciclo celular.

		<b>Linha celular</b>	<b>Duração do tratamento</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<b>Fármaco</b>	Isotretinoína	S91 de melanoma de ratinho	Até 72h	Não analisados.	(186)
<b>TZD</b>	Ciglitazona			Não analisados.	
<b>TZD + Fármaco</b>	Ciglitazona + Isotretinoína			Aumento da acumulação de células na fase G0/G1 e decréscimo das células na fase S.	

#### 4.11 Estudo *in vivo*

Foi realizado um estudo *in vivo* cujo objetivo era analisar os efeitos antineoplásicos do tratamento com Ciglitazona num grupo de ratinhos injetados com células de melanoma humano A375 (190). Estes foram sujeitos a 50mg/kg de Ciglitazona por dia durante 2 semanas, tendo-se observado no final deste período que os ratinhos não desenvolveram tumores ou desenvolveram apenas tumores de pequenas dimensões, face aos ratinhos injetados com células de melanoma humano não tratados com esta TZD, que desenvolveram tumores de elevadas dimensões (190).

#### 4.12 Avaliação da resposta a novas terapêuticas

Dois dos estudos incluídos analisam a resposta a novas terapêuticas implementadas em doentes com melanoma em estado IV (Tabela 4.33) (177,183).

O estudo de *Reichle et al.* (2004) consistiu na administração diária de Pioglitazona com Rofecoxib (AINE) e Trofosfamida (antineoplásico), verificando-se uma estabilização da doença metastática em 11% dos doentes e remissão completa da patologia num doente (178).

O estudo de *Reichle et al.* (2007) consistiu na análise de duas terapêuticas, em que a primeira baseava-se apenas no antineoplásico Trofosfamida e a segunda consistia na combinação deste fármaco com Pioglitazona e Rofecoxib, tendo-se registado maiores valores de sobrevivência livre de progressão da doença nesta última terapêutica (184).

**Tabela 4.33** - Resultados de estudos de avaliação de resposta à terapêutica combinada com TZDs.

<b>Amostra</b>	<b>Método</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>19 doentes com melanoma em estado IV</i>	Administração diária de 45 mg de Pioglitazona + 25 mg de Rofecoxib durante 14 dias e a partir do 15º dia combinação com 50 mg 3x/dia de Trofosfamida.	Estabilização da doença durante mais de 6 meses em 11% dos doentes e remissão completa num doente.	(178)
<i>76 doentes com melanoma em estado IV</i>	Análise de 2 terapêuticas: Terapêutica A – 50 mg Trofosfamida 3x/dia Terapêutica B – 50 mg Trofosfamida + 60 mg Pioglitazona + 25mg Rofecoxib 1x/dia	A sobrevivência livre de progressão da doença é superior na terapêutica B.	(184)

### 4.13 Risco de desenvolvimento de cancro associado à utilização de TZDs

De modo a avaliar o efeito da terapêutica com alguns antidiabéticos orais na incidência de vários tipos de neoplasias, incluindo o melanoma, foram realizados estudos com 3 coortes de doentes diabéticos (190,193,195). Em dois dos estudos os doentes receberam tratamento com Pioglitazona em monoterapia e noutra receberam Metformina, Rosiglitazona ou Glibenclamida. Neste último, verificou-se que a utilização terapêutica de Metformina não apresentou vantagens na prevenção das neoplasias face ao tratamento com Rosiglitazona, uma vez que a diferença na incidência de cancro entre os doentes expostos aos dois fármacos não foi significativa (190,193,195). Relativamente ao risco associado ao tratamento com Pioglitazona, não foi possível estabelecer uma associação direta entre a sua exposição e o desenvolvimento do melanoma (Tabela 4.34) (196).

**Tabela 4.34** - Resultados de estudos de avaliação do risco de desenvolvimento de cancro associado a Antidiabéticos orais.

<b>Amostra</b>	<b>Objetivo</b>	<b>Duração da avaliação</b>	<b>Resultados</b>	<b>Referência</b>
<i>39 000 pessoas com diabetes mellitus tipo 2 tratadas com Metformina, Rosiglitazona ou Glibenclamida, em monoterapia</i>	Avaliar a incidência de ocorrência de neoplasias associadas aos diferentes tratamentos.	6 anos	A utilização terapêutica da Metformina não apresenta nenhuma vantagem na prevenção do risco de neoplasias, face à Rosiglitazona. No entanto, a Glibenclamida poderá ter uma menor ação nesta prevenção.	(191)
<i>252467 doentes diabéticos tratadas com Pioglitazona</i>	Avaliar a incidência de neoplasias associadas ao tratamento com Pioglitazona.	8 anos	Não foi estabelecida uma associação entre o uso de Pioglitazona e o risco de incidência de cancro.	(194)
<i>34181 doentes diabéticos tratados com Pioglitazona e 158918 doentes diabéticos nunca expostos a esta TZD</i>	Avaliar a incidência de neoplasias associadas ao tratamento com Pioglitazona.	8 anos	Não foi estabelecida uma associação entre o uso de Pioglitazona e o risco de desenvolvimento de cancro, incluindo o melanoma.	(196)

## 5. Discussão

Apesar de existirem terapêuticas direcionadas às mutações específicas no melanoma, a resistência adquirida pelos doentes ao tratamento constitui uma barreira ao sucesso dos tratamentos (29). Nesta revisão sistemática foram analisadas publicações que avaliam a utilização das Tiazolidinedionas (TZDs) no melanoma, numa tentativa de sustentar a sua potencial aplicabilidade na terapêutica desta patologia.

As publicações acerca desta temática tiveram o seu auge no ano de 2009, sugerindo que este tenha sido um ano de maior interesse na investigação da aplicação terapêutica das TZDs no melanoma.

Nesta revisão sistemática, existem linhas celulares mais frequentemente utilizadas comparativamente a outras, nomeadamente A375, G361 e Sk-mel28, identificadas em mais de um artigo selecionado. Este facto pode dever-se a que estas células são as que transmitem com maior precisão o perfil de transcrição cancerígeno, sendo por isso de maior interesse na investigação antitumoral (199). Deste modo, surgem como as linhas mais repetidas entre as publicações.

### 5.1 Ação antiproliferativa das TZDs

Células UISO-Mel6, G361, MV3, MeWo, Lox e FemX-1, foram expostas à mesma gama de concentrações (0,3  $\mu\text{M}$  – 300  $\mu\text{M}$ ) de Troglitazona, Ciglitazona, Rosiglitazona e Pioglitazona, durante o mesmo tempo de incubação (48h) (181). Verificou-se que os efeitos antiproliferativos nestas células são intensificados com o aumento da dose, obtendo-se para todas as TZDs, maior inibição no crescimento do tumor à concentração de 300  $\mu\text{M}$ . A TZD com maiores efeitos antiproliferativos nestas células é a Ciglitazona com 90% de inibição da proliferação, seguida da Troglitazona com 80% da inibição, Rosiglitazona com 40% e Pioglitazona com 30%.

Nas células MM-201, MM-254, MM-358 e KAI1 foram testadas a Rosiglitazona e Troglitazona a concentrações entre 0,1 $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , verificando-se a maior inibição da proliferação (90%) com 50  $\mu\text{M}$  de Rosiglitazona face aos 75% obtidos com a mesma dose de Troglitazona, a iguais tempos de incubação (96h) (175). Este dado sugere que a

Rosiglitazona inibe mais eficazmente a proliferação nestas linhas celulares, evidência comprovada pelo facto de ter sido descrita como o o agonista mais potente de PPAR $\gamma$ , (200) sendo consequentemente a TZD com maior ação antiproliferativa (175).

As células A375 e WM35 foram expostas a concentrações de Ciglitazona entre 5  $\mu$ M e 15  $\mu$ M, observando-se os seus efeitos antiproliferativos às 24h, 48h e 72h de tratamento (176). Verificou-se a ocorrência de ação inibitória da proliferação de modo dependente da dose a concentrações superiores a 5  $\mu$ M de Ciglitazona, atingindo a inibição máxima às 72h de tratamento (inibição de 80% da proliferação) (176). Estes dados vão de encontro aos resultados observados no estudo *in vivo*. Este foi realizado com células de melanoma humano A375 injetadas em ratinhos onde o efeito antiproliferativo da Ciglitazona foi demonstrado, verificando-se a diminuição do crescimento do tumor face aos ratinhos não tratados com esta TZD, cujos tumores desenvolvidos tinham elevadas dimensões (190). Relativamente aos resultados obtidos no estudo *in vivo*, uma vez que a Ciglitazona foi a única TZD utilizada, não é possível a comparação dos seus efeitos com outras TZDs.

Nos melanócitos humanos, não foi verificada inibição da proliferação quando estes foram sujeitos a concentrações entre 0,1  $\mu$ M – 10  $\mu$ M de Ciglitazona entre 60h e 96h, tendo sido necessário 50  $\mu$ M de Ciglitazona durante um período de incubação de 144h para a observação desse efeito (177,190,193). Estes dados, além de sugerirem que a Ciglitazona necessita de doses superiores para exercer a sua ação antiproliferativa nesta linha celular, pode indicar que as doses e tempo de exposição necessários para a inibição do crescimento celular nos melanócitos sejam superiores às necessárias nas linhas celulares de melanoma humano. Complementando com este facto, estudos anteriores efetuados a doentes diabéticos tratados com esta TZD, não demonstraram alterações na pigmentação da pele, sugerindo que esta classe de fármacos apesar de inibir o crescimento tumoral das células de melanoma, poderá não exercer um grande impacto no funcionamento normal dos melanócitos (201).

A linha celular MM96L, após exposição à Rosiglitazona (5  $\mu$ M) e Troglitazona (10  $\mu$ M) durante igual tempo de tratamento (7 dias), demonstrou maiores efeitos antiproliferativos nas células tratadas com Troglitazona, sugerindo que nesta linha celular a maior concentração de TZD é benéfica na potenciação dos efeitos antiproliferativos (187).

## 5.2 Ação apoptótica das TZDs

Foram analisados os efeitos apoptóticos de todas as TZDs nas células A375 e MV3. Observou-se que nas células A375, todas as TZDs exercem ação apoptótica, de modo dose dependente (179,193). No entanto, apesar das concentrações utilizadas terem sido as mesmas (entre 0,1  $\mu\text{M}$  e 10  $\mu\text{M}$ , durante 24h), os resultados obtidos diferem entre si, sendo mais intensos nas células tratadas com Ciglitazona e Troglitazona. Ou seja, estes resultados apoptóticos, medidos através da redução do número de células cancerígenas viáveis, acompanhadas pelas respectivas alterações morfológicas, atingiram o valor máximo de 63% e 60% (Ciglitazona e Troglitazona, respetivamente), seguido de 30% com Pioglitazona e 15% com Rosiglitazona.

Nas células MV3, foi analisada a ação de 0,1  $\mu\text{M}$  de Rosiglitazona (48h) no número de células apoptóticas (181). Tal como nas células A375, esta concentração não levou à apoptose nesta linha celular, apesar dos diferentes tempos de incubação (24h em A375), sugerindo que a utilização de doses mais elevadas poderá exercer maiores efeitos comparativamente ao aumento do tempo de exposição.

## 5.3 Ação das TZDs no ciclo celular

Na linha celular de melanoma A375, foi analisada a ação da Rosiglitazona e Ciglitazona, obtendo-se em ambos os casos uma indução da paragem do ciclo celular de modo dependente da dose (180,190). Comparando os resultados obtidos com ambas TZDs na mesma linha celular (A375), a doses semelhantes, verifica-se um maior efeito na ação da Rosiglitazona, em que 72h de exposição a 12  $\mu\text{M}$ , provocou um aumento de 79,9% na acumulação de células na fase G1, face aos 38% obtidos pelos 10  $\mu\text{M}$  de Ciglitazona, após incubação de 24h. Esta diferença pode ser atribuída aos diferentes tempos de exposição, sugerindo que um tratamento mais prolongado tenha um maior impacto na apoptose celular.

Nas células MM-201, foi analisada a ação de 50  $\mu\text{M}$  de Troglitazona durante 6h, 24h, 48h e 72h de tratamento, verificando-se um valor máximo de aumento na acumulação de células na fase G1 de modo tempo-dependente, às 72h do tratamento (175). Este maior efeito indutor da paragem do ciclo celular da Rosiglitazona a doses mais

baixas, face à Troglitazona, está de acordo com o facto da Rosiglitazona ser um agonista mais potente de PPAR $\gamma$  (202).

## 5.4 Ação das TZDs na ativação e/ou expressão de proteínas

A expressão e ativação de algumas proteínas/enzimas está estreitamente relacionada com a ativação de algumas vias importantes na manutenção dos processos cancerígenos (203). Nesta revisão sistemática, 25% dos estudos incluídos analisam a ação das TZDs nesta regulação.

### 5.4.1 Expressão de MITF e atividade da Tirosinase

MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*), um fator de transcrição específico para melanócitos, é responsável pela regulação da transcrição dos genes envolvidos na síntese de melanina, como a Tirosinase, sendo indispensável na diferenciação, proliferação e sobrevivência dos melanócitos (204).

As células MM96L expostas a 5  $\mu$ M de Rosiglitazona durante um período de incubação de 96h, não demonstraram qualquer alteração na expressão de MITF. No entanto, as mesmas células quando expostas ao dobro da concentração de Troglitazona durante o mesmo período de incubação, sofrem uma diminuição na sua expressão (187). Esta diferença sugere que uma maior concentração de TZD poderá exercer maior efeito na expressão de MITF.

Em células S91 expostas à Ciglitazona (25  $\mu$ M) verificou-se um aumento da expressão de MITF após 4h de tratamento, observando-se posteriormente um decréscimo até às 48h (186). A exposição de células A375 e Sk-mel28 à Ciglitazona durante 24h, resultou igualmente na diminuição da expressão de MITF (193), sugerindo que a exposição prolongada de Troglitazona e Ciglitazona nas diferentes linhas celulares conduzem a uma diminuição dos níveis de expressão de MITF.

MITF, além de regular uma variedade de genes envolvidos na pigmentação, atua como regulador do desenvolvimento dos melanócitos e precursor do melanoma, através da ativação da expressão de genes antiapoptóticos como BCL2A1, BCL2 e BIRC7 (205), sendo a sua expressão aumentada um fator de risco à sobrevivência do doente (205,206). Deste modo, a redução na expressão de MITF obtida pelo maior tempo de exposição à Troglitazona e Ciglitazona (96h e 24h) (187,193), e o aumento da dose de TZD utilizada,

como demonstrado por *Smith et. al* (2009) (187), poderão contribuir para o sucesso do tratamento.

A Tirosinase é a enzima responsável pela hidroxilação da tirosina no primeiro passo de síntese de melanina, sendo encontrada nos melanócitos e exercendo uma função indispensável na melanogênese (208). Estudos *in vivo* comprovaram que apesar da principal função da melanina ser a proteção contra a radiação UV, esta também regula a homeostase da epiderme e o comportamento do melanoma. Isto é, apesar de conferir proteção UV aos melanócitos, acelera o tempo de progressão do melanoma, por mecanismos ainda em avaliação (209).

Verificou-se que tanto na linha celular de melanoma A375 como nos melanócitos humanos, a Rosiglitazona e Ciglitazona atuam de modo dose dependente no aumento da atividade da Tirosinase, respetivamente (179,181). Este aumento na atividade da Tirosinase nos melanócitos humanos, vai de encontro ao aumento da expressão de MITF verificada nos melanócitos quando sujeitos à mesma TZD (182), uma vez que MITF modula a atividade desta enzima (204).

Deste modo, esta enzima Tirosinase poderá ser considerada uma enzima alvo para a ativação de fármacos anticancerígenos, através da ação no decréscimo da sua expressão, conseqüente redução na síntese de melanina e contribuição para a eficácia terapêutica (210).

#### 5.4.2 Expressão de p53 e Bcl-2

O gene supressor de tumor p53, atua na regulação da progressão do ciclo celular e expressão de várias proteínas, sendo a paragem do ciclo celular e a indução da apoptose as suas principais ações no processo cancerígeno (210,211). Este está envolvido em diferentes pontos de controlo do metabolismo e sinalização celular, podendo regular proteínas e enzimas importantes na resposta celular ao cancro como Bcl-2, proteínas antiapoptóticas reguladoras da permeabilidade da membrana mitocondrial (212,213).

Nos estudos incluídos, verificou-se que o nível de expressão de p53 aumentou 72h após o tratamento com Rosiglitazona na linha celular de melanoma A375, única em que este parâmetro foi analisado (180). A mesma linha celular foi exposta a Rosiglitazona sob as mesmas condições de tempo e concentração, verificando-se a redução

significativa da expressão da proteína Bcl-2 (180). Estes factos concordantes revelam que a Rosiglitazona atua em A375 de forma indutora da apoptose, através da indução do gene supressor de tumor p53 e repressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, contribuindo para o sucesso terapêutico das TZDs no melanoma (215).

### 5.4.3 Expressão de Klotho

Klotho é uma proteína relacionada com a idade, estando os seus níveis de expressão diminuídos ao longo da vida, e sendo por isso considerada uma proteína supressora do envelhecimento (197). Esta expressa-se principalmente nos rins e cérebro, e uma mutação no seu gene pode causar fenótipos extensos de envelhecimento (216). No estudo de *Behera et al* (2017), foi analisada a expressão desta proteína em ratinhos jovens resistentes a PLX4720 (Vemurafenib) expostos à Rosiglitazona e em ratinhos de maior idade, igualmente resistentes a PLX4720 (Vemurafenib), sob as mesmas condições de tratamento (197). Observou-se que nos ratinhos mais velhos a expressão da proteína Klotho aumentou com a exposição a esta TZD, enquanto nos ratinhos jovens houve um decréscimo na sua expressão. Estes dados, permitem inferir que a Rosiglitazona poderá ser fundamental na terapêutica direcionada do melanoma em doentes idosos, atuando no combate à maior incidência desta doença nas populações mais envelhecidas.

### 5.4.5 TZDs como indutoras da pigmentação

Verificou-se que nas células A375 expostas a 1,0  $\mu\text{M}$  de Rosiglitazona durante 72h, o teor de melanina aumentou em 50,92% (180). Nos melanócitos humanos incubados com iguais concentrações de Ciglitazona e Troglitazona (0,1  $\mu\text{M}$  - 50  $\mu\text{M}$ ) durante igual tempo de tratamento, foi também observada maior indução da pigmentação. No entanto, no tratamento com Troglitazona apenas a concentração mais elevada de fármaco (50  $\mu\text{M}$ ) provocou um ligeiro aumento no teor de melanina (10%)(182). Deste modo, observa-se que entre as duas TZDs utilizadas, a Ciglitazona poderá apresentar um maior efeito na indução da pigmentação.

Este aumento da pigmentação é concordante com o efeito anteriormente observado da Rosiglitazona e Ciglitazona no aumento da expressão da Tirosinase, uma

vez que esta é a enzima responsável pela hidroxilação da tirosina e consequente síntese de melanina (209).

## 5.6 Expressão de PPAR $\gamma$

Apesar dos mecanismos de ativação das Tiazolidinedionas ainda não estarem esclarecidos e haverem evidências que sustentam a dualidade da sua ativação através de mecanismos dependentes ou independentes da ativação de PPAR $\gamma$ , sendo as TZDs agonistas deste recetor, a avaliação dos seus níveis de expressão nas diferentes linhas celulares é um ponto fundamental na aplicação desta terapêutica (128).

Em 41,7% dos estudos incluídos, foi avaliada a expressão de PPAR $\gamma$  em 25 linhas celulares de melanoma, tanto de origem humana como de ratinho (175,176,180,181,185–187,190,195,198). Verificou-se que todas as linhas celulares analisadas apresentavam expressão de PPAR $\gamma$ , independentemente da exposição a TZD, com exceção de A2058. De entre as linhas celulares analisadas, WM35 e A375 foram colocadas sob incubação com TZDs e avaliada a expressão de PPAR $\gamma$  (176), não demonstrando alterações na expressão de PPAR $\gamma$  quando expostas à ação da Ciglitazona (176). No entanto, quando as células A375 foram expostas à Rosiglitazona no estudo de *Liu et al.* (2006), e à Ciglitazona e Pioglitazona no estudo de *Botton et al.* (2009), verificou-se um aumento na expressão de PPAR $\gamma$  de modo dose-dependente (180,190). Estes dados vão de encontro à dualidade de ativação das Tiazolidinedionas, sendo que parecem atuar por mecanismos dependentes e independentes da ativação de PPAR $\gamma$ , podendo interferir ou não no aumento da sua expressão (128).

## 5.7 Combinações terapêuticas

Nas células MV3, G361 e FemX-1, a combinação de 0,01  $\mu\text{g/mL}$  de Bortezomib (antineoplásico) ou 0,1  $\mu\text{g/mL}$  de ML-I (*Mistletoe Lectin-I*) (183,192), com a Rosiglitazona (0,01  $\mu\text{g/mL}$  e 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente), resultou na intensificação dos seus efeitos antiproliferativos face à aplicação dos fármacos em monoterapia (inibição da proliferação 39% Bortezomib vs 71% Bortezomib + Rosiglitazona; 32% ML-1 vs 79% ML-1 +

Rosiglitazona). Apesar das concentrações utilizadas não terem sido iguais, os resultados na inibição da proliferação são semelhantes, sugerindo que a combinação terapêutica de Rosiglitazona com Bortezomib poderá ser mais vantajosa, uma vez que são necessárias menores doses de ambos os fármacos para a obtenção desse efeito.

A combinação terapêutica de LGD1069 (antineoplásico) com Rosiglitazona, nas células A375 injetadas num modelo de ratinho demonstrou uma inibição de 85% da proliferação celular, face aos 50% obtidos pela ação em monoterapia da Rosiglitazona, comprovando assim a inibição do crescimento e diferenciação num modelo *in vivo* (188).

A combinação terapêutica Rosiglitazona + PLX4720 testada em células Yumm1.7, injetadas em ratinhos envelhecidos resistentes a Vemurafenib e em ratinhos jovens sob as mesmas condições, demonstrou contribuir eficazmente em ambos os casos para a redução do crescimento do tumor, face à monoterapia. No entanto, no ambiente jovem, o tratamento exclusivo com Rosiglitazona provocou o aumento do crescimento do tumor, facto não observado na monoterapia com esta TZD nos ratinhos mais velhos (197). Estes dados sugerem que a Rosiglitazona necessita de um ambiente envelhecido para exercer os seus efeitos antiproliferativos, quando aplicada em monoterapia.

A combinação de Isotretinoína (retinóide) ou IIF (hidrocarboneto aromático) com Ciglitazona, nas células S91 e G361, respetivamente, resultaram num maior efeito na inibição da proliferação celular, face ao tratamento em monoterapia (186,189). No entanto, a combinação deste retinóide com a Ciglitazona em células S91, além de demonstrar maior inibição da proliferação face à monoterapia, também resulta no aumento da acumulação de células na fase G0 do ciclo celular, impedindo a replicação do tumor. Deste modo, esta combinação terapêutica parece ser a mais vantajosa em todas as combinações observadas, uma vez que potencia os efeitos anticancerígenos da Ciglitazona através de duas ações, a inibição da proliferação celular e a paragem do ciclo celular.

No estudo de *Núñez et al.* (2005) observou-se que uma dieta restrita de determinados aminoácidos como a tirosina e fenilalanina, em concomitância com a Ciglitazona, aumenta os efeitos antiproliferativos e apoptóticos desta TZD nas células A375 (217). No entanto, não é possível inferir acerca da extensão desta conclusão para as restantes TZDs e linhas celulares, uma vez que não foram analisadas.

O estudo de *Reiche et al.* (2004) e (2007) realizados em doentes com melanoma em estadio IV, comprovou o benefício terapêutico da combinação de Pioglitazona com Trofosfamida (antineoplásico) e Rofecoxib (AINEs) na estabilização do estado mais grave da doença, conduzindo à remissão completa do tumor (178,184). Estes dados sugerem que a quimioterapia administrada simultaneamente com inibidores da COX-2 (Rofecoxib) e agonistas de PPAR $\gamma$  poderá aumentar o sucesso da terapêutica a longo prazo em doentes com melanoma em estado IV.

Evidências anteriores de que a Pioglitazona poderia estar associada ao aumento da incidência de cancro da bexiga e de outro tipo de neoplasias (218), suscitou o estudo de *Lewis et al* (2015) onde foi demonstrado que em doentes com DM2 expostos à Pioglitazona durante longos períodos de tempo, não apresentavam risco de desenvolvimento do melanoma (196). No entanto, verificou-se um aumento da incidência de cancro da próstata e pâncreas associado a esta TZD que, apesar de ainda necessitar de mais investigações, poderá indicar a preferível substituição de Pioglitazona por outra Tiazolidinediona.

## 6. Conclusão

Os resultados obtidos nesta revisão sistemática permitem sustentar a possibilidade da aplicação terapêutica das Tiazolidinedionas (TZDs) no melanoma. Através deste trabalho conclui-se que:

- Todos os artigos analisados foram publicados entre os anos de 2002 e 2018, tendo-se verificado um pico de publicações no ano de 2009.
- Dos 24 estudos incluídos, 79,2% desenvolvem o estudo em culturas celulares, sendo as células mais usadas, as linhas celulares A375 e G361, e melanócitos humanos; os restantes correspondem a 5 estudos clínicos.
- Os principais efeitos das TZDs sobre as células cancerígenas do melanoma incidem sobre a inibição da proliferação celular, a paragem do ciclo celular, impedindo a replicação cancerígena, e a indução da apoptose.
- As TZDs parecem contribuir para a atividade antitumoral através da regulação da ativação e/ou expressão de proteínas como a tirosinase, MITF, Bcl-2, Klotho e o gene supressor de tumores p53.
- O uso da Rosiglitazona resulta no aumento da proteína Klotho, que apresenta níveis reduzidos no envelhecimento, surgindo como uma estratégia terapêutica nos doentes idosos que desenvolvem resistência a Vemurafenib.
- Combinações terapêuticas como a associação de antineoplásicos, Isotretinoína e hidrocarbonetos aromáticos às TZDs, ou a complementaridade de tratamento farmacológico com uma dieta restrita em aminoácidos específicos (fenilalanina e tirosina), podem potenciar os efeitos anticancerígenos das TZDs.
- A administração conjunta de inibidores da COX-2, como o Rofecoxib, com as TZDs pode aumentar o sucesso da terapêutica a longo prazo em doentes com melanoma em estado IV, o estado mais grave da doença.

## 7. Bibliografia

1. World Cancer Research Fund International [Internet]. [cited 2019 Sep 8]. Available from: <https://www.wcrf.org/>.
2. Pitcovski J, Shahar E, Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. Vol. 115, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 36–49.
3. Demierre M-F. Epidemiology and Prevention of Cutaneous Melanoma. *Curr Treat Options Oncol*. 2006.
4. Force J, Salama A. First-line treatment of metastatic melanoma: role of nivolumab. *ImmunoTargets Ther*. 2017 Feb;Volume 6:1–10.
5. Tsao H, Chin L, Garraway LA. Melanoma: from mutations to medicine. *GENES Dev*. 2012.
6. Heppt M V., Steeb T, Schlager JG, Rosumeck S, Dressler C, Ruzicka T, et al. Immune checkpoint blockade for unresectable or metastatic uveal melanoma: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017 Nov;60:44–52.
7. Heppt M V., Roesch A, Weide B, Gutzmer R, Meier F, Loquai C, et al. Prognostic factors and treatment outcomes in 444 patients with mucosal melanoma. *Eur J Cancer*. 2017 Aug;81:36–44.
8. Padilla-Vázquez F, Escobar-de la Garma VH, Ayala-Arcipreste A, Mendizábal-Guerra R, Cuesta-Mejía T. Melanocitoma y melanomatosis meníngea, lesiones similares pero diferentes. *Cir Cir*. 2017 May;85(3):273–8.
9. Jhappan C, Noonan FP, Merlino G. Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3099–112.
10. Aitken J, Welch J, Duffy D, Milligan A, Green A, Martin N, et al. CDKN2A Variants in a Population-Based Sample of Queensland Families With Melanoma. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1999 Mar 3;91(5):446–52.
11. Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3042–52.
12. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002 Apr;146(s61):1–6.
13. Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept*. 2017 Apr 30;7(2).
14. Balch CM, Buzaid AC, Soong S-J, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, et al. Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. *J Clin Oncol*. 2001 Aug 15;19(16):3635–48.
15. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, et al. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 26;363(9):809–19.

16. MacKie RM. Malignant melanoma: clinical variants and prognostic indicators. *Clinical dermatology* . Review article. *Clin Exp Dermatol*. 2000 Nov;25(6):471–5.
17. Lens M. Current clinical overview of cutaneous melanoma. *Br J Nurs*. 2008.
18. Bataille V, Newton Bishop J, Sasieni P, Swerdlow A, Pinney E, Griffiths K, et al. Risk of cutaneous melanoma in relation to the numbers, types and sites of naevi: a case-control study. *Br J Cancer*. 1996.
19. Cohen LM. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1995 Dec;33(6):923–36.
20. Michielin O, Hoeller C. Gaining momentum: New options and opportunities for the treatment of advanced melanoma. *Cancer Treat Rev*. 2015 Sep;41(8):660–70.
21. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer*. 2016 Aug 1;63:201–17.
22. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993. *J Clin Oncol*. 1999 Jul;17(7):2105–2105.
23. Bomar L, Senithilnathan A, Ahn C. Systemic Therapies for Advanced Melanoma. *Dermatol Clin*. 2019 Oct;37(4):409–23.
24. Li J, Zhang Y, Tao J. Targeted Nanoparticles for Drug Delivery to Melanoma: From Bench to Bedside. In: *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier Inc.; 2016. p. 203–15.
25. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: An overview. Vol. 23, *ONCOLOGY*. 2009. p. 488–96.
26. Hauschild A, Weichenthal M, Balda B-R, Becker JC, Wolff HH, Tilgen W, et al. Prospective Randomized Trial of Interferon Alfa-2b and Interleukin-2 as Adjuvant Treatment for Resected Intermediate- and High-Risk Primary Melanoma Without Clinically Detectable Node Metastasis. *J Clin Oncol*. 2003 Aug;21(15):2883–8.
27. Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. Vol. 34, *Trends in Pharmacological Sciences*. 2013. p. 656–66.
28. Eggermont AMM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*. 2004;40(12):1825–36.
29. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2507–16.
30. Duprat Neto JP, Mauro AC arolin. C, Molina AS, Nishinari K, Zurstrassen CE, Costa OF, et al. Isolated limb infusion with hyperthermia and chemotherapy for advanced limb malignancy: factors influencing toxicity. *ANZ J Surg*. 2014 Sep 1;84(9):677–82.

31. Winder M, Virós A. Mechanisms of drug resistance in Melanoma. In: Handbook of Experimental Pharmacology. Springer New York LLC; 2018. p. 91–108.
32. Wan PT., Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, et al. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. *Cell*. 2004 Mar;116(6):855–67.
33. Solus JF, Kraft S. Ras, Raf, and MAP Kinase in Melanoma. *Adv Anat Pathol*. 2013 Jul;20(4):217–26.
34. Dossett LA, Kudchadkar RR, Zager JS. BRAF and MEK inhibition in melanoma. *Expert Opin Drug Saf*. 2015 Apr 3;14(4):559–70.
35. Greaves WO, Verma S, Patel KP, Davies MA, Barkoh BA, Galbincea JM, et al. Frequency and Spectrum of BRAF Mutations in a Retrospective, Single-Institution Study of 1112 Cases of Melanoma. *J Mol Diagnostics*. 2013 Mar;15(2):220–6.
36. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: a move toward precision medicine. *Mod Pathol*. 2018 Jan 17;31(1):24–38.
37. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 9;417(6892):949–54.
38. Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, et al. Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2012 Jul 12;367(2):107–14.
39. European Medicines Agency | [Internet]. [cited 2019 Sep 21]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en>.
40. Graf NP, Koelblinger P, Galliker N, Conrad S, Barysch M, Mangana J, et al. The spectrum of cutaneous adverse events during encorafenib and binimetinib treatment in B-rapidly accelerated fibrosarcoma-mutated advanced melanoma. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2019 Apr 13;33(4):686–92.
41. Aplin AE, Kaplan FM, Shao Y. Mechanisms of Resistance to RAF Inhibitors in Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2011 Sep;131(9):1817–20.
42. Flaherty KT, Infante JR, Daud A, Gonzalez R, Kefford RF, Sosman J, et al. Combined BRAF and MEK Inhibition in Melanoma with BRAF V600 Mutations. *N Engl J Med*. 2012 Nov;367(18):1694–703.
43. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib in patients with BRAF -mutant melanoma (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 May;19(5):603–15.
44. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Maio M, et al. Combined Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutated Melanoma. *N Engl J Med*. 2014 Nov 13;371(20):1867–76.
45. Hauschild A, Grob JJ, Demidov L V., Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label,

- phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2012;380(9839):358–65.
46. Kim KB, Flaherty KT, Chapman PB, Sosman JA, Ribas A, McArthur GA, et al. Pattern and outcome of disease progression in phase I study of vemurafenib in patients with metastatic melanoma (MM). *J Clin Oncol*. 2011 May 20;29(15\_suppl):8519–8519.
  47. Shi H, Hugo W, Kong X, Hong A, Koya RC, Moriceau G, et al. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy. *Cancer Discov*. 2014 Jan;4(1).
  48. Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, Infante JR, Ribas A, Sosman JA, et al. Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol*. 2013 Feb 1;31(4):482–9.
  49. Chen G, Davies MA. Targeted Therapy Resistance Mechanisms and Therapeutic Implications in Melanoma. Vol. 28, *Hematology/Oncology Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2014. p. 523–36.
  50. Rizos H, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Fung C, Hyman J, et al. BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: Spectrum and clinical impact. *Clin Cancer Res*. 2014 Apr 1;20(7):1965–77.
  51. Shi H, Moriceau G, Kong X, Lee MK, Lee H, Koya RC, et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies V600E B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. *Nat Commun*. 2012;3.
  52. Montagut C, Sharma S V., Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, et al. Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer Res*. 2008 Jun 15;68(12):4853–61.
  53. Paraiso KHT, Fedorenko I V, Cantini LP, Munko AC, Hall M, Sondak VK, et al. Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *Br J Cancer*. 2010 Jun 8;102(12):1724–30.
  54. Greger JG, Eastman SD, Zhang V, Bleam MR, Hughes AM, Smitheman KN, et al. Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR Inhibitors Overcome Acquired Resistance to the BRAF Inhibitor GSK2118436 Dabrafenib, Mediated by NRAS or MEK Mutations. *Mol Cancer Ther*. 2012 Apr 1;11(4):909–20.
  55. Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved Overall Survival in Melanoma with Combined Dabrafenib and Trametinib. *N Engl J Med*. 2015 Jan 1;372(1):30–9.
  56. Carlos G, Anforth R, Clements A, Menzies AM, Carlino MS, Chou S, et al. Cutaneous Toxic Effects of BRAF Inhibitors Alone and in Combination With MEK Inhibitors for Metastatic Melanoma. *JAMA Dermatology*. 2015 Oct 1;151(10):1103.
  57. Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2014 Mar;383(9919):816–27.
  58. Hamid O, Robert C, Daud A, Hodi FS, Hwu W-J, Kefford R, et al. Safety and Tumor

- Responses with Lambrolizumab (Anti-PD-1) in Melanoma. *N Engl J Med*. 2013 Jul 11;369(2):134–44.
59. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
  60. Tarhini A, Lo E, Minor DR. Releasing the Brake on the Immune System: Ipilimumab in Melanoma and Other Tumors. *Cancer Biother Radiopharm*. 2010 Dec;25(6):601–13.
  61. Chan D V, Gibson HM, Aufiero BM, Wilson AJ, Hafner MS, Mi Q-S, et al. Differential CTLA-4 expression in human CD4+ versus CD8+ T cells is associated with increased NFAT1 and inhibition of CD4+ proliferation. *Genes Immun*. 2014 Jan 31;15(1):25–32.
  62. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without *BRAF* Mutation. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):320–30.
  63. Larkin J, Minor D, D'Angelo S, Neyns B, Smylie M, Miller WH, et al. Overall Survival in Patients With Advanced Melanoma Who Received Nivolumab Versus Investigator's Choice Chemotherapy in CheckMate 037: A Randomized, Controlled, Open-Label Phase III Trial. *J Clin Oncol*. 2018 Feb;36(4):383–90.
  64. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015 Jul 2;373(1):23–34.
  65. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Cowey CL, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018 Nov;19(11):1480–92.
  66. Rosenberg SA. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *J Immunol*. 2014 Jun 15;192(12):5451–8.
  67. Kaufman HL, Kirkwood JM, Hodi FS, Agarwala S, Amatruda T, Bines SD, et al. The Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumour immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013 Oct 27;10(10):588–98.
  68. Achkar T, Tarhini AA. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. *J Hematol Oncol*. 2017 Dec 24;10(1):88.
  69. Kirkwood JM, Richards T, Zarour HM, Sosman J, Ernstoff M, Whiteside TL, et al. Immunomodulatory effects of high-dose and low-dose interferon  $\gamma$ 2b in patients with high-risk resected melanoma. *Cancer*. 2002 Sep 1;95(5):1101–12.
  70. Wang W, Edington HD, Rao UNM, Jukic DM, Land SR, Ferrone S, et al. Modulation of Signal Transducers and Activators of Transcription 1 and 3 Signaling in Melanoma by High-Dose IFN  $\gamma$ 2b. *Clin Cancer Res*. 2007 Mar 1;13(5):1523–31.

71. Paquette RL, Hsu NC, Kiertscher SM, Park AN, Tran L, Roth MD, et al. Interferon- $\alpha$  and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol.* 1998 Sep;64(3):358–67.
72. Liu BL, Robinson M, Han Z-Q, Branston RH, English C, Reay P, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther.* 2003 Feb 10;10(4):292–303.
73. Ott PA, Hodi FS. Talmogene Laherparepvec for the Treatment of Advanced Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2016 Jul 1;22(13):3127–31.
74. Andtbacka RHI, Kaufman HL, Collichio F, Amatruda T, Senzer N, Chesney J, et al. Talmogene Laherparepvec Improves Durable Response Rate in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol.* 2015 Sep;33(25):2780–8.
75. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet.* 2011 Jul;378(9786):169–81.
76. Jaune E, Rocchi S. Metformin: Focus on Melanoma. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 21;9.
77. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: The end of the beginning. Vol. 2, *Cancer Discovery.* 2012. p. 778–90.
78. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ.* 2005 Jun 4;330(7503):1304–5.
79. Pollak M. The insulin and insulin-like growth factor receptor family in neoplasia: an update. *Nat Rev Cancer.* 2012 Mar 16;12(3):159–69.
80. Cusi K, Consoli A, DeFronzo RA. Metabolic effects of metformin on glucose and lactate metabolism in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Nov;81(11):4059–67.
81. Cai Z, Ke J, He X, Yuan R, Chen Y, Wu X, et al. Significance of mTOR Signaling and Its Inhibitor Against Cancer Stem-Like Cells in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Jan 2;21(1):179–88.
82. Karthik G-M, Ma R, Lövrot J, Kis LL, Lindh C, Blomquist L, et al. mTOR inhibitors counteract tamoxifen-induced activation of breast cancer stem cells. *Cancer Lett.* 2015 Oct;367(1):76–87.
83. Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, et al. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest.* 2001 Oct 15;108(8):1167–74.
84. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, et al. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Mol Cell.* 2008 Apr;30(2):214–26.
85. Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, et al. AMP-Activated Protein Kinase Induces a p53-Dependent Metabolic Checkpoint. *Mol Cell.* 2005

- Apr;18(3):283–93.
86. Horman S, Browne GJ, Krause U, Patel J V., Vertommen D, Bertrand L, et al. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Leads to the Phosphorylation of Elongation Factor 2 and an Inhibition of Protein Synthesis. *Curr Biol.* 2002 Aug;12(16):1419–23.
  87. Ikhlas S, Ahmad M. Metformin: Insights into its anticancer potential with special reference to AMPK dependent and independent pathways. *Life Sci.* 2017 Sep;185:53–62.
  88. Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, et al. Metformin, Independent of AMPK, Inhibits mTORC1 in a Rag GTPase-Dependent Manner. *Cell Metab.* 2010 May;11(5):390–401.
  89. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JMM. New Users of Metformin Are at Low Risk of Incident Cancer: A cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009 Sep 1;32(9):1620–5.
  90. Currie CJ, Poole CD, Jenkins-Jones S, Gale EAM, Johnson JA, Morgan CL. Mortality After Incident Cancer in People With and Without Type 2 Diabetes: Impact of metformin on survival. *Diabetes Care.* 2012 Feb 1;35(2):299–304.
  91. Zhang P, Li H, Tan X, Chen L, Wang S. Association of metformin use with cancer incidence and mortality: A meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2013 Jun;37(3):207–18.
  92. BALAKUMAR P, ROSE M, GANTI S, KRISHAN P, SINGH M. PPAR dual agonists: Are they opening Pandora’s Box? *Pharmacol Res.* 2007 Aug;56(2):91–8.
  93. Gale EA. Lessons from the glitazones: a story of drug development. *Lancet.* 2001 Jun;357(9271):1870–5.
  94. Lalloyer F, Staels B. Fibrates, Glitazones, and Peroxisome Proliferator–Activated Receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 May;30(5):894–9.
  95. Woodcock J, Sharfstein JM, Hamburg M. Regulatory Action on Rosiglitazone by the U.S. Food and Drug Administration. *N Engl J Med.* 2010 Oct 14;363(16):1489–91.
  96. Rosen CJ. Revisiting the Rosiglitazone Story — Lessons Learned. *N Engl J Med.* 2010 Aug 26;363(9):803–6.
  97. Kuenzli S, Saurat J-H. Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br J Dermatol.* 2003 Aug;149(2):229–36.
  98. Boyd AS. Thiazolidinediones in dermatology. *Int J Dermatol.* 2007 Jun;46(6):557–63.
  99. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and the Human Skin. *Am J Clin Dermatol.* 2008;9(1):15–31.
  100. Braissant O, Fougère F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996 Jan;137(1):354–66.

101. Chawla A, Lazar MA. Peroxisome proliferator and retinoid signaling pathways co-regulate preadipocyte phenotype and survival. *Proc Natl Acad Sci.* 1994 Mar 1;91(5):1786–90.
102. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR $\gamma$ 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994 Dec;79(7):1147–56.
103. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM. mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev.* 1994 May 15;8(10):1224–34.
104. Kuenzli S, Saurat JH. Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. Vol. 149, *British Journal of Dermatology.* 2003. p. 229–36.
105. Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CDM, et al. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1997 Jan 7;94(1):237–41.
106. Takahashi N, Okumura T, Motomura W, Fujimoto Y, Kawabata I, Kohgo Y. Activation of PPAR $\gamma$  inhibits cell growth and induces apoptosis in human gastric cancer cells. *FEBS Lett.* 1999 Jul 16;455(1–2):135–9.
107. Oakes ND, Camilleri S, Furler SM, Chisholm DJ, Kraegen EW. The insulin sensitizer, BRL 49653, reduces systemic fatty acid supply and utilization and tissue lipid availability in the rat. *Metabolism.* 1997 Aug;46(8):935–42.
108. Oakes ND, Kennedy CJ, Jenkins AB, Laybutt DR, Chisholm DJ, Kraegen EW. A New Antidiabetic Agent, BRL 49653, Reduces Lipid Availability and Improves Insulin Action and Glucoregulation in the Rat. *Diabetes.* 1994 Oct 1;43(10):1203–10.
109. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. Present concepts and future outlook: Function of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) for pathogenesis, progression, and therapy of cancer. *J Cell Physiol.* 2007 Jul;212(1):1–12.
110. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular Regulation of Adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000 Nov;16(1):145–71.
111. Hu E, Tontonoz P, Spiegelman BM. Transdifferentiation of myoblasts by the adipogenic transcription factors PPAR gamma and C/EBP alpha. *Proc Natl Acad Sci.* 1995 Oct 10;92(21):9856–60.
112. Adams M, Chatterjee V, O’Rahilly S. Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 1997.
113. Birgel M, Gottschling-Zeller H, Röhrig K, Hauner H. Role of Cytokines in the Regulation of Plasminogen Activator Inhibitor-1 Expression and Secretion in Newly Differentiated Subcutaneous Human Adipocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Jun;20(6):1682–7.
114. Berger J. Thiazolidinediones produce a conformational change in peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma: binding and activation correlate with

- antidiabetic actions in db/db mice. *Endocrinology*. 1996 Oct 1;137(10):4189–95.
115. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. PEROXISOME PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS: A Nuclear Receptor Signaling Pathway in Lipid Physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996 Nov;12(1):335–63.
  116. Hauner H. The mode of action of thiazolidinediones. *Diabetes Metab Res Rev*. 2002.
  117. Lehrke M, Lazar MA. The Many Faces of PPAR $\gamma$ . *Cell*. 2005 Dec;123(6):993–9.
  118. Day C. Thiazolidinediones: A new class of antidiabetic drugs. Vol. 16, *Diabetic Medicine*. 1999. p. 179–92.
  119. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists. *Lancet Oncol*. 2004 Jul;5(7):419–29.
  120. Malhotra S, Bansal D, Shafiq N, Pandhi P, Kumar B. Potential therapeutic role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists in psoriasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2005 Aug 8;6(9):1455–61.
  121. Varani J, Bhagavathula N, Ellis CN, Pershadsingh HA. Thiazolidinediones: potential as therapeutics for psoriasis and perhaps other hyperproliferative skin disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006 Nov 16;15(11):1453–68.
  122. Xin X, Yang S, Kowalski J, Gerritsen ME. Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Ligands Are Potent Inhibitors of Angiogenesis *in Vitro* and *in Vivo*. *J Biol Chem*. 1999 Mar 26;274(13):9116–21.
  123. Fauconnet S, Lascombe I, Chabannes E, Adessi G-L, Desvergne B, Wahli W, et al. Differential Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Peroxisome Proliferator-activated Receptors in Bladder Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23534–43.
  124. Jaeckel EC, Raja S, Tan J, Das SK, Dey SK, Girod DA, et al. Correlation of Expression of Cyclooxygenase-2, Vascular Endothelial Growth Factor, and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\delta$  With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Neck Surg*. 2001 Oct 1;127(10):1253.
  125. Margeli A, Kouraklis G, Theocharis S. Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) Ligands and Angiogenesis. *Angiogenesis*. 2003;6(3):165–9.
  126. Theocharis S, Margeli A, Vielh P, Kouraklis G. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  ligands as cell-cycle modulators. *Cancer Treat Rev*. 2004 Oct;30(6):545–54.
  127. WANG T, XU J, YU X, YANG R, HAN Z. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in malignant diseases. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2006 Apr;58(1):1–14.
  128. Chou F-S, Wang P-S, Kulp S, Pinzone JJ. Effects of Thiazolidinediones on Differentiation, Proliferation, and Apoptosis. *Mol Cancer Res*. 2007 Jun 1;5(6):523–30.
  129. Glass CK, Saijo K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate

- inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol*. 2010 May;10(5):365–76.
130. Fröhlich E, Wahl R. Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–14.
  131. Elnemr A, Ohta T, Iwata K, Ninomia I, Fushida S, Nishimura G, et al. PPAR $\gamma$  ligand (thiazolidinedione) induces growth arrest and differentiation markers of human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol*. 2000 Dec 1.
  132. Hossain SU, Bhattacharya S. Synthesis of O-prenylated and O-geranylated derivatives of 5-benzylidene-2,4-thiazolidinediones and evaluation of their free radical scavenging activity as well as effect on some phase II antioxidant/detoxifying enzymes. *Bioorg Med Chem Lett*. 2007 Mar;17(5):1149–54.
  133. Millet A, Plaisant M, Ronco C, Cerezo M, Abbe P, Jaune E, et al. Discovery and Optimization of *N*-(4-(3-Aminophenyl)thiazol-2-yl)acetamide as a Novel Scaffold Active against Sensitive and Resistant Cancer Cells. *J Med Chem*. 2016 Sep 22;59(18):8276–92.
  134. Kim C, Noh S, Park Y, Kang D, Chun P, Chung H, et al. A Potent Tyrosinase Inhibitor, (E)-3-(2,4-Dihydroxyphenyl)-1-(thiophen-2-yl)prop-2-en-1-one, with Anti-Melanogenesis Properties in  $\alpha$ -MSH and IBMX-Induced B16F10 Melanoma Cells. *Molecules*. 2018 Oct 22;23(10):2725.
  135. Cerezo M, Lehraiki A, Millet A, Rouaud F, Plaisant M, Jaune E, et al. Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance. *Cancer Cell*. 2016 Jun;29(6):805–19.
  136. Flori E, Rosati E, Cardinali G, Kovacs D, Bellei B, Picardo M, et al. The  $\alpha$ -melanocyte stimulating hormone/peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$  pathway down-regulates proliferation in melanoma cell lines. *J Exp Clin Cancer Res*. 2017 Dec 11;36(1):142.
  137. Kim SH, Ha YM, Moon KM, Choi YJ, Park YJ, Jeong HO, et al. Anti-melanogenic effect of (Z)-5-(2,4-dihydroxybenzylidene) thiazolidine-2,4-dione, a novel tyrosinase inhibitor. *Arch Pharm Res*. 2013 Oct 1;36(10):1189–97.
  138. Singh I, Rani R, Luxami V, Paul K. Synthesis of 5-(4-(1H-phenanthro[9,10-d]imidazol-2-yl)benzylidene)thiazolidine-2,4-dione as promising DNA and serum albumin-binding agents and evaluation of antitumor activity. *Eur J Med Chem*. 2019 Mar;166:267–80.
  139. Nishida S, Maruoka H, Yoshimura Y, Goto T, Tomita R, Masumoto E, et al. Synthesis and biological activities of some new thiazolidine derivatives containing pyrazole ring system. *J Heterocycl Chem*. 2012 Mar;49(2):303–9.
  140. Jung K-Y, Samadani R, Chauhan J, Nevels K, Yap JL, Zhang J, et al. Structural modifications of (Z)-3-(2-aminoethyl)-5-(4-ethoxybenzylidene)thiazolidine-2,4-dione that improve selectivity for inhibiting the proliferation of melanoma cells containing active ERK signaling. *Org Biomol Chem*. 2013;11(22):3706.

141. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis.* 2011 Sep 1;2(9):e199–e199.
142. Huang Y-C, Liu K-C, Chiou Y-L, Yang C-H, Chen T-H, Li T-T, et al. Fenofibrate suppresses melanogenesis in B16-F10 melanoma cells via activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Chem Biol Interact.* 2013 Oct;205(3):157–64.
143. Rouaud F, Hamouda-Tekaya N, Cerezo M, Abbe P, Zangari J, Hofman V, et al. E2F1 inhibition mediates cell death of metastatic melanoma. *Cell Death Dis.* 2018;1–12.
144. Zhang W, Shao W, Dong Z, Zhang S, Liu C, Chen S. Cloxiquine, a traditional antituberculosis agent, suppresses the growth and metastasis of melanoma cells through activation of PPAR $\gamma$ . *Cell Death Dis.* 2019 Jun 28;10(6):404.
145. Steffan JJ, Cardelli JA. Thiazolidinediones Induce Rab7-RILP-MAPK-Dependent Juxtannuclear Lysosome Aggregation and Reduce Tumor Cell Invasion. *Traffic.* 2010 Feb;11(2):274–86.
146. Tai C-J, Wu AT, Chiou J-F, Jan H-J, Wei H-J, Hsu C-H, et al. The investigation of Mitogen-Activated Protein kinase Phosphatase-1 as a potential pharmacological target in non-small cell lung carcinomas, assisted by non-invasive molecular imaging. *BMC Cancer.* 2010 Dec 12;10(1):95.
147. Nijsten T, Geluyckens E, Colpaert C, Lambert J. Peroxisome proliferator-activated receptors in squamous cell carcinoma and its precursors. *J Cutan Pathol.* 2005 May;32(5):340–7.
148. Tseng C-H. Rosiglitazone may reduce non-melanoma skin cancer risk in Taiwanese. *BMC Cancer.* 2015 Dec 6;15(1):41.
149. Grommes C, Conway DS, Alshekhlee A, Barnholtz-Sloan JS. Inverse association of PPAR $\gamma$  agonists use and high grade glioma development. *J Neurooncol.* 2010 Nov 5;100(2):233–9.
150. Creuzot-Garcher C, Wolf S. Miscellaneous. In: *Macular Edema.* Basel: KARGER; 2010. p. 183–98.
151. Schneider MR, Samborski A, Bauersachs S, Zouboulis CC. Differentially regulated microRNAs during human sebaceous lipogenesis. *J Dermatol Sci.* 2013 May;70(2):88–93.
152. QIN L, REN Y, CHEN A-M, GUO F-J, XU F, GONG C, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands inhibit VEGF-mediated vasculogenic mimicry of prostate cancer through the AKT signaling pathway. *Mol Med Rep.* 2014 Jul;10(1):276–82.
153. Mantel A, Carpenter-Mendini A, VanBuskirk J, Pentland AP. Aldo-keto reductase 1C3 is overexpressed in skin squamous cell carcinoma (SCC) and affects SCC growth via prostaglandin metabolism. *Exp Dermatol.* 2014 Aug;23(8):573–8.
154. Mrówka P, Glodkowska E, Nowis D, Legat M, Issat T, Makowski M, et al. Ciglitazone,

- an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , exerts potentiated cytostatic/cytotoxic effects against tumor cells when combined with lovastatin. *Int J Oncol*. 2008 Jan 1.
155. Zhao H, Gu H, Zhang H, Li J-H, Zhao W-E. PPAR $\gamma$ -dependent pathway in the growth-inhibitory effects of K562 cells by carotenoids in combination with rosiglitazone. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2014 Jan;1840(1):545–55.
  156. L. Konger R, Derr-Yellin E, Travers JB, Ocana JA, Sahu RP. Epidermal PPAR $\gamma$  influences subcutaneous tumor growth and acts through TNF- $\alpha$  to regulate contact hypersensitivity and the acute photoresponse. *Oncotarget*. 2017;1–16.
  157. Steinbild S, Arends J, Medinger M, Häring B, Frost A, Dreves J, et al. Metronomic Antiangiogenic Therapy with Capecitabine and Celecoxib in Advanced Tumor Patients – Results of a Phase II Study. *Oncol Res Treat*. 2007;30(12):629–35.
  158. Sainz-Perez A, Gary-Gouy H, Gaudin F, Maarof G, Marfaing-Koka A, de Revel T, et al. IL-24 Induces Apoptosis of Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells Engaged into the Cell Cycle through Dephosphorylation of STAT3 and Stabilization of p53 Expression. *J Immunol*. 2008 Nov 1;181(9):6051–60.
  159. Steffan JJ, Snider JL, Skalli O, Welbourne T, Cardelli JA. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchangers and RhoA Regulate Acidic Extracellular pH-Induced Lysosome Trafficking in Prostate Cancer Cells. *Traffic*. 2009 Jun;10(6):737–53.
  160. Kharbanda C, Alam MS, Hamid H, Javed K, Shafi S, Ali Y, et al. Novel benzenesulfonylureas containing thiophenylpyrazoline moiety as potential antidiabetic and anticancer agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014 Nov;24(22):5298–303.
  161. Kim SH, Choi YJ, Moon KM, Lee HJ, Woo Y, Chung KW, et al. The inhibitory effect of a synthetic compound, (Z)-5-(2,4-dihydroxybenzylidene) thiazolidine-2,4-dione (MHY498), on nitric oxide-induced melanogenesis. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013 Aug;23(15):4332–5.
  162. Marshall NA, Galvin KC, Corcoran A-MB, Boon L, Higgs R, Mills KHG. Immunotherapy with PI3K Inhibitor and Toll-Like Receptor Agonist Induces IFN- $\gamma$  +IL-17<sup>+</sup> Polyfunctional T Cells That Mediate Rejection of Murine Tumors. *Cancer Res*. 2012 Feb 1;72(3):581–91.
  163. Mori A, Sakurai H, Choo M-K, Obi R, Koizumi K, Yoshida C, et al. Severe pulmonary metastasis in obese and diabetic mice. *Int J Cancer*. 2006 Dec 15;119(12):2760–7.
  164. Cruz AV, Figueiroa JF. Clinical Trial to Evaluate the Efficacy of a Dyslipidemic Therapy in Mexican Population. *US Natl Libr Med*. 2018.
  165. Nastasă C, Tamaian R, Oniga O, Tiperciuc B. 5-Arylidene(chromenyl-methylene)-thiazolidinediones: Potential New Agents against Mutant Oncoproteins K-Ras, N-Ras and B-Raf in Colorectal Cancer and Melanoma. *Medicina (B Aires)*. 2019 Mar 31;55(4):85.
  166. Reichle A, Vogt T. Systems Biology: A Therapeutic Target for Tumor Therapy. *Cancer Microenviron*. 2008 Dec 23;1(1):159–70.

167. Sertznig P, Seifert M, Tilgen W, Reichrath J. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) and the Human Skin. *Am J Clin Dermatol*. 2008;9(1):15–31.
168. Schadendorf D. Peroxisome Proliferator-Activating Receptors: A New Way to Treat Melanoma? *J Investig Res*. 2009.
169. Bundscherer A, Reichle A, Hafner C, Meyer S, Vogt T. Targeting the Tumor Stroma with Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR) Agonists. *Anticancer Agents Med Chem*. 2009 Sep 1;9(7):816–21.
170. Cseh Á, Szebeni B, Szalay B, Vásárhelyi B. Akt enzyme: new therapeutic target in cancer and diabetes? *Orv Hetil*. 2009 Feb;150(8):373–8.
171. Kostapanos MS, Elisaf MS, Mikhailidis DP. Pioglitazone and Cancer: Angel or Demon? *Curr Pharm Des*. 2013;19(27):4913–29.
172. Gupta M, Mahajan VK, Mehta KS, Chauhan PS, Rawat R. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: the ‘future’ in dermatology therapeutics? *Arch Dermatol Res*. 2015 Nov 19;307(9):767–80.
173. Chadha N, Bahia MS, Kaur M, Silakari O. Thiazolidine-2,4-dione derivatives: Programmed chemical weapons for key protein targets of various pathological conditions. *Bioorg Med Chem*. 2015 Jul;23(13):2953–74.
174. Pich C, Michalik L. The Janus face of rosiglitazone. *Oncotarget*. 2008;9:1–2.
175. Mössner R, Schulz U, Krüger U, Neumann C, Reich K, Middel P, et al. Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Inhibit Cell Growth in Malignant Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2002 Sep;119(3):576–82.
176. Placha W, Gil D, Dembinska-Kiec A, Laidler P. The effect of PPAR $\alpha$  ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Melanoma Res*. 2003;13:1–10.
177. Kang HY, Chung E, Lee M, Cho Y, Kang WH. Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptors in human melanocytes. *Br J Dermatol*. 2004 Mar;150(3):462–8.
178. Reichle A, Bross K, Vogt T, Bataille F, Wild P, Berand A, et al. Pioglitazone and rofecoxib combined with angiostatically scheduled trofosfamide in the treatment of far-advanced melanoma and soft tissue sarcoma. *Cancer*. 2004 Nov 15;101(10):2247–56.
179. Núñez N, Liu H, Meadows GG. PPAR- $\gamma$  ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2006.
180. Liu Y, Meng Y, Liu H, Li J, Fu J, Liu Y, et al. Growth Inhibition and Differentiation Induced by Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma Ligand Rosiglitazone in Human Melanoma Cell Line A375. *Med Oncol*. 2006;23(3):393–402.
181. Freudlsperger C, Moll I, Schumacher U, Thies A. Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anticancer Drugs*. 2006 Mar;17(3):325–32.

182. Lee JS, Choi YM, Kang HY. PPAR-gamma agonist, ciglitazone, increases pigmentation and migration of human melanocytes. *Exp Dermatol*. 2007 Feb;16(2):118–23.
183. Freudlsperger C, Thies A, Pfüller U, Schumacher U. The Proteasome Inhibitor Bortezomib Augments Anti-proliferative Effects of Mistletoe Lectin-I and the PPAR-Á Agonist Rosiglitazone in Human Melanoma Cells. *Anticancer Res* . 2007;1–7.
184. Reichle A, Vogt T, Coras B, Terheyden P, Neuber K, Trefzer U, et al. Targeted combined anti-inflammatory and angiostatic therapy in advanced melanoma: a randomized phase II trial. *Melanoma Res*. 2007 Dec;17(6):360–4.
185. Eastham LL, Mills CN, Niles RM. PPAR $\alpha/\gamma$  Expression and Activity in Mouse and Human Melanocytes and Melanoma Cells. *Pharm Res*. 2008 Jun 3;25(6):1327–33.
186. Grabacka M, Placha W, Urbanska K, Laidler P, Płonka PM, Reiss K. PPAR  $\gamma$  regulates MITF and  $\beta$ -catenin expression and promotes a differentiated phenotype in mouse melanoma S91. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Jun;21(3):388–96.
187. Smith AG, Beaumont KA, Smit DJ, Thurber AE, Cook AL, Boyle GM, et al. . *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Apr;41(4):844–52.
188. Klopper JP, Sharma V, Berenz A, Hays WR, Loi M, Pugazhenthii U, et al. Retinoid and thiazolidinedione therapies in melanoma: an analysis of differential response based on nuclear hormone receptor expression. *Mol Cancer*. 2009;8(1):16.
189. Papi A, Rocchi P, Ferreri AM, Guerra F, Orlandi M. Enhanced effects of PPARÁ ligands and RXR selective retinoids in combination to inhibit migration and invasiveness in cancer ce. *Oncol Rep*. 2009;1–7.
190. Botton T, Puissant A, Bahadoran P, Annicotte J-S, Fajas L, Ortonne J-P, et al. In Vitro and In Vivo Anti-Melanoma Effects of Ciglitazone. *J Invest Dermatol*. 2009 May;129(5):1208–18.
191. Home PD, Kahn SE, Jones NP, Noronha D, Beck-Nielsen H, Viberti G. Experience of malignancies with oral glucose-lowering drugs in the randomised controlled ADOPT (A Diabetes Outcome Progression Trial) and RECORD (Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes and Regulation of Glycaemia in Diabetes) clinical trials. *Diabetologia*. 2010 Sep 8;53(9):1838–45.
192. Freudlsperger C, Dahl A, Hoffmann J, Reinert S, Schumacher U. Mistletoe lectin-I augments antiproliferative effects of the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone on human malignant melanoma cells. *Phyther Res*. 2010 Sep;24(9):1354–8.
193. Botton T, Puissant A, Cheli Y, Tomic T, Giuliano S, Fajas L, et al. Ciglitazone negatively regulates CXCL1 signaling through MITF to suppress melanoma growth. *Cell Death Differ*. 2011 Jan 2;18(1):109–21.
194. Ferrara A, Lewis JD, Quesenberry CP, Peng T, Strom BL, Van Den Eeden SK, et al. Cohort Study of Pioglitazone and Cancer Incidence in Patients With Diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Apr 1;34(4):923–9.
195. Paulitschke V, Gruber S, Hofstätter E, Haudek-Prinz V, Klepeisz P, Schicher N, et al.

- Proteome Analysis Identified the PPAR $\gamma$  Ligand 15d-PGJ2 as a Novel Drug Inhibiting Melanoma Progression and Interfering with Tumor-Stroma Interaction. Smalley K, editor. PLoS One. 2012 Sep 25;7(9):e46103.
196. Lewis JD, Habel LA, Quesenberry CP, Strom BL, Peng T, Hedderson MM, et al. Pioglitazone Use and Risk of Bladder Cancer and Other Common Cancers in Persons With Diabetes. *JAMA*. 2015 Jul 21;314(3):265.
  197. Behera R, Kaur A, Webster MR, Kim S, Ndoye A, Kugel CH, et al. Inhibition of Age-Related Therapy Resistance in Melanoma by Rosiglitazone-Mediated Induction of Klotho. *Clin Cancer Res*. 2017 Jun 15;23(12):3181–90.
  198. Pich C, Meylan P, Mastelic-Gavillet B, Nguyen NT, Loyon R, Trang BK, et al. Induction of paracrine signaling in metastatic melanoma cells by PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone activates stromal cells and enhances tumor growth. *Cancer Res*. 2018 Sep 5;canres.0912.2018.
  199. Vincent KM, Postovit LM. Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models. *Oncotarget*. 2017.
  200. Henke BR, Blanchard SG, Brackeen MF, Brown KK, Cobb JE, Collins JL, et al. N-(2-benzoylphenyl)-L-tyrosine PPAR $\gamma$  agonists. 1. Discovery of a novel series of potent antihyperglycemic and antihyperlipidemic agents. *J Med Chem*. 1998 Dec 3;41(25):5020–36.
  201. Schoonjans K, Auwerx J. Thiazolidinediones: An update. Vol. 355, *Lancet*. Elsevier Limited; 2000. p. 1008–10.
  202. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). *J Biol Chem*. 1995 Jun 2;270(22):12953–6.
  203. Maley CC, Aktipis A, Graham TA, Sottoriva A, Boddy AM, Janiszewska M, et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. Vol. 17, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2017. p. 605–19.
  204. Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrest BA. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. Vol. 66, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009. p. 1493–506.
  205. Hartman ML, Czyz M. Pro-survival role of MITF in melanoma. Vol. 135, *Journal of Investigative Dermatology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 352–8.
  206. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):117–22.
  207. Ugurel S, Houben R, Schrama D, Voigt H, Zapatka M, Schadendorf D, et al. Microphthalmia-associated transcription factor gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 1;13(21):6344–50.

208. Dabbs DJ. Diagnostic Immunohistochemistry. Diagnostic Immunohistochemistry. 2010.
209. Slominski RM, Zmijewski MA, Slominski AT. The role of melanin pigment in melanoma. Vol. 24, Experimental Dermatology. Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 258–9.
210. Perry MJ, Mendes E, Simplício AL, Coelho A, Soares R V., Iley J, et al. Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: Activation by tyrosinase and implications for prodrug design. Eur J Med Chem. 2009 Aug;44(8):3228–34.
211. Mathai JP, Germain M, Marcellus RC, Shore GC. Induction and endoplasmic reticulum location of bik/nbk in response to apoptotic signaling by e1a and p53. Oncogene. 2002 Apr 11;21(16):2534–44.
212. Yu J, Zhang L. The transcriptional targets of p53 in apoptosis control. Vol. 331, Biochemical and Biophysical Research Communications. Academic Press Inc.; 2005. p. 851–8.
213. Eberle J, Hossini A. Expression and Function of Bcl-2 Proteins in Melanoma. Curr Genomics. 2008 Sep 1;9(6):409–19.
214. Schuler M, Green DR. Transcription, apoptosis and p53: Catch-22. Vol. 21, Trends in Genetics. Elsevier Ltd; 2005. p. 182–7.
215. Najem A, Krayem M, Salès F, Hussein N, Badran B, Robert C, et al. P53 and MITF/Bcl-2 identified as key pathways in the acquired resistance of NRAS-mutant melanoma to MEK inhibition. Eur J Cancer. 2017 Sep 1;83:154–65.
216. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of klotho: From gene to function in aging. Vol. 36, Endocrine Reviews. Endocrine Society; 2015. p. 174–93.
217. Núñez NP, Liu H, Meadows GG. PPAR- $\gamma$  ligands and amino acid deprivation promote apoptosis of melanoma, prostate, and breast cancer cells. Cancer Lett. 2006 May;236(1):133–41.
218. Actos P. ACTOS<sup>®</sup> Product Monograph PRODUCT MONOGRAPH.