



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

***A fenformina como potencial terapêutica no
melanoma - Revisão sistemática***

Jéssica da Silva António

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

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

2021



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

***A fenformina como potencial terapêutica no
melanoma - Revisão sistemática***

Jéssica da Silva António

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

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

2021

A fenformina como potencial terapêutica no melanoma - Revisão sistemática

Declaração de autoria de trabalho

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

(Jéssica da Silva António)

Copyright © 2021 Jéssica da Silva António. Todos os direitos reservados.

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

*Aos meus pais,
por todo o apoio e dedicação e,
por me terem sempre inculcido a busca pelo conhecimento.*

Agradecimentos

Agora que esta etapa se aproxima do fim, é com enorme satisfação e orgulho que agradeço a todos aqueles que fizeram parte do meu percurso e que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento, não só a nível profissional como pessoal.

Em primeiro lugar, quero deixar um especial agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Ana Luísa de Sousa Coelho, que prontamente se disponibilizou para me guiar nesta dissertação. Por toda a dedicação, palavras de incentivo, por todo o conhecimento transmitido, por todo o apoio e compreensão e, por nunca ter desistido de mim. Não foi um caminho fácil e a Professora manteve-se sempre a meu lado. O meu profundo e sincero: Obrigada.

Aos meus pais, por me terem sempre incentivado a seguir os meus sonhos. Em especial à minha mãe, por todo o amor e carinho, por todos os esforços diários para que eu pudesse chegar até aqui e, pelo apoio diário incondicional ao longo de todos estes anos.

À minha irmã Inês, por dar sentido à palavra Saudade e pelo seu jeito peculiar de demonstrar apoio e afeto.

Aos meus queridos avós maternos, que estiveram sempre presentes em todos os momentos da minha vida, obrigada por todas as palavras de apoio.

À minha segunda família do Algarve, por todos os momentos partilhados, por todas as risadas, por todo o apoio, por terem estado sempre presentes e por terem contribuído para a pessoa que sou hoje. Em especial, à Iara, por toda a cumplicidade e apoio, pela amizade, pela presença e por toda a partilha ao longo destes últimos anos. À Rita Bernardo, ao Pedro Guiomar, ao Gonçalo Pereira, à Ana Palma, por darem um significado especial à palavra amizade.

À minha madrinha, Ana Campos, por ter sido a minha melhor escolha. Pela partilha, pela ajuda, pelas vivências, pela pessoa incrível que é. *It was written.*

Às minhas amigas de sempre, Catarina, Sofia, Adriana, Lima, Ana Rita, Inês, Costa, Belchi, por terem continuado sempre lá para mim, apesar da ausência.

À minha amiga Andreia, não de sempre, mas para sempre. Por me mostrar que não importa a distância que nos separa, mas sim a amizade que nos une.

À Farmácia Pedra Mourinha, que me recebeu e acompanhou de forma excepcional durante o meu estágio, agradeço por todos os ensinamentos transmitidos.

Por último, agradecer à Universidade do Algarve e a todos os docentes que contribuíram para a minha aprendizagem ao longo deste percurso.

A todos vós, Obrigada.

Resumo

Com mais de um milhão de novos casos detetados todos os anos, o cancro de pele é a neoplasia maligna mais comum entre a população caucasiana, o que se traduz num grave problema de saúde pública. O melanoma é considerado o mais agressivo, sendo responsável por cerca de 80% das mortes por cancro de pele.

O melanoma, quando diagnosticado precocemente e num estadio inicial, pode ser removido cirurgicamente com uma elevada taxa de sucesso. No entanto, uma vez metastizado, está associado a um mau prognóstico, sendo necessário recorrer a opções terapêuticas sistémicas como a imunoterapia, a quimioterapia e terapias dirigidas. Apesar do progresso, a ineficácia terapêutica e as resistências adquiridas ao tratamento, conduziram à necessidade de encontrar opções terapêuticas mais eficazes e duradouras.

O recurso a antidiabéticos orais como a metformina, um fármaco da classe das biguanidas, para o tratamento do melanoma tem sido uma opção com um elevado potencial terapêutico. Por conseguinte, vários estudos sustentaram o efeito promissor da fenformina, um fármaco da mesma classe, na efetividade da inibição do crescimento tumoral e proliferação celular do melanoma.

Esta monografia centra-se assim numa revisão sistemática sobre o potencial uso terapêutico da fenformina no melanoma. Para isso, foi definido um protocolo de investigação, onde foi especificada a questão da investigação, os termos de pesquisa e bases de dados utilizadas. Após a pesquisa na literatura, e depois de aplicados os critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 7 artigos, publicados entre o ano de 2012 e 2020.

Os resultados obtidos sustentam a teoria de que numa ampla variedade de células de melanoma, tanto de humanos como de murganhos, a fenformina parece diminuir a proliferação celular, induzir a apoptose, bem como a paragem do ciclo celular. Desta forma, os resultados obtidos nesta revisão sistemática permitem apoiar a possível aplicação terapêutica da fenformina no melanoma.

Palavras-chave: *melanoma; fenformina; biguanidas; terapêutica anticancerígena; paragem do ciclo celular*

Abstract

With more than one million new cases detected each year, skin cancer is the most common malignancy among the caucasian population, which is a serious public health problem. Melanoma is considered the most aggressive, accounting for about 80% of deaths from skin cancer.

Melanoma, when diagnosed early and at an early stage, can be surgically removed with a high success rate. However, once metastasized, it is associated with a poor prognosis, making it necessary to resort to systemic therapeutic options such as immunotherapy, chemotherapy, and targeted therapies. Despite progress, therapeutic inefficiency and acquired resistance to treatment led to the need to find more effective and lasting therapeutic options.

The use of oral antidiabetics such as metformin, a drug of the biguanide class, for the treatment of melanoma has been an option with a high therapeutic potential. Therefore, several studies have supported the promising effect of phenformin, a drug of the same class, on the effectiveness of tumor growth inhibition and melanoma cell proliferation.

This monograph thus focuses on a systematic review of the potential therapeutic use of phenformin in melanoma. For this, an investigation protocol was defined, where the investigation question, the search terms and databases used were verified. After searching the literature, and after conditioning the inclusion and exclusion criteria, 7 articles were selected, published between the year 2012 and 2020.

The results obtained support the theory that in a wide variety of human and mouse melanoma cells, phenformin appears to decrease cell proliferation, induce apoptosis, as well as arrest the cell cycle. Thus, the results obtained in this systematic review support a possible application of phenformin in melanoma.

Keywords: *melanoma; phenformin; biguanides; anticancer therapy; cell cycle arrest*

Índice geral

Índice de figuras	x
Índice de tabelas	xi
Índice de anexos.....	xii
Lista de abreviaturas	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. Melanoma.....	1
1.2. Abordagem terapêutica no melanoma	4
1.2.1. Quimioterapia.....	6
1.2.2. Terapias dirigidas.....	7
1.2.2.1. Inibidores BRAF	8
1.2.2.2. Inibidores MEK.....	9
1.2.2.3. Resistência à terapêutica	10
1.2.2.4. Inibidores BRAF e MEK em combinação.....	10
1.2.3. Imunoterapia	11
1.2.3.1. Inibidores do CTLA-4.....	12
1.2.3.2. Inibidores do PD-1	13
1.2.4. Administração de citocinas.....	13
1.2.4.1. Interleucina 2 (IL-2).....	13
1.2.4.2. Interferão-alfa (IFN- α)	14
1.2.5. Terapia viral oncolítica.....	14
1.2.5.1. Talimogene laherparepvec (T-VEC)	14
1.3. Antidiabéticos orais no tratamento do melanoma.....	15
1.3.1. Metformina	15
1.3.1.1. Mecanismo de ação.....	15
1.3.2. Fenformina.....	17
1.3.2.1. Estrutura Química da Fenformina	18
1.3.2.2. Mecanismo de ação.....	19
1.3.2.3. Terapias combinadas com fenformina	20
2. Objetivos	21
3. Metodologia	21
3.1. Formulação da questão de investigação	21
3.2. Elaboração do protocolo de investigação	22
3.2.2. Critérios de inclusão e exclusão	22

3.2.3.	Pesquisa de Literatura	22
3.2.4.	Seleção dos estudos	23
3.2.5.	Extração e síntese dos dados.....	23
4.	Resultados	25
4.1.	Seleção dos estudos.....	25
4.1.1.	Artigos Irrelevantes.....	26
4.1.2.	Artigos de Revisão.....	26
4.1.3.	Características dos estudos incluídos	27
4.1.4.	Distribuição temporal das publicações.....	29
4.2.	Tipo de amostra utilizada	29
4.2.1.	Culturas celulares em modelos de murganho	30
4.2.2.	Células e linhas celulares humanas.....	31
4.2.3.	Linhas celulares de origem murina	32
4.3.	Fenformina no melanoma.....	32
4.3.1.	Efeitos na proliferação	32
4.3.2.	Indução da apoptose.....	34
4.3.3.	Paragem do ciclo celular	36
4.4.	Combinação terapêutica	38
4.5.	Estudos <i>in vivo</i>	40
5.	Discussão	43
6.	Conclusão	48
7.	Referências Bibliográficas	49

Índice de figuras

Figura 1.1. Progressão patológica da propagação do melanoma	2
Figura 1.2. Sistema ABCDE em lesões benignas e malignas	3
Figura 1.3. Terapias sistêmicas no melanoma metastático.....	5
Figura 1.4. Representação esquemática da via de sinalização MAPK.....	8
Figura 1.5. Mecanismos de ação do CTLA-4 e do PD-L1	12
Figura 1.6. Mecanismos moleculares associados ao efeito antitumoral da metformina	16
Figura 1.7. Estrutura da fenformina	18
Figura 1.8 Mecanismo de ação da fenformina	19
Figura 3.1 Resumo do processo da metodologia.....	24
Figura 4.1 Diagrama de seleção dos estudos.....	26

Índice de tabelas

Tabela 1.1. – Opções terapêuticas para o melanoma em estado avançado.....	6
Tabela 3.1. Estruturação da questão de investigação através da aplicação da metodologia PICO	21
Tabela 4.1. Estudos encontrados nas bases de dados referenciadas.	25
Tabela 4.2. Características dos estudos selecionados.	27
Tabela 4.3. Culturas celulares em modelos de murganhos usados nos estudos analisados.	30
Tabela 4.4. Células e linhas celulares humanas usadas nos estudos analisados.....	31
Tabela 4.5. Células e linhas celulares de murganho usadas nos estudos analisados.	32
Tabela 4.6. Resultados da ação da Fenformina na proliferação celular.	33
Tabela 4.7. Resultados da ação da Fenformina e da Oligomicina na indução da apoptose, a pH ácido.....	35
Tabela 4.8. Resultados da ação da Fenformina na paragem do ciclo celular	36
Tabela 4.9. Resultados da combinação terapêutica com Fenformina e iBRAF PLX4720.	38
Tabela 4.10. Resultados da combinação da Fenformina + inibidor ERK SCH772984.	39

Índice de anexos

Anexo A1: Características e justificações dos artigos irrelevantes à temática.....	59
Anexo A2: Características dos estudos de revisão excluídos.....	63

Lista de abreviaturas

ACC - Acetil-CoA carboxilase

AICAR - Do inglês *5-aminoimidazole-4- carboxamide-ribonucleoside*

ALM - Melanoma acral lentiginoso (do inglês *acral lentiginous melanoma*)

AMP - Adenosina monofosfato (do inglês *adenosine monophosphate*)

ATP - Adenosina trifosfato (do inglês *adenosine triphosphate*)

BRAF - Gene humano que codifica a proteína B-Raf (do inglês *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*)

CTLA-4 - Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)

DCA - Dicloroacetato

DM2 - Diabetes *mellitus* tipo 2

DTIC - Dacarbazina

EMA - Agência Europeia do Medicamento (do inglês *European Medicines Agency*)

ERK - Cinase regulada por sinalização extracelular

FDA - Do inglês *Food and Drug Administration*

GM-CSF - Do inglês *Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor*

GTPase - Guanosina trifosfatase (do inglês *Guanosine triphosphatase*)

IFN - Interferão-alfa (IFN- α)

IL – Interleucina

IRS – Substrato do recetor de insulina (do inglês *Insulin receptor substrate*)

LBK1 - Do inglês *liver kinase B1*

LDH – Enzima lactato desidrogenase

LMM - Melanoma lentigo maligno (do inglês *lentigo maligna melanoma*)

MAPK - Proteína cinase ativada por mitogénio (do inglês *mitogen- activated protein kinase*)

MEK - Proteína envolvida na via de sinalização MAPK

MHC - Do inglês *major histocompatibility complex*

NK - Do inglês *natural killer cell*

NM - Melanoma nodular (do inglês *nodular melanoma*)

OMS - Organização Mundial de Saúde

OXPHOS – Fosforilação oxidativa (do inglês *Oxidative phosphorylation*)

PD-1 - Recetor de morte programada 1 (do inglês *Programmed cell death-1*)

PDK – Piruvato desidrogenase quinase (do inglês *Pyruvate dehydrogenase kinase*)

PI3K - Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês *phosphatidylinositol-3-kinase*)

PIP3 - Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (do inglês *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*)

PFS - Sobrevivência livre de progressão (do inglês *progression-free survival*)

PTEN - Fosfatase homóloga à tensina (do inglês *Phosphatase and Tensin Homolog*)

PUVA - Terapêutica que combina psolarenos com a exposição à radiação ultravioleta A

RAS - Do inglês *rat sarcoma virus*

RUV - Radiação ultravioleta

SSM - Melanoma extensivo superficial (do inglês *superficial spreading melanoma*)

T-VEC - Vírus de herpes modificado Talimogene laherparepvec

VHS-1 - Vírus herpes simplex do tipo 1

1. Introdução

1.1. Melanoma

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro é umas das principais causas de morte a nível mundial, representando a segunda causa mais importante de morte e morbidade na Europa (1).

O melanoma é a forma mais agressiva de cancro cutâneo, sendo responsável por 80% das mortes por cancro de pele (2). A incidência desta doença tem vindo a aumentar nas últimas décadas, atingindo cerca de 300 000 novos casos em todo o mundo, em 2018. Estima-se que nos próximos 20 anos, o número de pessoas diagnosticadas com cancro da pele aumente drasticamente (3).

Esta patologia resulta da transformação neoplásica dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, que derivam da crista neural. (4) Estas células estão localizadas na camada basal da epiderme, podendo também ser encontradas em vários tecidos do corpo, tais como os folículos pilosos, a coroide do olho, as meninges e o ouvido interno (5,6).

Atualmente, o melanoma é considerado uma doença com uma etiologia bastante complexa, determinada pela relação entre fatores de risco ambientais e características genéticas. O principal fator associado ao desenvolvimento desta patologia é a exposição à radiação ultravioleta (RUV), uma vez que existe uma relação entre a exposição intermitente ao sol, durante a infância e a adolescência, e um risco aumentado de contrair a patologia (7). Possuem também um risco acrescido de adquirir a doença pessoas com pele e olhos claros e, cabelos ruivos, uma vez que a produção de melanina se encontra diminuída (8). A suscetibilidade genética, a história pessoal e familiar de melanoma, a idade, o número de nevos melanocíticos (acumulações benignas de melanócitos, vulgarmente conhecido por “sinais”, que podem ser congénitos ou adquiridos), a imunossupressão e a terapêutica que combina psolarenos com a exposição à radiação ultravioleta (PUVA) são também alguns dos fatores predisponentes (5,7,8).

No que diz respeito ao desenvolvimento da doença, esta pode ser dividida em cinco estadios (Figura 1.1). Inicialmente, no **estadio 0**, também designado de melanoma *in situ*, o melanoma está confinado à camada superior da pele. As células cancerígenas estão compreendidas na epiderme, existindo uma interação mínima com os vasos sanguíneos, pelo que o tumor pode ser facilmente removido através de uma cirurgia (9,10). No **estadio I** ou fase de crescimento radial, ocorre uma proliferação das células tumorais na epiderme, não existindo evidência da sua presença nos gânglios linfáticos ou órgãos distantes. O **estadio II** é caracterizado por uma fase de crescimento vertical com invasão na derme vascularizada, podendo ser dividida em 3 grupos – A, B e C- consoante a espessura do tumor e/ou o grau de ulceração. Quando o melanoma progride para o **estadio III**, as células tumorais formam metástases nos gânglios linfáticos adjacentes. Por último, no **estadio IV**, as metástases disseminam-se para outras zonas da pele, ou órgãos mais distantes, como o fígado, pulmões e cérebro (11,12).

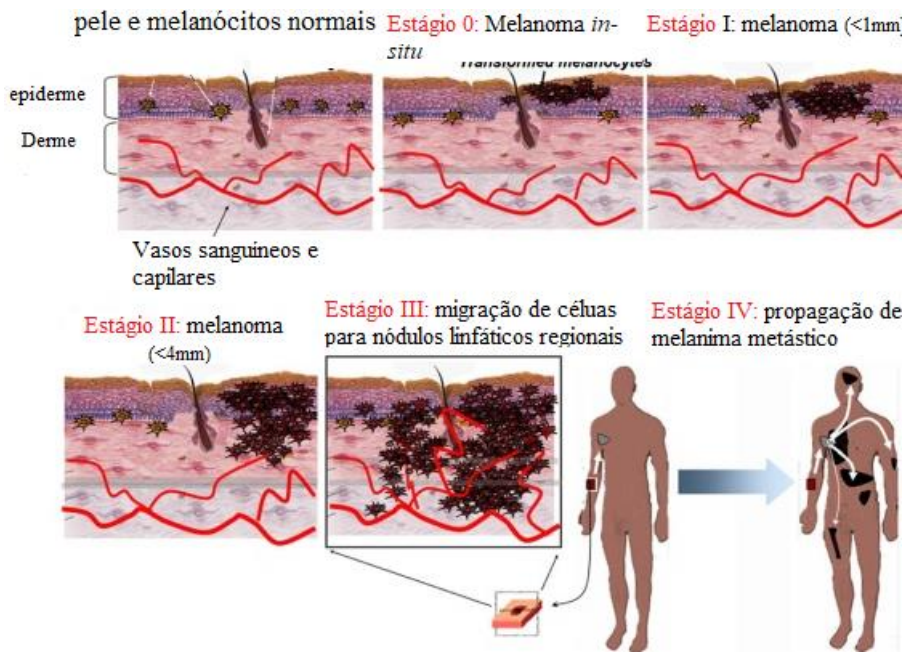


Figura 1.1. Progressão patológica da propagação do melanoma. Adaptado de (12).

A classificação histogenética do melanoma data de 1969, quando Wallace Clark e os colegas reportaram tumores malignos, com características macro- e microscópicas bem distintas (13). Esta doença cutânea pode assim ser dividida em quatro variantes principais:

melanoma extensivo superficial (SSM), melanoma nodular (NM), melanoma lentigo maligno (LMM) e melanoma acral lentiginoso (ALM) (14).

A aparência clínica do melanoma varia de acordo com o seu subtipo. Alterações nos nevos, vulgarmente conhecidos por “sinais”, podem ser um indicativo de que estamos na presença de melanoma. Algumas dessas alterações são a assimetria da lesão, os contornos irregulares, a alteração da cor e da sua superfície e, o aumento de tamanho (Figura 1.2) (15,18).

Tendo em conta o elevado índice de mortalidade desta doença, o seu diagnóstico precoce assume um papel fundamental, uma vez que em estadios iniciais, o melanoma pode ser facilmente curável através da sua excisão cirúrgica.

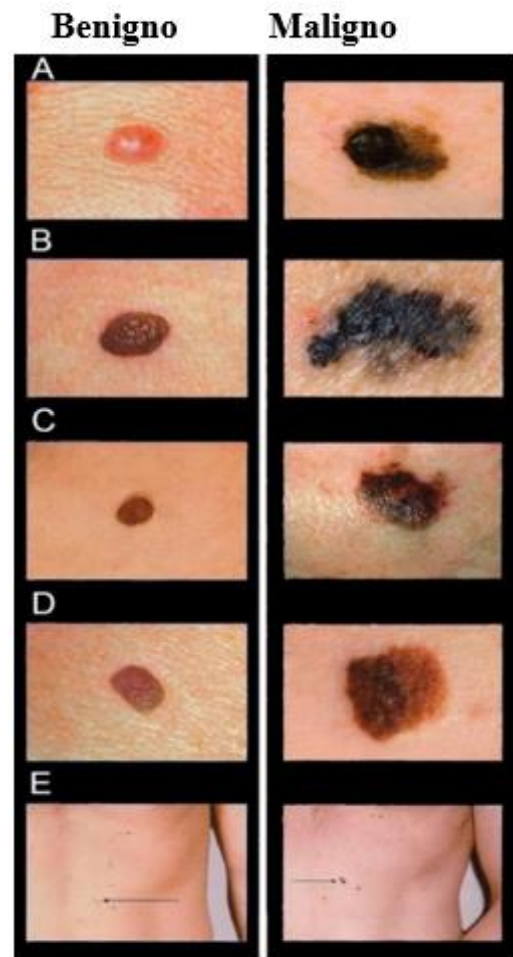


Figura 1.2. Sistema ABCDE em lesões benignas e malignas. A- assimetria; B- bordos; C- cor; D- diâmetro; E- evolução. Adaptado de (135).

1.2. Abordagem terapêutica no melanoma

A detecção precoce e a remoção cirúrgica do tumor continuam a ser a chave de ouro para o tratamento do melanoma cutâneo primário (10). Atualmente, em doentes com lesões de estadio I e II, a ressecção cirúrgica está associada a uma taxa de sobrevivência a 5 anos, de 95% e 80%, respetivamente (15).

Contudo, quando o diagnóstico é feito num estadio mais avançado, em que já ocorreu disseminação metastática para outros órgãos, o seu prognóstico torna-se reservado, apresentando uma taxa de sobrevivência a 3 anos, inferior a 15%. Nestes casos, apesar da cirurgia continuar a ser o tratamento preferencial para metástases cutâneas, deverá considerar-se terapias sistémicas se existirem lesões numerosas ou extensas inoperáveis, bem como metástases distantes (17,23).

Até ao ano de 2011, as únicas opções terapêuticas sistémicas para o melanoma metastático aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) e pela Agência Europeia do Medicamento (EMA) incluíam a terapêutica anticancerígena com Dacarbazina (DTIC) e doses elevadas de interleucina (IL)-2 (18). No entanto, os riscos de toxicidade associados e a baixa taxa de resposta da Dacarbazina (DTIC), cerca de 20%, limitaram a sua aplicação (17,24).

Tal como referido anteriormente, o melanoma metastático é praticamente irremovível cirurgicamente, sendo necessário recorrer a terapias sistémicas, tais como a quimioterapia, a radioterapia, as terapias dirigidas e a imunoterapia (20). Estas terapias têm como princípios adjacentes: o aumento da taxa de sobrevivência e a diminuição do tamanho do tumor, com ausência ou diminuição de sintomas (15).

Com o avanço da investigação, surgiram assim novas estratégias terapêuticas no campo das terapias dirigidas e da imunoterapia, destacando-se os inibidores seletivos de BRAF, como o Vemurafenib, Dabrafenib e Encorafenib (usados sozinhos e/ou em combinação com inibidores de MEK, como o Cobimetinib, Binimetinib e Trametinib), os anticorpos anti-recetor de morte programada 1 (anti-PD-1), como o Nivolumab e o Pembrolizumab e, os agentes inibidores do antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), como o Ipilimumab (21). Estes mecanismos encontram-se ilustrados na Figura 1.3.

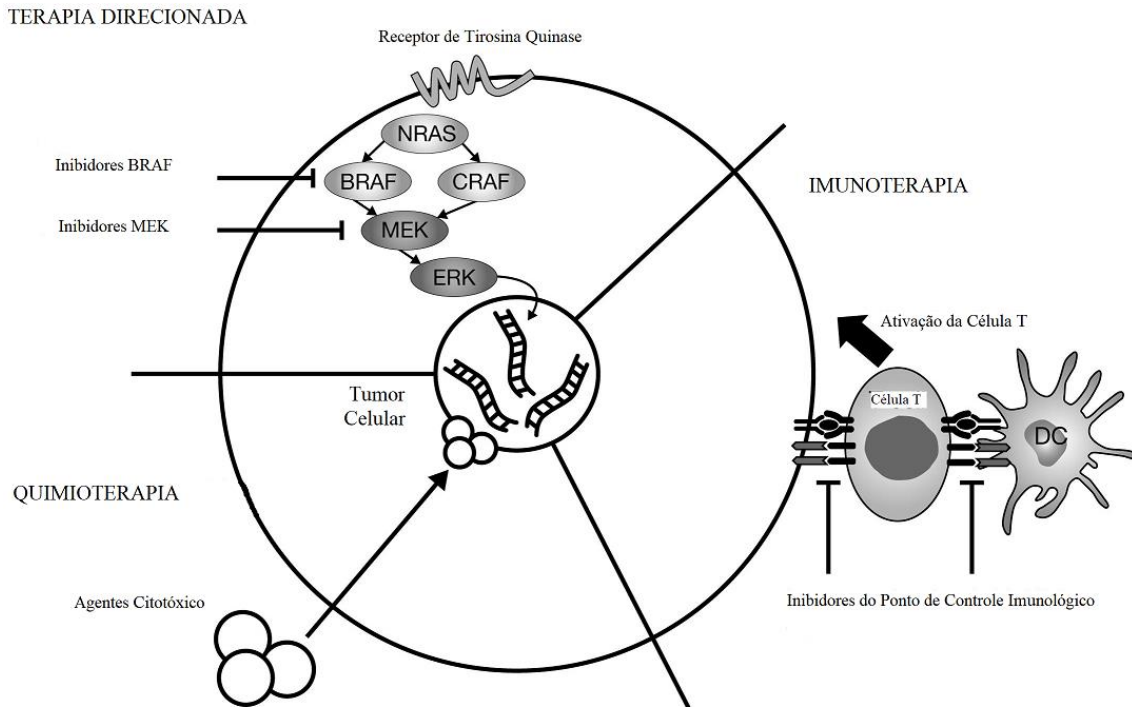


Figura 1.3. Terapias sistêmicas no melanoma metastático. Adaptado de (23).

Na Tabela 1.1. encontram-se sumarizadas as opções terapêuticas sistêmicas para o melanoma em estado avançado.

Tabela 1.1. – Opções terapêuticas para o melanoma em estado avançado. (CTLA-4 – antígeno associado a linfócitos T citotóxicos; PD-1 – proteína de morte celular 1) Adaptado de (22).

Quimioterapia	Citotóxicos	Dacarbazina Temozolamida Carboplatina/ Cisplatina Vincristina/ Vinblastina, Carmustina/ Fotemustina Paclitaxel Docexatel
Terapias dirigidas	Inibidores BRAF (iBRAF)	Vemurafenib Dabrafenib Encorafenib
	Inibidores MEK (iMEK)	Trametinib Cobimetinib Binimetinib
	Inibidores BRAF e MEK	Dabrafenib + Trametinib Vemurafenib + Cobimetinib Encorafenib + Binimetinib
Imunoterapia	Inibidores CTLA-4	Ipilimumab
	Inibidores PD-1	Nivolumab Pembrolizumab
	Imunoterapia combinada	Nivolumab + Ipilimumab
Outras terapêuticas	Interleucina-2 Terapia viral oncolítica Interferão alfa	

1.2.1. Quimioterapia

Antes do desenvolvimento da terapêutica dirigida e da imunoterapia, a quimioterapia era usada como padrão de tratamento em pacientes com melanoma metastático, com Dacarbazina ou outros agentes alquilantes como a Temozolomida, a Fotemustina ou os Taxanos. Contudo, com o avanço das terapias dirigidas e da imunoterapia, a quimioterapia foi considerada uma terapia de segunda a terceira linha.

Atualmente, os agentes citotóxicos utilizados são Dacarbazina, Temozolamida, Carboplatina, Cisplatina, Vincristina, Vinblastina, Tamoxifeno, Fotemustina e Paclitaxel (23).

Contudo, a DTIC é o agente mais utilizado, sendo considerado o mais ativo em regimes de monoterapia no tratamento do melanoma com metástases distantes. Está associado a uma taxa de resposta entre 10-20% e a uma duração média de 6 meses. Por outro lado, a média de sobrevivência aos 6 anos é inferior a 2% (23,24).

Com o objetivo de fazer face à baixa taxa de resposta observada no tratamento por monoterapia com Dacarbazina, foram inicialmente desenvolvidos estudos que sugeriam que a combinação entre agentes citotóxicos, aumentavam a taxa de resposta e a sobrevivência dos pacientes comparativamente ao uso isolado dos mesmos (23,24). Foram assim criados vários regimes, entre eles o BOLD (Bleomicina + Vincristina + Lomustina + DTIC), o CVD (Cisplatina + Vinblastina + DTIC) e o regime de Dartmouth (DTIC + Cisplatina + Carmustina + Tamoxifeno). No entanto, estudos mais avançados não revelaram benefícios à utilização destes regimes de combinação, evidenciando níveis de toxicidade mais elevados (25).

1.2.2. Terapias dirigidas

Outra abordagem terapêutica do melanoma metastático relaciona-se com a inibição seletiva de processos mecanísticos essenciais, tais como a proliferação e sobrevivência celular, a angiogénese e metástase (26).

A via MAPK desempenha um papel importante no desenvolvimento do melanoma, tornando esta via um alvo terapêutico interessante. Esta via, também conhecida como via RAS/RAF/MEK/ERK, é despoletada em resposta a ligandos extracelulares que se ligam a recetores presentes na superfície das células. Uma vez ativados, estes recetores levam à ativação da proteína RAS, localizada na superfície membranar interna, que por sua vez leva à ativação da proteína BRAF, a mais abundante na família RAF. Esta proteína encontra-se assim capaz de fosforilar e ativar a MEK, que por seu lado fosforila e ativa a ERK. Quando ativada, a ERK fosforila proteínas citoplasmáticas e é transportada para o interior do núcleo, onde regula a transcrição de

genes envolvidos na diferenciação, proliferação e sobrevivência celulares assegurando, desta forma, o desenvolvimento de células cancerígenas (27–29) (Figura 1.4).

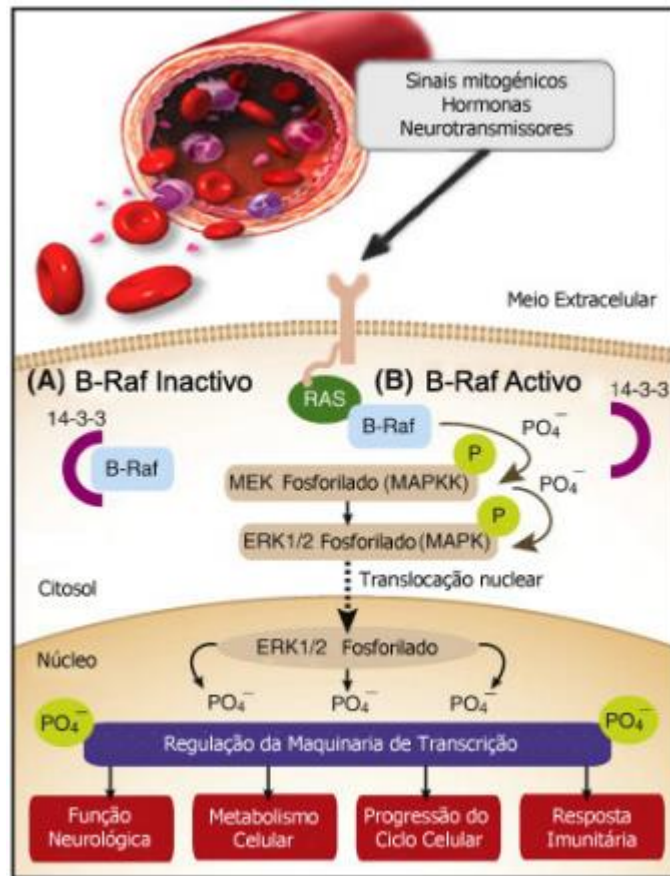


Figura 1.4. Representação esquemática da via de sinalização MAPK. (ERK - Cinase regulada por sinalização extracelular; PO₄⁻ - grupo fosfato; BRAF, MEK, RAS e ERK são proteínas constituintes desta via) Adaptado de (31).

A desregulação desta via de sinalização ocorre com frequência no melanoma metastático devido a mutações nos genes BRAF ou RAS (26,30).

1.2.2.1. Inibidores BRAF

O gene BRAF é o mais frequentemente mutado na via MAPK, sendo que aproximadamente 60% dos melanomas avançados contêm mutações neste gene. Em 90% das mutações BRAF é prevalente uma substituição de valina por ácido glutâmico no codão 600 (V600E) do exão 15 (31–33). BRAFV600E leva à hiperativação da via MAPK, que por sua vez desencadeia vias de sobrevivência e divisão celular de forma a promover o desenvolvimento do tumor por indução da proliferação (34).

No entanto, existem outras mutações como BRAFV600D, BRAFV600K e BRAFV600R, em que ocorre a substituição de valina por lisina, ácido aspártico ou arginina, respetivamente. Mutações como BRAFK601E e BRAFD594N também são conhecidas por ocorrer num número reduzido de pacientes (33). Outra mutação recorrente é a mutação no NRAS presente em aproximadamente entre 15 a 20% dos melanomas (23,32).

O Vemurafenib foi o primeiro inibidor seletivo do gene BRAF a ser desenvolvido, tendo sido aprovado pela FDA e pela EMA, em 2011 e 2012, respetivamente, para o tratamento de melanoma irressecável ou metastático com mutação BRAFV600E (22,35). O Dabrafenib é outro inibidor de BRAF específico que foi aprovado pela FDA e EMA em 2013, tendo sido mais recentemente, em 2018, aprovado o Encorafenib em combinação com Binimetinib (inibidor de MEK) (40,41).

Contudo, verifica-se com frequência o desenvolvimento de resistência adquirida/secundária a estes tratamentos com inibidores de BRAF, pelo que surgiu a necessidade da combinação terapêutica com inibidores MEK (37).

1.2.2.2. Inibidores MEK

Uma vez descoberta a importância da via MAPK e sendo esta uma via de sinalização em que as proteínas BRAF e MEK são ativadas consecutivamente perante uma forma anormal de BRAF, tornou-se emergente o desenvolvimento de inibidores MEK. Desta forma, o mecanismo dos inibidores MEK, consiste em bloquear diretamente a MEK e em prevenir a sua ativação pelo BRAF (38).

O Trametinib foi o primeiro fármaco a ser aprovado, em 2013 pela FDA e 2014 pela EMA, para o tratamento de doentes adultos, com melanoma metastizado ou irressecável, com a mutação BRAFV600E ou V600K (39).

O Binimetinib [FDA e EMA (2018)] e o Cobimetinib [FDA e EMA (2015)] foram aprovados para o tratamento do melanoma avançado em combinação com o Encorafenib e o Vemurafenib, respetivamente (22,39).

1.2.2.3. Resistência à terapêutica

Apesar das elevadas taxas de resposta com os inibidores BRAF e a atividade clínica promissora dos inibidores MEK nos melanomas BRAF mutados, a duração da resposta é relativamente curta devido aos mecanismos de resistência adquirida, limitando a eficácia da terapêutica (37). Os mecanismos de resistência podem ser divididos em 2 grupos: primário ou intrínseco, quando não é alcançado nenhum benefício terapêutico e, secundário ou adquirido, quando após existir uma resposta inicial à terapêutica se observa uma regressão nos resultados (40,41).

Na maior parte dos casos, a principal causa de resistência aos inibidores BRAF é a reativação da via MAPK, levando à ativação contínua da cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) na presença de inibição BRAF, o que ocorre em cerca de 80% dos tumores resistentes. Observou-se ainda que a reativação da via MAPK ocorre em cada 9 em 10 indivíduos que apresentam resistência a inibidores BRAF ou MEK, resultando no aumento da ativação ERK (42).

Foi também demonstrado que as células com resistência adquirida aos inibidores de BRAF podem recuperar as suas propriedades de sinalização e utilizar indeterminadamente qualquer uma das três isoformas de RAF para acionar a ativação de ERK e regular a proliferação de células de melanoma. Foi observado que a inibição de 1 ou 2 das isoformas de RAF não afetou de forma relevante a progressão do ciclo celular, ao passo que a inibição simultânea das 3 isoformas, levou à paragem do ciclo celular G0/G1 (43,44).

Verificou-se também que, em cerca de 10-20% dos casos que desenvolvem resistência precoce ou são intrinsecamente resistentes à inibição da MAPK, existem mutações ao nível da proteína PI3K ou AKT, ou uma perda do gene PTEN (fosfatase homóloga à tensina). Uma vez que o PTEN é um gene supressor do tumor que regula negativamente a via PI3K/AKT, a sua expressão diminuída conduzirá a níveis aumentados de AKT e PIP3, que por sua vez aumenta o crescimento e proliferação celular, inibindo a apoptose (41,44).

1.2.2.4. Inibidores BRAF e MEK em combinação

A resistência adquirida com o tratamento, em monoterapia, com os inibidores BRAF é quase universal, pelo que os estudos a combinar diversas terapêuticas começaram

a ser desenvolvidos. Atendendo que a inibição em simultâneo das proteínas BRAF e MEK da via MAPK demonstrou atenuar a resistência adquirida, levando a uma maior eficácia terapêutica, uma resposta antitumoral mais elevada e uma sobrevivência livre de progressão (PFS) mais longa, começaram a ser utilizadas combinações terapêuticas de iBRAF e iMEK (40,43).

Estes resultados conduziram à aprovação de 3 combinações para uso no melanoma metastático que expressam mutações BRAFV600E ou BRAFV600K. São elas a associação de Dabrafenib com o Trametinib [FDA (2013) e EMA (2014)], Vemurafenib com Cobimetinib e Encorafenib [FDA e EMA (2015)] com Binimetinib [FDA e EMA (2018)] (22,39,45).

Num estudo realizado em linhas celulares de melanoma, em que 36% apresentavam mutações BRAF ativadoras, foi observada uma maior sensibilidade à combinação terapêutica de Vemurafenib (iBRAF) com Trametinib (iMEK) comparativamente ao seu uso isolado. Verificou-se também que uma proporção dos pacientes que desenvolviam resistência à terapêutica com inibidores BRAF, respondiam à terapêutica com inibidores MEK (46).

1.2.3. Imunoterapia

Os doentes com melanoma metastático têm uma resposta imune antitumoral comprometida, conduzindo a uma tolerância por parte do sistema imunitário e à criação de um microambiente favorável à progressão do mesmo (47). A imunoterapia, que supera com sucesso esta supressão do sistema imunitário mediada pelo tumor, é utilizada para melhorar a resposta imune dos doentes com melanoma e aumentar a eliminação de células cancerígenas (33,48).

Esta abordagem terapêutica baseia-se no bloqueio de alguns pontos reguladores do sistema imunitário, no entanto, ao contrário dos anticorpos atualmente aprovados para o tratamento do cancro, estes não atuam diretamente sobre as células tumorais. Vão atuar sobre os recetores linfocitários ou sobre os seus ligandos, com o objetivo de aumentar a atividade antitumoral endógena (37).

Atualmente, estão disponíveis três anticorpos monoclonais responsáveis por aumentar a imunidade antitumoral ao inibir os pontos de controlo imunitário, como o CTLA-4 e o PD-1 (Figura 1.5) (49,50).

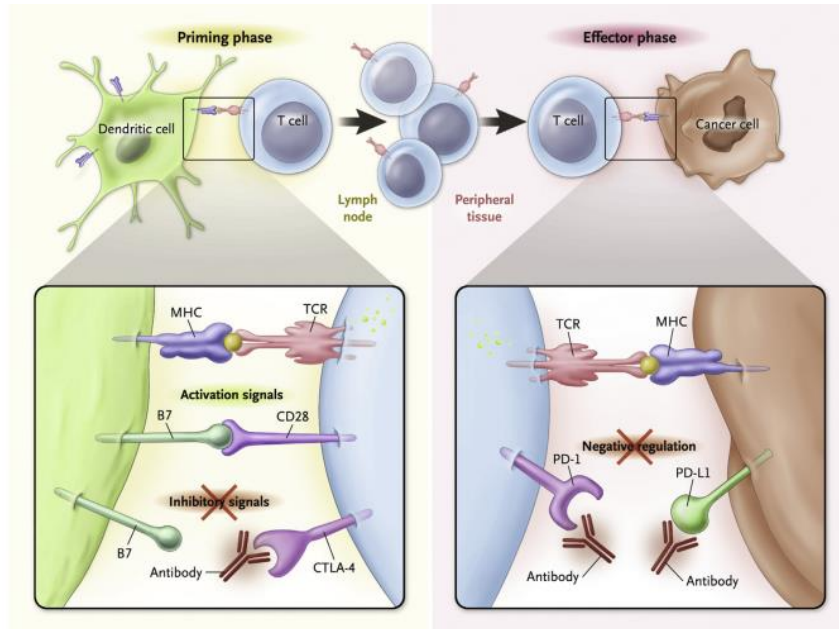


Figura 1.5. Mecanismos de ação do CTLA-4 e do PD-L1. Adaptado de (50).

1.2.3.1. Inibidores do CTLA-4

O Ipilimumab, aprovado em 2011 pela FDA e pela EMA, é um anticorpo monoclonal concebido para se ligar à proteína CTLA-4, que é expressa à superfície das células T, inibindo a sua atividade. Através desta ligação, vai promover a ativação e proliferação de células T, que por sua vez se infiltram nos tumores, eliminando as células cancerígenas (28,37,38). Em 2017, este anticorpo foi aprovado pela FDA no tratamento do melanoma metastático ou irrecetável (tumor que não pode ser removido completamente por cirurgia) em doentes com idade igual ou superior a 12 anos (52).

1.2.3.2. Inibidores do PD-1

Por sua vez, o recetor de morte programada 1 (PD-1) expressa-se preferencialmente na superfície de células T ativadas, linfócitos B e células natural killer (NK) e, está envolvido em processos de tolerância imunitária (32, 40).

Foram identificados dois ligandos para esta proteína, o ligando de morte programada 1 (PD-L1) e o ligando de morte programada 2 (PD-L2), que se podem expressar à superfície das células tumorais. A ligação do recetor PD-1 aos seus ligandos, vai regular, de forma negativa, a ativação das células T, impedindo-as de combater o cancro (47,50).

Surgiram assim os anticorpos monoclonais anti-PD-1 Nivolumab e Pembrolizumab, aprovados pela FDA e EMA em 2015 e, pela FDA e EMA em 2014 e 2015, respetivamente. Estes anticorpos ligam-se ao recetor PD-1, bloqueando-o, inibindo a sua interação com os ligandos PD-L1 e PD-L2, prevenindo a inibição da resposta imune celular (38,39).

Estudos demonstraram um aumento significativo na sobrevivência livre de progressão (PFS) em doentes tratados em regime de associação de ipilimumab (anti-CTLA-4) e nivolumab (anti-PD-1), comparativamente ao regime de monoterapia. Esta combinação foi aprovado pela FDA em 2015 como tratamento de primeira linha em doentes com melanoma avançado BRAF-negativo, tendo sido expandido a doentes com a mutação BRAF em 2016 (53,54).

1.2.4. Administração de citocinas

1.2.4.1. Interleucina 2 (IL-2)

A Interleucina 2 (IL-2) foi a segunda citocina exógena a demonstrar atividade antitumoral em tumores sólidos, como o melanoma, tendo sido aprovada pela FDA, em 1998, para o tratamento do melanoma metastático (32,42). A IL-2 é uma glicoproteína, que estimula a proliferação e sobrevivência das células T, sendo essencial na homeostasia das células T reguladoras, de forma a desencadear uma resposta antitumoral (56).

1.2.4.2. Interferão-alfa (IFN- α)

O Interferão-alfa (IFN- α) é uma proteína imunorreguladora, que demonstrou ter propriedades pro-apoptóticas e antiproliferativas. O IFN- α tem vários mecanismos de ação, sendo responsável por aumentar a expressão de MHC-1 (complexo major de histocompatibilidade classe 1) nas células do melanoma, possuir uma atividade antitumoral direta e inibir a angiogênese (processo descrito pela formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos funcionais pré-existentes) (35,44-46). Aprovado pela FDA em 1996, foi anos mais tarde, em 2000, aprovado pela EMA como terapêutica adjuvante em doentes com melanoma com alto risco de recorrência após recessão cirúrgica (47,59).

1.2.5. Terapia viral oncolítica

1.2.5.1. Talimogene laherparepvec (T-VEC)

Muitos vírus são capazes de infetar células tumorais, causando a lise destas células com consequente libertação de fatores pró-inflamatórios e antigénios, resultando numa expansão clonal de células T específicas para o tumor. O Talimogene laherparepvec (T-VEC) é um vírus herpes simplex do tipo 1 (VHS-1) geneticamente modificado e, foi produzido para ser injetado na pele, em metástases subcutâneas ou em lesões nodulares de forma a causar respostas antitumorais locais e sistémicas (60).

Aprovado pela FDA e EMA em 2015, este vírus tem um mecanismo de ação duplo. Possui um efeito oncolítico através do qual infeta e mata diretamente as células tumorais no local da injeção e, foi projetado para se replicar de forma seletiva dentro dos tumores e para produzir o Fator Estimulante de Colónias de Granulócitos e Macrófagos (GM-CSF) com o objetivo de potencializar uma resposta imune antitumoral sistémica (60–62).

1.3. Antidiabéticos orais no tratamento do melanoma

1.3.1. Metformina

A história do uso da classe de antidiabéticos orais das biguanidas pode ser explicada desde o uso da *Galega officinalis* (também conhecida como Arruda-caprária ou Falso-anil), uma planta utilizada na medicina tradicional durante vários séculos (63). A guanidina, princípio ativo desta planta, foi utilizada para sintetizar diversos compostos antidiabéticos na década de 1920, sendo que, a metformina e a fenformina, as duas principais biguanidas, foram introduzidas no final de 1950 (64).

Apesar do uso da Metformina ter sido aprovado em 1972 no Canadá, só em 1994 recebeu a aprovação da FDA para uso clínico no tratamento da diabetes tipo 2 (65,66).

Desde então que a metformina conquistou o seu lugar e tornou-se no fármaco mais prescrito mundialmente para a redução da glicémia, estando incluído na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde (OMS), ainda que o seu mecanismo de ação concreto seja ainda incerto (73,74,75).

1.3.1.1. Mecanismo de ação

O facto da metformina provocar um efeito na redução dos níveis de glucose sanguínea é essencialmente uma consequência dos mecanismos de ação primário deste composto. Estes mecanismos incluem a inibição da gluconeogénese no fígado e um aumento da sensibilidade à insulina, levando ao aumento da captação e utilização da glucose pelo músculo esquelético e pelos adipócitos. Isto vai resultar numa diminuição da glucose circulante e dos níveis de insulina plasmática (64,70,71).

A nível molecular, os principais efeitos da metformina são maioritariamente exercidos através da inibição da fosforilação oxidativa na mitocôndria, através da inibição do complexo I da cadeia respiratória e, ativação da AMPK (proteína cinase ativada por AMP) (Figura 1.6) (72).

A indução de stress metabólico, por sua vez, aumenta os níveis endógenos de espécies reativas de oxigénio (ROS). Consequentemente, o stress oxidativo vai levar à morte das células cancerígenas que dependem da fosforilação oxidativa para a produção de energia. De forma a manter a homeostase celular em resposta à mudança no rácio AMP/ATP induzida pela metformina, o LKB1 (Liver Kinase B1), uma vez ativado, é

responsável pela fosforilação do resíduo Thr-172 e ativação do AMPK. As vias anabólicas e catabólicas são consequentemente inibidas e ativadas, respetivamente (69,73).

A ativação do AMPK pela metformina inibe o crescimento de células tumorais através de três diferentes vias de uma forma tecido dependente: inibição do *mammalian target of rapamycin* (mTOR) e síntese de ácidos gordos (FAS), bem como estimulação do gene supressor tumoral p53 (72).

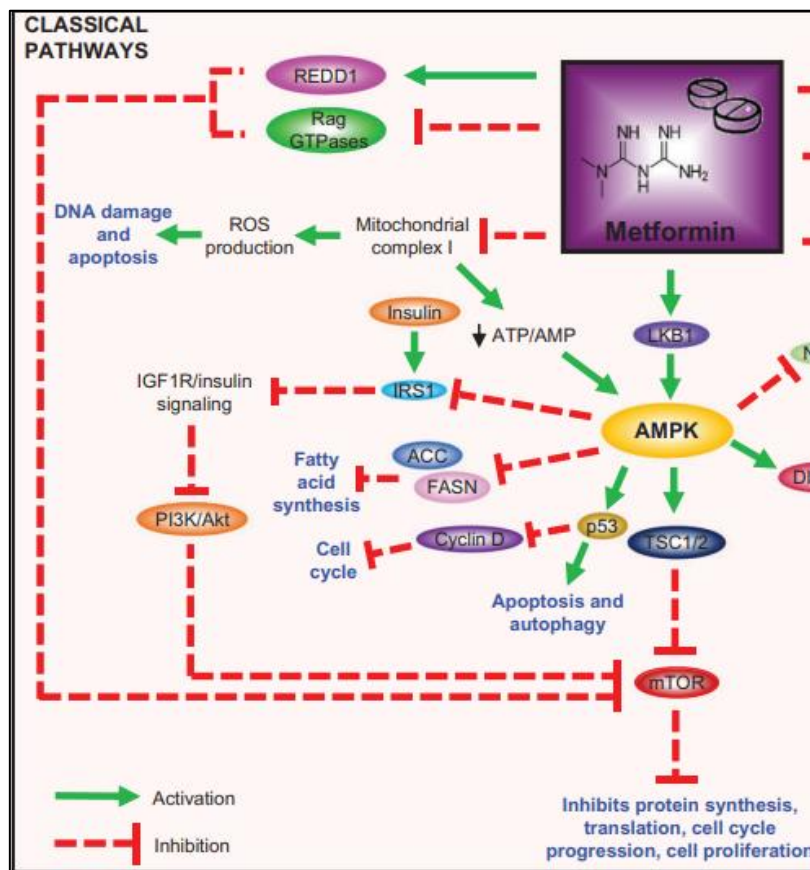


Figura 1.6. Mecanismos moleculares associados ao efeito antitumoral da metformina. ATP- adenosina trifosfato; AMP- adenosina monofosfato; AMPK- proteína cinase ativada por AMP; GTPases- enzimas que se ligam a GTP; FASN- ácido gordo sintase; mTOR- proteína alvo da rapamicina em mamíferos; p53- proteína supressora do tumor; PI3K- Fosfatidilinositol 3-cinase; REDD1- regulador negativo mTOR; ROS- espécies reativas de oxigênio; TSC1/2- genes supressores do tumor. Adaptado de (71).

Uma consequência direta da ativação do AMPK é a inibição do mTOR, uma proteína cinase serina/treonina que, está integrado em dois complexos multi-proteicos, TORC1 e TORC2, e é regulado por fatores extracelulares (insulina e fatores de

crescimento insulina-like) e intracelulares (nutrientes, aminoácidos, glicose), essenciais para o crescimento da célula (72,73).

Através da ativação de TSC1 e TSC2, é formado um complexo de supressão tumoral TSC2-TSC1, que inibe a atividade de mTOR, inibindo, conseqüentemente, a proliferação de células cancerígenas (72).

A inibição da síntese de ácidos gordos poderá ser outra forma da metformina induzir efeitos antitumorais. Isto porque, em muitas das células cancerígenas, a síntese de ácidos gordos está aumentada como consequência da elevada expressão da sintase de ácidos gordos (FAS) (72). A ativação de AMPK pela metformina leva à supressão da expressão do gene da FAS e à inativação da acetil-CoA carboxilase (ACC), conduzindo a uma redução da lipogênese e da síntese do produto da ACC, malonil-CoA, resultando num aumento da oxidação de ácidos gordos e, conseqüente inibição da proliferação de células cancerígenas, induzindo a morte celular por apoptose (74).

Por último, foi também sugerida a importância do p53, um supressor tumoral que está frequentemente mutado no cancro. O AMPK pode fosforilar e ativar o p53, induzindo a interrupção do ciclo celular e a indução da apoptose (72).

1.3.2. Fenformina

A fenformina faz parte da família das biguanidas, desenvolvida no final da década de 1950. Esta foi prescrita para tratamento de diabetes até ao ano de 1977, sendo descontinuada devido à ocorrência relativamente mais frequente de acidose láctica em comparação com outras biguanidas como a metformina (81,82). Enquanto isso, a fenformina demonstrou ter atividade anticancerígena em vários tipos de tumores, como por exemplo o colangiocarcinoma, o cancro do ovário, da mama, retal, cérebro e hipófise, melanoma e cancros neuroendócrinos (77).

A fenformina é também um inibidor do complexo I mitocondrial, tal como a metformina, mas devido à sua porção hidrofóbica, é transportada com maior afinidade e cineticamente mais rápido para o interior das células. Os seus efeitos antineoplásicos incluem: inibição da proliferação celular, indução de apoptose de células neoplásicas, supressão *in vivo* do desenvolvimento e crescimento do tumor, inibição da transição mesenquimal-epitelial e inibição da angiogénese (77).

A fenformina foi usada no tratamento da diabetes, sendo um agente hipoglicemiante da classe das biguanidas com ações e utilizações semelhantes às da metformina. Esta diminui a absorção de glucose pelo intestino, diminuindo a produção de glucose no fígado e aumentando a capacidade do corpo de utilizar a insulina de forma mais eficaz. Assim, melhora o controlo glicémico, aprimorando a sensibilidade à insulina (78).

Embora a fenformina não seja usada no tratamento da DM2, pela incidência alta de acidose láctica, demonstrou uma eficácia antitumoral mais ampla, tendo sido alvo de estudo em vários tipos de cancro (77).

1.3.2.1. Estrutura Química da Fenformina

A estrutura cristalina da fenformina é composta por duas moléculas independentes que coexistem na unidade assimétrica, ambas relacionadas por ligações de hidrogénio (H) intermoleculares do tipo N-H...N. A protonação ocorre no N11 ou N14 levando à localização de dois átomos H em ambos, N11 e N14, sendo esta estrutura otimamente estabilizada por ressonância (Figura 1.7). Em contrapartida, a mudança drástica do pH é responsável pela sua forma catiónica. Desta forma, a fenformina existe na forma monoprotionada em pH aproximadamente 7,2 e a espécie diprotionada requer um pH cerca de 2. A sua porção guanidina não tem uma conformação planar geral, com o grupo fenil formando um ângulo diedro de aproximadamente 55° em relação à porção biguanida (75).

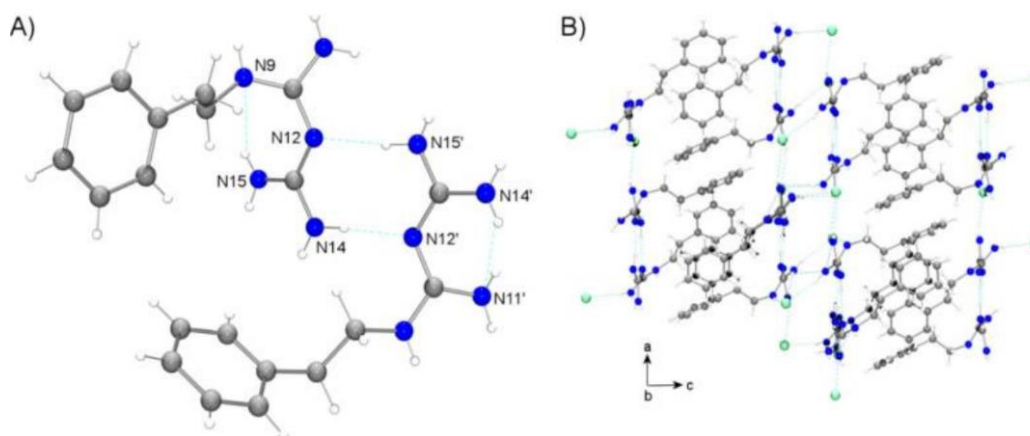


Figura 1.7. Estrutura da fenformina. (A) Dímero formado pelas ligações de H a ligandos de fenformina dentro do cristal de cloridrato de fenformina. (B) Estrutura cristalina de cloridrato de fenformina. Adaptado de (75).

1.3.2.2. Mecanismo de ação

O mecanismo de ação da fenformina é muito semelhante ao da metformina, sendo o efeito da fenformina mais potente do que a metformina devido à forma como esta entra nas células uma vez que, não requer transportadores proteicos para ser capaz de atravessar a membrana celular. Este é um fator relevante na sua utilização uma vez que permite o uso de concentrações mais altas dentro das células tumorais e, permite o sucesso terapêutico no tratamento de tumores que não tenham uma expressão aumentada de transportadores de cátions orgânicos (75,78).

Uma vez no interior das células, a fenformina pode atuar de três maneiras diferentes: por inibição do complexo I da cadeia respiratória, ativação da proteína REDD1 (regulador negativo mTOR) e inibição dos recetores do substrato do recetor de de insulina (IRS). A ativação da proteína AMPK ocorre por inibição do complexo I da cadeia respiratória. Por outro lado, a inibição de AMPK conduz ao bloqueio da via mTOR pela ativação do inibidor de mTOR, a proteína TSC2. Deste modo, é promovida a paragem do ciclo celular e inibição da invasão, assim como a inibição da proliferação celular, a inibição da síntese de proteínas e a inibição da sobrevivência celular (Figura 1.8) (75).

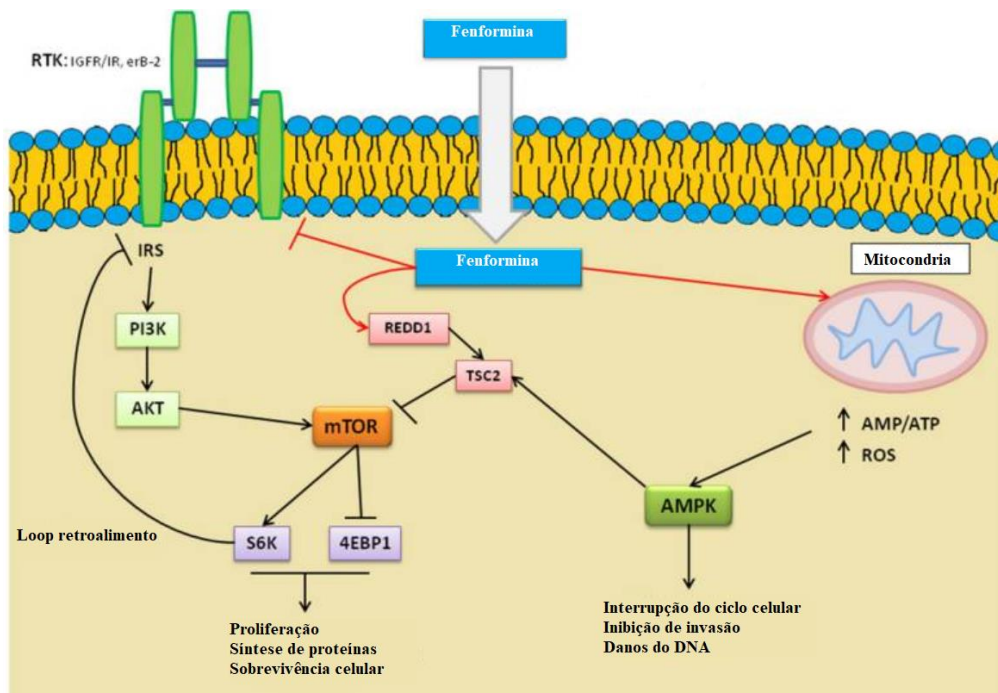


Figura 1.8 Mecanismo de ação da fenformina. Adaptado de (75).

O efeito direto da fenformina ocorre pela ativação da AMPK devido à inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, aumentando assim o rácio AMP/ATP celular e o subsequente aumento do número de espécies reativas de oxigênio (ROS). A produção de ROS apenas provoca a morte das células tumorais (79).

De outra forma, a ativação da AMPK inibe a via mTOR, que é um regulador chave da proliferação celular. Esta cinase ativa o inibidor da proteína mTOR, TSC2 e, conseqüentemente, inibe a via mTOR, conduzindo à inibição da proteína S6K e à ativação da proteína 4E-BP1, um fator de iniciação da transcrição (23, 24). Desta forma, diminui o crescimento de células cancerígenas.

A via anteriormente descrita regula ainda o substrato do recetor de insulina (IRS) que constitui uma importante mecanismo de retroalimentação (82). O bloqueio da S6K leva à ativação de várias proteínas, levando à ativação da proliferação celular. A fenformina bloqueia este processo, diminuindo a transdução IR/IGF 1R (83).

1.3.2.3. Terapias combinadas com fenformina

Como referido anteriormente, a terapia com dois ou mais agentes terapêuticos combinados tem uma eficácia superior relativamente às abordagens de monoterapia. Esta combinação reduz potencialmente a resistência à terapêutica e fornece benefícios terapêuticos sobre o cancro, tais como uma redução no crescimento do tumor, a redução de populações de células estaminais cancerígenas e a indução da apoptose (84).

A combinação da fenformina e oxamato/dicloroacetato (DCA) é uma terapia promissora. Neste contexto, a fenformina induz a apoptose e inibe a proliferação celular em condições restritivas de glucose pela inibição do complexo I na mitocôndria, o aumento da produção de espécies ROS e diminui a ativação da fosforilação oxidativa (OXPHOS) (85). O DCA ou o oxamato inibem a atividade da enzima desidrogenase láctica (LDH), diminuindo a glicólise e a produção de lactato pelas células, produzindo a ativação da OXPHOS e conseqüente produção de ATP. Esta junção leva à indução da apoptose, redução do crescimento do tumor e morte celular (91,92,93). O DCA é um inibidor da enzima piruvato desidrogenase quinase (PDK), que diminui a acidose láctica induzida pelas biguanidas, potencializando os efeitos da fenformina na indução da morte celular e prolongando o tempo de sobrevivência (88).

2. Objetivos

A presente monografia tem como principal objetivo abordar a fenformina como potencial terapêutica no melanoma. Pretende-se elaborar uma revisão sistemática, evidenciando, numa primeira fase, o possível uso da fenformina nesta patologia. Dar-se-á ênfase ao mecanismo de ação envolvido bem como a possíveis resultados terapêuticos. Se possível, comparar-se-á os resultados obtidos com outros fármacos da classe das biguanidas, bem como com o uso deste fármaco noutros tipos de cancro.

3. Metodologia

3.1. Formulação da questão de investigação

Para o desenvolvimento desta revisão sistemática, foi inicialmente definida a questão de investigação. Deste modo, com o intuito de especificar as características dos estudos a incluir na amostra e a estruturar a questão de investigação, utilizou-se uma adaptação da metodologia PICO (Tabela 3.1).

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

P	Population	Linhas celulares de melanoma humano e de murganho; pacientes;
I	Intervention	Tratamento com fenformina (isolada ou em combinação terapêutica);
C	<i>Comparison</i>	Comparação com os respetivos controlos (não tratados e/ou outros fármacos);
O	Outcome	Sucesso no tratamento do melanoma; mecanismo de ação anticancerígena.

Com base no anteriormente descrito, esta revisão sistemática prende-se com a seguinte questão de investigação: “Qual o potencial terapêutico da fenformina no melanoma?”.

3.2. Elaboração do protocolo de investigação

3.2.1. Definição dos termos de pesquisa e bases de dados

Para a realização deste trabalho procedeu-se à análise de artigos obtidos através das bases de dados *PubMed*, *B-On*, *Cochrane Library*, *ScienceDirect*, *Scielo*, *RCAAP* (Repositório Científico de Acesso Aberto em Portugal), *Open Grey* e *Web of Science*. No que diz respeito à pesquisa de ensaios clínicos, recorreu-se à base de dados *ClinicalTrials.gov*. A pesquisa foi efetuada recorrendo aos termos “*melanoma AND Phenformin*”; “*melanoma ANDbiguanides*”; “*skin cancer AND phenformin*”.

3.2.2. Critérios de inclusão e exclusão

De forma a limitar temporalmente o nosso estudo, foram incluídos artigos a partir de 2001 publicados nos idiomas Inglês ou Português. Foram considerados artigos cujas populações-alvo sejam constituídas por humanos, animais, e ainda, culturas celulares. Excluiu-se artigos de revisão, artigos aos quais o seu acesso completo não fosse autorizado e artigos que, após a sua leitura, se tenham evidenciado irrelevantes para o tema em questão.

3.2.3. Pesquisa de Literatura

A pesquisa de informação para a realização do presente trabalho foi realizada entre os dias 14 e 28 de Agosto de 2020, nas bases de dados indicadas, utilizando os termos de pesquisa em Inglês e Português.

3.2.4. Seleção dos estudos

A seleção dos artigos a incluir nesta revisão sistemática foi realizada com base nas etapas abaixo mencionadas:

1. Eliminação dos artigos duplicados;
2. Avaliação dos títulos e resumos, com vista a remover os estudos não relacionados com o tópico em questão;
3. Avaliação da concordância entre os critérios de inclusão e os artigos selecionados;
4. Aquisição dos textos completos dos artigos selecionados;
5. Organização dos estudos anteriormente selecionados e, posterior extração de dados.

3.2.5. Extração e síntese dos dados

Para a extração dos dados dos estudos que integram esta revisão, os mesmos foram reunidos e tratados, procedendo-se à análise descritiva de cada estudo. Assim, destacou-se informação detalhada como o ano de publicação, autor, objetivo de estudo, dimensão e tipo de amostra, os principais métodos utilizados e os resultados obtidos. Na Figura 3.1 encontra-se representado o processo metodológico.

Questão de investigação: Qual o potencial terapêutico da Fenformina no melanoma?

Metodologia:

Base de dados: *PubMed, B-On, Cochrane Library, ScienceDirect, ClinicalTrials.gov, Scielo, RCAAP, Open Grey, Web of Science;*

Termos de pesquisa: *melanoma AND phenformin; melanoma AND biguanides; skin cancer AND phenformin.*

Critérios de inclusão:

- Estudos publicados a partir de 2001 em Inglês e Português;
- Estudos realizados em humanos e animais, incluindo os trabalhos realizados em culturas celulares;
- Considerados apenas os artigos aos quais o seu acesso completo fosse autorizado;

Critérios de exclusão:

- Artigos de revisão;
- Artigos que, após a sua leitura, se tenham evidenciado irrelevantes para o tema em questão.

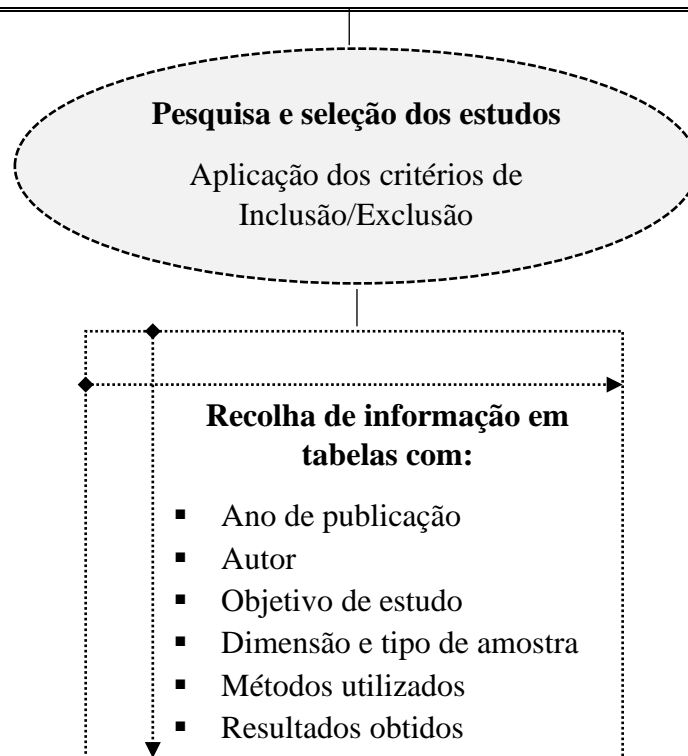


Figura 3.1 Resumo do processo da metodologia.

4. Resultados

Da pesquisa inicial resultaram 48 artigos em Inglês, não tendo sido obtidas quaisquer publicações em Português (Tabela 4.1.).

Tabela 4.1. Estudos encontrados nas bases de dados referenciadas.

Base de dados	Nº de estudos encontrados
PubMed	22
B-On	15
ScienceDirect	7
ClinicalTrials.gov	1
Web of Science	3
Cochrane Library	0
Scielo	0
RCAAP	0
Open Grey	0
	Total = 48

4.1. Seleção dos estudos

Após a recolha dos estudos obtidos, e a partir do cruzamento das diferentes bases de dados, alguns encontravam-se em duplicado.

Dos 48 artigos pré-selecionados, foram excluídos 8 artigos que estavam em duplicado nas bases de dados selecionadas. Dos restantes, 32 foram excluídos depois de aplicados os critérios de exclusão, sendo que 21 foram considerados irrelevantes para a revisão sistemática em questão, 11 tratavam-se de artigos de revisão e 1 por ser um ensaio clínico que ainda não apresentava resultados. É de notar que os artigos cujo acesso na íntegra não era permitido, foram automaticamente excluídos e por isso não foram contabilizados. Desta forma, a amostra desta revisão sistemática é constituída por 7 artigos (Figura 4.1).

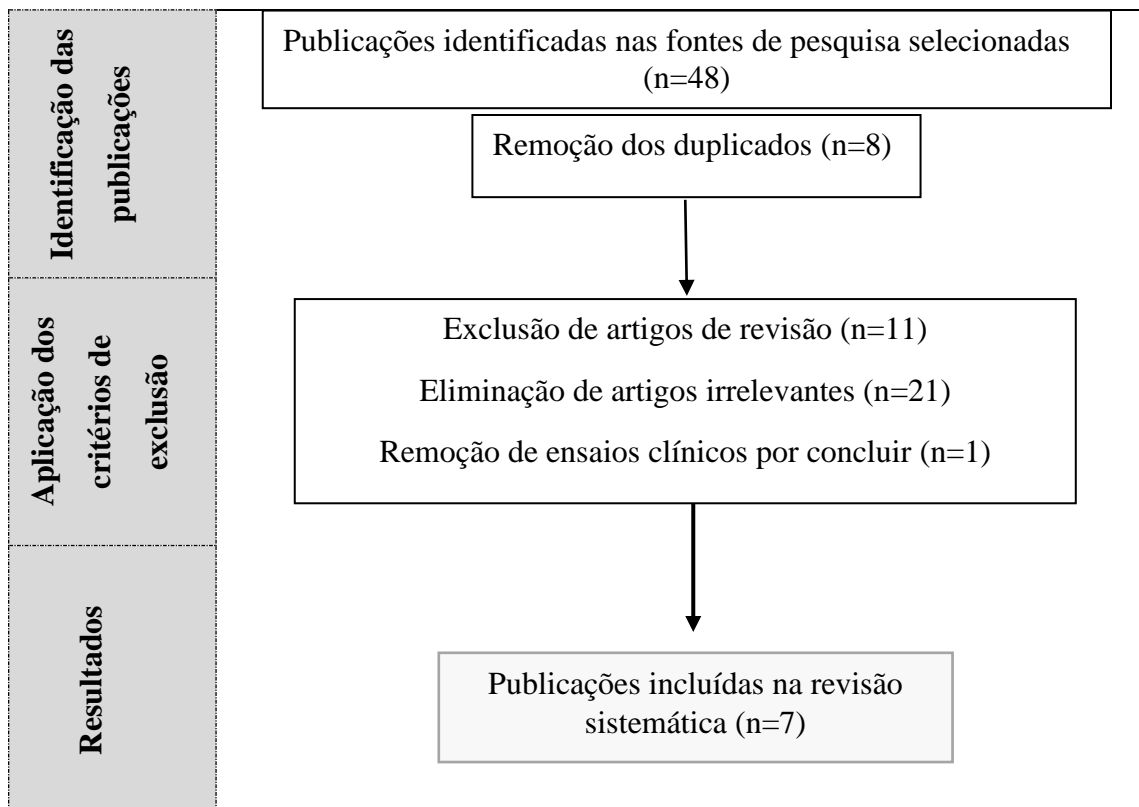


Figura 4.1 Diagrama de seleção dos estudos.

4.1.1. Artigos Irrelevantes

Quando aplicados os critérios de exclusão, foram excluídos da amostra 21 estudos, essencialmente por não se focarem na utilização da fenformina ou por não estarem relacionados com a abordagem do melanoma, embora incidisse no fármaco em estudo. Foi também excluído um estudo por não ser permitido o seu acesso integral e um ensaio clínico que se não se encontrava concluído até à data. Na Tabela A1 (em anexo) encontram-se detalhadas as publicações e as respetivas justificações que ditaram a sua exclusão.

4.1.2. Artigos de Revisão

Na seleção dos artigos foram excluídas 11 publicações uma vez que eram artigos de revisão, embora constituam material de estudo com relevância para o tema. Na Tabela A2 (em anexo) estão descritas as características dos artigos de revisão encontrados.

4.1.3. Características dos estudos incluídos

Foram incluídos 7 estudos na revisão sistemática que preenchiam todos os critérios de inclusão. Na Tabela 4.2 encontram-se descritas as suas características, bem como o objetivo principal de cada estudo, ordenados por ano de publicação.

Tabela 4.2. Características dos estudos selecionados.

Título	Revista (ano)	Autor	Objetivos	Referência
AMPK activators inhibit the proliferation of human melanomas bearing the activated MAPK pathway	Melanoma Research (2012)	Petti <i>et al.</i>	Avaliação dos efeitos antitumorais no melanoma aquando da reativação farmacológica da função AMPK.	(89)
Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF ^(V600E) inhibition in melanoma	PNAS (2013)	Yuan <i>et al.</i>	Avaliação dos efeitos antitumorais no uso da combinação da fenformina com o inibidor BRAF PLX4720 no melanoma.	(90)
Therapeutic potential of the metabolic modulator phenformin in targeting the stem cell compartment in melanoma	Oncotarget (2016)	Petrachi <i>et al.</i>	Avaliação da capacidade da fenformina atingir o compartimento de células estaminais no melanoma.	(91)

Tabela 4.2. Características dos estudos selecionados (continuação).

<i>Título</i>	<i>Revista (ano)</i>	<i>Autor</i>	<i>Objetivos</i>	<i>Referência</i>
Phenformin Inhibits Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Anti-Tumor Activity of PD-1 Blockade in Melanoma	Journal of Investigation Dermatology (2017)	Kim <i>et al.</i>	Estudo dos potenciais efeitos no microambiente tumoral, quando usados os antidiabéticos orais metformina e fenformina.	(92)
Phenformin Enhances the Efficacy of ERK Inhibition in NF1-Mutant Melanoma	Journal of Investigation Dermatology (2017)	Trousil <i>et al.</i>	Avaliação da combinação do inibidor ERK SCH772984 e a biguanida fenformina para a inativação do supressor de tumor neurofibromina 1 (NF1).	(93)
Calcium-Dependent Enhancement by Extracellular Acidity of the Cytotoxicity of Mitochondrial Inhibitors against Melanoma	Molecular Cancer Therapeutics (2017)	Noguchi <i>et al.</i>	Estudo do efeito citotóxico do pH e dos inibidores mitocondriais contra as células cancerígenas.	(94)
The antitumor properties of metformin and phenformin reflect their ability to inhibit the actions of differentiated embryo chondrocyte 1	Cancer Management and Research (2019)	Kuo <i>et al.</i>	Estudo dos efeitos da metformina e da fenformina na expressão de DEC1 em células de carcinoma cervical humano e melanoma.	(95)

4.1.4. Distribuição temporal das publicações

Nesta revisão foram incluídos 7 artigos publicados entre os anos de 2013 e 2020, sendo que 3 deles foram publicados em 2017. Dos 11 artigos de revisão excluídos (Tabela A2), 6 deles foram publicados entre os anos de 2017 e 2020.

Na Figura 4.2. são apresentadas graficamente as duas distribuições temporais, destacando-se o ano 2017 com o maior número de publicações relativas à temática, tanto nos artigos originais (n=3) como nos artigos de revisão (n=3).

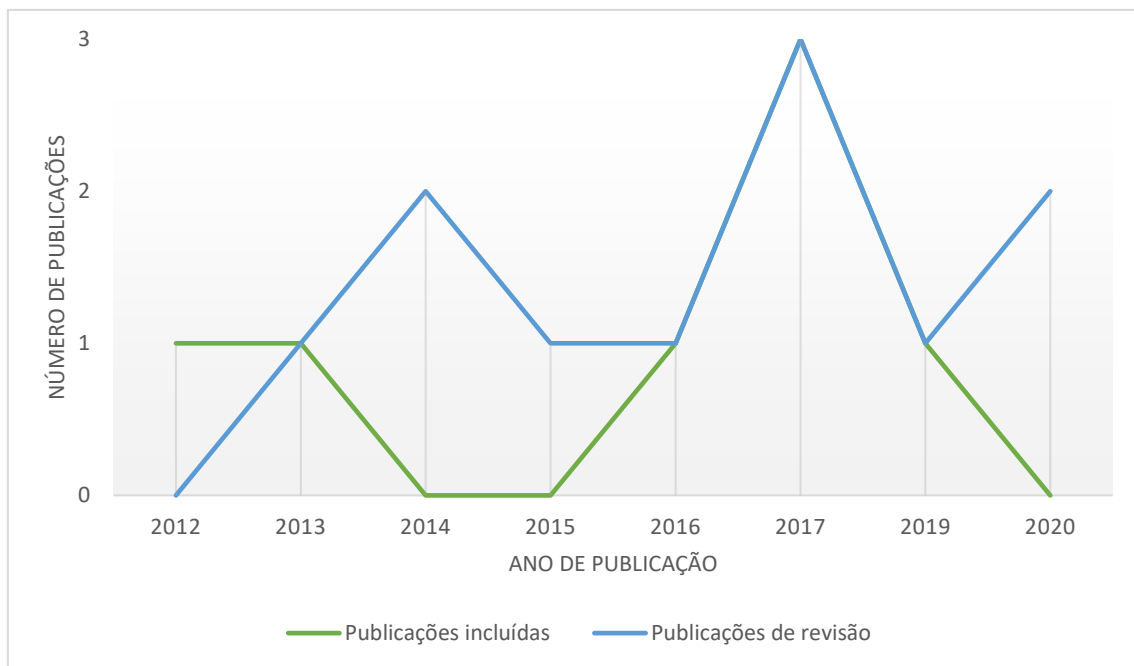


Figura 4.2. Distribuição temporal das publicações incluídas e de revisão.

4.2. Tipo de amostra utilizada

Nos diferentes estudos recolhidos, são usados vários tipos de amostras tais como culturas celulares injetadas em murganhos, células e linhas celulares humanas e, linhas celulares de murganho.

4.2.1. Culturas celulares em modelos de murganho

Dos estudos incluídos na revisão, dois destes analisaram o efeito da fenformina na proliferação celular e apoptose, assim como o seu efeito na expressão de diferentes proteínas importantes, como a AMPK, uma vez que a fenformina induz a sua ativação através da inibição do complexo I da cadeia mitocondrial, tendo um papel crucial na inibição da proliferação celular (106, 108).

O estudo realizado por Yuan *et al.* (2013) incide nesta análise estudando diferentes células de melanoma e a combinação da fenformina com o inibidor BRAF (iBRAF) PLX4720, de modo a avaliar o crescimento de colónias resistentes *in vitro*. Investigou também os efeitos da combinação fenformina/iBRAF no crescimento do tumor *in vivo*, implantando células de melanoma humana Colo829 em modelos de murganhos fêmea com 6 semanas de idade (90).

No estudo realizado por Kim *et al.* (2017) foram usados murganhos fêmea com 6 semanas de idade. Estes animais foram injetados, via subcutânea, no flanco lateral direito com células de melanoma de murganho BP01 que foram originalmente derivadas de células de melanoma de murganho com mutação BRAFV600E/PTEN. Este estudo pretendia avaliar o efeito da fenformina nas células supressoras derivadas da linhagem mielóide granulocítica (G-MDSCs), pela sua potente atividade imunossupressora, e ainda, estudar o potencial efeito da combinação terapêutica da fenformina com um anticorpo anti-PD1, no ambiente tumoral. (92).

Tabela 4.3. Culturas celulares em modelos de murganhos usados nos estudos analisados.

<i>Células de melanoma</i>	<i>O que avalia</i>	<i>Referência</i>
A375 Colo829	Proliferação e crescimento de células cancerígenas	(90)
Células de melanoma de murganhos BP01	Efeito da fenformina e da combinação com um anticorpo anti-PD1 no microambiente tumoral	(92)

4.2.2. Células e linhas celulares humanas

Células e linhas celulares estabelecidas foram usadas em cultura num total de 5 publicações incluídas nesta revisão. Regra geral, estas têm como objetivo analisar o efeito antitumoral nas células cancerígenas, por consequência da diminuição da proliferação celular. Nestes estudos, é avaliado o efeito da terapêutica na inibição do ciclo celular, bem como o efeito antitumoral do uso combinado da fenformina com outras terapias. Na Tabela 4.4 é detalhado o tipo de células usadas em cada estudo, assim como o objetivo do mesmo.

Além das linhas celulares A375, BTC#2, WM115, Mewo, SK-MEL-28, e A2058, o estudo retratado por Petti *et al.* (2012) utilizou células obtidas dos tumores primários de diversos pacientes, com melanoma recorrente e metastático (89).

Tabela 4.4. Células e linhas celulares humanas usadas nos estudos analisados.

<i>Células de melanoma</i>	<i>O que avalia</i>	<i>Referência</i>
Me1402R ^C Me10538P Me4405P Me20842P Me8959M Me2211M Me1402M Me1402P ^C Me 18656	Efeito antitumoral na reativação da AMPK	(89)
A375 BTC#2	Inibição de apoptose e ciclo celular	(91)
WM115	Ciclo celular e indução da apoptose	(93)

Tabela 4.4. Células e linhas celulares humanas usadas nos estudos analisados (continuação).

Células de melanoma	O que avalia	Referência
Mewo SK-MEL-28 A375	Processo de apoptose celular	(94)
A2058	Crescimento tumoral	(95)

4.2.3. Linhas celulares de origem murina

Nesta revisão sistemática houve uma publicação que usou células de melanoma de murganhos (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Células e linhas celulares de murganho usadas nos estudos analisados.

<i>Células de melanoma</i>	<i>O que avalia</i>	<i>Referência</i>
B16F10	Apoptose celular	(94)

4.3. Fenformina no melanoma

Nesta revisão foi possível descrever algumas ações anticancerígenas induzidas pela biguanida fenformina, tais como o efeito antiproliferativo, a indução da apoptose, levando à autodestruição das próprias células do melanoma, e, também, a interrupção do ciclo celular das diferentes células do melanoma.

4.3.1. Efeitos na proliferação

Nesta revisão sistemática foi observado o efeito antiproliferativo induzido pela fenformina em duas publicações que usaram linhas celulares SK-MEL-28 e A375 de melanoma mutante BRAFV600E humanas, células de melanoma primário BTC#2 (91),

células de melanoma (A2058) (95). Na Tabela 4.6, são detalhadas as concentrações utilizadas e resultados dos estudos.

Verificou-se o efeito da fenformina na inibição da proliferação celular, através da análise da viabilidade celular, quando as células foram expostas a concentrações de fenformina (0,1mM – 1mM) ao longo de 72 horas, sendo que esses efeitos aumentaram de forma considerável com a concentração de fenformina e o tempo de exposição ao fármaco (91).

Tabela 4.6. Resultados da ação da Fenformina na proliferação celular.

<i>Linhas Celulares</i>	<i>Concentrações utilizadas</i>	<i>Duração do tratamento</i>	<i>Resultados</i>	<i>Ref.</i>
A375	0,1mM, 0,5mM, 1mM	72 horas	Inibição máxima da proliferação em cerca de 21%, 32% e 45%.	(91)
Células de melanoma primário BTC#2	0,1mM, 0,5mM, 1mM		Inibição máxima da proliferação em cerca de 15%, 38% e 84%.	
SK-MEL-28	0,1mM, 0,5mM, 1mM		Inibição máxima da proliferação em cerca de 93%, 93% e 90%.	
A2058	5 μ M	10 dias	Inibição máxima da proliferação em cerca de 80%.	(95)
	10 μ M			
	20 μ M			

Muitos estudos têm abordado a ação inibitória da fenformina sobre alguns aspetos da carcinogénese, entre eles a proliferação celular, a migração das células cancerígenas e a indução da apoptose. Para sustentar estes factos, o autor do estudo (95) avaliou os efeitos antitumorais da fenformina na formação de colónias em células de melanoma A2058 e, observou que a fenformina, em concentrações mais elevadas, suprime a proliferação das células cancerígenas, inibindo assim o crescimento do tumor.

4.3.2. Indução da apoptose

A indução da apoptose é outro mecanismo de ação antitumoral, sendo a fenformina também usada em diferentes ensaios. Este foi realizado usando as linhas celulares de melanoma humano MEWO, SK-MEL-28 e A375(94).

De forma a perceber se a citotoxicidade dos inibidores mitocondriais nas células de melanoma é afetada pelo pH extracelular *in vitro*, Noguchi *et al.* (2017) observou o comportamento das células de melanoma humano em pH 7,4 ou 6,7, tratadas com oligomicina (0,01 mg/mL), um inibidor da ATP sintase mitocondrial, ou fenformina (1 mM), inibidor do complexo I da cadeia mitocondrial. Ao passo que existia um número residual de células apoptóticas no meio de cultura em que as células foram cultivadas com os fármacos a pH 7,4 ou a pH ácido sem os fármacos, observou-se um aumento no número de células apoptóticas quando as células foram cultivadas com oligomicina ou fenformina a pH ácido. Estes dados indicam que a acidez extracelular aumenta o efeito inibitório da fosforilação oxidativa em células de melanoma *in vitro*, induzindo a apoptose (94).

Na Tabela 4.7, são detalhadas as concentrações utilizadas e resultados dos estudos.

Tabela 4.7. Resultados da ação da Fenformina e da Oligomicina na indução da apoptose, a pH ácido.

<i>Inibidores mitocondriais</i>	<i>Linhas Celulares</i>	<i>Concentrações utilizadas</i>	<i>Duração do tratamento</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
Fenformina	MEWO	1 mM	48 horas	Aumento de 17% do número de células apoptóticas	(94)
Oligomicina		0,01 µg/ml		Aumento de 28% do número de células apoptóticas	
Fenformina	SK-MEL-28	1 mM	72 horas	Aumento de 20% do número de células apoptóticas	
Oligomicina		0,01 µg/ml		Aumento de 40% do número de células apoptóticas	
Fenformina	A375	1 mM	72 horas	Aumento de 33% do número de células apoptóticas	
Oligomicina		0,01 µg/ml		Aumento de 45% do número de células apoptóticas	

De forma a verificar se o comportamento anteriormente observado se reproduzia em células ditas saudáveis, foram utilizados também fibroblastos dérmicos humanos, retirados do couro cabeludo de uma paciente com 14 anos de idade. Foram sujeitos a concentrações de fenformina de 1 mM, durante 72 horas e comparados ao grupo controlo (sem tratamento), em pH ácido e básico. Foi observado um aumento do número de células apoptóticas na ordem dos 95%, no grupo tratado com fenformina, em pH ácido, o que sustenta a sensibilidade à fenformina em pH ácido, tanto em células normais como malignas (94).

4.3.3. Paragem do ciclo celular

A interrupção do ciclo celular é outra ação anticancerígena que pode ser observada após administração da fenformina. Na revisão são incluídos dois estudos onde é avaliada a progressão do ciclo celular, utilizando células provenientes de melanoma obtidos de pacientes (89), ou células de melanoma (A2058) (95). Na Tabela 4.8. estão detalhados os efeitos provocados pela fenformina.

No estudo realizado por Petti *et al.* (2012), foram utilizadas células provenientes de nove tumores, portadoras da mutação BRAF ou NRAS. Estas células foram tratadas com 1mM de fenformina ou AICAR (ribonucleótido 5-aminoimidazol-4-carboxamida), um ativador da AMPK, durante 8 dias. Das nove células testadas, cinco delas revelaram uma acumulação de células na fase G0/G1 do ciclo celular e, quatro uma acumulação de células na fase S do ciclo celular. Aparentemente, estes dois tipos de interrupção do ciclo celular não estão relacionados às mutações BRAF ou NRAS (89). Na tabela abaixo estão especificados os resultados de duas dessas células.

Tabela 4.8. Resultados da ação da Fenformina na paragem do ciclo celular. (Me-1: Me1402Rc, Me-3: Me4405P)

<i>Linhas Celulares</i>	<i>Concentrações utilizadas</i>	<i>Duração do tratamento</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
(Me-1) células de melanoma BRAFV600E	1 mM	8 dias	Acumulação de 71,26% das células na fase S do ciclo celular, com perda quase completa da fase G2/M.	(89)
(Me-3) células de melanoma NRASQ61R			Acumulação de 61,54% das células na fase G0/G1.	

Utilizando células de melanoma com mutação BRAF (Me-1) ou NRAS (Me-3), este estudo permitiu-nos avaliar a importância da fenformina no controlo da proliferação celular, uma vez que a presença de mutações conduz à ativação aumentada da via AMPK, promovendo a divisão celular e o crescimento descontrolado do tumor. A fenformina revelou resultados satisfatório na paragem do ciclo celular e consequente inibição da proliferação do tumor (89).

Neste último estudo, desenvolvido por Kuo *et al.* (2019), verificou-se uma diminuição de cerca de 75% nas populações G1, e de 60% nas populações G2/M do ciclo celular, nas células tratadas com fenformina, em comparação com células não tratadas. Estes dados sustentam a hipótese de que a fenformina pode induzir a paragem do ciclo celular, uma vez que a diminuição das populações nestas fases do ciclo, pode induzir paragem do crescimento celular, uma vez que a célula não completa o seu ciclo de crescimento e divisão celular (95).

Tabela 4.8. Resultados da ação da Fenformina na paragem do ciclo celular (continuação)

<i>Linhas Celulares</i>	<i>Concentrações utilizadas</i>	<i>Duração do tratamento</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
A2058	5 μ M	30 horas	Diminuição das populações G1 e G2/M, em cerca de 75% e 60%, respetivamente, com o aumento da concentração de fenformina	(95)
	10 μ M			
	20 μ M			

4.4. Combinação terapêutica

Além da ação terapêutica da fenformina em monoterapia, foram selecionadas duas publicações que analisam também a combinação terapêutica com outros fármacos. Estes podem potencializar os efeitos antiproliferativos, apoptóticos e indutores da paragem do ciclo celular.

Yuan et al (2013) realizou a combinação da fenformina com o inibidor de BRAF PLX4720 na proliferação de células de melanoma mutado em BRAF em modelos de murganhos (90). Com o seu estudo demonstrou que a fenformina, em combinação com o inibidor BRAF PLX4720, conduz a uma maior sensibilidade das células cancerígenas a esta terapêutica, uma vez que conduz a uma diminuição mais pronunciada na viabilidade celular, em comparação com o uso isolado dos mesmos (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Resultados da combinação terapêutica com Fenformina e iBRAF PLX4720.

<i>Linhas Celulares</i>	<i>Concentrações utilizadas (inibidor)</i>	<i>Duração do tratamento</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
A375 (controlo)	0.3 µM	7 semanas	20% de viabilidade celular.	(90)
	1 µM			
A375 (pré tratada com inibidor BRAF)	0.3 µM		Revelou uma menor sensibilidade ao inibidor, 40% de viabilidade celular.	
	1 µM			
A375 (pré tratada com inibidor BRAF e fenformina [0,03 mM])	0.3 µM		Maior sensibilidade ao inibidor, 8% de viabilidade celular.	
	1 µM			

Estes resultados sustentam a hipótese de que a combinação terapêutica da fenformina e de inibidores BRAF suprime o surgimento de resistências aos inibidores BRAF em células de melanoma com mutação BRAF V600E.

Trousil *et al.* (2017) desenvolveu outro estudo em que foi evidenciada a eficácia da combinação terapêutica. Este combinou o inibidor ERK (iERK) SCH772984 e a biguanida fenformina usando cultura de células WM115. Verificou-se que a combinação destes 2 fármacos levou a uma acumulação de população de células na fase subG1 (55%), em comparação com o uso isolado da fenformina (20%) ou do iERK (12%). Sendo que existe uma acumulação de células na fase subG1 do ciclo celular e consequente diminuição do seu número na fase S (fase de replicação), há uma inibição da proliferação das células cancerígenas (93) (Tabela 4.10).

Tabela 4.10. Resultados da combinação da Fenformina + inibidor ERK SCH772984.

<i>Combinação</i>	<i>Linhas Celulares</i>	<i>Concentrações utilizadas</i>	<i>Duração do tratamento</i>	<i>Resultados</i>	<i>Referência</i>
Fenformina com o inibidor ERK SCH772984	WM115	1mM de fenformina e 0,3µM de inibidor	48 horas	População de células apoptóticas aumenta significativamente e aumento da população de células sub-G1	(93)

4.5. Estudos *in vivo*

Dos sete estudos incluídos na revisão, quatro destes procederam a estudos *in vivo*. Estes incluíram células de melanoma (89), modelos de animais (murganhos) (90), células de melanoma de murganho BP01 (92) e células de melanoma de murganho B16F10 (94).

Num estudo realizado por Petti *et al.* (2012), foram selecionadas, pela sua capacidade de se desenvolverem em murganhos *nude*, células de cultura primária com mutação NRAS e injetadas num grupo de murganhos. Após 25 dias a serem tratados 5 vezes por semana com 100 mg/kg ou 400 mg/kg de AICAR (ativador de AMPK), não se verificou qualquer inibição significativa do crescimento do tumor, em relação ao grupo não tratado. Nas células de murganhos tratados com 400 mg/kg de AICAR, foi observado no último dia de tratamento atividade por parte da enzima β -galactosidase, o que indica que as células tratadas com AICAR desenvolveram senescência celular. Este processo é considerado um estado de suspensão permanente do ciclo celular, podendo ser bastante interessante no processo de supressão e progressão tumoral (96). No mesmo grupo, foi também observada uma expressão aumentada de p21, um regulador negativo do melanoma, e ainda, extensas áreas de tecidos necrosados (89).

Yuan et al (2013) realizou um estudo *in vivo*, cujo objetivo era analisar os efeitos da combinação da fenformina com o inibidor BRAF PLX4720 em células de melanoma com mutação BRAF. Primeiramente, as células de melanoma humano Colo829 eram injetadas num grupo de murganhos e, de seguida, uma vez o tumor atingindo um volume entre 80 e 100 mm³, eram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo seria o controlo, o segundo e terceiro grupo seriam expostos a concentrações de iBRAF PLX4720 de 20mg/kg e de fenformina de 100mg/kg, respetivamente. Havia ainda um último grupo onde os murganhos eram expostos à combinação terapêutica de fenformina/iBRAF. Ao fim de catorze dias de tratamento, apesar de ter existido uma progressão constante do tumor no grupo de controlo, observou-se uma redução significativa do tamanho do tumor, cerca de 84%, no grupo tratado com a combinação fenformina/iBRAF. No grupo de murganhos tratado com fenformina ou iBRAF em monoterapia, a inibição do crescimento do tumor não foi tão significativa (90).

O estudo de Kim *et al.* (2017) incidiu sobre a análise da inibição seletiva da fenformina em células supressoras da linhagem mieloide granulocíticas (G-MDSCs) em

células de melanoma de murganho BP01. Foram depois divididos em 3 grupos, em que foi administrado pela água, durante 10 dias, fenformina (100 mg/kg/dia), metformina (300 mg/kg/dia) ou água apenas (controle). Após este período, verificou-se uma inibição seletiva significativa das G-MDSCs no grupo tratado com fenformina. Uma vez que estas células têm uma elevada atividade imunossupressora, uma vez inibidas, irão levar a uma diminuição da proliferação celular e indução da apoptose, evitando a progressão do tumor (92).

Dados os efeitos inibitórios da fenformina sobre os imunossupressores G-MDSCs, o estudo anteriormente referido procurou saber se a fenformina poderia aumentar a eficácia do anticorpo anti-PD1 usando um modelo de murganho BRAF/PTEN geneticamente modificado. Para isso foram divididos em 4 grupos, o grupo controle, um segundo grupo onde apenas era administrado 100mg/kg/dia de fenformina, o terceiro grupo com a administração de 100µg/dose do anticorpo anti-PD1, e um último grupo com a combinação terapêutica da fenformina e do anticorpo anti-PD1. Verificou-se uma inibição significativa no crescimento do tumor, cerca de 53%, no grupo de murganhos que recebeu a combinação terapêutica, comparativamente com o uso isolado da fenformina (35%) e do anticorpo anti-PD1 (31%) (92).

Também Noguchi *et al.* (2017) procurou realizar estudos *in vivo*, para apoiar as suas ideias. Uma vez concluindo que a acidez extracelular aumentava o efeito inibitório da fosforilação oxidativa em células de melanoma *in vitro*, o autor quis perceber se o tamponamento alcalino com NaHCO₃ diminuiria a atividade antitumoral da fenformina, em células cancerígenas. Para isso, utilizou células de melanoma de murganho B16F10 que injetou em murganhos, sendo depois divididos em quatro grupos. Um grupo controle, sem tratamento, um segundo grupo onde foi administrado oralmente NaHCO₃ (200 mmol/L), um terceiro grupo onde foi administrada fenformina (100 mg/kg) e um quarto grupo onde os murganhos foram expostos à combinação de fenformina com NaHCO₃ (94).

Dezasseis dias depois, os resultados foram os seguintes: verificou-se uma inibição significativa do crescimento do tumor (90%) no grupo tratado com fenformina em comparação com o grupo controle; no grupo tratado com a combinação de fenformina com NaHCO₃, observou-se um aumento significativo do crescimento do tumor (33%) em comparação com o grupo tratado apenas com fenformina. No grupo de murganhos

tratado com fenformina e NaHCO_3 , verificou-se também um aumento das células proliferativas e uma diminuição das células apoptóticas. Também o número de metástases nos pulmões diminuiu no grupo de murganhos tratado com fenformina em comparação com o controlo e, aumentou no grupo tratado com fenformina e NaHCO_3 , comparativamente ao grupo de murganhos tratado apenas com a fenformina (94).

5. Discussão

Ainda que existam terapias orientadas para as mutações específicas do melanoma, a resistência adquirida à terapêutica tornou-se uma dificuldade para alcançar o sucesso dos tratamentos (69). No sentido de apoiar o potencial efeito da fenformina na terapêutica do melanoma, foram analisadas publicações, nesta revisão sistemática, que avaliam a utilização da fenformina no melanoma.

As publicações encontradas nas bases de dados são escassas, onde apenas sete artigos se tornaram relevantes para esta revisão, o que sugere que ainda não seja uma temática intensamente estudada. Não obstante, o auge de publicações remete-nos para o ano de 2017, dando a entender que este tenha sido um ano de maior relevância na investigação da aplicação desta biguanida no melanoma.

Nestes artigos, os autores usaram várias linhas celulares, ambas humanas e de murganhos. Destaca-se pelo seu uso frequente comparativamente a outras, A375, uma linha celular derivada de um melanoma em estadio I de uma mulher de 54 anos, com morfologia epitelióide (98). Tal situação pode justificar-se com o facto destas células representarem com maior precisão o perfil de transcrição do melanoma, existindo uma expressão semelhante da maioria dos genes, tanto na linha celular, como na própria patologia (99).

5.1. Efeitos na proliferação

A revisão sistemática incluiu dois estudos que evidenciam a ação antiproliferativa da fenformina, sendo utilizadas linhas celulares humanas SK-MEL-28 e A375 de melanoma mutante BRAFV600E, células de melanoma primário BTC#2 (91), e, células de melanoma (A2058) (95).

No estudo conduzido por Petrachi *et al.* (2016), observou-se uma redução significativa do número de células viáveis, ou seja, que estão metabolicamente ativas, nas células SK-MEL-28, A375 e BTC#2. Verificou-se que os efeitos antiproliferativos nestas células são intensificados de forma dose-dependente, atingindo o seu máximo quando expostas à concentração de fenformina máxima, 1mM, após 72 horas (91).

Estudos anteriores desenvolvidos por Tomic *et al.* (2011), procuraram avaliar o efeito de outro fármaco da classe das biguanidas, a metformina, na inibição da proliferação das células do melanoma. Foram utilizadas as mesmas duas linhas celulares que o estudo anterior, SK-MEL-28 e A375, expostas a concentrações de metformina de 1mM, 2,5mM, 5mM e 10mM, durante 72 horas. Obteve-se uma diminuição do número de células cancerígenas viáveis, de modo dose-dependente, tendo-se obtido uma inibição da proliferação mais acentuada quando a concentração de metformina foi de 10 mM (100). Estes dados sustentam os resultados alcançados no estudo anterior, uma vez que tanto a metformina como a fenformina mostraram resultados bastante satisfatórios na diminuição da proliferação de células cancerígenas. Verificou-se também que as concentrações de fenformina utilizadas são mais baixas que as de metformina, o que pode ser explicado pela porção hidrofóbica da fenformina, uma vez que é transportada com maior afinidade para o interior das células, sendo cineticamente mais rápida (101).

As células A2058 também foram expostas a concentrações de fenformina entre 5 μ M e 20 μ M, verificando-se uma ação inibitória da proliferação celular de modo dose-dependente, atingindo o seu máximo ao 10º dia (inibição de 80% da proliferação) (95).

5.2. Indução da apoptose

Estudos com linhas celulares de melanoma humano MEWO, SK-MEL-28 e A375, permitiram avaliar o efeito da fenformina na indução da apoptose, sendo essa análise avaliada pelo número de células apoptóticas. Verificou-se um aumento no número de células apoptóticas quando as células foram cultivadas com fenformina em pH ácido (94). Sabendo que a metastização de células cancerígenas para órgãos distantes constitui uma das principais causas de morte em pacientes com cancro, é importante percebermos a importância do pH extracelular (pH_e). Um estudo realizado com células de melanoma humano em grupos de murganhos, comprovou a existência de metástases pulmonares na presença de pH_e ácido, pelo que, podemos facilmente inferir que a acidez do meio extracelular promove a proliferação de células cancerígenas. O pH_e pode ser assim considerado um importante marcador da atividade tumoral (102). Na presença da fenformina, a acidez extracelular potencia o efeito citotóxico deste fármaco nas células do melanoma, induzindo a apoptose. Uma vez que o pH extracelular dos tumores sólidos

tende a ser mais ácido do que nos tecidos normais, poderá ser interessante a utilização da fenformina (94).

5.3. Paragem do ciclo celular

Sendo o cancro caracterizado pela extensa atividade do ciclo celular, isto conduz a uma proliferação descontrolada das células cancerígenas, promovendo o crescimento do tumor (103). Tornou-se então emergente o estudo de estratégias que tenham como objetivo uma indução da paragem do ciclo celular.

No estudo realizado por Petti *et al.* (2012), foram utilizadas células provenientes de nove tumores, portadoras da mutação BRAF ou NRAS. Verificou-se que após tratamento com fenformina ou AICAR, cinco destas células revelaram uma acumulação de células na fase G0/G1 do ciclo celular e, quatro uma acumulação de células na fase S do ciclo celular (89).

Também no estudo desenvolvido por Kuo *et al.* (2019), verificou-se uma diminuição de cerca de 75% nas populações G1, e de 60% nas populações G2/M do ciclo celular, nas células de melanoma A2058 tratadas com fenformina, em comparação com células não tratadas. Estes dados fomentam a hipótese de que a fenformina pode conduzir as células cancerígenas à apoptose, uma vez que a diminuição das populações nestas fases do ciclo celular, pode induzir paragem do crescimento celular (95).

O efeito indutor da fenformina na paragem do ciclo celular também foi estudado noutros tipos de cancro, como o cancro da mama. Linhas celulares de cancro da mama, MCF7, ZR-75-1, MDA-MB-231 e SUM1315, foram expostas a concentrações de fenformina de 1,1184 mM, 0,665 mM, 2,347 mM, e 1,885 mM, respetivamente. A acumulação de células na fase G1 do ciclo celular aumentou consideravelmente, com percentagens a rondar os 67,7%, 35,9%, 29,5% e 54,4%. Estes dados são consistentes com outro estudo realizado em células de cancro da mama, que demonstrou que a fenformina interrompeu o potencial da membrana mitocondrial, sendo este potencial fundamental para a cadeia respiratória gerar ATP e garantir a sobrevivência celular (104).

5.4. Combinação terapêutica

A combinação terapêutica da fenformina com o inibidor BRAF PLX4720 em células de melanoma com mutação BRAF em modelos de murganhos revelou uma diminuição significativa na viabilidade celular (8% de viabilidade celular), em comparação com o uso isolado do iBRAF (40% de viabilidade celular) (90).

A combinação de fenformina com o iERK SCH772984 testada em células WM115, demonstrou uma acumulação pronunciada de células na fase subG1 (55%), em comparação com o uso isolado da fenformina (20%) ou do iERK (12%), evidenciando assim uma inibição da proliferação das células cancerígenas (93).

Yuan et al. (2013) realizou também um estudo *in vivo*, onde analisou os efeitos da combinação da fenformina com o inibidor BRAF PLX4720 em células de melanoma com mutação BRAF. Observou-se uma redução significativa do tamanho do tumor, cerca de 84%, no grupo tratado com a combinação fenformina/iBRAF. No grupo de murganhos tratado com fenformina ou iBRAF em monoterapia, a inibição do crescimento do tumor não foi tão significativa (90).

Devido aos resultados promissores da combinação terapêutica da fenformina com outros fármacos nas células do melanoma, está a decorrer um ensaio clínico que combina a fenformina com um inibidor BRAF e MEK, em pacientes com melanoma com mutação BRAFV600E/K. O objetivo deste estudo será testar a segurança e eficácia da administração concomitante da fenformina com uma das três combinações terapêuticas de iBRAF/iMEK aprovadas atualmente pela FDA: Dabrafenib/Trametinib, Vemurafenib/Cobimetinib, ou Encorafenib/Binimetinib e, que fazem parte do tratamento standard em pacientes com melanoma metastático, com mutação BRAF. O ensaio clínico encontra-se neste momento na fase 1, a recrutar voluntários e, prevê-se que esteja concluído em Janeiro de 2023 (105).

No caso do melanoma, a fenformina reduz fortemente a viabilidade celular, o crescimento e a invasão das células do melanoma ao induzir a apoptose. Contudo, a combinação de fenformina com outros agentes de quimioterapia mostrou melhores resultados terapêuticos do que o uso de fenformina isoladamente uma vez que reduz potencialmente a resistência aos fármacos e fornece benefícios terapêuticos contra o

cancro, como o reduzido crescimento tumoral e potencial metastático, uma redução nas populações de células estaminais cancerígenas e a indução da apoptose (81).

6. Conclusão

Nos dias de hoje, há cada vez mais evidências do potencial da metformina, um antidiabético oral da classe das biguanidas globalmente prescrito na diabetes tipo II, pela sua atividade antitumoral, em vários tipos de cancros.

Contudo, através dos resultados obtidos nesta revisão sistemática, também a fenformina, um fármaco da mesma classe da metformina, mostrou atividade promissora na sua aplicação terapêutica no melanoma.

De entre todos os artigos analisados e incluídos nesta revisão, apesar de não constituírem uma amostra muito extensa, verificou-se um auge de publicações no ano de 2017.

Dos vários estudos realizados, *in vitro* e *in vivo*, os principais efeitos da fenformina incidem sobre a inibição da proliferação celular, a paragem do ciclo celular e a indução da apoptose.

Parece ser de bastante interesse a combinação terapêutica da fenformina com inibidores BRAF, inibidores MEK e inibidores de PD-1, uma vez que é potenciado o efeito citotóxico da fenformina nas células do melanoma, em comparação com o uso isolado dos mesmos.

Uma vez sendo a fenformina considerada mais potente que a metformina na inibição da proliferação celular e do crescimento do tumor, poderia ser considerada um agente antitumoral com bastante interesse. O facto de estar associada a um aumento da acidose láctica levou a que deixasse de ser utilizada como antidiabético oral, daí talvez o seu efeito no cancro ter sido pouco estudado. No entanto, com doses e efeitos ajustados, a fenformina parece ter potencial para ser usada como agente antitumoral no melanoma.

7. Referências Bibliográficas

1. 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;49(6):1374–403.
2. Miller AJ, Mihm MC. Mechanisms of disease Melanoma. *N Engl J Med*. 2006;355(1):51–65.
3. World Cancer Research Fund. Diet , nutrition , physical activity and skin cancer. *Expert Rep*. 2018;
4. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE, Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Co Biol Ltd*. 2015;142(7):620–32.
5. Bandarchi B, Ma L, Navab R, Seth A, Rasty G. From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract*. 2010;1–8.
6. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Dermatologii i Alergol*. 2013;30:30–41.
7. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. Melanoma : Epidemiology , Risk Factors , Pathogenesis , Diagnosis and Classification. In *Vivo (Brooklyn)*. 2014;28:1005–12.
8. Medical C, Accreditation E, Nursing C, Accreditation E, Disclosures A, Continuing ACS, et al. Recent Developments in the Medical and Surgical Treatment of Melanoma Recent Developments in the Medical and Surgical Treatment of Melanoma. *A cancer J Clin*. 2014;64(3):171–85.
9. Ali Z, Yousaf N, Larkin J. Melanoma epidemiology , biology and prognosis. *EJC Suppl*. 2013;11:81–91.
10. Michielin O, Akkooi ACJ Van, Ascierto PA, Dummer R, Keilholz U, Committee G. Cutaneous melanoma : ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis , treatment and follow-up. *Cancer-related Cogn Impair*. 2019;30(5):1884–901.
11. Ward WH, Lambreton F, Goel N, et al. Clinical Presentation and Staging of Melanoma. Ward WH, Farma JM, editors. 2017; 6:1-16.
12. Pitcovski J, Shahar E, Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017;115:36–49.
13. Clark H, From L, Bernardino E, Mihm MC. The histogenesis and biologic The Histogenesis Malignant and Biologic Behavior of Primary Human Melanomas of the Skin. *Cancer resear*. 1969;29:705–27.
14. Simões MCF, Sousa JJS, Pais AACC. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Lett*. 2015;357:8–42.

15. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline. *Eur J Cancer*. 2016;63:201–17.
16. Ashfaq A, Marghoob, MD; Vitaly Terushkin, BS; Stephen W. Dusza D et al. Dermatologists, General Practitioners, and the Best Method to Biopsy Suspect Melanocytic Neoplasms. *ARCH Dermatology*. 2010;146(3):325–8.
17. Li J, Zhang Y, Tao J. Targeted Nanoparticles for Drug Delivery to Melanoma: From Bench to Bedside. *Nanosci Dermatology*. 2016;16:203–15.
18. Salama AKS, Force J. First-line treatment of metastatic melanoma: role of nivolumab. *ImmunoTargets Ther*. 2017;6:1–10.
19. Daniel DaviSchulz N, Hasmin P. Systemic Therapies for Late-stage Melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016;9(10):36–40.
20. Chen J, Zhang XD. Nanodelivery of Anticancer Agents in Melanoma: Encouraging, But a Long Way to Go. *Nanosci Dermatology*. 2016;15:189–201.
21. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26:126–32.
22. Bomar L, Senithilnathan A, Ahn C. Systemic Therapies for Advanced Melanoma. *Dermatol Clin*. 2019;37(4):409–23.
23. Michielin O, Hoeller C. Gaining momentum : New options and opportunities for the treatment of advanced melanoma. *Cancer Treat Rev*. 2015;41(8):660–70.
24. Gomes F. Tratamento do melanoma maligno cutâneo. Universidade do Porto; 2012.
25. Jason J. Luke MD, Gary K. Schwartz M. Chemotherapy in the Management of Advanced Cutaneous Malignant Melanoma. *Clin Dermatol*. 2008;23(1):1–7.
26. Wellbrock C, Hurlstone A. BRAF as therapeutic target in melanoma. *Biochem Pharmacol*. 2010;80(5):561–7.
27. Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene*. 2003;22(29):4578–80.
28. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9(2):180–6.
29. Tang KT, Lee CH. BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma: Pathogenic Role and Clinical Implications. *J Chinese Med Assoc*. 2010;73(3):113–28.
30. Inamdar GS, Madhunapantula S V. Targeting the MAPK Pathway in Melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol*. 2011;80(5):624–37.

31. Nucera C, Goldfarb M, Hodin R, Parangi S. Role of B-RafV600E in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-RafV600E. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2009;1795(2):152–61.
32. Greaves WO, Verma S, Patel KP, Davies MA, Barkoh BA, Galbincea JM, et al. Frequency and spectrum of BRAF mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. *J Mol Diagnostics*. 2013;15(2):220–6.
33. Cheng L, Lopez-Beltran A, Massari F, MacLennan GT, Montironi R. Molecular testing for BRAF mutations to inform melanoma treatment decisions: A move toward precision medicine. *Mod Pathol*. 2018;31:24–38.
34. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417:949–54.
35. EMA. Anexo I - Resumo das Características do Medicamento - dabigatran. 2010;1–29.
36. Metoxiflurano P. Relatório público de avaliação. 2020;1–18.
37. Passos MJ. Imunoterapia e Melanoma Avançado. 1st Editio. Silva M, editor. Intergrupo Português de Melanoma; 2013. 246-259 p.
38. European Medicines Agency. Cotellic [Internet]. 2015. p. 1–3. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/cotellic-epar-summary-public_pt.pdf
39. Rodrigues AS, Brinca A. Treatment of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma: Immunotherapy or Target Therapy? *J Port Soc Dermatology Venereol*. 2021;79(2):103–11.
40. Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *Int J Mol Sci*. 2020;21:1–21.
41. Manzano JL, Layos L, Bugés C, Gil MDLL, Vila L, Martínez-cardús A. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann Transl Med*. 2016;4(12):1–9.
42. Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long G V. ScienceDirect Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma : Where to next ? *Eur J Cancer*. 2016;62:76–85.
43. Aplin AE, Kaplan FM, Shao Y. Mechanisms of Resistance to RAF Inhibitors in Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2011;131(9):1817–20.
44. Mek C, Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-kalabis M, et al. Article Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome. *Cancer Cell*. 2010;18(6):683–95.
45. Terheyden P, Krackhardt A, Eigentler T. The Systemic Treatment of Melanoma- the place of immune checkpoint inhibitors and the suppression of intracellular signal transduction. *Dtsch Arztebl Int* 2019. 2019;116:497–504.

46. Stones CJ, Kim JE, Joseph WR, Leung E, Marshall ES, Finlay GJ, et al. Comparison of responses of human melanoma cell lines to MEK and BRAF inhibitors. *Front Genet.* 2013;4:1–6.
47. Achkar T, Tarhini AA. The use of immunotherapy in the treatment of melanoma Ahmed Tarhini; Timothy Burns; Rahul Parikh; Guarvel Goel; Annie im. *J Hematol Oncol.* 2017;10:1–9.
48. Chen J, Shao R, Zhang XD, Chen C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *Int J Nanomedicine.* 2013;8:2677–88.
49. Clarke C, Cormack G, Kisman D, Lynam T. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):3252–8.
50. Franklin C, Livingstone E, Roesch A, Schilling B. Immunotherapy in melanoma : Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43(3):604–11.
51. European Medicines Agency. Eylea (afibercept) - Um resumo sobre Eylea e porque está autorizado na UE. 2018;31:1–4.
52. BMS. U.S. Food and Drug Administration Expands Approval of Yervoy® (ipilimumab) to Include Pediatric Patients 12 Years and Older with Unresectable or Metastatic Melanoma [Internet]. 2017 [cited 2021 Jul 26]. Available from: <https://news.bms.com/news/details/2017/US-Food-and-Drug-Administration-Expands-Approval-of-Yervoy-ipilimumab-to-Include-Pediatric-Patients-12-Years-and-Older-with-Unresectable-or-Metastatic-Melanoma/default.aspx>
53. Ph D, Ariyan CE, Ph D, Gordon R, Agunwamba BU, Zhang X, et al. Safety and clinical activity of combined PD-1 (nivolumab) and CTLA-4 (ipilimumab) blockade in advanced melanoma patients. *N Engl J Med.* 2017;369(2):122–33.
54. Hodi FS, Chiarion-sileni V, Gonzalez R, Grob J, Rutkowski P, Cowey CL, et al. Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre , randomised , phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018;1–13.
55. Smith FO, Downey SG, Klapper JA, Yang JC, Richard M, Royal RE, et al. Treatment of Metastatic Melanoma Using Interleukin-2 Alone or in Conjunction with Vaccines. *Clin Cancer Res.* 2009;14(17):5610–8.
56. Jiang T, Zhou C, Ren S. Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2016;5(6):1–10.
57. Wieczorek M, Abualrous ET, Sticht J, Álvaro-Benito M, Stolzenberg S, Noé F, et al. Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation. *Front Immunol.* 2017;8(292):1–16.
58. Bikfalvi A. Angiogenesis. *Encycl Endocr Dis.* 2004;1:227–33.
59. Di Trollo R, Simeone E, Di Lorenzo G, Buonerba C, Ascierto PA. The use of

- interferon in melanoma patients: A systematic review. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(2):203–12.
60. Conry RM, Westbrook B, McKee S, Norwood TG. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Hum Vaccines Immunother.* 2018;14(4):839–46.
 61. Garnock-jones KP. Talimogene Laherparepvec : A Review in Unresectable Metastatic Melanoma. *BioDrugs.* 2016;1–8.
 62. Cao G, He X, Sun Q, Chen S, Wan K, Xu X. The Oncolytic Virus in Cancer Diagnosis and Treatment. *Front Oncol.* 2020;10(1786):1–12.
 63. Bailey CJ, Day C. Traditional Plant Medicines as Treatments for Diabetes. *Diabetes Care.* 1989;12(8):553–64.
 64. Americans M, In- A, Control TD. Review articles - Metformin, Drug therapy. *N Engl J Med.* 1996;574–9.
 65. Meštrović DT. Metformin history. *News-Medical.net- An AZoNetwork Site.* 2011. p. <https://www.news-medical.net/health/Metformin-Hist>.
 66. Pollak M. Metformin and Other Biguanides in Oncology: Advancing the Research Agenda. *Cancer Prev Res.* 2011;3(9):1060–5.
 67. Bailey CJ. Metformin : historical overview. *Diabetologia.* 2017;60:1566–76.
 68. World Health Organization Model List of Essential Medicines. 2019;
 69. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Dermatol Res Pract.* 2017;60:1577–85.
 70. Hang NZ, Hi YS, Ie YX, Ie YX. Effects of Metformin and Rosiglitazone on Peripheral Insulin Resistance and β -Cell Function in Obesity: a Double-blind, Randomized, Controlled Study. *J Int Med Res.* 2011;39:358–65.
 71. Saini N, Yang X. Metformin as an anti-cancer agent : actions and mechanisms targeting cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2018;50(2):133–43.
 72. Micic D, Cvijovic G, Trajkovic V. Metformin : Its emerging role in oncology. *Hormones.* 2011;10(1):5–15.
 73. Sahra I Ben, Marchand-brustel Y Le, Tanti J, Bost F. Metformin in Cancer Therapy : A New Perspective for an Old Antidiabetic Drug? *Mol Cancer Ther.* 2010;9(5):1092–100.
 74. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Paola A, Bae-jump VL, et al. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation – implications for a novel treatment strategy. 2011;116(1):92–8.
 75. Eugenia M, Carrillo E, Ruiz G, Dom A, Marchal JA, Boulaiz H. Phenformin as an Anticancer Agent : Challenges and Prospects. *Int J Mol Sci.* 2019;20:1–17.

76. Magno L Di, Manni S, Pastena F Di, Agostinelli E, Magno L Di, Manni S, et al. Phenformin Inhibits Hedgehog-Dependent Tumor Growth through a Complex I-Independent Redox / Corepressor Module Article Phenformin Inhibits Hedgehog-Dependent Tumor Growth through a Complex I-Independent Redox / Corepressor Module. *CellReports*. 2020;30(6):1735–1752.e7.
77. Coperchini F, Croce L, Denegri M, Awwad O, Ngnetejeu T, Magri F, et al. The anti-cancer effects of phenformin in thyroid cancer cell lines and in normal thyrocytes. 2019;10(60):6432–43.
78. Drugbank. Phenformin [Internet]. Drugbank. Available from: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00914>
79. Veiga SR, Ge X, Mercer CA, Hernandez-Alvarez MI, Thomas HE, Hernandez-Losa J, et al. Phenformin-induced mitochondrial dysfunction sensitizes hepatocellular carcinoma for dual inhibition of mTOR. *Clin Cancer Res*. 2018;24(15):3767–80.
80. Jackson AL, Sun W, Kilgore J, Guo H, Fang Z, Yin Y, et al. Phenformin has anti-tumorigenic effects in human ovarian cancer cells and in an orthotopic mouse model of serous ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8(59):100113–27.
81. Jossé L, Xie J, Proud CG, Smales CM. MTORC1 signalling and eIF4E/4E-BP1 translation initiation factor stoichiometry influence recombinant protein productivity from GS-CHOK1 cells. *Biochem J*. 2016;473(24):4651–64.
82. Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Mol Biol Int*. 2014;1–14.
83. Guo Z, Zhao M, Howard EW, Zhao Q, Parris AB, Ma Z, et al. Phenformin inhibits growth and epithelial-mesenchymal transition of ErbB2-overexpressing breast cancer cells through targeting the IGF1R pathway. *Oncotarget*. 2017;8(36):60342–57.
84. Bayat S, Shekari Khaniani M, Choupani J, Alivand MR, Mansoori Derakhshan S. HDACis (class I), cancer stem cell, and phytochemicals: Cancer therapy and prevention implications. *Biomed Pharmacother*. 2018;97(7):1445–53.
85. Miskimins WK, Ahn HJ, Kim JY, Ryu S, Jung YS, Choi JY. Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One*. 2014;9(1):1–14.
86. Menendez JA, Oliveras-Ferraros C, Cufí S, Corominas-Faja B, Joven J, Martin-Castillo B, et al. Metformin is synthetically lethal with glucose withdrawal in cancer cells. *Cell Cycle*. 2012;11(15):2782–92.
87. Chaube B, Malvi P, Singh SV, Mohammad N, Meena AS, Bhat MK. Targeting metabolic flexibility by simultaneously inhibiting respiratory complex I and lactate generation retards melanoma progression. *Oncotarget*. 2015;6(35):37281–99.
88. Jiang W, Finniss S, Cazacu S, Xiang C, Brodie Z, Mikkelsen T, et al. Repurposing phenformin for the targeting of glioma stem cells and the treatment of

- glioblastoma. *Oncotarget*. 2016;7(35):56456–70.
89. Petti C, Vegetti C, Molla A, Bersani I, Cleris L, Mustard KJ, et al. AMPK activators inhibit the proliferation of human melanomas bearing the activated MAPK pathway. *Melanoma Res*. 2012;341–50.
 90. Yuan P, Ito K, Perez-Lorenzo R, Del Guzzo C, Lee JH, Shen CH, et al. Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(45):18226–31.
 91. Petrachi T, Romagnani A, Albini A, Longo C, Argenziano G, Grisendi G, et al. Therapeutic potential of the metabolic modulator phenformin in targeting the stem cell compartment in melanoma. *Oncotarget*. 2016;1–15.
 92. Kim SH, Li M, Trousil S, Zhang Y, Magliano MP di, Swanson KD, et al. Phenformin Inhibits Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Anti-Tumor Activity of PD-1 Blockade in Melanoma. *J Investig Dermatology*. 2017;137:1740–8.
 93. Trousil S, Chen S, Mu C, Shaw FM, Yao Z, Shakuntala T, et al. Phenformin Enhances the Efficacy of ERK Inhibition in NF1-Mutant Melanoma. *J Investig Dermatology*. 2017;137(5):1135–43.
 94. Noguchi F, Inui S, Fedele C, Shackleton M, Itami S. Calcium-dependent enhancement by extracellular acidity of the cytotoxicity of mitochondrial inhibitors against melanoma. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(5):936–47.
 95. Management C, Kuo C, Li SH, Liang S, Liu S, Huang L, et al. The antitumor properties of metformin and phenformin reflect their ability to inhibit the actions of differentiated embryo chondrocyte 1. *Cancer Manag Res*. 2019;6567–79.
 96. Kumari R, Jat P. Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:1–24.
 97. Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Testori A, Maio M, Hogg D, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med*. 2013;364(26):2507–16.
 98. Avram S, Coricovac DE, Pavel IZ, Pinzaru I, Ghiulai R, Baderca F, et al. Standardization of A375 human melanoma models on chicken embryo chorioallantoic membrane and Balb/c nude mice. *Oncol Rep*. 2017;38(1):89–99.
 99. Vincent KM, Postovit LM. Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models. *Oncotarget*. 2017;8(6):10498–509.
 100. Tomic T, Botton T, Cerezo M, Robert G, Luciano F, Puissant A, et al. Metformin inhibits melanoma development through autophagy and apoptosis mechanisms. *Cell Death Dis*. 2011;2(9):1–10.
 101. Bridges HR, Sirviö VA, Agip ANA, Hirst J. Molecular features of biguanides required for targeting of mitochondrial respiratory complex I and activation of AMP-kinase. *BMC Biol*. 2016;14(1):1–11.

102. Rofstad EK, Mathiesen B, Kindem K, Galappathi K. Acidic extracellular pH promotes experimental metastasis of human melanoma cells in athymic nude mice. *Cancer Res.* 2006;66(13):6699–707.
103. Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. *Physiol Behav.* 2017;17(2):139–48.
104. Liu Z, Ren L, Liu C, Xia T, Zha X, Wang S. Phenformin induces cell cycle change, apoptosis, and mesenchymal-epithelial transition and regulates the AMPK/mTOR/p70s6k and MAPK/ERK pathways in breast cancer cells. *PLoS One.* 2015;10(6):1–16.
105. Center MSKC. Clinical Trial of Phenformin in Combination With BRAF Inhibitor + MEK Inhibitor for Patients With BRAF-mutated Melanoma [Internet]. *ClinicalTrials.gov.* 2017. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT03026517>
106. Zu T, Wen J, Xu L, Li H, Mi J, Li H, et al. Up-Regulation of Activating Transcription Factor 3 in Human Fibroblasts Inhibits Melanoma Cell Growth and Migration Through a Paracrine Pathway. *Front oncology.* 2020;10(624):1–15.
107. Shackelford DB, Abt E, Gerken L, Vasquez DS, Seki A, Leblanc M, et al. LKB1 inactivation dictates therapeutic response of non-small cell lung cancer to the metabolism drug phenformin. 2014;23(2):143–58.
108. Janzer A, German NJ, Gonzalez-Herrera KN, Asara JM, Haigis MC, Struhl K. Metformin and phenformin deplete tricarboxylic acid cycle and glycolytic intermediates during cell transformation and NTPs in cancer stem cells. *Proc Natl Acad Unitade States Am.* 2014;111(29):10574–9.
109. Gan L, Gui M, Si J, Zhang J, Liu Z, Zhao J, et al. Protective effects of phenformin on zebrafish embryonic neurodevelopmental toxicity induced by X-ray radiation. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2019;47(1):4202–10.
110. Zhou Q, Kim SH, Pérez-lorenzo R, Liu C, Huang M, Dotto P, et al. Phenformin promotes keratinocyte differentiation via the calcineurin/NFAT pathway. *J Invest Dermatol.* 2020;141:152–63.
111. Livingstone E, Swann S, Lilla C, Schadendorf D, Resch A. Combining BRAF(V600E) inhibition with modulators of the mitochondrial bioenergy metabolism to overcome drug resistance in metastatic melanoma. *Exp Dermatol.* 2015;24:709–10.
112. Li K, Zhang T-T, Wang F, Cui B, Zhao C-X, Yu J-J, et al. Metformin suppresses melanoma progression by inhibiting KAT5-mediated SMAD3 acetylation, transcriptional activity and TRIB3 expression. *Oncogene.* 2018;5:1–16.
113. Ryabaya O, Prokofieva A, Akasov R, Khochenkov D, Emelyanova M, Burov S, et al. Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitor binimetinib in 2D and 3D models of human metastatic melanoma cells. *Biomed Pharmacother.* 2019;109:2548–60.

114. Hui-Wen Tseng S-CL, Tsai K-W. Metformin Treatment Suppresses Melanoma Cell Growth and Motility through Modulation of microRNA Expression. *Cancers (Basel)*. 2019;11(2):1–20.
115. Audrito V, Managò A, Gaudino F, Deaglio S. Targeting metabolic reprogramming in metastatic melanoma: The key role of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT). *Semin Cell Dev Biol*. 2020;98:192–201.
116. Cha J-H, Yang W-H, Xia W, Wei Y, Chan L-C, Lim S-O, et al. Metformin promotes antitumor immunity via endoplasmic reticulum-associated degradation of PD-L1. *Mol Cell*. 2018;71(4):606–20.
117. Kaushik G, Kwatra D, Subramaniam D, Jensen RA, Anant S, Mammen JMV. Honokiol affects melanoma cell growth by targeting the AMP-activated protein kinase signaling pathway. *Am J Surg*. 2014;208(6):995–1002.
118. Pistoni M, Tondelli G, Gallo C, Torricelli F, Maresca A, Carelli V, et al. Exploring metabolic reprogramming in melanoma via acquired resistance to the oxidative phosphorylation inhibitor phenformin. *Melanoma Res*. 2020;30(1):1–13.
119. Caraci F, Chisari M, Frasca G, Chiechio S, Salomone S, Pinto A, et al. Effects of phenformin on the proliferation of human tumor cell lines. *Life Sci*. 2003;74(5):643–50.
120. Rosilio C, Lounnas N, Nebout M, Imbert V, Hagenbeek T, Spits H, et al. The metabolic perturbators metformin, phenformin and AICAR interfere with the growth and survival of murine PTEN-deficient T cell lymphomas and human T-ALL/T-LL cancer cells. *Cancer Lett*. 2013;336(1):114–26.
121. Zhang S, Liu C, Zhang X. Mitochondrial Damage Mediated by miR-1 Overexpression in Cancer Stem Cells. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019;18:938–53.
122. Center MSKC. Clinical Trial of Phenformin in Combination With Dabrafenib and Trametinib for Patients With BRAF-mutated Melanoma. *ClinicalTrials*. 2020;
123. Nijenhuis CM, Haanen JBAG, Schellens JHM, Beijnen JH. Is combination therapy the next step to overcome resistance and reduce toxicities in melanoma? *Cancer Treat Rev*. 2012;39(4):305–12.
124. Bristot IJ, Dias CK, Chapola H, Parsons RB, Klamt F. Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020;153:102995.
125. Zhou W, Zhang J, Marcus AI. LKB1 tumor suppressor: Therapeutic opportunities knock when LKB1 is inactivated. *Genes Dis*. 2014;1(1):64–74.
126. Neagu M. Metabolic Traits in Cutaneous Melanoma. *Front Oncol*. 2020;10:1–12.
127. Wolpaw A, Dang C V. Exploiting Metabolic Vulnerabilities of Cancer with Precision and Accuracy. *Trends Cell Biol*. 2017;176(5):139–48.
128. Quinn BJ, Kitagawa H, Memmott RM, Gills JJ, Dennis PA. Repositioning metformin for cancer prevention and treatment. *Trends Endocrinol Metab*.

2013;24(9):469–80.

129. Harguindey S, Stanciu D, Devesa J, Alfarouk K, Cardone RA, Polo Orozco JD, et al. Cellular acidification as a new approach to cancer treatment and to the understanding and therapeutics of neurodegenerative diseases. *Semin Cancer Biol.* 2017;43:157–79.
130. Abildgaard C, Guldberg P. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol Med.* 2015;21(3):164–71.
131. Faubert B, Vincent EE, Poffenberger MC, Jones RG. The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator. *Cancer Lett.* 2015;356:165–70.
132. Somlyai G, Collins TQ, Meuillet EJ, Hitendra P, D’Agostino DP, Boros LG. Structural homologies between phenformin, lipitor and gleevec aim the same metabolic oncotarget in leukemia and melanoma. *Oncotarget.* 2017;8(30):50187–92.
133. Kaushik I, Ramachandran S, Prasad S, Srivastava SK. Drug rechanneling: A novel paradigm for cancer treatment. *Semin Cancer Biol.* 2020;68:279–90.
134. Smith LK, Rao AD, McArthur GA. Targeting metabolic reprogramming as a potential therapeutic strategy in melanoma. *Pharmacol Res.* 2016;107:42–7.
135. Joseph AS, Isaac E. GPU Accelerated real-time Melanoma Detection. *Int J Eng Technol.* 2018;7(3):1208–15.

<i>Título</i>	<i>Revista (ano)</i>	<i>Autor (Ref)</i>	<i>Justificação</i>
Combining BRAF ^{V600E} inhibition with modulators of the mitochondrial bioenergy metabolism to overcome drug resistance in metastatic melanoma	Experimental Dermatology (2015)	Livingstone <i>et al.</i> (111)	Incidem na ação terapêutica de outros fármacos nas células cancerígenas do melanoma, não referenciando a utilização da fenformina.
Metformin suppresses melanoma progression by inhibiting KAT5-mediated SMAD3 acetylation, transcriptional activity and TRIB3 expression	Oncogene (2018)	Ke Li <i>et al.</i> (112)	
Metformin increases antitumor activity of MEK inhibitor binimetinib in 2D and 3D models of human metastatic melanoma cells	Biomed Pharmacother (2019)	Ryabaya <i>et al.</i> (113)	
Metformin Treatment Suppresses Melanoma Cell Growth and Motility through Modulation of microRNA Expression	Biomedicine & Pharmacotherapy (2019)	Ryabaya <i>et al.</i> (114)	
Targeting metabolic reprogramming in metastatic melanoma: The key role of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)	Seminars in Cell & Developmental Biology (2020)	Audrito <i>et al.</i> (115)	

Título	Revista (ano)	Autor (Ref)	Justificação
Metformin promotes antitumor immunity via endoplasmic reticulum-associated degradation of PD-L1	Molecular Cell (2018)	Jong-Ho Cha <i>et al.</i> (116)	Incide na utilização de fármacos na terapêutica de vários tipos de cancro, não referenciando a fenformina.
Honokiol affects melanoma cell growth by targeting the AMP-activated protein kinase signaling pathway	American Journal of Surgery (2014)	Kaushik <i>et al.</i> (117)	
Exploring metabolic reprogramming in melanoma via acquired resistance to the oxidative phosphorylation inhibitor phenformin	Wolters Kluwer (2020)	Pistoni <i>et al.</i> (118)	Leitura integral não foi permitida
Effects of phenformin on the proliferation of human tumor cell lines	Life Sciences (2003)	Caraci <i>et al.</i> (119)	Incide na ação terapêutica da fenformina noutros tipos de cancro, não referenciando a sua aplicação no melanoma.
The metabolic perturbators metformin, phenformin and AICAR interfere with the growth and survival of murine PTEN-deficient T cell lymphomas and human T-ALL/T-LL cancer cells	Cancer Letters (2013)	Rosilio <i>et al.</i> (120)	
Phenformin Inhibits Hedgehog-Dependent Tumor Growth through a Complex I-Independent Redox/Corepressor Module	Cell Reports (2020)	Magno <i>et al.</i> (76)	

<i>Título</i>	<i>Revista (ano)</i>	<i>Autor (Ref)</i>	<i>Justificação</i>
Mitochondrial Damage Mediated by miR-1 Overexpression in Cancer Stem Cells	Molecular Therapy Nucleic Acids (2019)	Zhang <i>et al.</i> (121)	Estuda a influência do miR-1 no cancro da mama, melanoma e células estaminais cancerígenas.
Clinical Trial of Phenformin in Combination With Dabrafenib and Trametinib for Patients With BRAF-mutated Melanoma	ClinicalTrials.gov (2017)	-- (122)	Ensaio clínico em curso.
Is combination therapy the next step to overcome resistance and reduce toxicities in melanoma?	Cancer Treatment Reviews (2012)	Nijenhuis <i>et al.</i> (123)	Incide na utilização de fármacos na terapêutica do melanoma, não referenciando a fenformina.
Honokiol affects melanoma cell growth by targeting the AMP-activated protein kinase signaling pathway	American Journal of Surgery (2014)	Kaushik <i>et al.</i> (117)	
Metabolic rewiring in melanoma drug-resistant cells	Critical Reviews in Oncology and Hematology (2020)	Bristot <i>et al.</i> (124)	

Anexo A2 - Características dos estudos de revisão excluídos.

<i>Título</i>	<i>Revista (ano)</i>	<i>Autor</i>	<i>Referência</i>
LKB1 Tumor Suppressor: Therapeutic Opportunities Knock when LKB1 Is Inactivated	Genes & Diseases (2014)	Zhou <i>et al.</i>	(125)
Phenformin as an anticancer agent: Challenges and prospects	International Journal of Molecular Sciences (2019)	Rubino <i>et al.</i>	(75)
Metabolic Traits in Cutaneous Melanoma	Frontiers in Oncology (2020)	Neagu <i>et al.</i>	(126)
Exploiting Metabolic Vulnerabilities of Cancer with Precision and Accuracy	Trends in Cell Biology (2017)	Wolpaw <i>et al.</i>	(127)
Repositioning metformin for cancer prevention and treatment	Trends in Endocrinology & Metabolism (2013)	Quinn <i>et al.</i>	(128)
Cellular acidification as a new approach to cancer treatment and to the understanding and therapeutics of neurodegenerative diseases	Seminars in Cancer Biology (2017)	Harguindey <i>et al.</i>	(129)

Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma	Trends in Molecular Medicine (2014)	Abildgaard <i>et al.</i>	(130)
The AMP-activated protein kinase (AMPK) and cancer: Many faces of a metabolic regulator	Cancer Letters (2015)	Faubert <i>et al.</i>	(131)
Structural homologies between phenformin, lipitor and gleevec aim the same metabolic oncotarget in leukemia and melanoma	Oncotarget (2017)	Somlyai <i>et al.</i>	(132)
Drug rechanneling: A novel paradigm for cancer treatment	Seminars in Cancer Biology (2020)	Kaushik <i>et al.</i>	(133)
Targeting metabolic reprogramming as a potential therapeutic strategy in melanoma	Pharmacological Research (2016)	Smith <i>et al.</i>	(134)