

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

O Potencial Papel da TRIB2 no Tratamento do Melanoma com Tiazolidinedionas

Inês dos Santos Gonçalves Albuquerque Claro

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

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Ana Luísa de Sousa Coelho

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**O Potencial Papel da TRIB2 no
Tratamento do Melanoma com
Tiazolidinedionas**

Inês dos Santos Gonçalves Albuquerque Claro

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

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Ana Luísa de Sousa Coelho

O Potencial Papel da TRIB2 no Tratamento do Melanoma com Tiazolidinedionas

Declaração de autoria do 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.

© 2021 Inês dos Santos Gonçalves Albuquerque Claro

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho, através 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

Se em setembro de 2015, quando saíram as colocações, me tivessem dito que se aproximavam uns dos melhores anos da minha vida, não teria acreditado. Foram cinco anos de muito esforço e dedicação, e principalmente de muita aprendizagem. Cinco anos que não trocava por nada deste mundo. E porque “o curso não se faz sozinho”, tenho alguns agradecimentos a fazer:

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Luísa de Sousa Coelho, por todo o apoio, disponibilidade e todo o saber transmitido, e por não me deixar desanimar mesmo quando os resultados não eram os esperados.

À equipa do laboratório *Cellular Signaling* do Centro de Investigação em Biomedicina da Universidade do Algarve, por me terem acolhido e pela oportunidade de crescimento enquanto estudante e futura profissional de saúde.

Ao corpo docente do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Algarve, por todo o esforço para que os seus alunos se tornassem em farmacêuticos de excelência.

A todos os amigos que a universidade me trouxe, por todos os momentos de lazer, diversão ou de estudo (por vezes, os três em conjunto) partilhados.

Aos meus amigos de infância, Mariana Bravo, Rita Campos, Mafalda Canastro, Alexandra Santos, Rodrigo Lopes e Bruno Mata, por terem sempre os braços abertos nos meus regressos a Sesimbra.

À minha madrinha de praxe, Raquel Marques, por ser uma inspiração desde o primeiro dia de curso e por me ter recebido tão bem nesta grande família.

Ao Hugo Loja, por toda a paciência, todo o carinho, toda a força, e por termos partilhado momentos tão ímpares.

À minha família de praxe de Faro, a maior e melhor surpresa que esta cidade e este curso me deram, com quem vivi toda esta aventura. Se a capa é negra de saudade e se segredos desta cidade levo comigo p’rá vida, é devido a todos os nossos momentos. Uma família certamente disfuncional, mas Não Sei o que teria sido de mim sem vocês.

À Soraia Alves, por se ter revelado uma verdadeira amiga no *sprint* final do curso e por partilhar as aventuras do salto para a vida adulta.

À Bruna Ramos, Cristiano Sales e Inês Diogo, os meus companheiros de todos os momentos, que se tornaram família.

À minha tia Duxa, pelo apoio incondicional e por em 2015 me ter obrigado a entrar no autocarro destinado às terras algarvias, e à minha prima Raquel, por me considerar a farmacêutica da família mesmo antes de sê-lo.

Aos meus avós, por todos os conselhos, por todas as rezas e velinhas acesas por cada cadeira do curso, por estarem sempre perto mesmo estando longe.

Aos meus pais, com todo o meu coração, por serem a minha maior força em todos os momentos, por nunca me deixarem desistir, por estarem sempre do meu lado, por todo o amor que sempre me deram. Sem vocês, nada disto teria sido possível.

Aos meus pais,
Os melhores do mundo.

Resumo

Embora o melanoma represente apenas 1% de todos os cânceros de pele, este é o que apresenta a maior taxa de mortalidade. Uma das principais causas do insucesso terapêutico é a resistência às terapias anticancerígenas, onde a proteína TRIB2 tem vindo a apresentar um papel de destaque, sendo associada ao aumento da resistência. Os fármacos Rosiglitazona e Pioglitazona, agonistas do PPAR γ , da família dos antidiabéticos orais tiazolidinedionas (TZDs), já foram relatados anteriormente como eficaz terapia para o melanoma – no entanto, existem resultados em que se verifica o contrário. Um estudo preliminar, não publicado, verificou que a expressão de TRIB2 encontra-se diminuída em culturas de adipócitos tratados com Rosiglitazona.

Neste sentido, colocou-se as seguintes hipóteses: 1) As TZDs poderão levar a uma diminuição dos níveis de TRIB2 nas células de melanoma; 2) A potencial redução dos níveis de TRIB2 poderá estar envolvida no mecanismo de ação anticancerígena das TZDs. Para validar experimentalmente as hipóteses desenvolvidas, tratou-se células de melanoma UACC-62 com Rosiglitazona ou Pioglitazona (em diferentes concentrações e com diferentes tempos de tratamento) e realizou-se a extração de proteínas para avaliar os níveis de expressão de TRIB2 por *Western blot*, e ainda avaliou-se a proliferação/viabilidade das células UACC-62 parentais e TRIB2-KO (dois clones de células CRISPR independentes) tratadas com Rosiglitazona ou Pioglitazona através de ensaios MTT.

Através da análise *Western blot* verificou-se que os tratamentos com as TZDs em estudo aumentam a expressão de TRIB2 e de P-AKT nas células de melanoma. Os ensaios MTT não revelaram nenhuma relação consistente entre os tratamentos *standard* com fármaco e a viabilidade celular; já os tratamentos duplos (72h+24h) parecem causar um aumento da viabilidade das células de melanoma.

Palavras-chave: Melanoma; Pioglitazona; PPAR γ ; Rosiglitazona; Tiazolidinedionas; TRIB2.

Abstract

Although melanoma represents only 1% of all skin cancers, it is the one that has the highest mortality rate. One of the main causes of therapeutic failure is the resistance to anticancer therapies, where the TRIB2 protein has been playing a prominent role, being associated with increased resistance. Rosiglitazone and Pioglitazone, PPAR γ agonists, from the thiazolidinediones (TZDs) family of oral antidiabetics, have previously been reported as effective therapy for melanoma – however, there are results where the opposite is verified. A preliminary unpublished study found that TRIB2 expression is decreased in cultures of adipocytes treated with Rosiglitazone.

In this sense, the following hypotheses were put forward: 1) TZDs could lead to a decrease in TRIB2 levels in melanoma cells; 2) The potential reduction in TRIB2 levels may be involved in the anticancer mechanism of action of TZDs. To experimentally validate the developed hypotheses, UACC-62 melanoma cells were treated with Rosiglitazone or Pioglitazone (at different concentrations and with different treatment times) and protein extraction was performed to assess TRIB2 expression levels by Western blot, and the proliferation/viability of parental UACC-62 and TRIB2-KO cells (two independent CRISPR cell clones) treated with Rosiglitazone or Pioglitazone was evaluated by MTT assays.

Through Western blot analysis it was found that the treatments with the TZDs under study increase the expression of TRIB2 and P-AKT in melanoma cells. MTT assays revealed no consistent relationship between standard drug treatments and cell viability; on the other hand, double treatments (72h+24h) seem to cause an increase in the viability of melanoma cells.

Keywords: Melanoma; Pioglitazone; PPAR γ ; Rosiglitazone; Thiazolidinediones; TRIB2.

Índice

Índice de Figuras.....	X
Índice de Tabelas.....	XIV
Lista de Abreviaturas.....	XV
1. Introdução.....	1
1.1 Melanoma.....	1
1.1.1 Sistema de classificação clínica.....	2
1.2 Mutações no melanoma.....	4
1.3 Terapêutica no melanoma.....	6
.....	6
1.3.1 Quimioterapia.....	7
1.3.2 Terapêutica dirigida a pequenas moléculas.....	8
1.3.2.1 Inibidores BRAF.....	9
1.3.2.2 Inibidores MEK.....	9
1.3.2.3 Combinação inibidores BRAF + inibidores MEK.....	10
1.3.3 Inibidores de <i>checkpoints</i> imunitários.....	11
1.3.3.1 CTLA-4.....	11
1.3.3.2 PD-1.....	12
1.3.4 Citocinas.....	12
1.3.4.1 IL-2.....	12
1.3.4.2 IFN- α	13
1.3.5 Terapia viral oncolítica.....	13
1.3.5.1 T-VEC.....	13
1.4 Resistências à terapêutica no melanoma.....	14
1.4.1 TRIB2.....	16
1.5 Antidiabéticos orais no melanoma.....	18

1.5.1 Tiazolidinedionas.....	18
1.5.1.1 Mecanismo de ação das tiazolidinedionas.....	20
2. Hipóteses e Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	24
3.1 Linha celular e condições de cultura.....	24
3.2 Tratamentos.....	26
3.3 Ensaio MTT.....	26
3.4 Extração e quantificação de extratos proteicos	27
3.5 Eletroforese em gel de acrilamida e <i>Western blot</i>	29
3.6 Análise estatística	34
4. Resultados	35
4.1 Análise da expressão de TRIB2 em resposta a tratamentos com TZDs.....	35
.....	37
4.2 Análise da expressão de proteínas das vias de sinalização MAPK e PI3K em resposta a tratamentos com TZDs.....	37
.....	42
4.3 Viabilidade celular.....	43
4.3.1 Viabilidade das células UACC-62 WT em resposta a tratamentos com TZDs	43
4.3.2 Viabilidade das células UACC-62 KO-TRIB2 em resposta a tratamentos com TZDs.....	46
4.3.3 Viabilidade das células UACC-62 e PANC-1 em resposta a tratamentos com TZDs (72h+24h)	50
4.4 Análise da expressão de PPAR- γ em resposta a tratamentos com TZDs	54
5. Discussão	56
6. Conclusão.....	59
7. Bibliografia.....	60

8. Anexos	72
Anexo I – Poster “TRI(B)pping over Rosiglitazone: Exploring the role of Thiazolidinediones in melanoma”	72
Anexo II – Poster “Avaliação do risco/benefício da terapia com antidiabéticos orais – o caso das biguanidas e tiazolidinedionas na progressão do melanoma na diabetes”	73
Anexo III – Resumo “Potential Role of TRIB2 in the Treatment of Melanoma with Thiazolidinediones”	74

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Os cinco estádios do melanoma cutâneo e o seu desenvolvimento nas várias camadas da pele. Figura retirada e adaptada de (2).	2
Figura 1.2 - Representação esquemática das vias de sinalização mais relevantes e respetivas mutações relacionadas com o melanoma. Figura retirada e adaptada de (17).....	5
Figura 1.3 – Linha cronológica da terapêutica no melanoma.	6
Figura 1.4 – Representação esquemática da via de sinalização MAPK. Figura retirada e adaptada de (31).	8
Figura 1.5 – Mecanismos de resistência no melanoma. Figura retirada e adaptada de (18).....	14
Figura 1.6 – Representação esquemática do mecanismo de resistência no melanoma à terapêutica mediada pela TRIB2. Figura retirada e adaptada de (81).	17
Figura 1.7 – Representação esquemática do funcionamento dos PPARs. Figura adaptada de (105).	21
Figura 1.8 – Representação esquemática dos efeitos das TZDs em várias vias de sinalização. Figura retirada e adaptada de (125).	22
Figura 3.1 – Esquematização do método "sandwich".....	31
Figura 4.1 – Efeito da Rosiglitazona e Pioglitazona na expressão de TRIB2 em células de melanoma UACC-62. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO, Rosiglitazona ou Pioglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando um anticorpo que reconhece seletivamente TRIB2.	36
Figura 4.2 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de TRIB2 em células de melanoma UACC-62. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO e concentrações crescentes de Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando um anticorpo que reconhece seletivamente TRIB2.....	37

Figura 4.3 – Efeito da Rosiglitazona e Pioglitazona na expressão de AKT em células de melanoma UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT e UACC-62 KO foram tratadas com DMSO, Rosiglitazona ou Pioglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-AKT e AKT total.	38
Figura 4.4 – O efeito da Rosiglitazona na expressão de AKT em células de melanoma UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT e UACC-62 KO foram tratadas com DMSO ou Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-AKT e AKT total.	38
Figura 4.5 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de AKT em células UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO e concentrações crescentes de Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-AKT e Total AKT.....	39
Figura 4.6 – Efeito da Rosiglitazona e Pioglitazona na expressão de ERK em células de melanoma UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO, Rosiglitazona ou Pioglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-ERK rabbit e Total ERK.....	40
Figura 4.7 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de ERK em células de melanoma UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO ou Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-ERK mouse e Total ERK.....	41
Figura 4.8 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de p70S6K em células de melanoma UACC-62 WT. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO ou Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-p70S6K e p70S6K total.....	42

- Figura 4.9 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1-2. C: n=2-3. D: n=2-3. *P<0,05 e **P<0,01 (unpaired t test)..... 44
- Figura 4.10 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Pioglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Pioglitazona na ordem dos μM e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=2-4. B: n=1-3. *P<0,05 (unpaired t test). 45
- Figura 4.11 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 KO #28 e KO #31 tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1. C: n=1-2. D: n=1. E: n=1-3. F: n=1-2. G: n=1-3. H: n=1-2. 48
- Figura 4.12 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 KO #28 e KO #31 tratadas com Pioglitazona..... 49
- Figura 4.13 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1..... 51
- Figura 4.14 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Pioglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Pioglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo

colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1..... 51

Figura 4.15 – Análise da viabilidade celular de células de cancro do pâncreas PANC-1 tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de cancro do pâncreas, PANC-1, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1..... 52

Figura 4.16 – Análise da viabilidade de células de cancro do pâncreas PANC-1 tratadas com Pioglitazona. A linha de células de cancro do pâncreas, PANC-1, foi incubada com diferentes concentrações de Pioglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1..... 53

Figura 4.17 – Análise da expressão de PPAR γ em células de melanoma UACC-62 WT. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO e concentrações crescentes de Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando um anticorpo que reconhece seletivamente o PPAR γ 54

Figura 4.18 – Células PANC-1 tratadas com DMSO expressam PPAR γ . Células PANC-1 foram tratadas com DMSO e com Rosiglitazona a 50 μM e células UACC-62 (WT, centro; KO #31, direita) foram tratadas unicamente com DMSO, sendo posteriormente analisadas por Western blot, utilizando um anticorpo que reconhece seletivamente o PPAR γ 55

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Mutações mais frequentes no melanoma. Informação retirada e adaptada de (17).....	4
Tabela 1.2 – As três isoformas do PPAR: respectivas distribuições no organismo e funções. Informação retirada e adaptada de (114).	20
Tabela 3.1 - Constituição para 10mL de 1x CST buffer.....	28
Tabela 3.2 - Composição para um running gel e um stacking gel.....	29
Tabela 3.3 – Composição de 1L de <i>Running Buffer</i>	30
Tabela 3.4 – Composição de 1L de <i>Transfer Buffer</i>	31
Tabela 3.5 – Composição de 8L de TBS-T.	32
Tabela 3.6 – Lista de anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo.	32
Tabela 3.7 – Composição do ECL.	33

Lista de Abreviaturas

AJCC	Comité Conjunto Americano do Cancro (do inglês <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
AKT	Proteína cinase B (do inglês <i>protein kinase B</i>)
APS	Persulfato de amónia (do inglês <i>ammonium persulfate</i>)
B-G-P	Do inglês <i>beta-glycerophosphate</i>
BRAF	Gene que codifica a proteína B-RAF
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>bovine serum albumin</i>)
CAS	Do inglês <i>CRISPR associated protein</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CRISPR	Repetições palindrómicas curtas agrupadas e regularmente interespaçadas (do inglês <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>)
CST	Tampão de lise celular (do inglês <i>cell lysis buffer</i>)
CTLA-4	Antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês <i>cytotoxic t-lymphocyte antigen 4</i>)
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo (do inglês <i>dimethyl sulfoxide</i>)
ECL	Quimioluminescência aumentada (do inglês <i>enhanced chemiluminescent</i>)
EMA	Agência Europeia do Medicamento (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
ERK	Proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês <i>extracellular signal-regulated kinases</i>)
FBS	Soro bovino fetal (do inglês <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FOXO	Do inglês <i>Forkhead box O</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (do inglês <i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
IFN	Interferão-alfa (IFN- α)
IL	Interleucina
KIT	Recetor tirosina cinase tipo III (do inglês <i>Receptor Tyrosine Kinase Type III</i>)

KO	Do inglês <i>knock-out</i>
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio (do inglês <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MEK	Proteína envolvida na via de sinalização MAPK
MTIC	3-metil-(triazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida
mTOR	Proteína-alvo mecanístico da rapamicina
MTT	Do inglês (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina, na forma reduzida (do inglês <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NRAS	Gene que codifica a enzima NRAS
p70S6K	Proteína ribossómica S6 cinase β -1
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>)
PD-1	Proteína de morte programada 1 (do inglês <i>programmed cell death-1</i>)
PI3K	Fosfoinositídeo 3-cinase
PIC	Cocktail inibidor de proteases (do inglês <i>protease inhibitor cocktail</i>)
PPAR	Recetor ativado de proliferadores do peroxissoma (do inglês <i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>)
PPRE	Elementos de resposta do proliferador do peroxissoma
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina (do inglês <i>phosphatase and tensin homolog</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	Recetor retinoide X
T-VEC	Vírus herpes oncolítico modificado (do inglês <i>modified herpes virus</i>)
TBS-T	Tampão salino <i>tween</i> 20
TEMED	Tetrametiletenodiamina
TNM	Do inglês <i>Thickness, Nods and Metastasis</i>
TRIB2	Do inglês <i>tribbles2</i>
TZD	Tiazolidinediona
UACC-62	Do inglês <i>University of Arizona Cell Culture-62</i>
UV	Ultravioleta
WT	Do inglês <i>wild-type</i>

1. Introdução

1.1 Melanoma

O melanoma, também referido como melanoma maligno, é um tipo de cancro da pele que resulta da transformação maligna dos melanócitos, células da epiderme produtoras de melanina (1). Embora ocorra mais frequentemente na pele (sendo também apelidado de melanoma cutâneo), o melanoma não é exclusivo desta, podendo ocorrer também na cavidade oral, no trato gastrointestinal, nas meninges do sistema nervoso central e na úvea ocular (2,3).

Esta neoplasia é a décima nona mais comum a nível mundial e a sua incidência tem vindo a aumentar rapidamente de ano para ano (4–6). Na maior parte dos países europeus, a taxa de incidência do melanoma tem vindo a duplicar a cada década (7). Apesar de representar apenas 1% dos cancros da pele, o melanoma é considerado o mais perigoso, uma vez que é o mais provável de metastizar (isto é, espalhar-se para outras áreas do corpo) caso não seja detetado e tratado antecipadamente – deste modo, o melanoma é o detentor da maior taxa de mortalidade entre todos os cancros da pele (8).

Para além da predisposição genética, existem vários fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do melanoma. A exposição à radiação ultravioleta (UV), muitos ou atípicos sinais na pele, pele e cabelos claros, a existência de história familiar ou pessoal de melanoma ou outros tipos de cancro da pele e imunossupressão integram os principais fatores de risco para o desenvolvimento deste tipo de cancro (9,10). A incidência do melanoma é maior em idosos (>70 anos) e em homens, englobando assim estes também nos fatores de risco (9,11).

1.1.1 Sistema de classificação clínica

Após o diagnóstico de melanoma é necessário definir qual o seu grau de extensão e desenvolvimento, de forma a permitir aos médicos executar a melhor estratégia terapêutica, bem como informar o paciente sobre o prognóstico (12).

Para definir qual o estágio da doença recorre-se a um sistema de classificação internacional denominado TNM, estabelecido pelo Comité de Estadiamento do Melanoma, pertencente ao Comité Conjunto Americano do Cancro (AJCC). Este classifica o melanoma em cinco estádios (Figura 1.1) – 0, I, II, III e IV – de acordo com três parâmetros: T de espessura (*thickness*), ou seja, quão profundo está o tumor na pele; N de gânglios linfáticos (*nods*), classifica a invasão ou não dos mesmos, próximos ao tumor; M de metástases (*metastasis*), classifica a existência ou não de metástases em outros tecidos ou órgãos (13,14).

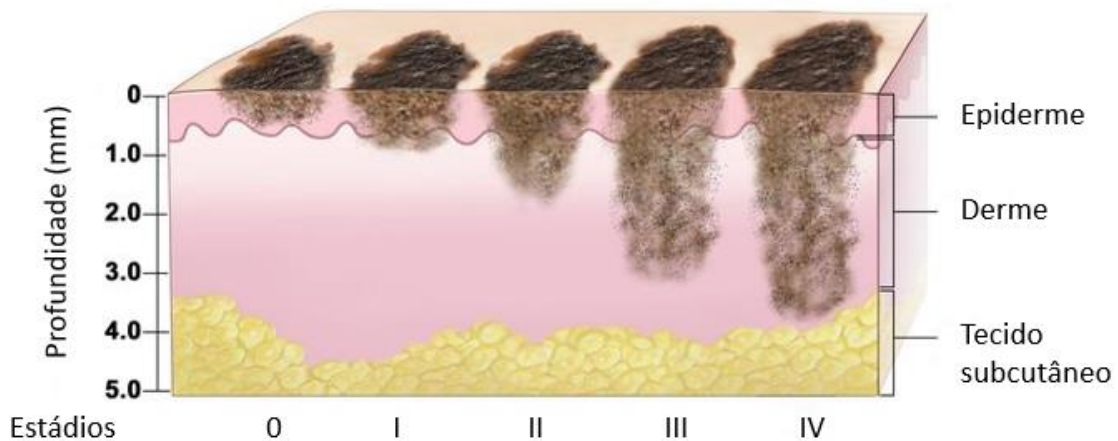


Figura 1.1 – Os cinco estádios do melanoma cutâneo e o seu desenvolvimento nas várias camadas da pele. Figura retirada e adaptada de (2).

No estágio 0 o melanoma está localizado apenas na epiderme, sendo denominado por melanoma *in situ*, e no estágio I alcança uma maior profundidade, continuando a manter-se na epiderme – estes dois estádios comportam a classificação de melanoma inicial. O melanoma inicial, dado que é localizado, deve ser removido cirurgicamente (12,13,15).

O melanoma intermediário ou de alto risco é um melanoma no estágio II. Este já atingiu a derme e possui um alto risco de se espalhar para outras áreas do corpo. Neste caso, a cirurgia é novamente a primeira opção terapêutica sendo recomendada a imunoterapia ou a radiação pós-cirúrgica para evitar o reaparecimento da neoplasia (12,13,15).

O melanoma em estágio III alcança a epiderme e a derme, e já engloba metástases nos gânglios linfáticos mais próximos, e o melanoma em estágio IV avançou para outros tecidos ou órgãos (comumente pulmões, fígado, cérebro, ossos ou trato gastrointestinal). Estes dois estágios constituem a classificação de melanoma avançado, sendo os mais difíceis de tratar – remove-se o tumor cirurgicamente, bem como os gânglios linfáticos com metástases, submetendo posteriormente o paciente a imunoterapia ou terapias dirigidas a pequenas moléculas (12,13,15).

1.2 Mutações no melanoma

Após o diagnóstico é necessário estabelecer-se uma estratégia terapêutica. Para a decisão de qual a melhor estratégia a aplicar, deve ter-se em conta o estágio do tumor, a localização do mesmo e ainda o seu perfil genético (16).

A identificação de mutações só foi possível após o projeto Genoma Humano em 2003 e tem sido amplamente utilizada não só para obter uma melhor compreensão acerca do melanoma (uma vez que esta neoplasia é considerada muito heterogênea) como também para determinar mutações com relevância para a terapêutica (17,18). Das mutações mais comuns no melanoma (Tabela 1.1), destacam-se as mutações do gene que codifica a proteína B-RAF (BRAF) V600 que serão abordadas no subcapítulo dos inibidores BRAF.

Tabela 1.1 – Mutações mais frequentes no melanoma. Informação retirada e adaptada de (17).

Mutação	Frequência (%)
BRAF V600	40-50
NRAS	15-20
NF1	10-15
KIT	1-2
BRAF atípica (não V600)	4-5
GNAQ/GNA11	80-90 (uveal)
PTEN	4-8

Todas estas mutações levam a uma alteração de vias de sinalização moleculares que resultam num aumento da proliferação e do crescimento das células de melanoma (Figura 1.2). Embora certas terapias sejam mais eficazes em melanomas com certas mutações, a única que é realmente alvo terapêutico com fármacos aprovados é a mutação BRAF (17).

1.3 Terapêutica no melanoma

A cirurgia é a melhor opção para quando ainda não existem metástases, nos estádios iniciais da doença, tendo uma elevada probabilidade de cura e apresentando assim um melhor prognóstico. Quando há progressão do melanoma para o estado metastático esta continua a ser imprescindível, passando a estratégia terapêutica obrigatoriamente pela adição de terapias sistêmicas de forma a melhorar o prognóstico (16,19,20).

Até 2011, o melanoma metastático era considerado fatal, sendo os tratamentos *standard* para este a quimioterapia com Dacarbazina e a imunoterapia com Interleucina-2, conduzindo o paciente a uma reduzida sobrevivência de, em média, nove meses (21). Este panorama mudou positivamente desde que as principais agências do medicamento aprovaram novas terapêuticas, nomeadamente inibidores do BRAF, como o Vemurafenib e o Dabrafenib, inibidores de MEK, como o Trametinib e o Cobimetinib, anticorpos direcionados ao antigénio 4 associado a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4), como o Ipilimumab, e direcionados à proteína de morte celular 1 (PD-1), como o Nivolumab e o Pembrolizumab, e um vírus herpes oncolítico modificado (T-VEC) (Figura 1.3). A descoberta e aprovação destas terapêuticas levou a uma otimização do prognóstico dos pacientes com melanoma avançado, alterando o objetivo da terapêutica de um mero atraso para os cuidados paliativos para o alcance de uma resposta terapêutica duradoura (21) – no entanto, continua a existir uma grande preocupação relativamente ao melanoma: a resistência às terapêuticas.

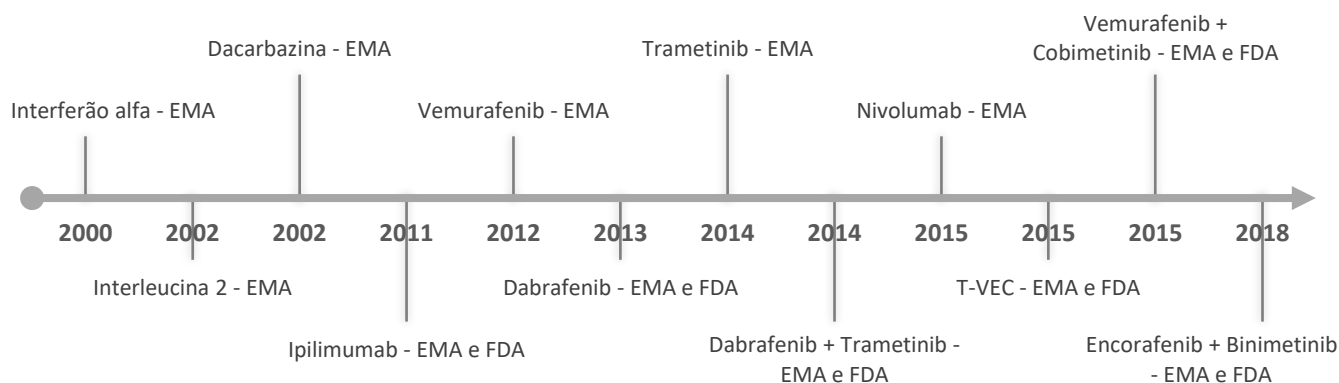


Figura 1.3 – Linha cronológica da terapêutica no melanoma.

1.3.1 Quimioterapia

A quimioterapia foi a primeira terapêutica a surgir para o melanoma metastático, décadas antes do desenvolvimento da imunoterapia e da terapêutica dirigida a pequenas moléculas (16). Embora já não represente a primeira opção terapêutica, esta continua a desempenhar um papel relevante nos melanomas metastáticos sem mutações no BRAF, no NRAS ou no gene que codifica a proteína KIT (*Receptor Tyrosine Kinase Type III*), em que não pode ser utilizada a terapêutica dirigida a pequenas moléculas, sendo a opção que se segue à imunoterapia (22).

Os agentes quimioterapêuticos podem ser divididos em três categorias: agentes alquilantes, que englobam a Dacarbazina, a Temozolomida e nitrosoureas, como a Carmustina e a Lomustina; análogos de platina, como a Carboplatina e a Cisplatina; e toxinas microtubulares, que consistem nos alcaloides da vinca (inibidores da junção microtubular), como a Vincristina e a Vinblastina, e os taxanos (inibidores da desassociação microtubular), como o Paclitaxel e o Docetaxel. Estes podem ser usados em monoterapia ou em combinação (23–25).

A Dacarbazina, agente alquilante do DNA, foi aprovada em 1974 pela FDA (Figura 2), e em 2002 pela Agência Europeia do Medicamento (EMA), para o tratamento do melanoma metastático (19,26). Este análogo de purina administrado intravenosamente necessita de ativação metabólica para exercer o seu efeito, sendo o seu metabolito ativo o 3-metil-(triazeno-1-il)imidazol-4-carboxamida (MTIC) (22–24). Embora as taxas de resposta completa a este fármaco em monoterapia sejam cerca de 6%, a Dacarbazina é o fármaco quimioterapêutico mais utilizado para o melanoma metastático (16,22,27). Já este fármaco combinado com outros fármacos de quimioterapia ou com agentes imunoterapêuticos (interferão-alfa (IFN- α) e interleucina 2 (IL-2)), não só não mostrou qualquer melhoria da sobrevivência global, como também aumentou os efeitos secundários e diminuiu a qualidade de vida dos pacientes (28).

A Temozolomida é um pró-fármaco do metabolito ativo da Dacarbazina, que tem atividade no sistema nervoso central, uma vez que, contrariamente à Dacarbazina, consegue atravessar a barreira hematoencefálica – conseguindo assim, atuar em metástases cerebrais (25). No entanto, estudos não mostram diferenças significativas na taxa de resposta nem na taxa geral de sobrevivência entre estes fármacos, sendo a

escolha do fármaco baseada em fatores como o custo, a via de administração e presença ou ausência de metástases cerebrais (19,22,25).

Os análogos da platina, os alcaloides da vinca e os taxanos não têm resultados excepcionais quando comparados à Dacarbazina – sendo que, os que apresentam melhores resultados que a Dacarbazina, estão associados a uma maior toxicidade (24,25,29).

1.3.2 Terapêutica dirigida a pequenas moléculas

As moléculas de principal interesse nesta terapêutica pertencem à via de sinalização da MAPK (Figura 1.4). A ativação desta via pode ocorrer através de mutações no NRAS ou no BRAF, levando a um aumento descontrolado da proliferação celular através da ativação ERK1/2 (30,31).

A terapêutica dirigida a pequenas moléculas engloba os inibidores BRAF e os inibidores MEK, tendo ganho protagonismo entre as opções terapêuticas para o melanoma metastático.

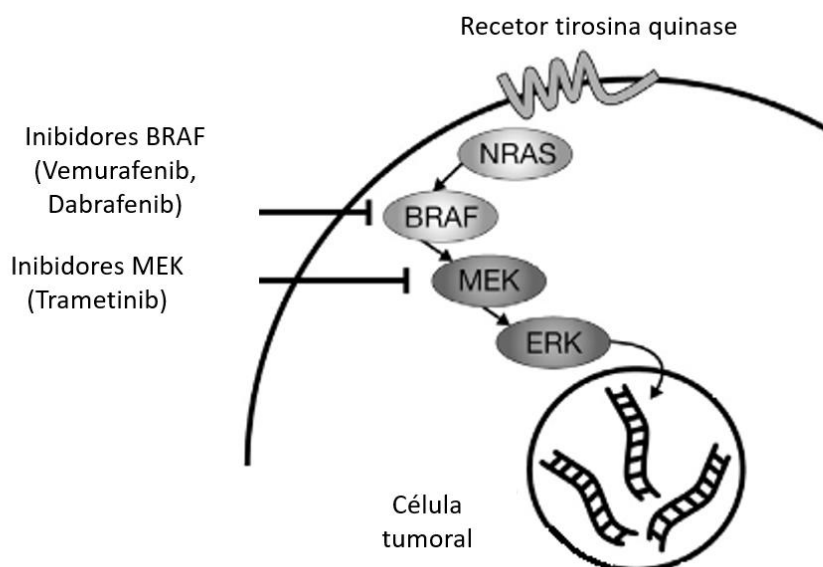


Figura 1.4 – Representação esquemática da via de sinalização MAPK. Figura retirada e adaptada de (31).

1.3.2.1 Inibidores BRAF

Estima-se que 40-50% dos melanomas possuam mutações no BRAF, sendo a mutação mais comum neste tipo de cancro (32). A mutação mais frequente, que compreende cerca de 74-86% das mutações BRAF, ocorre no codão 600 com a substituição de uma valina por um ácido glutâmico (V600E), e a segunda mais frequente, 10-30% das mutações BRAF, ocorre igualmente no codão 600, com a substituição de uma valina por uma lisina (V600K), destacando-se na população mais envelhecida (>65 anos) e/ou na população com exposição crónica aos raios UV (32–34).

Existem ainda outras mutações, menos comuns, no mesmo codão do BRAF, como a substituição de valina por ácido aspártico (V600D) ou por arginina (V600R) (33,34). Todas estas mutações originam uma ativação constitutiva da via de sinalização MAPK, resultando numa proliferação celular descontrolada (21) (Figura 1.4).

O interesse nos inibidores BRAF despertou com a descoberta da importância e da frequência destas mutações no melanoma. O primeiro inibidor a surgir foi o Vemurafenib, tendo a aprovação da FDA em 2011 e da EMA em 2012, seguindo-se o Dabrafenib, aprovado pela FDA e pela EMA em 2013 (35–37) (Figura 1.3). Ambos podem ser usados em monoterapia ou em combinação com um inibidor MEK (21).

Estes fármacos inibem a BRAF através do sítio de ligação do ATP, levando a proteína a uma conformação inativa, inibindo toda a via de sinalização a jusante (38,39).

1.3.2.2 Inibidores MEK

Para além da BRAF, outras proteínas da via MAPK ganharam interesse farmacêutico, nomeadamente a MEK – a BRAF ativada vai fosforilar a MEK1 e MEK2, proteína que se segue na via, que por sua vez vai fosforilar a ERK, levando ao aumento da proliferação celular (31) (Figura 1.4).

Os inibidores MEK exercem a sua ação por modificação alostérica da proteína, não sendo competitivos do ATP, contrariamente aos inibidores BRAF (40). O primeiro a ser aprovado para o melanoma metastático foi o Trametinib, aprovado pela FDA em 2013 e pela EMA em 2014, que inibe tanto MEK1 como a MEK2 (41–43). O Binimetinib (inibidor MEK1 e MEK2) e o Cobimetinib (inibidor MEK1) só estão aprovados para o

melanoma metastático em terapêutica combinada com o Encorafenib (EMA, 2018) e com o Vemurafenib (EMA, 2015), respetivamente (43) (Figura 1.3).

1.3.2.3 Combinação inibidores BRAF + inibidores MEK

A utilização de inibidores BRAF na terapêutica para o melanoma metastático está associada a uma resistência adquirida à terapêutica, sendo que aproximadamente metade dos pacientes sofre uma recaída após 6 meses de tratamento devido à reativação da via de sinalização MEK-ERK (40,44–46).

Vários estudos sugeriram que a terapêutica combinada entre um inibidor BRAF e um inibidor MEK podem atenuar a resistência à terapêutica comparativamente ao uso de inibidores BRAK em monoterapia, garantindo assim uma melhor eficácia terapêutica, pelo que vieram a ser aprovadas várias combinações destes fármacos (47–50).

Atualmente, existem três combinações de inibidores BRAF e inibidores MEK aprovadas para o melanoma metastático com as mutações BRAFV600E e BRAFV600K: Vemurafenib e Cobimetinib (EMA, 2015); Dabrafenib e Trametinib (EMA, 2014); Encorafenib e Binimetinib (EMA, 2018) (41,51,52) (Figura 1.3).

1.3.3 Inibidores de *checkpoints* imunitários

Juntamente com os inibidores BRAF e os inibidores MEK, os inibidores de *checkpoints* imunitários têm constituído uma nova abordagem terapêutica para o melanoma metastático desde o início da segunda década de 2000.

Estes *checkpoints* controlam a amplitude e a duração da resposta imunitária do organismo, nomeadamente das células T, sendo essenciais para a manutenção da autotolerância (isto é, prevenção de autoimunidade) e para evitar danos da resposta imunitária às células do próprio organismo. O CTLA-4 e a PD-1 despertaram interesse neste mecanismo, tendo sido criadas moléculas específicas para a sua inibição (31,53).

Esta abordagem terapêutica apresenta vantagens comparativamente a outras, nomeadamente uma maior duração da resposta imunitária em relação às citocinas (IL-2 e IFN) (54,55) e uma menor suscetibilidade à resistência em relação à quimioterapia e à terapêutica dirigida a pequenas moléculas (56).

1.3.3.1 CTLA-4

O CTLA-4 é expresso unicamente por linfócitos T citotóxicos e, através da ligação ao CD80/86 presentes nas células apresentadoras de antígenos, provoca uma diminuição da expressão deste tipo de linfócitos, diminuindo a resposta imunitária contra células cancerígenas (53,54).

O Ipilimumab surge como anticorpo monoclonal que, através da sua ligação ao CTLA-4, vai inibir a ligação ao CD80/86, promovendo assim um mecanismo de aumento de expressão dos linfócitos T citotóxicos, resultando numa maior ação destas contra as células cancerígenas (31,53,54). Este fármaco foi aprovado em 2011 pela EMA e pela FDA para o tratamento do melanoma metastático (31,57) (Figura 1.3).

1.3.3.2 PD-1

O PD-1 é um recetor expresso amplamente nos linfócitos T que, através da união aos seus ligandos (PD-L1) presentes nas células cancerígenas, limita a atividade antitumoral destes linfócitos (31,53).

Os inibidores do PD-1 permitem que a ligação não ocorra, possibilitando que as células do sistema imunitário continuem a atuar sobre as células tumorais. O Nivolumab, aprovado pela FDA em 2014 e pela EMA em 2015, e o Pembrolizumab, aprovado pela FDA em 2014 e pela EMA em 2015, são exemplos destes fármacos com indicação para o tratamento do melanoma metastático (58–62) (Figura 1.3).

O Nivolumab pode ser utilizado em monoterapia ou em combinação com o Ipilimumab (inibidor de CTLA-4) (31,57).

1.3.4 Citocinas

A imunoterapia foi uma das primeiras terapias a surgir para o melanoma metastático e várias estratégias demonstraram ter efeito antitumoral. No entanto, a relevância do uso de citocinas como terapêutica tem diminuído, tanto devido ao surgimento de novas terapêuticas como devido ao seus efeitos tóxicos (como febre, calafrios, hipotensão e arritmias), uma vez que esta não apresenta especificidade para as células tumorais (31).

1.3.4.1 IL-2

A glicoproteína IL-2 foi uma das primeiras imunoterapias a ser indicada para o melanoma metastático, tendo sido aprovada pela FDA em 1998 e pela EMA em 2002 para a referida indicação. Esta citocina, naturalmente produzida pelas células T, vai promover a proliferação das mesmas, gerando uma maior resposta imune contra as células cancerígenas (63).

Esta é usualmente administrada em altas doses e pode ser aplicada diretamente na lesão, de modo a reduzir os efeitos tóxicos sistémicos e a aumentar a eficácia terapêutica (63,64).

1.3.4.2 IFN- α

O IFN- α é uma proteína que demonstrou ter efeitos antiangiogénicos, antiproliferativos e pró-apoptóticos, sendo por isso utilizada como terapêutica em vários tumores malignos. Esta proteína aumenta a resposta das células dendríticas ao tumor (65).

Este foi aprovado pela FDA em 1995 e pela EMA em 2000 para o tratamento do melanoma maligno, representando uma terapêutica adjuvante após a cirurgia para pacientes de alto risco (65–67).

1.3.5 Terapia viral oncolítica

Os vírus oncolíticos são uma terapia em ascensão na área da Oncologia. Através da manipulação genética, estes vírus podem ter uma ação antitumoral, tendo a vantagem de levarem a uma especificidade do sistema imunitário para atuar nas células tumorais, evitando danos nas células saudáveis (68).

1.3.5.1 T-VEC

O Talimogene laherparepvec (T-VEC) é um vírus derivado do vírus *Herpes simplex* que é administrado diretamente na lesão. Aprovado pela EMA e pela FDA em 2015, este vírus replica-se especificamente nas células tumorais, levando à morte celular através da lise celular causada pela replicação viral, da ativação de vias apoptóticas, e da promoção da ação do sistema imunitário (69–72).

Atualmente está a ser estudado como adjuvante da terapia anti PD-1, sendo que parece aumentar a eficácia desta terapêutica através da alteração do microambiente tumoral (73).

1.4 Resistências à terapêutica no melanoma

O desenvolvimento e a aprovação de novas terapêuticas para o melanoma metastático constituíram um importante marco para a otimização da sobrevivência global, contudo os efeitos adversos e o desenvolvimento de resistências associadas a estas terapêuticas continua a ser uma preocupação (74,75).

A resistência pode ser intrínseca, ou seja, já existente antes do início da terapêutica, ou adquirida, quando esta ocorre durante ou após a finalização da terapêutica, sendo que inicialmente a neoplasia era sensível à mesma – a diferença entre estas não é muito precisa, uma vez que o mesmo evento pode ocorrer em diferentes fases da terapêutica (76). Esta pode ser originada por acontecimentos mutacionais ou não-mutacionais, assim como alterações do microambiente envolvente do tumor (74,75) (Figura 1.5).

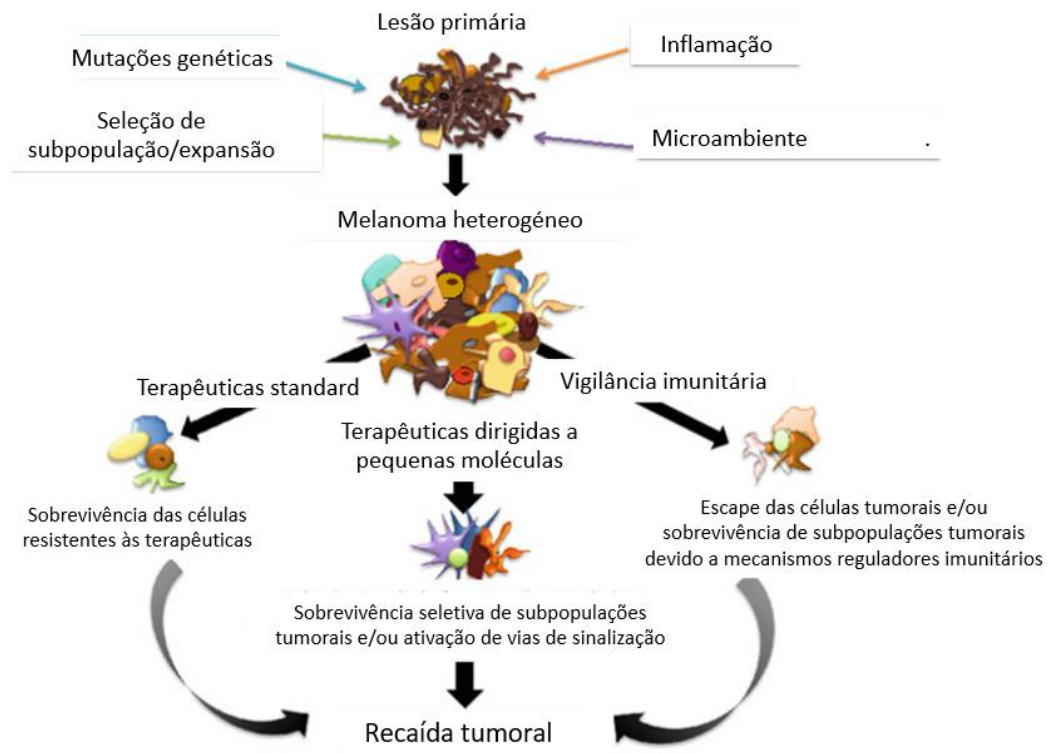


Figura 1.5 – Mecanismos de resistência no melanoma. Figura retirada e adaptada de (18).

Uma das resistências adquiridas mais comuns à terapêutica para o melanoma metastático é a reativação da via MAPK, que leva à falha das terapêuticas dirigidas a pequenas moléculas (inibidores BRAF e inibidores MEK). Através de uma sobreativação da ERK, contornando a inibição de proteínas da via por os fármacos já referidos, continua a existir proliferação e consequente sobrevivência das células tumorais. Esta reativação está presente em cerca de 80% dos tumores resistentes a terapêuticas dirigidas a pequenas moléculas, o que reforça o papel proeminente desta via neste tipo de células e ainda a envolvimento desta na resistência à terapêutica, para além de sugerir que há uma rápida adaptação celular à inibição destas proteínas (76,77).

Outra via metabólica igualmente associada ao desenvolvimento de resistência à terapêutica é a via PI3K-mTOR. Pensa-se que a sobreativação desta deve-se mutações na fosfatase homóloga à tensina (PTEN), que leva a uma redução da função da mesma, e consequente falha na inibição da via PI3K-mTOR (76).

1.4.1 TRIB2

A Tribbles 2 (TRIB2) é uma proteína pseudo-quinase pertencente à família dos Tribbles. Esta família engloba três homólogos (TRIB1, TRIB2 e TRIB3) e todos eles contêm um domínio pseudo-quinase, sem atividade catalítica, funcionando então como adaptadores (78). Esta desempenha um importante papel na regulação e desenvolvimento de processos fisiológicos celulares, como a inflamação e a diferenciação celular, estando também associada a distúrbios metabólicos, doenças cardíacas e vários tipos de cancro, nomeadamente cancro do pulmão, do fígado, leucemias e melanoma (79,80).

A TRIB2 encontra-se intimamente relacionada com o melanoma, encontrando-se sobre expresso neste tipo de cancro, comparativamente a pele saudável (81). Esta foi sugerida como um vantajoso biomarcador para a progressão do melanoma, uma vez que a sua expressão aumenta à medida que a neoplasia se desenvolve (82). Além disso, o mesmo estudo sugere o gene TRIB2 como biomarcador da resposta à quimioterapia (Dacarbazina, taxanos, análogos da Platina), uma vez que, na obtenção de uma resposta completa à quimioterapia, a expressão deste se encontra mais reduzida, comparativamente a quando não há resposta há terapêutica (82). A identificação de TRIB2 como biomarcador nestas duas situações traz uma grande vantagem para a otimização da terapêutica.

A TRIB2 facilita a sobrevivência e crescimento das células tumorais, causando assim resistência à terapêutica (81,83). O mecanismo proposto para este efeito é a repressão das proteínas *Forkhead box O* (FOXO), fatores de transcrição considerados supressores tumorais, que se encontram envolvidos na regulação de vários genes que intervêm na proliferação, sobrevivência, metabolismo e resposta ao stress das células (83,84). Este processo ocorre na presença de elevados níveis de TRIB2, em que esta se une à AKT, ativando-a, provocando posteriormente a inibição de FOXO e também de p53 (Figura 1.6), uma proteína conhecida pelo seu papel como supressor tumoral (81).

O Potencial Papel da TRIB2 no Tratamento do Melanoma com Tiazolidinedionas

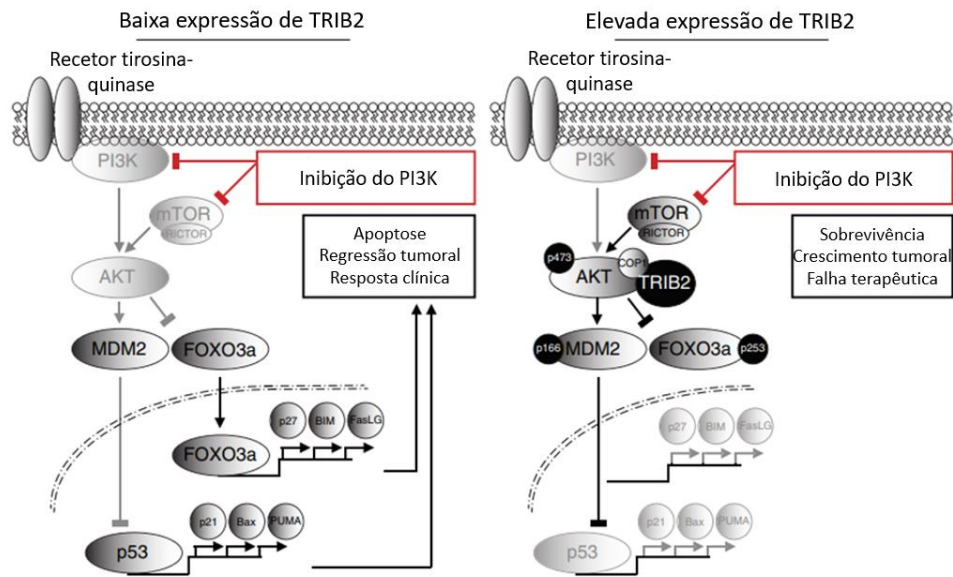


Figura 1.6 – Representação esquemática do mecanismo de resistência no melanoma à terapêutica mediada pela TRIB2. Figura retirada e adaptada de (81).

Há evidência de que a elevada expressão de TRIB2 encontra-se relacionada com a sensibilidade a terapêuticas anticancerígenas. Assim, uma vez identificada como potenciadora da resistência a terapêuticas (tanto quimioterapia como terapêuticas dirigidas a pequenas moléculas), surge o interesse da redução dos níveis da TRIB2, com a finalidade de promover uma maior eficácia das terapêuticas (85,86).

1.5 Antidiabéticos orais no melanoma

Vários têm sido os fármacos utilizados na procura de novas estratégias para o tratamento do melanoma através do reposicionamento de fármacos – processo que consiste na procura de novas utilizações para fármacos já aprovados em certa(s) patologia(s) (87). Este apresenta várias vantagens comparativamente à descoberta de novos fármacos, nomeadamente a existência de dados prévios relativos aos mecanismos de ação e à segurança dos mesmos, o que reduz o tempo decorrente até aos ensaios clínicos e, assim, os custos associados (88).

De entre os vários fármacos considerados no reposicionamento para a terapêutica ou diminuição da resistência à terapêutica, surgem os antidiabéticos orais, como a metformina e as tiazolidinedionas.

1.5.1 Tiazolidinedionas

As tiazolidinedionas (TZDs) são fármacos sintéticos, desenvolvidos na década de 90 para o tratamento da Diabetes *mellitus* tipo 2, doença metabólica caracterizada pela resistência à insulina (89). Esta classe engloba quatro fármacos: a Ciglitazona, a Troglitazona, a Rosiglitazona e a Pioglitazona. Atualmente, apenas a Pioglitazona é aprovada pela EMA e pela FDA, e a Rosiglitazona aprovada unicamente pela FDA (90–92). A Ciglitazona nunca foi usada clinicamente e a Troglitazona, embora tenha sido a primeira TZD a ser aprovada pela FDA, foi retirada no ano 2000 devido a hepatotoxicidade (89,93,94).

Estes fármacos têm como principal alvo terapêutico o recetor ativado de proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ), sendo agonistas do mesmo. O PPAR γ é um fator de transcrição envolvido na regulação da diferenciação de adipócitos, metabolismo energético e sensibilidade dos tecidos à insulina (95).

Através da redução dos níveis de glicose no sangue (em jejum) para níveis normais e do aumento da sensibilização à insulina, as TZDs conseguem controlar a hiperglicemia nos pacientes com Diabetes *mellitus* tipo 2 (89,95,96). Estes fármacos preservam ainda a função das células β , reduzindo a progressão para a necessidade de

insulina (97), e diminuem a excreção renal de proteínas, evitando a progressão da nefropatia diabética (98).

Para além do seu potencial como fármacos antidiabéticos, estudos demonstram que tanto a Rosiglitazona como a Pioglitazona são potenciais agentes anticancerígenos (99). Em linhas celulares de melanoma a Rosiglitazona demonstrou efeitos anti tumorais, nomeadamente efeitos anti proliferativos (100–106), indução da apoptose (103,106) e paragem do ciclo celular (104). A Pioglitazona demonstrou também efeito anti proliferativos e indução da apoptose em linhas celulares de melanoma (103,106).

No entanto, recentemente um estudo apresenta resultados contrários, evidenciando que as TZDs não têm efeitos anti-proliferativos, mas sim favorecem a proliferação celular tumoral (107). Nesse mesmo estudo, publicado em 2018, realizado em várias linhas celulares de melanoma, a Rosiglitazona favorece a formação do tumor, pondo em causa o seu potencial anticancerígeno, limitando o seu potencial terapêutico (107).

Relativamente a ensaios clínicos, uma meta-análise realizada com dados de quatro ensaios clínicos randomizados e doze estudos observacionais determinou que o uso de TZDs está associado a uma diminuição significativa do risco do cancro do pulmão, colorretal e da mama (108), e um estudo sugere que a quimioterapia conjunta com inibidores da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e TZDs poderá levar à remissão tumoral e assim ao sucesso terapêutico (109). Por outro lado, um estudo retrospectivo, em doentes diabéticos tipo 2, tratados cronicamente com TZDs, associou o uso de Pioglitazona a um risco aumentado de desenvolver cancro da bexiga (110), e um outro associou o uso de TZDs a um risco aumentado de desenvolver linfoma não-Hodgkin (111). No entanto, um estudo demonstrou que doentes com Diabetes *mellitus* tipo 2 expostos à Pioglitazona por um longo período de tempo não apresentavam um risco acrescido de desenvolver melanoma (112).

1.5.1.1 Mecanismo de ação das tiazolidinedionas

PPAR γ , principal alvo da ação das TZDs, pertence à família dos PPARs, que por sua vez faz parte da superfamília de recetores nucleares (113,114). A família dos PPARs é composta por três isoformas: o PPAR α , PPAR γ , o δ e o PPAR δ (também conhecido como PPAR β). Estes três PPARs, para além de estarem distribuídos por diferentes tecidos, possuem diferentes sítios de ligação para os seus ligandos e estão envolvidos em diferentes funções fisiológicas (Tabela 1.2), embora estas normalmente sejam complementares (115).

Tabela 1.2 – As três isoformas do PPAR: respetivas distribuições no organismo e funções. Informação retirada e adaptada de (114).

	Distribuição	Funções
PPAR α	Fígado Tecido adiposo castanho Músculo esquelético e cardíaco, rins e enterócitos	Catabolismo lipídico Controlo da inflamação Diferenciação e proliferação de queratinócitos Cicatrização de feridas na pele
PPAR γ	Tecido adiposo Macrófagos Cólon, baço, retina, células hematopoiéticas	Anabolismo lipídico (armazenamento) Diferenciação de adipócitos Controlo da inflamação Maturação dos macrófagos Alvo molecular das TZDs
PPAR δ	Todos os tecidos	Transporte reverso do colesterol Proliferação celular e apoptose Mielinização Diferenciação de adipócitos

Existem 2 isoformas de PPAR γ : o PPAR- γ 1, que é encontrado em vários tecidos; o PPAR- γ 2, expresso principalmente no tecido adiposo (116,117). Apesar da presença do PPAR γ em vários tecidos, é muito provável que o tecido adiposo seja o principal local de ação pelas TZDs (118–120). Para exercer a sua ação, a TZD entra na célula e liga-se ao seu alvo, PPAR γ . Após esta ligação, o PPAR γ heterodimiza com o recetor retinoide X (RXR), possibilitando o reconhecimento dos elementos de resposta do proliferador do peroxissoma (PPRE), na região promotora dos genes alvo, por este complexo – esta alteração conformacional vai ainda recrutar cofatores e coativadores que irão influenciar os genes transcritos (114). Os PPRE encontram-se em regiões reguladoras dos genes que controlam a proliferação, diferenciação, apoptose e angiogénese, e ainda genes envolvidos no metabolismo lipídico (121–123). Esta ação promove assim a expressão de genes que codificam proteínas que contribuem para a sensibilização à insulina (Figura 1.7) (124).

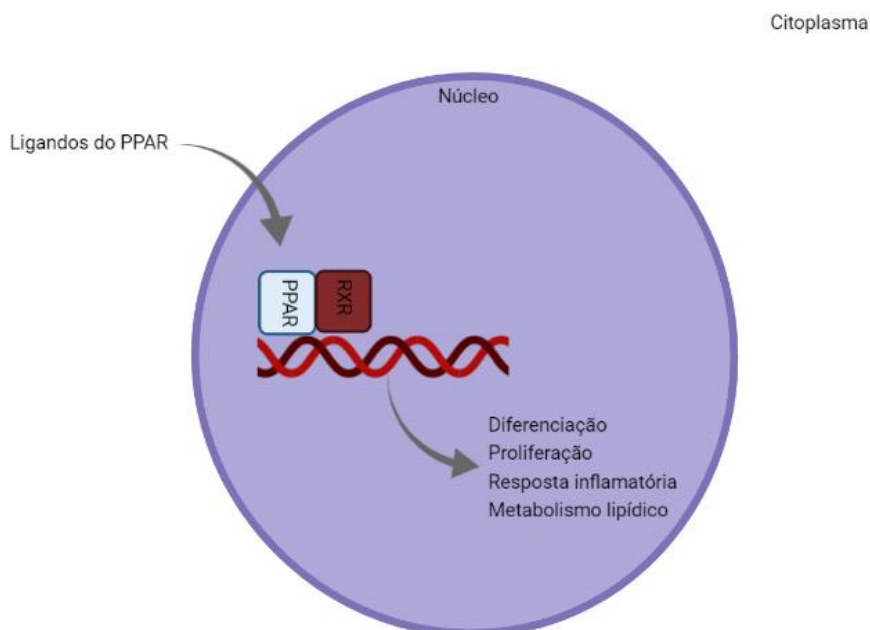


Figura 1.7 – Representação esquemática do funcionamento dos PPARs. Figura adaptada de (105).

Assim, através deste mecanismo, as TZDs diminuem a resistência dos tecidos à insulina por meio da captação da glucose pelos adipócitos e da diminuição dos níveis séricos de ácidos gordos (118,124).

O mecanismo de ação anticancerígena poderá passar pela ativação do PPAR γ , sendo que esta influenciará várias vias de sinalização envolvidas na carcinogénese, tal como demonstra a Figura 1.8 (125).

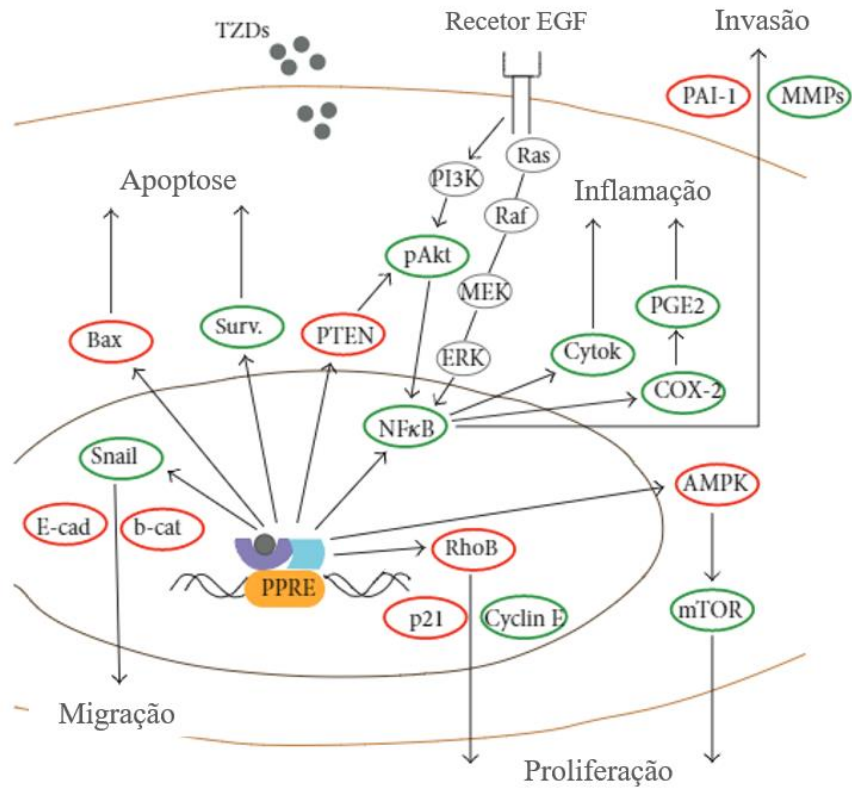


Figura 1.8 – Representação esquemática dos efeitos das TZDs em várias vias de sinalização. Figura retirada e adaptada de (125).

2. Hipóteses e Objetivos

Dados ainda não publicados, recentemente obtidos através da base de dados GEO Profiles por investigadores do laboratório Cell Signaling do Centro de Investigação em Biomedicina (CBMR) da Universidade do Algarve, à responsabilidade do Professor Doutor Wolfgang Link, demonstram que a expressão de TRIB2 encontra-se aumentada em tecido adiposo branco, quando comparado com tecido adiposo castanho. Verificou-se também que a expressão de TRIB2 em tecido adiposo branco está aumentada em indivíduos obesos, e diminui mediante a administração de TZDs, em tecido adiposo branco de ratinhos.

Assim, tendo em conta esta informação preliminar, a formulação das hipóteses desta dissertação teve por base três pontos principais: os agonistas do PPAR γ , nomeadamente as TZDs, parecem reduzir o crescimento de células de melanoma; o TRIB2 é um oncogene e a sua sobre expressão está relacionada com a resistência à terapêutica anticancerígena; a expressão de TRIB2 encontra-se diminuída em adipócitos brancos após tratamento com TZDs.

Estas informações permitiram a formulação de duas hipóteses:

- 1) As TZDs poderão levar a uma diminuição da expressão da TRIB2 nas células de melanoma;
- 2) A potencial redução dos níveis de TRIB2 pelas TZDs poderá estar envolvida no seu mecanismo de ação anticancerígena.

Tendo em conta as hipóteses estabelecidas, esta dissertação tem como objetivo avaliar a ação das Tiazolidinedionas nos níveis de expressão de TRIB2 nas células de melanoma UACC-62, assim como na proliferação das mesmas. Além disso, visa alcançar uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no modo de ação da Rosiglitazona e da Pioglitazona, bem como perceber qual o papel de TRIB2 no tratamento com TZDs.

3. Materiais e Métodos

3.1 Linha celular e condições de cultura

A linha celular UACC-62 (*University of Arizona Cell Culture-62*), células derivadas de melanoma maligno humano (*Homo sapiens*), foi cedida pela Professora Doutora Bibiana Ferreira, investigadora do Centro de Investigação em Biomedicina da Universidade do Algarve. As células foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), juntamente com 10% de soro fetal de bovino (FBS) e 1% de Penicilina-Streptomicina e incubadas numa atmosfera com 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C. Estas células apresentam variadas mutações (126), sendo as mais estudadas uma mutação no BRAF (c. 1799T>A) (32,127,128) e uma no PTEN (c. 741_742insA) (128).

Além das células parentais, foram utilizados dois clones independentes de células UACC-62 TRIB2 *knock-out* (KO), obtidos através da técnica CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)(129). Esta técnica consiste numa pequena sequência de RNA, produzida propositadamente para reconhecer uma sequência específica de DNA, que se liga a uma Cas (*CRISPR associated protein*). Esta ligação permitirá a Cas cortar a sequência de DNA reconhecida, possibilitando a edição da mesma (130) – neste caso específico, esta alteração permitirá que não haja a tradução para a proteína TRIB2 nestas células, confirmado através de Western blot em ambos os clones.

Além da linha celular de melanoma, utilizou-se a linha celular PANC-1. Estas células são derivadas de cancro do pâncreas humano (*Homo sapiens*), e foram mantidas em iguais condições à linha celular UACC-62.

Para a manutenção das culturas celulares, mudava-se o meio da cultura de 48h em 48h ou de 72h em 72h, conforme a observação ao microscópio da confluência celular. Todos os processos de manuseamento celular foram realizados numa câmara de fluxo laminar de classe II, sendo que o material utilizado foi previamente limpo com álcool a 70% e passado por radiação UV, dentro da câmara, durante dez minutos.

A partir de uma cultura celular numa placa de Petri de 10cm (p100), primeiramente aspirou-se o meio antigo, passando-se de seguida a duas lavagens com 3mL de tampão fosfato salino (PBS), de forma a eliminar sobras de meio de cultura e resíduos celulares – durante as lavagens, inclinou-se e rodou-se a placa de Petri de forma à lavagem ser mais eficaz, passando por todas as zonas da placa. Uma vez realizadas as lavagens com PBS e aspirado o mesmo, adicionou-se 0,5mL de tripsina, cuja função é desagregar as células da superfície da placa. Da mesma forma que as lavagens com PBS, inclinou-se e rodou-se a placa, de forma a garantir que a tripsina passava por toda a placa. Após 30 segundos de incubação e verificar-se que existia arrasto (isto é, que já não havia adesão das células à superfície da placa), adicionou-se DMEM e ressuspendeu-se junto à placa com auxílio de uma pipeta, para evitar a formação de agregados celulares que pudessem induzir em erro a contagem celular. De seguida, retirou-se toda a suspensão para um tubo de Falcon.

Para a realização da contagem celular, agitou-se ligeiramente o tubo de Falcon com a suspensão celular e retirou-se 10µL desta para um tubo Eppendorf. A estes 10µL eram adicionados 10µL de azul de tripano (substância usada para diferenciar as células do meio e das células mortas, tornando mais fácil a sua observação e contagem), procedendo-se a uma mistura com a pipeta. Da mistura, retirou-se 10µL para uma câmara de Neubauer, sendo esta posteriormente observada ao microscópio de forma a realizar a contagem celular em quadrados de 1mm².

Utilizou-se a seguinte fórmula para calcular a quantidade de células por mL:

$$\begin{aligned} & \textit{Média do número de células por quadrado} \times 10000 \times \textit{fator de diluição} (2) \\ & = \textit{Número de células por mL} \end{aligned}$$

3.2 Tratamentos

Através de um *stock* de Rosiglitazona (10mM em sulfóxido de dimetilo (DMSO), Cayman®) obteve-se diferentes concentrações – [0,1; 1; 10; 50] μ M, diluindo o *stock* em DMEM, e contendo todas elas 0,5% de DMSO. Para a obtenção dos tratamentos de Pioglitazona ([10; 50] μ M), realizou-se o mesmo processo, usando um *stock* de 10mM em DMSO (Cayman®).

Relativamente ao ensaio por 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol (MTT), houve experiências com diferentes tempos de incubação, nomeadamente 24h, 48h, 72h ou 72h+24h. Todos os tratamentos utilizados foram realizados em triplicado, isto é, três poços de uma mesma placa continham o mesmo tratamento. As células de controlo foram tratadas unicamente com DMSO (0,5%, cujo veículo é DMEM) e incubadas durante os respetivos períodos.

3.3 Ensaio MTT

Para a avaliação da proliferação através de ensaios MTT, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, numa densidade de 3000 células/poço. O MTT é um ensaio colorimétrico que se baseia na capacidade das células conseguirem converter o MTT em formazan, um produto de cor roxa, cuja absorvância máxima é próxima dos 570nm, através de uma reação com NADH ou moléculas redutoras semelhantes, que transferem eletrões para o MTT (131,132). Assim, este ensaio mede a viabilidade celular, uma vez que só as células vivas conseguem converter o MTT em formazan. Este processo realizou-se quando completado o tempo definido para a incubação de cada placa (24h, 48h, 72h ou 72h+24h de tratamento).

A cada placa retirou-se o meio das células e adicionou-se o mesmo volume (100 μ L) de solução de MTT (0,5mg/mL em DMEM, VWR®) aos poços, sendo a placa posteriormente incubada durante 3h a 37°C (5% CO₂). Após a incubação de 3h, o meio foi eliminado e adicionou-se 100 μ L de DMSO a cada poço, para dissolver o formazan, sendo as placas agitadas à temperatura ambiente durante 5 minutos. Os valores da densidade ótica das células foram obtidos a dois comprimentos de onda diferentes (560nm e 750nm) por espectrofotometria, através do aparelho GloMax®-Multi Detection

System, e calculadas subtraindo os valores obtidos a 750nm aos valores obtidos a 560nm, de forma a eliminar interferências que algo que não seja do interesse de análise possa ter. Em cada placa foram colocados três poços sem células, mas submetidos a todo o procedimento anteriormente descrito. Os valores obtidos para estes três poços foram utilizados para a normalização dos valores obtidos para as células.

3.4 Extração e quantificação de extratos proteicos

Para a extração proteica, foram utilizadas células cultivadas em placas de 6cm (p60), numa densidade de 500000 células/placa, 24h antes do tratamento. No dia seguinte, retirou-se o meio de cada placa e adicionou-se novo meio, já com fármaco – a gama de concentrações de Rosiglitazona utilizada foi igual à gama de concentrações utilizada no ensaio MTT (0,1 a 50 μ M), enquanto a Pioglitazona foi utilizada apenas na concentração de 10 μ M. De modo a obter os lisados celulares, após 24h de tratamento, retirou-se as placas da incubadora e colocou-se as mesmas em gelo. Eliminou-se o meio, fez-se duas lavagens com PBS frio, eliminou-se o mesmo e acrescentou-se 1mL de PBS a cada placa. Por fim, procedeu-se à raspagem das placas com um raspador de células a frio (sem levantá-las do gelo) e recolheu-se o obtido para tubos de 1,5mL previamente rotulados, os quais foram mantidos em gelo. Estes tubos foram posteriormente centrifugados a 10000 rpm, a 4°C, durante cinco minutos. Após a centrifugação, colocou-se os tubos em gelo e, com o auxílio de uma micropipeta, eliminou-se o sobrenadante.

Ao *pellet* obtido adicionou-se 75 μ L de tampão de lise celular (CST) (Tabela 3.1) suplementado com o inibidor de fosfatases calcicolina A (10nM) e PIC (*cocktail* inibidor de proteases) (Sigma®), para lisar as células. Os microtubos foram agitados com recurso ao vórtex durante 5 segundos, de 5 em 5 minutos, perfazendo um total aproximado de 20 minutos, sendo mantidos em gelo nos intervalos. Posteriormente foram centrifugados por 15 minutos, a 4°C e a 15000 rpm. O sobrenadante foi recolhido para um novo microtubo e usou-se o ensaio de Bradford para a quantificação da proteína.

Tabela 2.1 - Constituição para 10mL de 1x CST buffer.

Componente	Quantidade
Água fria	7 mL
1M Tris pH 7,5	200 µL
5M NaCl	300 µL
5% Triton X- 100	2 mL
1M NaF	500 µL
0,5M EDTA	20 µL
0,5M EGTA	20 µL
1M b-g-p	20 µL
100mM ovo4	100 µL

O ensaio de Bradford é um ensaio rápido e preciso usado para a quantificação proteica. Este consiste na ligação da forma mais aniónica do corante *Coomassie Blue* às proteínas – assim, a quantidade de proteína pode ser estimada a partir da quantidade de corante ligado às proteínas, já que a solução obtém uma cor proporcional que pode ser quantificada através de um espectrofotómetro (133).

Para análise através do ensaio de Bradford, diluiu-se as amostras (1:10), com água destilada, em novos tubos de 1,5mL previamente rotulados. Preparou-se um branco (2µL de tampão CST com 18µL de água destilada) e também seis padrões de albumina de soro bovino (BSA), com as seguintes concentrações: [0,15; 0,3; 0,6; 0,8; 1; 2]µg/µL. Numa placa de 96 poços, colocou-se 5µL de cada solução em cada poço, adicionando-se posteriormente 250µL do reagente de Bradford e procedeu-se à medição da absorvância, a 595nm. A estes resultados foi aplicada a Lei de Lambert-Beer (uma vez que os padrões de BSA tinham concentrações conhecidas), de forma a extrapolar as concentrações proteicas das amostras.

3.5 Eletroforese em gel de acrilamida e *Western blot*

Western blot é uma técnica comumente utilizada para identificar proteínas de interesse num determinado extrato proteico celular. Esta consiste em três principais etapas: 1) separação das proteínas por tamanho; 2) transferência das proteínas para um suporte sólido; 3) marcação da proteína de interesse utilizando um anticorpo primário e, posteriormente, um anticorpo secundário (134). Assim, para a realização desta técnica, é necessária a realização de uma eletroforese.

Os géis para a realização da eletroforese foram preparados de acordo com um protocolo estabelecido em laboratório, estando as suas composições descritas na Tabela 3.2. Primeiramente preparou-se o *running gel* (onde correm as amostras, durante a eletroforese) e seguidamente o *stacking gel* (onde são carregadas as amostras).

Tabela 3.2 - Composição para um *running gel* e um *stacking gel*.

<i>Running gel (10%)</i>	
Componente	Quantidade
1M Tris pH=8,8	3 mL
Acrilamida 40%	2 mL
Água Mili-Q	2,9 mL
SDS 10%	80 µL
APS 25%	32 µL
TEMED	12 µL
<i>Stacking gel</i>	
Componente	Quantidade
1M Tris pH 6,8	312,5 µL
Acrilamida 40%	312,5 µL
Água Mili-Q	1,85 mL
SDS 10%	25 µL
APS 25%	12,5 µL
TEMED	7,5 µL

É de referir que a tetrametiletilenodiamina (TEMED) deverá ser o último componente da fórmula a adicionar, uma vez que, em conjunto com o APS (persulfato de amónia), são os catalisadores da polimerização do gel. Após a adição do TEMED, agitou-se as misturas e as mesmas foram colocadas em moldes de vidro, em suportes da Bio-Rad, durante aproximadamente meia hora – sendo que, de modo a criar os poços para carregar as amostras, após colocação da solução para formar o *stacking* gel no molde, colocou-se um pente de 1,5mm sobre esta. Após a solidificação dos géis, procedeu-se à montagem do equipamento necessário à eletroforese, enchendo a tina com *running buffer* (Tabela 3.3) até ao topo. Das amostras quantificadas anteriormente pelo ensaio de Bradford, 50µg de cada foi carregada em gel – antes de serem carregadas, foi adicionado tampão Laemmli a cada uma, os seus volumes igualados com água e posteriormente desnaturadas a 100°C durante 10 minutos. Iniciou-se a eletroforese a 75V, durante aproximadamente 20 minutos, permitindo que as amostras passassem para o *running* gel, passando seguidamente para uma voltagem de 150V durante aproximadamente 1 hora.

Tabela 3.3 – Composição de 1L de *Running Buffer*.

Componente	Quantidade
Tris	30,3 g
Glicerina	188 g
SDS	10 g

Terminada a eletroforese, procedeu-se à transferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose, com a finalidade de ter as proteínas num suporte físico que permitisse a sua visualização. Para tal, utilizou-se o método “sandwich”, representado na Figura 3.1. A tina foi preenchida com *transfer buffer* (Tabela 3.4) e uma placa de gelo, sendo ainda colocado gelo ao seu redor, para manter uma baixa temperatura durante a transferência. A transferência dos extratos proteicos para as membranas realizou-se a 75V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

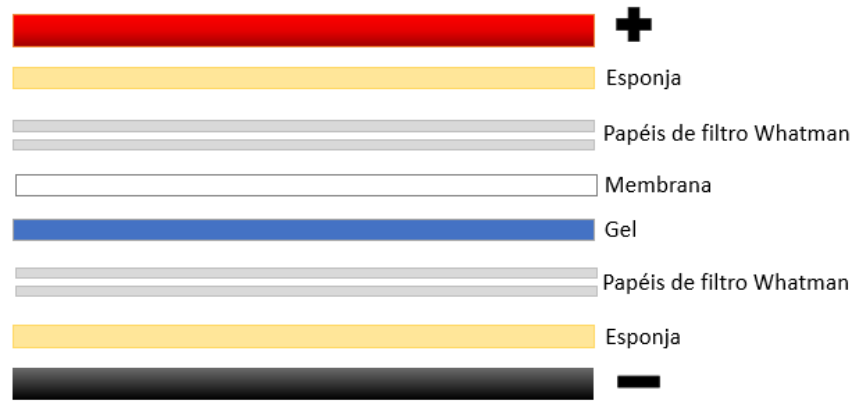


Figura 3.1 – Esquematização do método "sandwich".

Tabela 3.4 – Composição de 1L de *Transfer Buffer*.

Componente	Quantidade
Tris	72,7 g
Glicerina	36,6 g

Terminada a transferência, as membranas foram bloqueadas com 5% de leite magro em pó, dissolvido em tampão salino tween-20 1% (TBS-T) (Tabela 3.5) (sendo que o "T" vem de *tween*, agente emulsivo), durante um mínimo de 1h à temperatura ambiente, em agitação lenta. Seguidamente foram incubadas com o anticorpo primário (que nos permite identificar a proteína de interesse), diluído em TBS-T, durante a noite a 4°C. No dia seguinte lavou-se as membranas quatro vezes (7 minutos cada lavagem) com TBS-T, passando estas à incubação com o anticorpo secundário, durante um mínimo de 1h, à temperatura ambiente e em agitação lenta. Os anticorpos utilizados e respectivas diluições encontram-se na Tabela 3.6.

Tabela 3.5 – Composição de 8L de TBS-T.

Componente	Quantidade
Água	5L
Base Tris	1,936 g
NaCl	1,400 g
HCl	qb até pH=7,5
Água	Até perfazer 7,840L
Tween	160 mL

Tabela 3.6 – Lista de anticorpos primários e secundários utilizados neste estudo.

Anticorpos primários				
Anticorpo	Diluição	Origem	Referência	Fornecedor
P-AKT (ser473)	1:1000	Coelho	CST 4060	Cell Signaling Technology
P-AKT (ser473)	1:500	Coelho	Sc-7985	Santa Cruz Biotechnology
AKT total	1:1000	Coelho	CST 9272	Cell Signaling Technology
P-ERK (thr202/tyr204)	1:1000	Coelho	CST 4370	Cell Signaling Technology
P-ERK	1:300	Rato	Sc-7383	Santa Cruz Biotechnology
ERK total	1:300	Coelho	sc-94	Santa Cruz Biotechnology
GAPDH	1:5000	Coelho	sc-25778	Santa Cruz Biotechnology
PPAR γ	1:1000	Coelho	CST 2443	Cell Signaling Technology
TRIB2	1:1000	Coelho	CST 4370	Cell Signaling Technology

p70S6K (Thr389)	1:500	Cabra	sc-11759	Santa Cruz Biotechnology
p70S6K total (C-18)	1:500	Coelho	sc-230	Santa Cruz Biotechnology
Anticorpos secundários				
Anticorpo	Diluição	Origem	Referência	Fornecedor
Anti-cabra	1:10000	Coelho	NA46	GE Healthcare
Anti-coelho	1:10000	Burro	NA934	GE Healthcare
Anti-rato	1:10000	Ovelha	NA931	GE Healthcare

Por fim, após quatro lavagens de 7 minutos com TBS-T, as membranas foram reveladas com ECL (do inglês *enhanced chemiluminescent*) (Tabela 3.7), sendo incubadas durante 5 minutos, em agitação, nesta solução. As imagens das bandas foram obtidas no ChemiDoc™ XRS+ System, BioRad.

Tabela 3.7 – Composição do ECL.

Solução 1	
Componente	Quantidade
250 mM luminol	200 µL
90mM ácido P-Cumárico	88 µL
1 M Tris pH=8,5	2 mL
Água	17,7 mL
Solução 2	
Componente	Quantidade
30% H₂O₂	12 µL
1M Tris pH=8,5	2 mL
Água	18 mL

3.6 Análise estatística

Para realizar a análise estatística dos dados obtidos foi usado o *unpaired t test*, através do programa GraphPad Prism, versão 6.01. Os resultados com *P<0,05 e **P<0,01 foram considerados significativos.

4. Resultados

4.1 Análise da expressão de TRIB2 em resposta a tratamentos com TZDs

Os ensaios realizados por *Western blot* foram realizados com o fim de atingir o principal objetivo deste trabalho: avaliar a expressão de TRIB2 em células de melanoma tratadas com Rosiglitazona (Rosi) ou Pioglitazona (Pio). Para tal, usaram-se células KO #31 como controlo negativo, uma vez que não expressam a proteína em análise (Figura 4.1). Utilizou-se ainda o extrato proteico de células tratadas unicamente com DMSO (veículo) de modo a poder comparar-se o extrato proteico de células tratadas com fármacos a estas, após a incubação de 24 horas. O anticorpo específico para a deteção do gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como controlo da quantidade proteica carregada nos géis para *Western blotting*, uma vez que este gene é bastante estável e expresso de forma constitutiva.

Numa primeira exposição verificou-se apenas a existência de leves bandas, correspondentes às células *wild-type* (WT) tratadas com fármaco (Figura 4.1). Procedeu-se então a uma exposição mais prolongada em que se pôde verificar claramente a presença de TRIB2 nas células WT, aparentando uma maior expressão nas células tratadas com Rosiglitazona ou Pioglitazona comparativamente às células não tratadas (controlo, DMSO) (Figura 4.1). As células KO, como expectável, não apresentaram bandas referentes a TRIB2 (Figura 4.1).

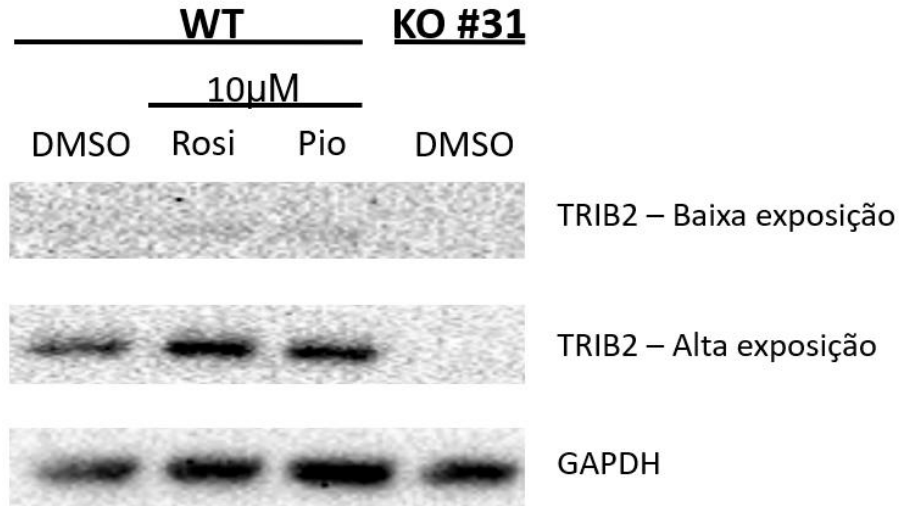


Figura 4.1 – Efeito da Rosiglitazona e Pioglitazona na expressão de TRIB2 em células de melanoma UACC-62. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO, Rosiglitazona ou Pioglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando um anticorpo que reconhece seletivamente TRIB2.

Além da análise da expressão de TRIB2 em células tratadas com Rosiglitazona e células tratadas com Pioglitazona, procedeu-se à análise da expressão de TRIB2 em células WT tratadas com uma concentração crescente de Rosiglitazona, na ordem dos μM (Figura 4.2). Comparando com as células tratadas unicamente com DMSO (controlo), verifica-se um ligeiro aumento da expressão de TRIB2 nas células tratadas com $1\mu\text{M}$ e um aumento mais acentuado nas células tratadas com Rosiglitazona a $10\mu\text{M}$. Porém, esse aumento crescente da expressão de TRIB2 consoante o aumento da concentração de Rosiglitazona não se verifica nas células tratadas com Rosiglitazona a $50\mu\text{M}$ (Figura 4.2).

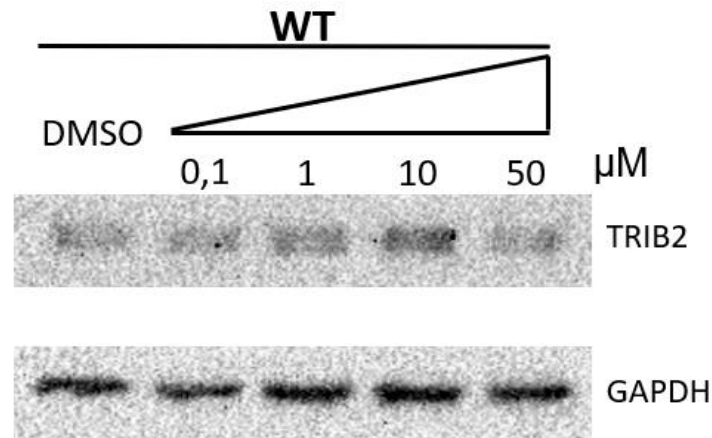


Figura 4.2 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de TRIB2 em células de melanoma UACC-62. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO e concentrações crescentes de Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando um anticorpo que reconhece seletivamente TRIB2.

4.2 Análise da expressão de proteínas das vias de sinalização MAPK e PI3K em resposta a tratamentos com TZDs

A TRIB2 liga-se à AKT, ativando-a, e desencadeando a sua via de sinalização (81). De forma a verificar a expressão de AKT e ativação da via, nas células de melanoma UACC-62, realizou-se ensaios por *Western blot*, utilizando um anticorpo específico para a deteção de P-AKT e um anticorpo específico para a deteção do AKT total (fosforilada na Serina 473 e não fosforilado, respetivamente).

Realizou-se dois ensaios com células parentais (WT) e células KO #31. Estas foram tratadas com 10μM de Rosiglitazona e Pioglitazona, e com DMSO (0,5%), durante 24h. No primeiro ensaio verificou-se um aumento de P-AKT nas células WT, que expressam TRIB2, comparativamente às células KO #31, que não expressam TRIB2 (Figura 4.3). Em ambos os ensaios parece haver um aumento na fosforilação de AKT nas células WT tratadas com Rosiglitazona a 10μM (Figura 4.3 e Figura 4.4), o qual não se observa nas células TRIB2-KO.

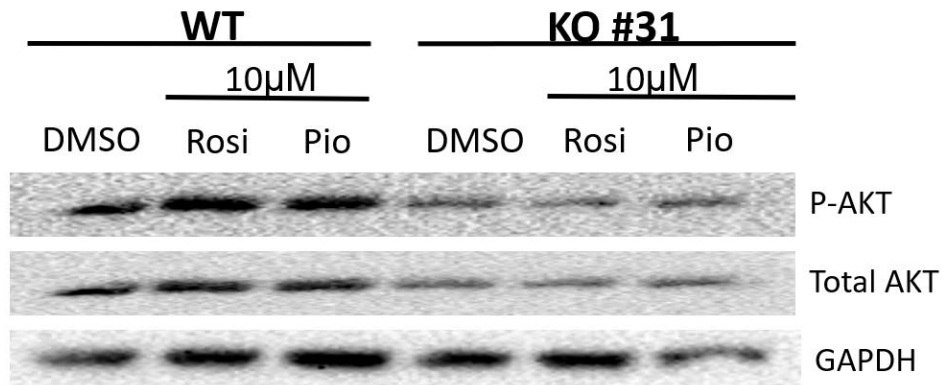


Figura 4.3 – Efeito da Rosiglitazona e Pioglitazona na expressão de AKT em células de melanoma UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT e UACC-62 KO foram tratadas com DMSO, Rosiglitazona ou Pioglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-AKT e AKT total.

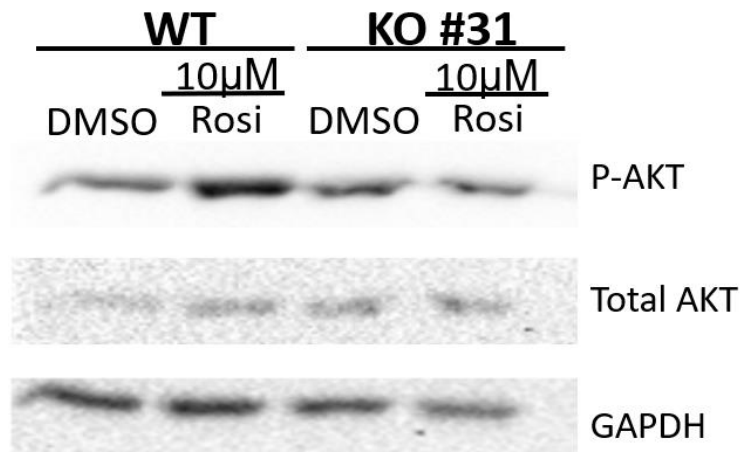


Figura 4.4 – O efeito da Rosiglitazona na expressão de AKT em células de melanoma UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT e UACC-62 KO foram tratadas com DMSO ou Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-AKT e AKT total.

Testou-se ainda concentrações crescentes de Rosiglitazona nas mesmas células, de modo a perceber se existia alguma relação entre uma maior concentração de fármaco e a expressão proteica em análise. Tal como observado anteriormente, há um relativo aumento da fosforilação do AKT nas células WT comparativamente às células KO, porém não se evidencia uma relação consistente entre os níveis de ativação da proteína (P-AKT/AKT total) e as concentrações crescentes de fármaco testadas – no entanto, torna-se difícil esta percepção uma vez que as bandas têm intensidades diferentes (Figura 4.5).

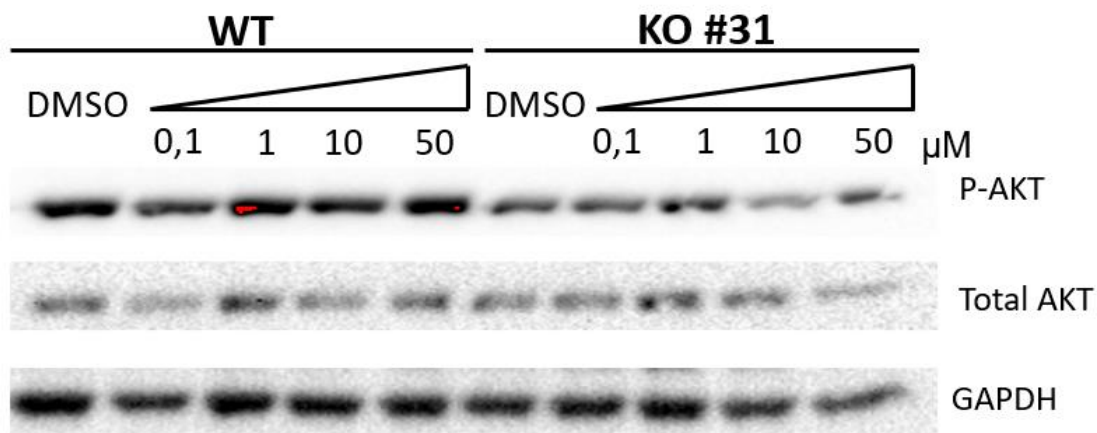


Figura 4.5 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de AKT em células UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO e concentrações crescentes de Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-AKT e Total AKT.

A ERK é uma proteína pertencente à via de sinalização da MAPK, cuja ativação leva a um aumento descontrolado da proliferação celular, característico das células cancerígenas (30,31). Analisou-se a expressão de ERK na mesma linha celular de melanoma, UACC-62, utilizando anticorpos específicos para a deteção de P-ERK e de ERK total. Para tal, realizaram-se duas experiências independentes, ambas com células parentais (WT) e com células KO #31.

Na primeira experiência (Figura 4.6), tratou-se as células com 10 μ M de Rosiglitazona e Pioglitazona, e com DMSO, durante 24h. Nesta pôde observar-se uma diminuição dos níveis de P-ERK nas células tratadas com fármacos comparativamente às células controlo (DMSO), em ambas células WT e KO. Além disso, parece existir um

aumento de P-ERK nas células KO não tratadas (DMSO) comparativamente às células parentais (Figura 4.6).

Relativamente aos níveis totais de ERK, não se verifica nenhuma alteração da expressão entre células parentais e KO, bem como em células tratadas e não tratadas (Figura 4.6).

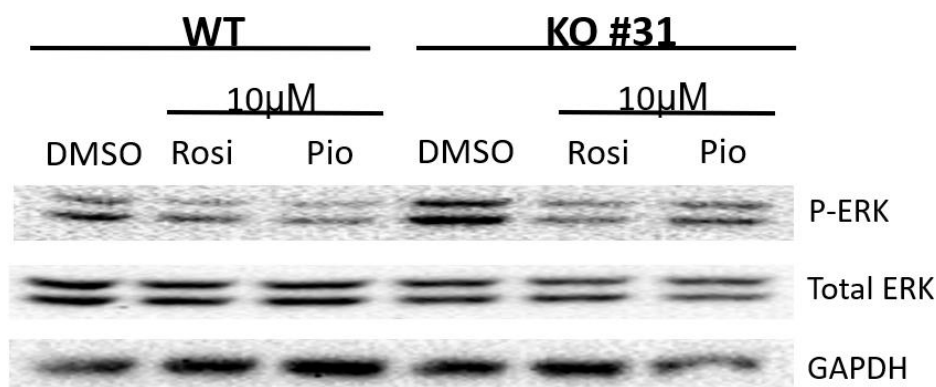


Figura 4.6 – Efeito da Rosiglitazona e Pioglitazona na expressão de ERK em células de melanoma UAC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO, Rosiglitazona ou Pioglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-ERK rabbit e Total ERK.

Numa segunda experiência testou-se tratamentos de concentrações crescentes de Rosiglitazona em células parentais (WT) e KO#31 (Figura 4.7). Os resultados não foram consistentes com os da primeira experiência, uma vez que nesta não foi observável diferenças da expressão de P-ERK entre as células tratadas com fármaco ou tratadas exclusivamente com DMSO. Também não se verificou nenhuma relação entre a expressão de P-ERK e ERK total e os tratamentos de concentrações crescentes de Rosiglitazona.

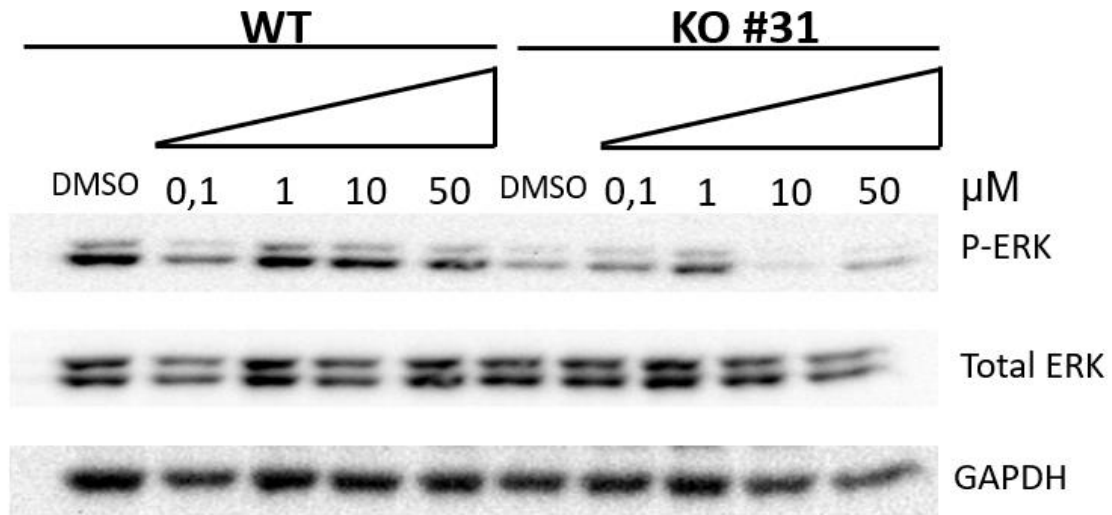


Figura 4.7 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de ERK em células de melanoma UACC-62 WT e KO#31. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO ou Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-ERK mouse e Total ERK.

Investigou-se ainda a expressão de P-p70S6K, uma proteína a jusante na via de sinalização da AKT (17). Para tal, tratou-se células parentais de melanoma UACC-62 com concentrações crescentes de Rosiglitazona e com DMSO, procedendo à extração proteica e incubação das membranas com anticorpos (Figura 4.8). Como pode verificar-se, não existe nenhuma alteração nos níveis de P-p70S6K nem na expressão total de p70S6K entre células tratadas com fármaco e células tratadas com DMSO, nem entre as células tratadas com diferentes concentrações de Rosiglitazona.

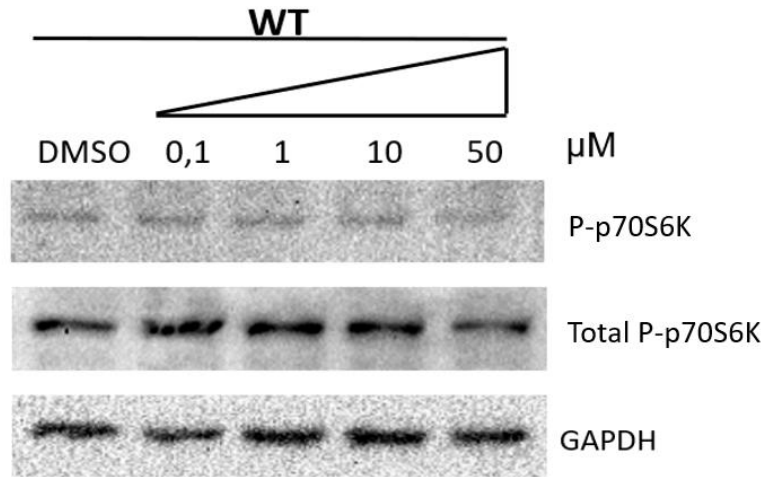


Figura 4.8 – Efeito de concentrações crescentes de Rosiglitazona na expressão de p70S6K em células de melanoma UACC-62 WT. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO ou Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por Western blot utilizando anticorpos que reconhecem seletivamente P-p70S6K e p70S6K total.

4.3 Viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar a proliferação celular das células de melanoma UACC-62 em resposta aos tratamentos com TZDs, nomeadamente a Rosiglitazona e a Pioglitazona, e de forma a avaliar a possível influência da TRIB2 na viabilidade celular, incubou-se as células de melanoma com diferentes concentrações dos fármacos referidos, na ordem dos μM . Cada condição foi realizada em triplicado, para cada experiência. A viabilidade celular das mesmas foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. Este procedimento foi realizado de igual forma para as células WT e para os dois clones KO.

4.3.1 Viabilidade das células UACC-62 WT em resposta a tratamentos com TZDs

Os resultados apresentados na Figura 4.9 representam um conjunto de várias experiências independentes (indicado na legenda), sendo que cada uma das condições de cada experiência foi realizada em triplicado.

Das concentrações testadas neste trabalho, em células parentais (WT) – isto é, que expressam TRIB2 – tanto a Rosiglitazona a $0,1\mu\text{M}$ (Figura 4.9.A) como a Rosiglitazona a $50\mu\text{M}$ (Figura 4.9.D), não demonstraram alterações significativas da viabilidade celular em comparação com as células tratadas com o veículo DMSO, em qualquer dos tempos de tratamento (24h, 48h e 72h). A Rosiglitazona a $1\mu\text{M}$ (Figura 4.9.B) demonstrou uma diminuição significativa da viabilidade celular de aproximadamente 15% às 48h ($p=0,0110$), porém esse efeito perde-se com o tempo, já que às 72h não se observam alterações na viabilidade das células. Já a concentração de Rosiglitazona de $10\mu\text{M}$ (Figura 4.9.C) demonstrou um efeito de ligeiro aumento, mas significativo, da viabilidade celular de cerca de 7% às 24h ($p=0,0028$), contrariamente aos seguintes tempos de tratamento, em que não se verificaram alterações significativas.

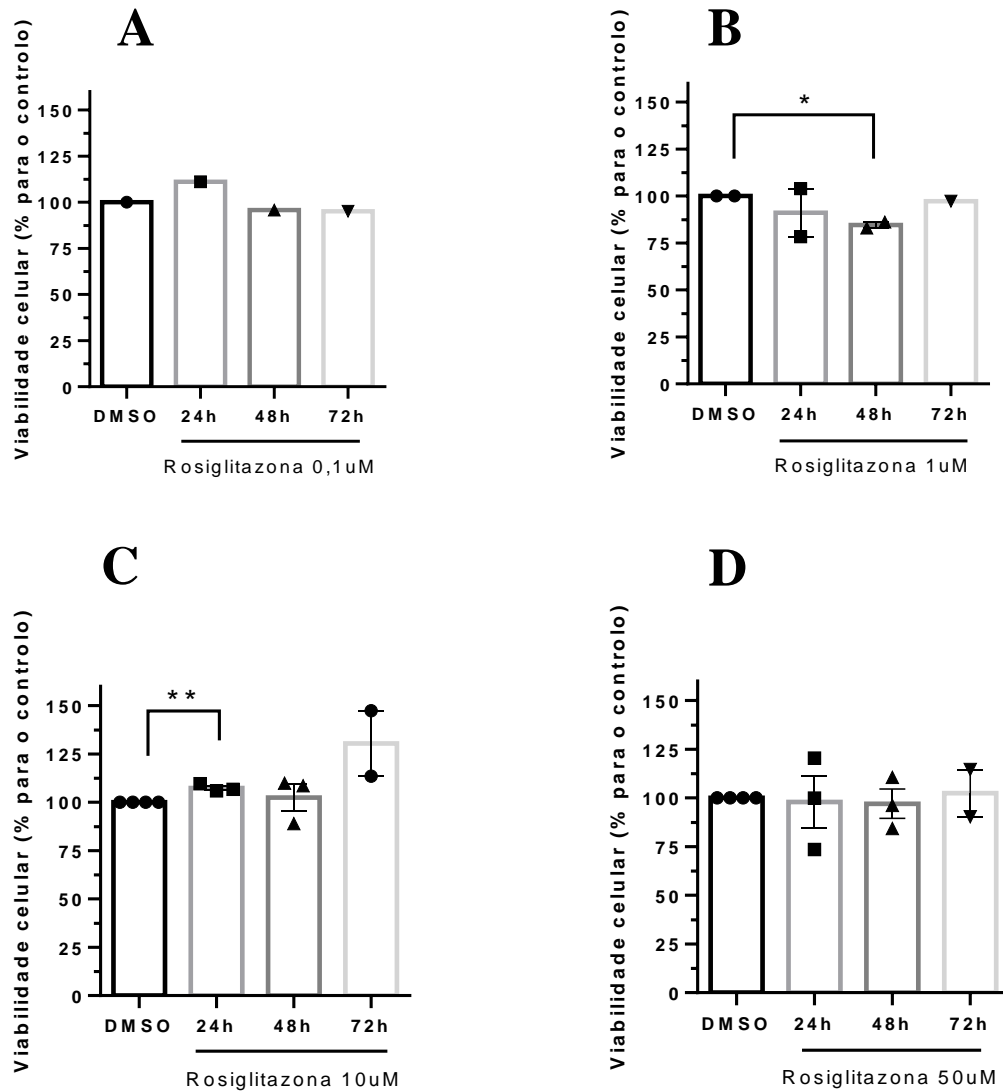


Figura 4.9 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1-2. C: n=2-3. D: n=2-3. *P<0,05 e **P<0,01 (unpaired t test).

As células de melanoma UACC-62 foram incubadas com diferentes concentrações de Pioglitazona, 10 μ M (Figura 4.10.A) e 50 μ M (Figura 4.10.B), e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. Às 72h verifica-se um aumento significativo de 4% na viabilidade celular das células tratadas com Pioglitazona 10 μ M ($p=0,0411$). Porém, em nenhum dos outros tempos, quer com Pioglitazona 10 μ M ou Pioglitazona 50 μ M, não se verifica uma alteração significativa da viabilidade celular das UACC-62.

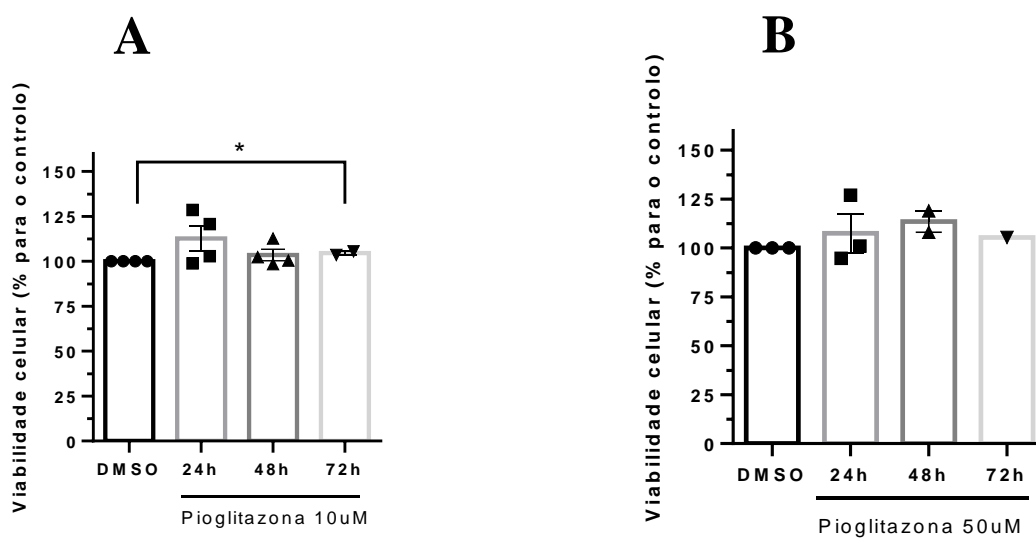


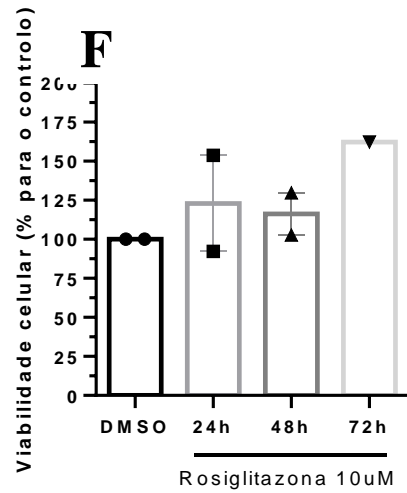
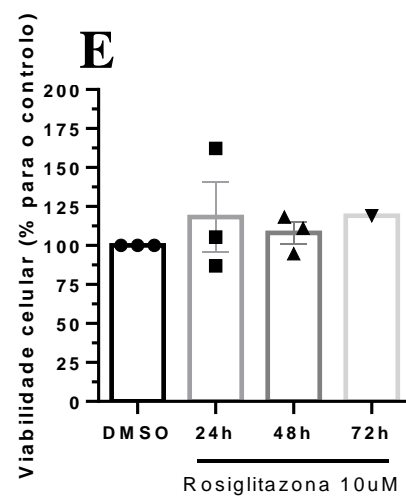
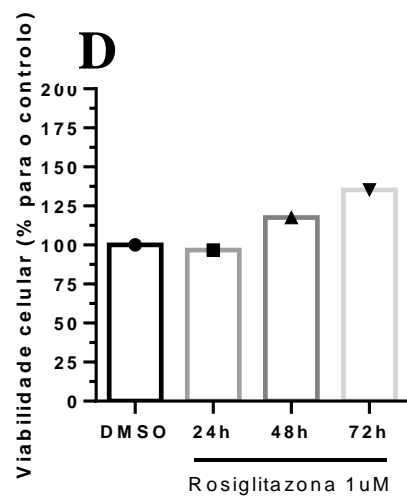
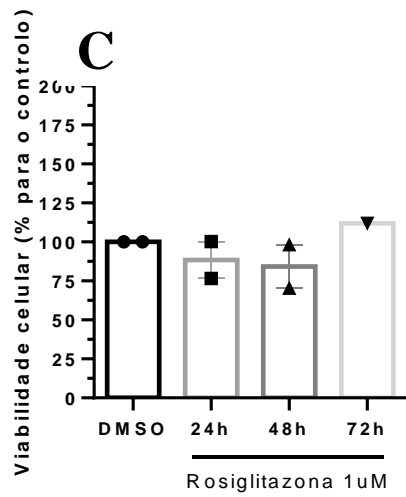
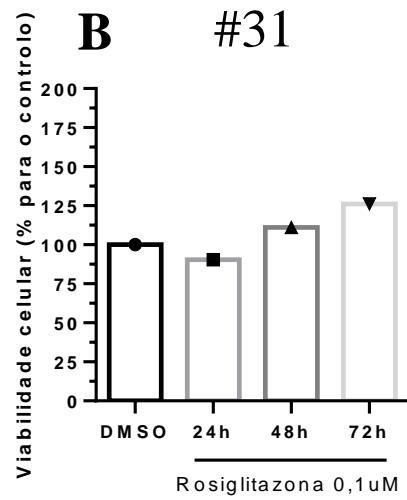
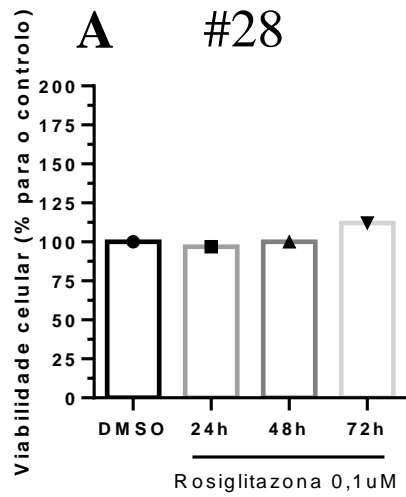
Figura 4.10 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Pioglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Pioglitazona na ordem dos μ M e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=2-4. B: n=1-3. * $P<0,05$ (unpaired t test).

4.3.2 Viabilidade das células UACC-62 KO-TRIB2 em resposta a tratamentos com TZDs

De modo a avaliar a influência de TRIB2 na viabilidade das células de melanoma UACC-62 e na viabilidade das células tratadas com Rosiglitazona ou Pioglitazona e com DMSO, procedeu-se ao ensaio MTT nos dois clones TRIB2-KO: #28 e #31. Para tal, tratou-se as células com diferentes concentrações de Rosiglitazona (0,1, 1, 10 e 50 μM) e diferentes concentrações de Pioglitazona (10 e 50 μM), e avaliou-se a viabilidade a vários tempos de tratamento (24h, 48h, 72h). Foram efetuadas várias experiências independentes, sendo que cada condição foi realizada em triplicado.

Em ambos os clones TRIB2-KO, nenhuma das concentrações de Rosiglitazona testadas (0,1 μM , 1 μM , 10 μM e 50 μM) demonstrou exercer um efeito na viabilidade celular, nos tempos de tratamento estabelecidos (24h, 48h e 72h), quando em comparação com as células tratadas apenas com o veículo DMSO (Figura 4.11). Ainda assim parece haver um aumento da viabilidade celular às 72h, independentemente do clone e da dose de fármaco.

O Potencial Papel da TRIB2 no Tratamento do Melanoma com Tiazolidinedionas



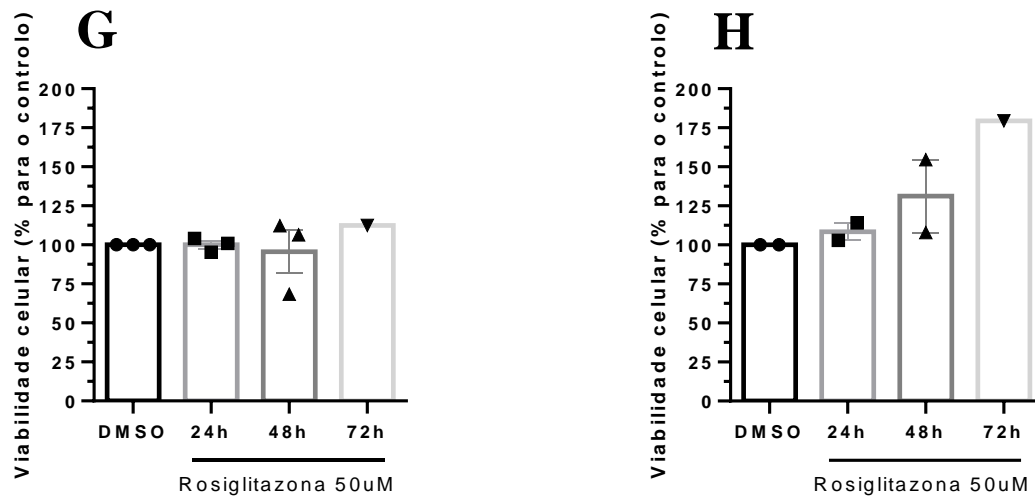


Figura 4.11 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 KO #28 e KO #31 tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1. C: n=1-2. D: n=1. E: n=1-3. F: n=1-2. G: n=1-3. H: n=1-2.

Nenhum dos clones TRIB2-KO tratados com $10\mu\text{M}$ ou $50\mu\text{M}$ de Pioglitazona durante 24h, 48h ou 72h, teve a sua viabilidade alterada de forma significativa, semelhante ao que se verificou com a Rosiglitazona (Figura 4.12).

É de referir que alguns dos valores foram obtidos apenas de uma experiência, como é o caso da Rosiglitazona $0,1\mu\text{M}$ e a Pioglitazona $50\mu\text{M}$, não sendo possível inferir significado estatístico.

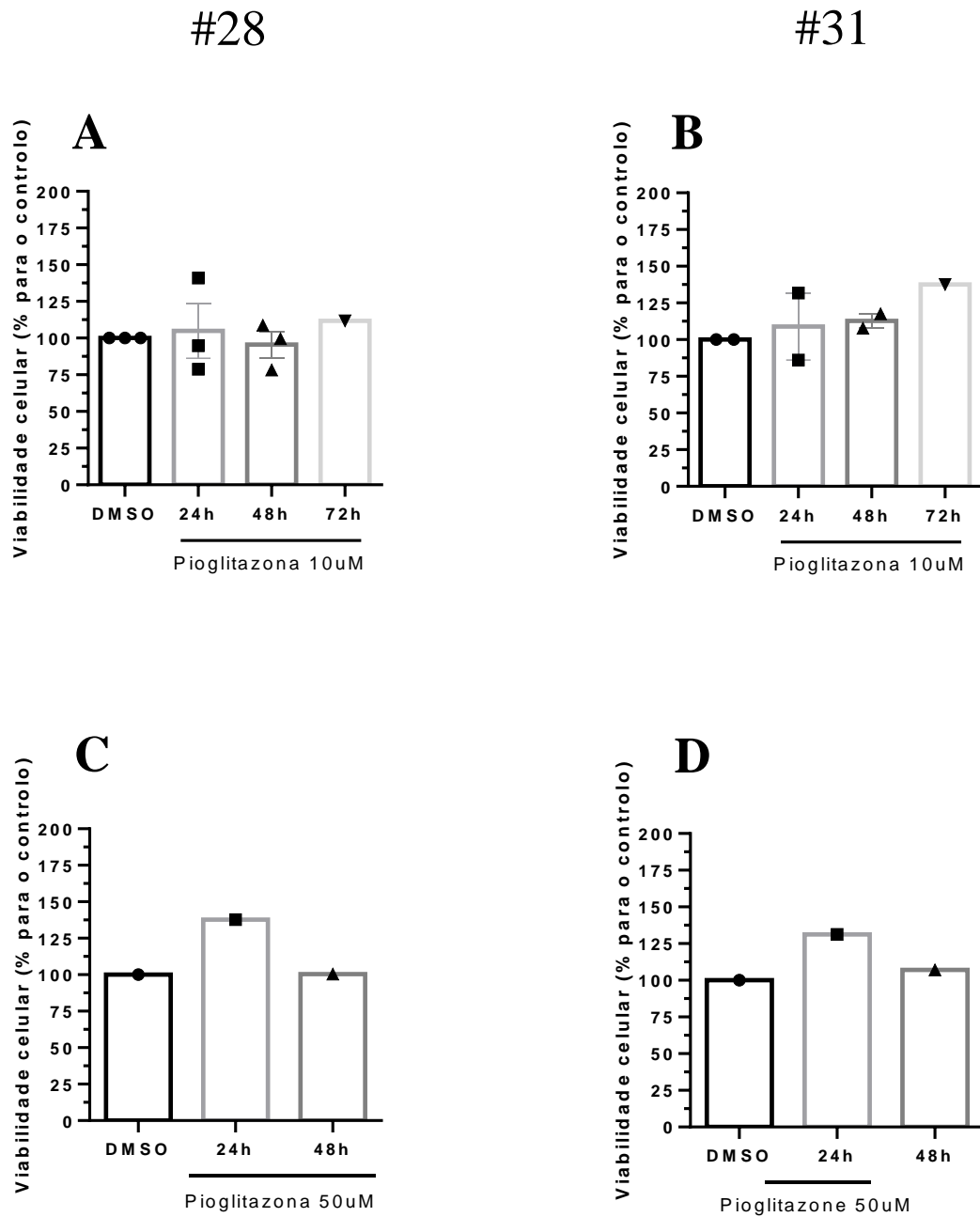


Figura 4.12 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 KO #28 e KO #31 tratadas com Pioglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Pioglitazona na ordem dos μM e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT, a diferentes horas de tratamento. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1-3. B: n=1-2. C: n=1. D: n=1.

4.3.3 Viabilidade das células UACC-62 e PANC-1 em resposta a tratamentos com TZDs (72h+24h)

Após a verificação de que nenhum dos fármacos (Rosiglitazona e Pioglitazona), nas concentrações testadas ([0,1; 1; 10; 50] μ M), provocou alterações consistentes na viabilidade celular, decidiu-se reforçar o tratamento, submetendo as células ao mesmo tratamento duas vezes: tratou-se as células pela primeira vez 24h depois das mesmas serem plaqueadas para as placas de 96 poços e, após 72h sem se verificar alterações na sua confluência ao microscópio (isto é, sem se verificar visualmente uma diminuição na sua confluência, como esperado em caso de diminuição da proliferação ou aumento da morte celular), retirou-se o meio em que estas estavam e substituiu-se os tratamentos por iguais (onde estavam tratamentos de 10 μ M, colocou-se tratamentos iguais de 10 μ M, fazendo o mesmo processo para os de 50 μ M), procedendo à leitura da placa 24h depois dos segundos tratamentos serem colocados. Em suma, os tratamentos realizados foram 72h+24h. Optou-se por utilizar concentrações de fármaco previamente testadas, de modo a conseguir obter uma possível comparação, elegendo-se as duas concentrações mais elevadas: 10 μ M e 50 μ M.

Parece observar-se um aumento da viabilidade nas células tratadas com Rosiglitazona (Figura 4.13.A. e Figura 4.13.B.) e nas células tratadas com Pioglitazona 10 μ M (Figura 4.14.A.), mas uma ligeira diminuição da viabilidade nas células tratadas com Pioglitazona 50 μ M (Figura 4.14.B). É de referir, porém, que esta experiência foi realizada apenas uma vez e (ainda que em triplicado) deste modo não é possível apresentar uma análise estatística destes resultados.

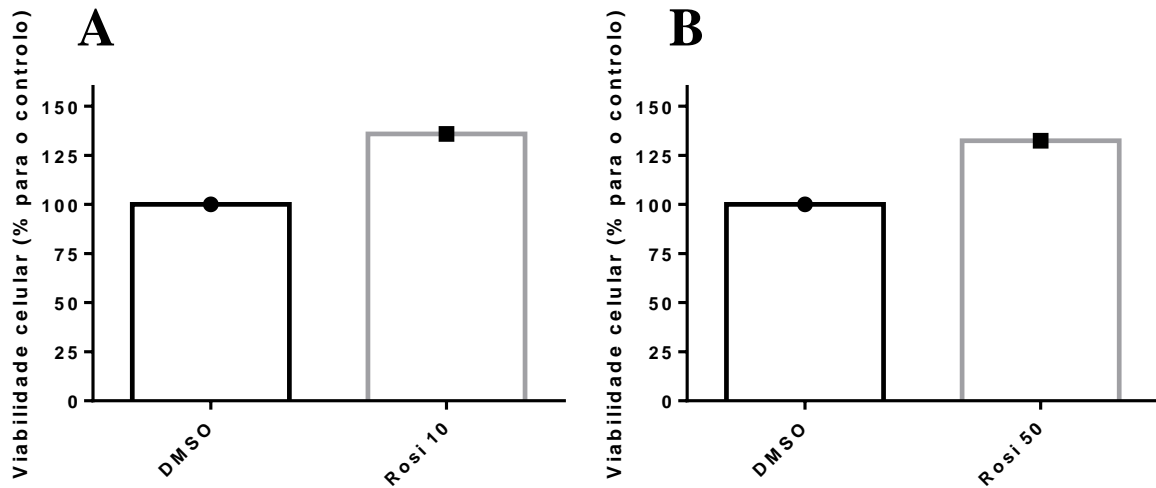


Figura 4.13 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1.

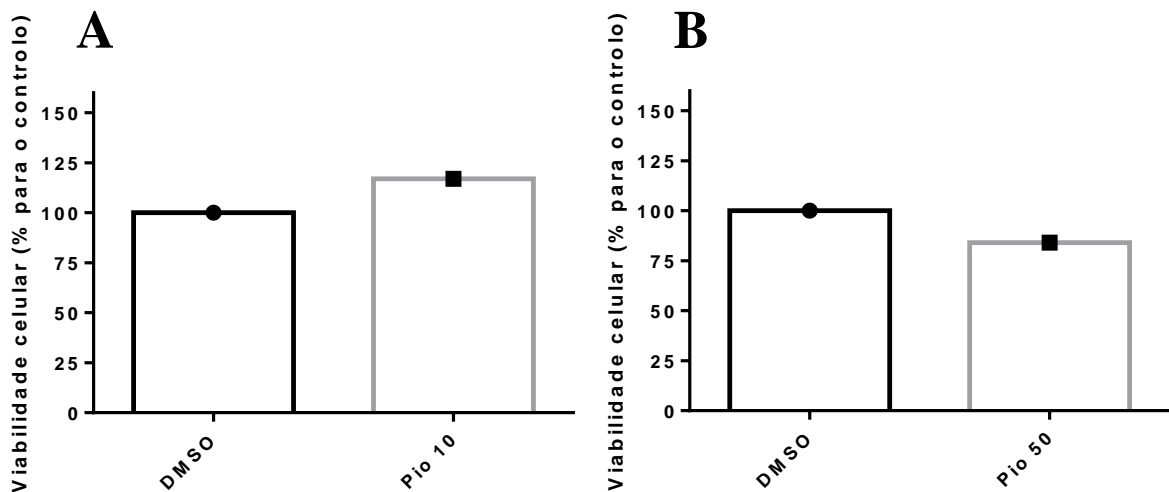


Figura 4.14 – Análise da viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 WT tratadas com Pioglitazona. A linha de células de melanoma, UACC-62, foi incubada com diferentes concentrações de Pioglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1.

Como controlo positivo, utilizou-se as células PANC-1, uma vez que existe evidência que há uma diminuição significativa na viabilidade das mesmas, quando tratadas com Rosiglitazona ($40\mu\text{M}$) durante 48h (135). Submeteu-se então as células PANC-1 aos mesmos dois tratamentos consecutivos: 72h de tratamento mais 24h de tratamento, seguido de leitura do ensaio MTT. Os resultados dos tratamentos com Rosiglitazona, a $10\mu\text{M}$ e a $50\mu\text{M}$, estão apresentados na Figura 4.15 e os resultados dos tratamentos com Pioglitazona, a $10\mu\text{M}$ e a $50\mu\text{M}$, estão apresentados na Figura 4.16. Em ambos os tratamentos parece verificar-se uma diminuição da viabilidade celular, comparativamente às células tratadas apenas com DMSO – ainda assim, é de notar que essa diminuição é bastante mais acentuada com a Pioglitazona comparativamente à Rosiglitazona, e de modo dose dependente.

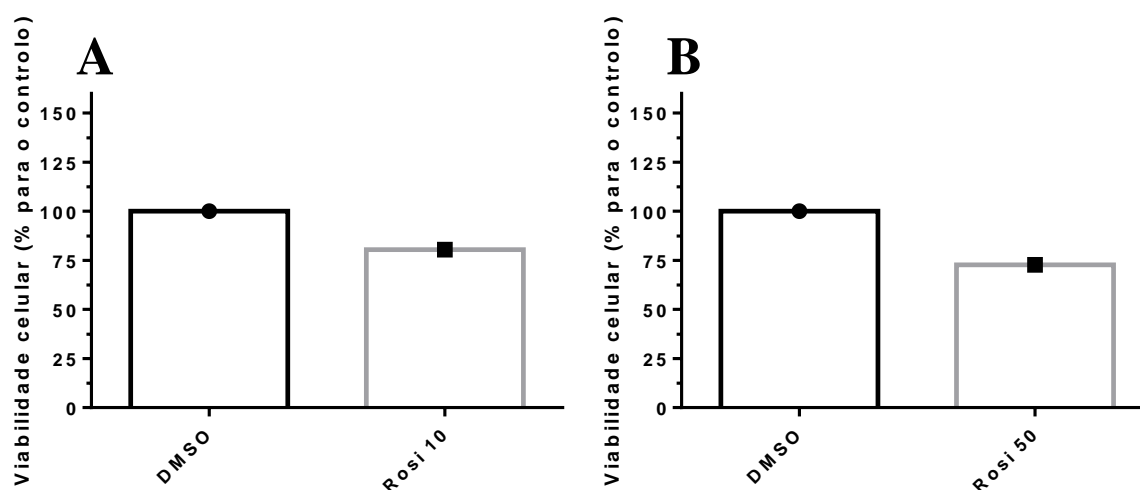


Figura 4.15 – Análise da viabilidade celular de células de cancro do pâncreas PANC-1 tratadas com Rosiglitazona. A linha de células de cancro do pâncreas, PANC-1, foi incubada com diferentes concentrações de Rosiglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1.

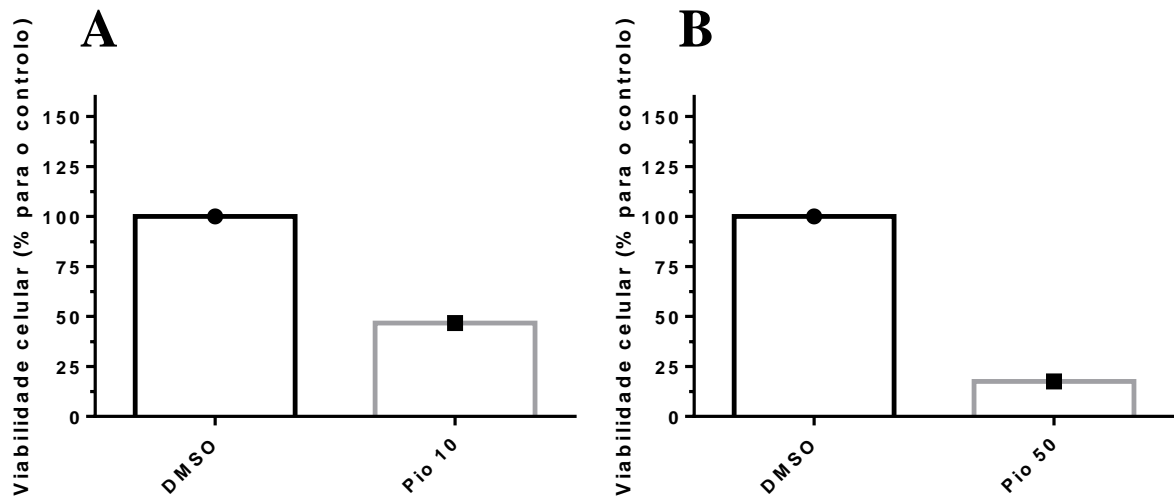


Figura 4.16 – Análise da viabilidade de células de cancro do pâncreas PANC-1 tratadas com Pioglitazona. A linha de células de cancro do pâncreas, PANC-1, foi incubada com diferentes concentrações de Pioglitazona na ordem dos μM , durante 72h, sendo colocado um novo tratamento e a viabilidade da mesma foi avaliada por ensaios MTT ao fim de 24h. As percentagens da viabilidade das células tratadas são calculadas tomando os valores obtidos para as células em DMSO como 100%. A: n=1. B: n=1.

4.4 Análise da expressão de PPAR- γ em resposta a tratamentos com TZDs

A expressão de PPAR γ , alvo terapêutico dos fármacos em estudo, foi investigada na linha celular de melanoma utilizada, UACC-62, nas células WT, através de *Western blot*, usando um anticorpo seletivo para o PPAR γ (α -PPAR γ). Nas células UACC-62 tratadas com concentrações crescentes de Rosiglitazona e nas células tratadas apenas com DMSO, não foi possível detetar a expressão desta proteína (Figura 4.17).

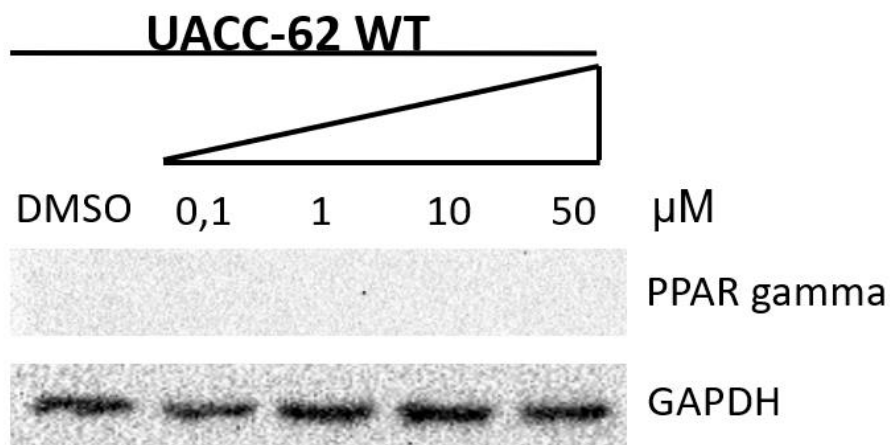


Figura 4.17 – Análise da expressão de PPAR γ em células de melanoma UACC-62 WT. Células de melanoma UACC-62 WT foram tratadas com DMSO e concentrações crescentes de Rosiglitazona, sendo posteriormente analisadas por *Western blot* utilizando um anticorpo que reconhece seletivamente o PPAR γ .

Como controlo positivo para a expressão de PPAR γ , utilizaram-se extratos proteicos de células PANC-1, uma linha celular de cancro do pâncreas. Verificou-se que o tratamento com Rosiglitazona a 50 μ M levou à diminuição dos níveis basais de PPAR γ para níveis indetetáveis (Figura 4.18). Já nas células UACC-62, tanto as parentais como as TRIB2-KO, verificou-se níveis indetetáveis de PPAR γ , como já tinha sido observado na experiência anterior.

5. Discussão

Para além de ser um dos cancros com maior taxa de incidência a nível mundial, o melanoma apresenta uma preocupante taxa de mortalidade, representando mais de 80% das mortes atribuídas ao cancro da pele (4–8). Um dos fatores que leva à elevada taxa de mortalidade é a resistência às terapias, sendo necessária uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na mesma e de fármacos que a contornem, de forma a promover a melhoria do estado do paciente. Além disso, o lento desenvolvimento e os elevados custos implícitos na produção de novos fármacos criam a necessidade de reaproveitamento de fármacos já utilizados, com a finalidade de abranger outras indicações para além das para as quais já estão aprovados. Este reaproveitamento apresenta vários benefícios, uma vez que as reações adversas a estes já são mais conhecidas, bem como os mecanismos de ação, levando a um período de ensaios clínicos mais curto e proporcionando uma menor exigência financeira (136).

Dada a problemática apresentada, evidenciando o interesse para a área de terapêutica oncológica da mesma, e tendo em conta os resultados não publicados obtidos previamente (a expressão de TRIB2 está diminuída em tecido adiposo branco de ratinhos em resposta ao tratamento com TZDs), colocou-se a hipótese das TZDs reduzirem os níveis de TRIB2 nas células de melanoma, levando a um aumento da eficácia das terapêuticas aprovadas.

Contrariamente à hipótese colocada, não houve redução da expressão de TRIB2 nas células de melanoma UACC62 tratadas com TZDs – não só não se verificou uma redução da expressão, como parece verificar-se um aumento. Indo de encontro a estes resultados, em células parentais (que expressam TRIB2) verifica-se também um aumento da expressão de P-AKT em resposta aos tratamentos com TZDs, e em células KO (que não expressam TRIB2) há uma expressão mais baixa de P-AKT comparativamente às células parentais. A hipotetizada redução da expressão de TRIB2 pode não ter ocorrido uma vez que a expressão de PPAR γ (alvo molecular das TZDs) não é detetável nas células utilizadas – isto significa que o fármaco poderá não exercer a sua ação através do mecanismo esperado, uma vez que poderá não ter o alvo para se ligar. Ainda assim, parece haver um aumento da expressão de TRIB2 nas células UACC-62 tratadas com fármaco comparativamente às células tratadas apenas com DMSO,

podendo esse efeito ser atribuído a um mecanismo de ação alternativo que não envolva PPAR γ .

Uma vez que parece haver um aumento da fosforilação de AKT em resposta aos tratamentos com as TZDs, era expectável haver também um aumento de expressão de P-p70S6K em resposta aos mesmos uma vez que esta se encontra a jusante na via de sinalização do AKT, porém tal não se verifica. Os resultados obtidos para a P-ERK não são coerentes entre si, nas duas experiências realizadas – numa há uma redução da fosforilação aquando o tratamento com TZDs, noutra experiência tal não se verifica. Para ambos os casos, seria necessária a repetição das experiências.

Contrariamente ao que se observou relativamente à viabilidade nas células UACC-62 tratadas com TZDs neste trabalho, em quatro estudos diferentes verificou-se previamente que a Rosiglitazona causava uma diminuição da viabilidade celular, sendo menor a viabilidade quanto maior a concentração do fármaco e maior o tempo de exposição(102–105). Mössner *et al.* utilizaram três linhas celulares de melanoma (MM-201, MM-254 e MM-358) e testaram a Rosiglitazona numa gama de concentrações de [0,1-50] μ M durante 96h (105); Liu *et al.* testaram o mesmo fármaco em células de melanoma A375, numa gama de concentrações [6,0-150] μ M, durante 72h (104); Freudlsperger *et al.* usaram seis linhas celulares de melanoma diferentes (UISO-Mel6, G361, MV3, MeWo, Lox e FemX-1) e uma concentração de fármaco de [0,3-300] μ M, durante 48h (103); Smith *et al.* testaram Rosiglitazona em MM96L, linha celular de melanoma, a 5 μ M, durante 7 dias (102). A Pioglitazona, por sua vez, foi testada unicamente por Freudlsperger *et al.*, nas mesmas linhas celulares e nas mesmas concentrações e duração de tratamento que a Rosiglitazona, verificando-se uma também diminuição da viabilidade celular com todas as concentrações de Pioglitazona testadas (103).

Dois dos estudos supramencionados testaram condições semelhantes às testadas no trabalho realizado nesta dissertação. Freudlsperger *et al.* realizaram tratamentos de 48h nas linhas celulares referidas, utilizando várias concentrações de Rosiglitazona ou Pioglitazona. Com tratamentos de 0,3 μ M apenas duas das linhas celulares mostraram uma redução significativa da viabilidade, com Pioglitazona. Já com tratamentos de 30 μ M, a linha G361, a MeWo e a FemX-1 tiveram uma menor viabilidade com a Rosiglitazona e a linha MV3, a UISO-Mel6 e a Lox tiveram uma menor viabilidade

com a Pioglitazona (103). Já Liu *et al.*, às 72h, observaram uma diminuição da viabilidade com tratamentos de 6 μ M e com tratamentos de 30 μ M de Rosiglitazona, em células A375 (104). No trabalho realizado, porém, não se observa o mesmo em tratamentos semelhantes (1 μ M e 50 μ M) aos mesmos tempos.

Pode inferir-se que uma das diferenças entre os resultados obtidos no nosso trabalho e os resultados dos trabalhos referidos, se sustenha nas diferenças entre as linhas celulares utilizadas. O melanoma é um tipo de cancro bastante heterogêneo (18,137) pelo que se espera que as diferentes linhas celulares de melanoma apresentem variabilidade a nível molecular e, assim, apresentem diversas respostas a um certo fármaco. Esta variabilidade revela-se por exemplo na expressão de PPAR γ , que, como pôde observar-se nos resultados deste trabalho, foi impossível detetar nas células UACC-62. Contrariamente, as linhas celulares utilizadas nos trabalhos anteriormente referidos mostram níveis detetáveis de PPAR γ em células não tratadas (102–105), sendo que Liu *et al.* demonstram que a expressão de PPAR γ aumenta consoante tratamentos de concentrações crescentes de Rosiglitazona (104), ao contrário do observado nas células PANC-1. A ausência de PPAR γ poderá justificar a inexistência de efeito consistente das TZDs na viabilidade celular das UACC-62, uma vez que é o alvo terapêutico principal desta classe de fármacos.

A suportar esta hipótese encontram-se os resultados obtidos para a viabilidade das células PANC-1 em comparação com os resultados obtidos para a viabilidade das células UACC-62: tratamentos de 72h+24h de Rosiglitazona (a 10 e a 50 μ M) como de Pioglitazona (a 10 e a 50 μ M) parecem diminuir a viabilidade celular das PANC, contrariamente ao observado nas UACC-62. Isto poderá ter ocorrido uma vez que as PANC possuem níveis observáveis de PPAR γ enquanto que as UACC-62 não, levando a diferenças significativas no mecanismo de ação do fármaco.

O trabalho realizado apresenta uma principal limitação: o número de repetições das condições. O reduzido número de repetições de cada condição representa uma limitação para os resultados, nomeadamente para a análise estatística dos mesmos.

6. Conclusão

Tendo em conta as hipóteses inicialmente colocadas e os dois tipos de análise utilizados neste trabalho, podem ser tiradas conclusões preliminares associadas a cada um deles.

Contrariamente à hipótese inicialmente colocada, verifica-se que as tiazolidinedionas Rosiglitazona e Pioglitazona aumentam a expressão de TRIB2 nas células de melanoma UACC-62, concordando com o aumento da fosforilação de AKT nas mesmas.

Além disso, verifica-se que a Rosiglitazona e a Pioglitazona não diminuem a viabilidade das células de melanoma UACC-62, sendo que quando submetidas a tratamentos de 72h+24h a sua viabilidade parece aumentar.

7. Bibliografia

1. What Is Melanoma Skin Cancer? | What Is Melanoma? [Internet]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/what-is-melanoma.html>
2. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Melanoma Treatment (PDQ®): Patient Version. PDQ Cancer Information Summaries. 2002.
3. Kibbi N, Kluger H, Choi JN. Melanoma: Clinical Presentations. In: Cancer Treatment and Research. Kluwer Academic Publishers; 2016. p. 107–29.
4. Rigel DS, Carucci JA. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin*. 2000 Jul 1;50(4):215–36.
5. Matthews NH, Li W-Q, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. In: *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*. Codon Publications; 2017. p. 3–22.
6. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019 Apr 15;144(8):1941–53.
7. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JWW, Comber H, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*. 2013 Apr;49(6):1374–403.
8. Melanoma Skin Cancer Statistics [Internet]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html#references>
9. Melanoma Skin Cancer Risk Factors | Melanoma Risk Factors [Internet]. [cited 2020 Apr 19]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html>
10. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob J-J, Halpern A, et al. Melanoma. *Nat Rev Dis Prim*. 2015 Dec 17;1(1):15003.
11. Macdonald JB, Dueck AC, Gray RJ, Wasif N, Swanson DL, Sekulic A, et al. Malignant Melanoma in the Elderly: Different Regional Disease and Poorer Prognosis. *J Cancer*. 2011;2(1):538–43.
12. Dickson P V., Gershenwald JE. Staging and Prognosis of Cutaneous Melanoma.

Surg Oncol Clin N Am. 2011 Jan;20(1):1–17.

13. Melanoma Stages - The Skin Cancer Foundation [Internet]. [cited 2020 Apr 20]. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/the-stages-of-melanoma/>
14. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6199–206.
15. Melanoma Treatment - The Skin Cancer Foundation [Internet]. [cited 2020 Apr 20]. Available from: <https://www.skincancer.org/skin-cancer-information/melanoma/melanoma-treatments/>
16. Domingues B, Lopes J, Soares P, Populo H. Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets Ther*. 2018 Jun;Volume 7:35–49.
17. Davis EJ, Johnson DB, Sosman JA, Chandra S. Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer*. 2018 Sep 1;124(17):3490–9.
18. Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Heterogeneity in Melanoma. In: *Cancer Treatment and Research*. Kluwer Academic Publishers; 2016. p. 1–15.
19. Batus M, Waheed S, Ruby C, Petersen L, Bines SD, Kaufman HL. Optimal Management of Metastatic Melanoma: Current Strategies and Future Directions. *Am J Clin Dermatol*. 2013 Jun 16;14(3):179–94.
20. Pavri SN, Clune J, Ariyan S, Narayan D. Malignant Melanoma. *Plast Reconstr Surg*. 2016 Aug 1;138(2):330e–340e.
21. Luke JJ, Flaherty KT, Ribas A, Long G V. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017 Aug 4;14(8):463–82.
22. Wilson MA, Schuchter LM. Chemotherapy for Melanoma. In: *Cancer Treatment and Research*. Kluwer Academic Publishers; 2016. p. 209–29.
23. Yang AS, Chapman PB. The History and Future of Chemotherapy for Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2009 Jun;23(3):583–97.
24. Luke JJ, Schwartz GK. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin Dermatol*. 2013 May;31(3):290–7.
25. Bhatia S, Tykodi SS, Thompson JA. Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)*. 2009 May;23(6):488–96.

26. Dacarbazine Faulding | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Apr 23]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/dacarbazine-faulding>
27. Tentori L, Lacal PM, Graziani G. Challenging resistance mechanisms to therapies for metastatic melanoma. *Trends Pharmacol Sci*. 2013 Dec;34(12):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 Aug;40(12):1825–36.
29. Bajetta E, Del Vecchio M, Bernard-Marty C, Vitali M, Buzzoni R, Rixe O, et al. Metastatic melanoma: Chemotherapy. *Semin Oncol*. 2002 Oct 2;29(5):427–45.
30. Pratilas CA, Solit DB. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway: Physiological Feedback and Drug Response: Fig. 1. *Clin Cancer Res*. 2010 Jul 1;16(13):3329–34.
31. Michielin O, Hoeller C. Gaining momentum: New options and opportunities for the treatment of advanced melanoma. *Cancer Treat Rev*. 2015 Sep 1;41(8):660–70.
32. 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.
33. Long G V., Menzies AM, Nagrial AM, Haydu LE, Hamilton AL, Mann GJ, et al. Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic BRAF in Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1239–46.
34. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015 Jun 20;161(7):1681–96.
35. Zelboraf | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Jul 19]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/zelboraf>
36. Kim G, McKee AE, Ning Y-M, Hazarika M, Theoret M, Johnson JR, et al. FDA Approval Summary: Vemurafenib for Treatment of Unresectable or Metastatic Melanoma with the BRAF V600E Mutation. *Clin Cancer Res*. 2014 Oct 1;20(19):4994–5000.
37. Ballantyne AD, Garnock-Jones KP. Dabrafenib: First Global Approval. *Drugs*. 2013 Aug 24;73(12):1367–76.

38. Tsai J, Lee JT, Wang W, Zhang J, Cho H, Mamo S, et al. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Feb 26;105(8):3041–6.
39. Croce L, Coperchini F, Magri F, Chiovato L, Rotondi M. The multifaceted anti-cancer effects of BRAF-inhibitors. *Oncotarget*. 2019 Nov 12;10(61):6623–40.
40. Mackiewicz J, Mackiewicz A. BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. *Współczesna Onkol*. 2018;2018(1):68–72.
41. Mekinist | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Jul 26]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mekinist>
42. Wright CJM, McCormack PL. Trametinib: First Global Approval. *Drugs*. 2013 Jul 12;73(11):1245–54.
43. Amann VC, Ramelyte E, Thurneysen S, Pitocco R, Bentele-Jaberg N, Goldinger SM, et al. Developments in targeted therapy in melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2017 Mar 1;43(3):581–93.
44. Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, et al. Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature*. 2010 Dec 24;468(7326):973–7.
45. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010 Dec 24;468(7326):968–72.
46. Solit DB, Rosen N. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. *N Engl J Med*. 2011 Feb 24;364(8):772–4.
47. Ribas A, Daud A, Pavlick AC, Gonzalez R, Lewis KD, Hamid O, et al. Extended 5-Year Follow-up Results of a Phase Ib Study (BRIM7) of Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF -Mutant Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2020 Jan 1;26(1):46–53.
48. Long G V., Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, et al. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*. 2015 Aug 1;386(9992):444–51.
49. 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.
50. Gogas H, Ascierto PA, Flaherty K, Arance A, Mandalà M, Liskay G, et al. Update on overall survival in COLUMBUS: A randomized phase III trial of encorafenib (ENCO) plus binimetinib (BINI) versus vemurafenib (VEM) or ENCO in patients with BRAF V600-mutant melanoma. *J Clin Oncol*. 2020 May 20;38(15_suppl):10012–10012.
 51. Braftovi | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Aug 9]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/braftovi>
 52. Cotellic | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Aug 9]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/cotellic>
 53. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr 22;12(4):252–64.
 54. Fang L, Lonsdorf AS, Hwang ST. Immunotherapy for Advanced Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2008 Nov 1;128(11):2596–605.
 55. Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC, Moschos SJ, Zarour HM, Butterfield LH, et al. Next Generation of Immunotherapy for Melanoma. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3445–55.
 56. Zigler M, Villares GJ, Lev DC, Melnikova VO, Bar-Eli M. Tumor Immunotherapy in Melanoma. *Am J Clin Dermatol*. 2008 Sep 10;9(5):307–11.
 57. Yervoy | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Sep 13]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yervoy>
 58. Marchetti A, Di Lorito A, Buttitta F. Why anti-PD1/PDL1 therapy is so effective? Another piece in the puzzle. *J Thorac Dis*. 2017 Dec 1;9(12):4863–6.
 59. Raedler LA. Opdivo (Nivolumab): Second PD-1 Inhibitor Receives FDA Approval for Unresectable or Metastatic Melanoma. *Am Heal drug benefits*. 2015 Mar;8(Spec Feature):180–3.
 60. Opdivo | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Sep 14]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo>
 61. Keytruda | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Sep 14]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>
 62. Raedler LA. Keytruda (Pembrolizumab): First PD-1 Inhibitor Approved for

Previously Treated Unresectable or Metastatic Melanoma. Am Heal drug benefits. 2015 Mar;8(Spec Feature):96–100.

63. Achkar T, Tarhini AA. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma. *J Hematol Oncol*. 2017 Dec 24;10(1):88.
64. Maverakis E, Cornelius L, Bowen G, Phan T, Patel F, Fitzmaurice S, et al. Metastatic Melanoma – A Review of Current and Future Treatment Options. *Acta Derm Venereol*. 2015;95(5):516–24.
65. Tarhini AA, Gogas H, Kirkwood JM. IFN- α in the Treatment of Melanoma. *J Immunol*. 2012 Oct 15;189(8):3789–93.
66. Interferon (Intron[®] A or Sylatron[™]) - Melanoma Research Alliance [Internet]. [cited 2020 Sep 18]. Available from: <https://www.curemelanoma.org/patient-eng/melanoma-treatment/adjuvant-therapy/interferon-intron-a-or-sylatron/>
67. IntronA | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Sep 18]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/introna>
68. Ma W, He H, Wang H. Oncolytic herpes simplex virus and immunotherapy. *BMC Immunol*. 2018 Dec 18;19(1):40.
69. Johnson DB, Puzanov I, Kelley MC. Talimogene laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma. *Immunotherapy*. 2015 Jul 1;7(6):611–9.
70. Harrington KJ, Puzanov I, Hecht JR, Hodi FS, Szabo Z, Murugappan S, et al. Clinical development of talimogene laherparepvec (T-VEC): a modified herpes simplex virus type-1–derived oncolytic immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015 Dec 2;15(12):1389–403.
71. IMLYGIC (talimogene laherparepvec) | FDA [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/imlygic-talimogene-laherparepvec>
72. Imlygic | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imlygic>
73. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell*. 2017 Sep 7;170(6):1109-1119.e10.
74. Winder M, Virós A. Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer New York LLC; 2017. p. 91–108.

75. Kozar I, Margue C, Rothengatter S, Haan C, Kreis S. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2019 Apr 1;1871(2):313–22.
76. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. MAPK pathway in melanoma part II—secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer*. 2017 Mar 1;73:93–101.
77. Moriceau G, Hugo W, Hong A, Shi H, Kong X, Yu CC, et al. Tunable-Combinatorial Mechanisms of Acquired Resistance Limit the Efficacy of BRAF/MEK Cotargeting but Result in Melanoma Drug Addiction. *Cancer Cell*. 2015 Feb 9;27(2):240–56.
78. Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E. Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal*. 2007 Feb;19(2):238–50.
79. Yokoyama T, Nakamura T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci*. 2011 Jun;102(6):1115–22.
80. Lohan F, Keeshan K. The functionally diverse roles of tribbles. *Biochem Soc Trans*. 2013 Aug 1;41(4):1096–100.
81. Hill R, Madureira PA, Ferreira B, Baptista I, Machado S, Colaço L, et al. TRIB2 confers resistance to anti-cancer therapy by activating the serine/threonine protein kinase AKT. *Nat Commun*. 2017 Apr 9;8(1):14687.
82. Hill R, Kalathur RKR, Colaço L, Brandão R, Ugurel S, Futschik M, et al. TRIB2 as a biomarker for diagnosis and progression of melanoma. *Carcinogenesis*. 2015 Apr;36(4):469–77.
83. Zanella F, Renner O, García B, Callejas S, Dopazo A, Peregrina S, et al. Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells. *Oncogene*. 2010 May 8;29(20):2973–82.
84. Huang H, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci*. 2007 Aug 1;120(15):2479–87.
85. Foulkes DM, Byrne DP, Yeung W, Shrestha S, Bailey FP, Ferries S, et al. Covalent inhibitors of EGFR family protein kinases induce degradation of human Tribbles 2 (TRIB2) pseudokinase in cancer cells. *Sci Signal*. 2018 Sep 25;11(549):eaat7951.
86. Mayoral-Varo V, Jiménez L, Link W. The Critical Role of TRIB2 in Cancer and

- Therapy Resistance. *Cancers (Basel)*. 2021 May 30;13(11):2701.
87. Cortés H, Reyes-Hernández OD, Alcalá-Alcalá S, Bernal-Chávez SA, Caballero-Florán IH, González-Torres M, et al. Repurposing of Drug Candidates for Treatment of Skin Cancer. *Front Oncol*. 2021 Jan 8;10.
 88. Langedijk J, Mantel-Teeuwisse AK, Slijkerman DS, Schutjens M-HDB. Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov Today*. 2015 Aug 1;20(8):1027–34.
 89. Soccio RE, Chen ER, Lazar MA. Thiazolidinediones and the Promise of Insulin Sensitization in Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2014 Oct 7;20(4):573–91.
 90. FDA Drug Safety Communication: Avandia (rosiglitazone) labels now contain updated information about cardiovascular risks and use in certain patients | FDA [Internet]. [cited 2020 Apr 24]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-avandia-rosiglitazone-labels-now-contain-updated-information-about>
 91. FDA Drug Safety Communication: Updated FDA review concludes that use of type 2 diabetes medicine pioglitazone may be linked to an increased risk of bladder cancer | FDA [Internet]. [cited 2020 Apr 24]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug-safety-communication-updated-fda-review-concludes-use-type-2-diabetes-medicine-pioglitazone>
 92. Actos | European Medicines Agency [Internet]. [cited 2020 Apr 24]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/actos>
 93. Nissen SE. The rise and fall of rosiglitazone. *Eur Heart J*. 2010 Apr 1;31(7):773–6.
 94. Lalloyer F, Staels B. Fibrates, Glitazones, and Peroxisome Proliferator–Activated Receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010 May;30(5):894–9.
 95. Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ . *Annu Rev Biochem*. 2008 Jun;77(1):289–312.
 96. Nanjan MJ, Mohammed M, Prashantha Kumar BR, Chandrasekar MJN. Thiazolidinediones as antidiabetic agents: A critical review. *Bioorg Chem*. 2018 Apr 1;77:548–67.
 97. Wang A, Li X, Zheng Y, Liu B, Huang G, Yan X, et al. Thiazolidinediones protect

- mouse pancreatic β -cells directly from cytokine-induced cytotoxicity through PPAR γ -dependent mechanisms. *Acta Diabetol.* 2013 Apr 10;50(2):163–73.
98. Sarafidis PA, Stafylas PC, Georgianos PI, Saratzis AN, Lasaridis AN. Effect of Thiazolidinediones on Albuminuria and Proteinuria in Diabetes: A Meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2010 May;55(5):835–47.
99. Freudlsperger C, Schumacher U, Reinert S, Hoffmann J. The Critical Role of PPAR γ in Human Malignant Melanoma. *PPAR Res.* 2008;2008:1–5.
100. Cheng W-C, Tsui Y-C, Ragusa S, Koelzer VH, Mina M, Franco F, et al. Uncoupling protein 2 reprograms the tumor microenvironment to support the anti-tumor immune cycle. *Nat Immunol.* 2019 Feb 21;20(2):206–17.
101. Esteves P, Pecqueur C, Alves-Guerra M-C. UCP2 induces metabolic reprogramming to inhibit proliferation of cancer cells. *Mol Cell Oncol.* 2015 Jan 2;2(1):e975024.
102. Smith AG, Beaumont KA, Smit DJ, Thurber AE, Cook AL, Boyle GM, et al. PPAR γ agonists attenuate proliferation and modulate Wnt/ β -catenin signalling in melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Apr;41(4):844–52.
103. Freudlsperger C, Moll I, Schumacher U, Thies A. Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anticancer Drugs.* 2006 Mar;17(3):325–32.
104. 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.
105. Mössner R, Schulz U, Krüger U, Neumann C, Reich K, Middel P, et al. Agonists of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Inhibit Cell Growth in Malignant Melanoma. *J Invest Dermatol.* 2002 Sep 1;119(3):576–82.
106. 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.
107. Pich C, Meylan P, Mastelic-Gavillet B, Nguyen TN, Loyon R, Trang BK, et al. Induction of Paracrine Signaling in Metastatic Melanoma Cells by PPAR γ Agonist

- Rosiglitazone Activates Stromal Cells and Enhances Tumor Growth. *Cancer Res.* 2018 Nov 15;78(22):6447–61.
108. Colmers IN, Bowker SL, Johnson JA. Thiazolidinedione use and cancer incidence in type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Metab.* 2012 Dec;38(6):475–84.
109. 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.
110. Neumann A, Weill A, Ricordeau P, Fagot JP, Alla F, Allemand H. Pioglitazone and risk of bladder cancer among diabetic patients in France: A population-based cohort study. *Diabetologia.* 2012 Jul;55(7):1953–62.
111. 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.
112. 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.
113. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism. *Endocr Rev.* 1999 Oct 1;20(5):649–88.
114. Kuenzli S, Saurat J-H. Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br J Dermatol.* 2003 Aug 1;149(2):229–36.
115. 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.
116. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre A-M, Saladin R, et al. The Organization, Promoter Analysis, and Expression of the Human PPAR γ Gene. *J Biol Chem.* 1997 Jul;272(30):18779–89.
117. Vidal-Puig A, Jimenez-Liñan M, Lowell BB, Hamann A, Hu E, Spiegelman B, et al. Regulation of PPAR gamma gene expression by nutrition and obesity in rodents. *J Clin Invest.* 1996 Jun 1;97(11):2553–61.
118. Lehrke M, Lazar MA. The Many Faces of PPAR γ . *Cell.* 2005 Dec 16;123(6):993–9.
119. He W, Barak Y, Hevener A, Olson P, Liao D, Le J, et al. Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor knockout causes insulin resistance in

- fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci*. 2003 Dec 23;100(26):15712–7.
120. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, et al. Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest*. 2000 Nov 15;106(10):1221–8.
 121. Reginato MJ, Lazar MA. Mechanisms by which Thiazolidinediones Enhance Insulin Action. *Trends Endocrinol Metab*. 1999 Jan 1;10(1):9–13.
 122. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones and the liver in humans. *Curr Opin Lipidol*. 2009 Dec;20(6):477–83.
 123. McKenna NJ, O’Malley BW. Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell*. 2002 Feb 22;108(4):465–74.
 124. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor γ in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 2004 Jun;25(6):331–6.
 125. Fröhlich E, Wahl R. Chemotherapy and Chemoprevention by Thiazolidinediones. *Biomed Res Int*. 2015;2015:1–14.
 126. UACC62 | skin, NS, haematopoietic and lymphoid tissue, malignant melanoma, melanoma, lymphoid neoplasm | Mutations | Cell Line overview | Cancer [Internet]. [cited 2020 Apr 1]. Available from: <https://cansarblack.icr.ac.uk/cell-line/UACC-62/mutations>
 127. Sini MC, Doneddu V, Paliogiannis P, Casula M, Colombino M, Manca A, et al. Genetic alterations in main candidate genes during melanoma progression. *Oncotarget*. 2018 Feb 2;9(9):8531–41.
 128. Ikediobi ON, Davies H, Bignell G, Edkins S, Stevens C, O’Meara S, et al. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set. *Mol Cancer Ther*. 2006 Nov;5(11):2606–12.
 129. Machado S, Silva A, De Sousa-Coelho AL, Duarte I, Grenho I, Santos B, et al. Harmine and Piperlongumine Revert TRIB2-Mediated Drug Resistance. *Cancers (Basel)*. 2020 Dec 9;12(12):3689.
 130. What are genome editing and CRISPR-Cas9? - Genetics Home Reference - NIH [Internet]. [cited 2020 Apr 1]. Available from: <https://ghr.nlm.nih.gov/primer/genomicresearch/genomeediting>
 131. Berridge MV, Tan AS. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-

- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993 Jun;303(2):474–82.
132. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Vol. 5, *Growth Regulation*. 1995. p. 69–84.
133. Kruger NJ. The Bradford Method For Protein Quantitation. In 2009. p. 17–24.
134. Yang P-C, Mahmood T. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *N Am J Med Sci*. 2012 Sep;4(9):429.
135. Wang Z, Shen W, Li X, Feng Y, Qian K, Wang G, et al. The PPAR γ Agonist Rosiglitazone Enhances the Radiosensitivity of Human Pancreatic Cancer Cells. *Drug Des Devel Ther*. 2020 Jul;Volume 14:3099–110.
136. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov*. 2019 Jan 12;18(1):41–58.
137. Tirosh I, Izar B, Prakadan SM, Wadsworth MH, Treacy D, Trombetta JJ, et al. Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science (80-)*. 2016 Apr 8;352(6282):189–96.

8. Anexos

Anexo I – Poster “TRI(B)pping over Rosiglitazone: Exploring the role of Thiazolidinediones in melanoma”

TRI(B)pping over Rosiglitazone: Exploring the role of Thiazolidinediones in melanoma

III POSTER SUNSET SESSION
ESFMIG 2019



Claro IG¹, Ferreira BI^{2,3,4}, Link W^{2,3,5}, De Sousa-Coelho AL^{2,3,6,7,8}

¹Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Química e Farmácia, Faculdade de Ciências e Tecnologia; ²CBMR, Centre for Biomedical Research; ³ABC, Algarve Biomedical Center; ⁴DCBM, Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina; ⁵Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" (CSIC-UAM), Arturo Duprier, Madrid, Spain; ⁶ESSUAIG, Escola Superior de Saúde; ⁷CESUAIG, Centro de Estudos e Desenvolvimento em Saúde; ⁸CENIE, Centro Internacional sobre o Envelhecimento. Universidade do Algarve, Faro, Portugal.

INTRODUCTION

Although melanoma represents only 1% of all skin cancers, it is the one with the highest mortality rate.¹ Aging is one of the major risk factors for this cancer, showing a higher mortality rate in older patients.²

TRIB2 is a Tribbles family protein that is pointed as a cause of resistance to cancer therapies.³ Its expression has been found to be decreased in adipocyte cultures treated with Rosiglitazone, a PPAR γ agonist, from the Thiazolidinediones (TZDs) family of oral antidiabetic drugs. (Rodrigues-Viegas *et al.*, unpublished) TZDs have been previously reported to be effective in melanoma therapies, however there are still some controversial results.⁴

Due to this high mortality rate, the increasing incidence in the last three decades and the innate or acquired resistance to therapy, efforts have been pooled to optimize existing therapeutic strategies and to find new ones.¹

HYPOTHESIS

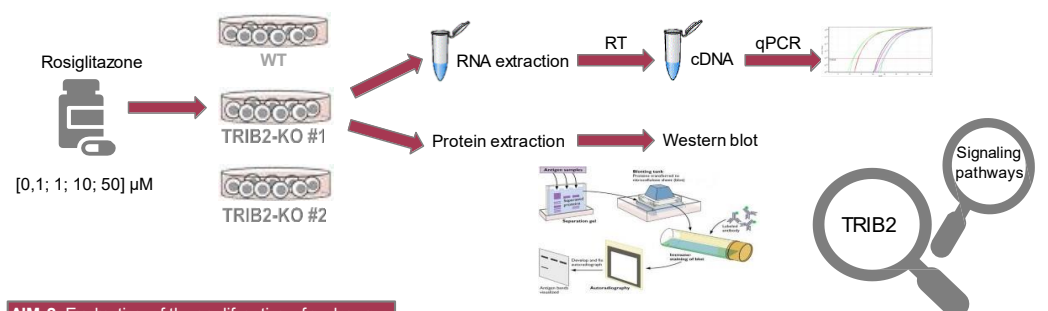
❖ Rosiglitazone will lead to a decrease of TRIB2 levels in melanoma cells;

❖ TRIB2 may play an important role in Thiazolidinedione action in melanoma treatment.

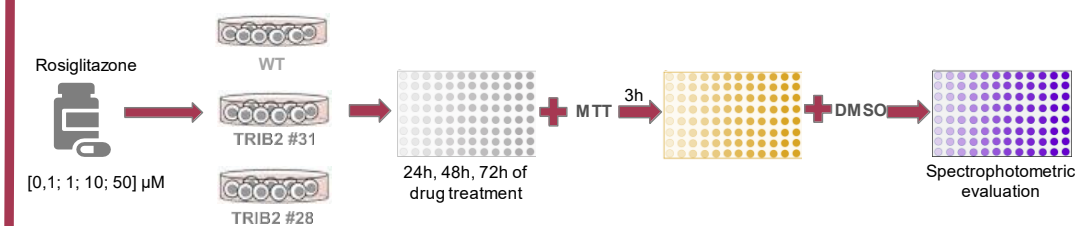


SCHEMATIC METHODOLOGY

AIM 1: Evaluation of TRIB2 levels in melanoma cells treated with Rosiglitazone, and TRIB2 potential role in the signaling pathways involved in Rosiglitazone mode of action.



AIM 2: Evaluation of the proliferation of melanoma cells in response to Rosiglitazone treatment and TRIB2 influence in cells viability.



EXPECTED RESULTS

Within this project we expect to validate the decrease of TRIB2 levels in melanoma cells upon Rosiglitazone treatment, and to open the therapeutic windows for new combined therapies for TRIB2-positive melanoma patients, resistant to current anticancer therapies, improving their prognosis.

Moreover, we also expect to reach a better understanding on the molecular mechanisms involved in Rosiglitazone's mode of action, and to uncover TRIB2 impact on TZD's treatment.

REFERENCES

- 1 American Cancer Society. Atlanta, GA: American Cancer Society.; 2018. Cancer Facts and Figures 2018.
- 2 Hill R, Kalathur RKR, Colaço L, Brandão R, Ugurel S, Fuschik M, et al. Trib2 as a biomarker for diagnosis and progression of melanoma. *Carcinogenesis*. 2014;36(4):469 –77.
- 3 Pich C, Meylan P, Mastelic-Gavillet B, et al. Induction of paracrine signaling in metastatic melanoma cells by PPAR γ agonist rosiglitazone activates stromal cells and enhances tumor growth. *Cancer Res*. 2018;78(22):6447 –6461.



ACKNOWLEDGEMENTS



Anexo II – Poster “Avaliação do risco/benefício da terapia com antidiabéticos orais – o caso das biguanidas e tiazolidinedionas na progressão do melanoma na diabetes”

Avaliação do risco/benefício da terapia com antidiabéticos orais – o caso das biguanidas e tiazolidinedionas na progressão do melanoma na diabetes

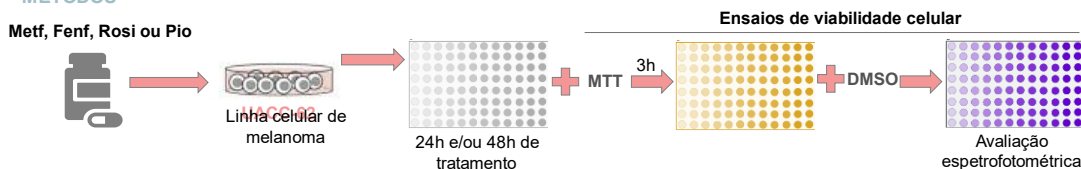
Claro IG¹, Pinto AP¹, Ferreira BI^{2,3,4}, Link W^{2,3,5}, De Sousa-Coelho AL^{2,3,6,7,8}

¹Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Química e Farmácia, Faculdade de Ciências e Tecnologia; ²CBMR, Centre for Biomedical Research; ³ABC, Algarve Biomedical Center; ⁴DCBM, Departamento de Ciências Biomédicas e Medicina; ⁵Instituto de Investigações Biomédicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM), Arturo Duperier, Madrid, Spain; ⁶ESSUA, Escola Superior de Saúde; ⁷CESUA, Centro de Estudos e Desenvolvimento em Saúde; ⁸CENIE, Centro Internacional sobre o Envelhecimento, Universidade do Algarve, Faro, Portugal.

INTRODUÇÃO

A diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) afeta milhões de pessoas e a sua incidência tem aumentado ao longo dos anos.¹ O melanoma representa a forma mais agressiva de cancro da pele.² Tal como para a diabetes, o envelhecimento é um dos principais fatores de risco para o melanoma, apresentando uma maior taxa de mortalidade em pacientes idosos.³ Estudos retrospectivos em doentes diabéticos e estudos em células cancerígenas relatam que tanto a Metformina (Metf) como a Fenformina (Fenf), fármacos antidiabéticos orais da classe das biguanidas, além de antagonizarem a redução da produção hepática de glucose, possuem também atividade antitumoral.^{4,5} Mais estudos demonstraram que a Pioglitazona (Pio) e a Rosiglitazona (Rosi), também fármacos antidiabéticos orais, pertencentes à classe das tiazolidinedionas (TZDs), além de melhorar o controlo glicémico em doentes com DM2 através da sensibilização dos tecidos-alvo à insulina, causam um efeito inibitório no crescimento tumoral.^{6,7,8}

MÉTODOS



RESULTADOS

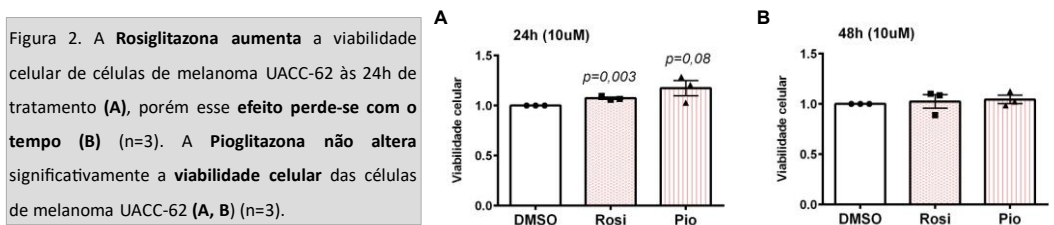
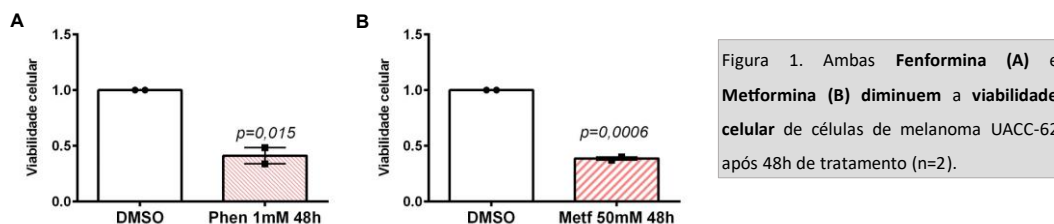


Figura 2. A Rosiglitazona aumenta a viabilidade celular de células de melanoma UACC-62 às 24h de tratamento (A), porém esse efeito perde-se com o tempo (B) (n=3). A Pioglitazona não altera significativamente a viabilidade celular das células de melanoma UACC-62 (A, B) (n=3).

CONCLUSÕES

Biguanidas ↓ Viabilidade celular 😊 Proteção adicional à progressão do melanoma!

TZDs não alteram Viabilidade celular 😞 Não parece ser terapêutica a considerar!

REFERÊNCIAS

1. Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011;378(9786):169 –81. 2. American Cancer Society. Atlanta, GA: American Cancer Society.; 2018. Cancer Facts and Figures 2018. 3. Macdonald JB, Dueck AC, Gray RJ, Wasif N, Swanson DL, Sekulic A, et al. Malignant melanoma in the elderly: different regional disease and poorer prognosis. *J Cancer*. 2011;2:538–43. 4. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: The end of the beginning. *Vol. 2, Cancer Discovery*. 2012. p. 778 –90. 5. 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. 6. Grommes C, Landreth GE, Heneka MT. Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor-γ agonists. *Lancet Oncol*. 2004 Jul;5(7):419–29. 7. Malhotra S, Bansal D, Shafig N, Pandhi P, Kumar B. Potential therapeutic role of peroxisome proliferator activated receptor-γ agonists in psoriasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2005 Aug 8;6(9):1455–61. 8. Varani J, Bhagavathula N, Ellis CN, Pershad Singh HA. Thiazolidinediones: potential as therapeutics for psoriasis and perhaps other hyperproliferative skin disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2006 Nov 16;15(11):1453–68.



Anexo III – Resumo “Potential Role of TRIB2 in the Treatment of Melanoma with Thiazolidinediones”

Authors:

Ana Luisa De Sousa-Coelho^{1,2,3}, Ines G. Claro⁴, Wolfgang Link⁵, Bibiana I. Ferreira^{1,2,,6}

Affiliations:

1Algarve Biomedical Center Research Institute (ABC-RI), Faro, Portugal

2Algarve Biomedical Center (ABC), Faro, Portugal

3Escola Superior de Saude (ESS), Universidade do Algarve, Faro, Portugal

4Faculdade de Ciencias e Tecnologia (FCT), Universidade do Algarve, Faro, Portugal

5Instituto de Investigaciones Biomedicas “Alberto Sols” (CSIC-UAM). Madrid, Spain

6Faculdade de Medicina e Ciencias Biomedicas (FMCB), Universidade do Algarve, Faro, Portugal

Introduction:

Although melanoma represents only 1% of all skin cancers, it is the one that has the highest mortality rate. One of the main causes of therapeutic failure is the resistance to anticancer therapies. TRIB2 protein, from pseudokinases Tribbles family, has been associated with increased chemoresistance. Rosiglitazone and Pioglitazone are PPAR γ agonists, from the thiazolidinediones (TZDs) family of oral antidiabetic drugs, which have been previously reported as potential effective therapy for melanoma. However, opposite results were also verified. Preliminary own unpublished studies found that TRIB2 mRNA expression is decreased in cultures of adipocytes treated with Rosiglitazone. From here, we hypothesized TZDs could reduce TRIB2 levels in melanoma cells, and that this effect could be involved in the anticancer mechanism of action of TZDs.

Materials and Methods:

UACC-62 melanoma cells were treated with Rosiglitazone or Pioglitazone. Protein was extracted to assess TRIB2 levels by Western blot. Viability of parental UACC-62 and TRIB2-KO cells, treated with Rosiglitazone or Pioglitazone, was evaluated by MTT assays.

Results:

A very mild increase in TRIB2 protein levels was observed after 10 μ M TZDs treatment for 24h in UACC-62 cells. MTT assays revealed TZDs treatments did not consistently impacted cell viability, which was TRIB2-independent. PPAR γ protein was undetectable in UACC-62 cell line.

Conclusions:

Contradicting our initial hypothesis, TRIB2 levels were not reduced in response to Rosiglitazone or Pioglitazone in UACC-62 melanoma cells. Moreover, TZDs treatment did not reduce cellular viability in this cell line, which might be a result of the low levels of TZDs target PPAR γ .