



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Potencial da *2-deoxy-D-glucose* como agente  
terapêutico no melanoma – Revisão Sistemática**

Ana Margarida Bonixe Campelo

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora

Ana Luísa De Sousa Coelho

2020

## Potencial da 2-deoxy-D-glucose como agente terapêutico no melanoma – Revisão Sistemática

### Declaração de autoria de trabalho

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

Ana Campelo

---

© Ana Margarida Bonixe Campelo

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

## Dedicatória

*Aos meus pais, César Campelo e Sylvie Campelo e à minha irmã, Matilde Campelo, por terem sido os meus pilares nesta viagem e por acreditarem sempre em mim, mesmo quando tudo parece ser impossível de alcançar. A pessoa que sou hoje e tudo aquilo que consegui foi graças a vocês.*

*A vocês devo tudo! Obrigada!*

## Agradecimentos

Terminada esta importante etapa da minha vida, não poderia deixar de expressar o mais profundo agradecimento a todos aqueles que contribuíram com toda a ajuda e apoio nesta caminhada de 5 anos e na concretização desta dissertação.

À Professora Doutora Ana Luísa de Sousa Coelho, pela excelente orientação prestada, pelo apoio incondicional, disponibilidade e conhecimento transmitido ao longo da realização deste trabalho. A sua ajuda foi preciosa e a si devo-lhe um enorme obrigada!

Aos meus pais e irmã, pelo amor e apoio incondicionais que sempre me deram, pela paciência, compreensão e encorajamento nos momentos mais difíceis, por me darem sempre a mão e por me proporcionarem esta oportunidade maravilhosa. São tudo para mim e um obrigada nunca será suficiente para vos agradecer por tudo aquilo que fazem.

Ao meu namorado, João Pedro Martins, por toda a paciência e compreensão nos momentos mais complicados e por me dar sempre a força que preciso para continuar.

Aos meus amigos de longa data, por compreenderem a minha ausência ao longo destes anos de curso. Mesmo estando longe, continuam sempre do meu lado.

À Universidade do Algarve e a todos os docentes que a incorporam pela formação proporcionada ao longo destes cinco anos de curso que me fez crescer a nível profissional e pessoal.

Aos amigos que esta aventura me permitiu criar e que levo para a vida, obrigada pelos momentos de cumplicidade, partilha e ajuda ao longo deste percurso académico.

## Resumo

O melanoma maligno é um cancro agressivo e, por esse motivo, apresenta uma grande tendência para ocorrência de metástases na fase inicial da doença. Neste caso, as opções de tratamento são limitadas e existe ainda uma grande necessidade de desenvolver estratégias adicionais para otimizar a resposta terapêutica, tais como a descoberta de novos fármacos ou redirecionamento de moléculas já existentes. Segundo o “Efeito *Warburg*”, as células cancerígenas, mesmo em condições aeróbias, preferem o metabolismo glicolítico para produção de ATP, ao invés da via da fosforilação oxidativa. Uma vez que, a molécula *2-deoxy-D-glucose* é um análogo da glucose com potencial na inibição da glicólise, sendo capaz de conduzir as células cancerígenas à apoptose, quando isolada ou em combinação, esta molécula representa um promissor agente anticancerígeno.

O foco desta monografia foi avaliar o potencial terapêutico da molécula *2-deoxy-D-glucose* no tratamento do melanoma, elaborando a primeira revisão sistemática que teve como principal objetivo a recolha e análise de toda a informação existente acerca deste tema. Em primeiro lugar foi estabelecida a questão de investigação e elaborado o protocolo de investigação onde foram definidos os critérios de inclusão e exclusão, os termos de pesquisa e as bases de dados a utilizar. Foram incluídos 17 estudos publicados entre 1998 e 2019. A *2-deoxy-D-glucose* demonstrou aumentar principalmente o stress do retículo endoplasmático e autofagia e inibir a glicólise, proliferação, migração e invasão celular, bem como diminuir a viabilidade celular. Foi capaz de potenciar o efeito dos agentes terapêuticos N-dodecilimidazol, cisplatina, imiquimod, TRAIL, coronatina e metiljasmonato.

A *2-deoxy-D-glucose* apresenta potencial anticancerígeno, no entanto a sua combinação com outros agentes terapêuticos contribui para um maior sucesso no tratamento do melanoma.

**Palavras-chave:** *2-deoxy-D-glucose*, melanoma, inibição da glicólise, combinação terapêutica

## Abstract

The malignant melanoma is an aggressive cancer and, for that reason, has a huge tendency to occur metastasis in the initial phase of the disease. In this case, the treatment options are limited and still exists an huge necessity to develop additional strategies in order to optimize the therapeutic response, such as the discovery of new drugs or the redirection of pre-existing molecules. According to the “Warburg Effect”, cancer cells, even under aerobic conditions, prefer glycolytic metabolism for the production of ATP, instead the oxidative phosphorylation route. Once that the 2-deoxy-D-glucose molecule is a glucose analogue with the potential to inhibit glycolysis, by being able to lead the cancer cells to apoptosis, when isolated or in combination, this molecule represents a promising anticancer agent.

The main focus of this monograph was to evaluate the therapeutic potential of the 2-deoxy-D-glucose molecule in the melanoma treatment, by elaborating the first systematic revision that had as main goal gathering and analyzing all the information that exists about this subject. Firstly, it was established the investigation question and elaborated the investigation protocole where it was defined the inclusion and exclusion criteria, the research terms and the used data bases. Were included 17 studies published between 1998 and 2019. The 2-deoxy-D-glucose has been shown to increase mainly the endoplasmic reticulum stress and autophagy and to inhibit glycolysis, proliferation, migration and cell invasion, as well as to decrease cell viability. It was possible to potentiate the effects of the therapeutic agents N-dodecylimidazole, cisplatin, imiquimod, TRAIL, coronatin and methyljasmonate.

The 2-deoxy-D-glucose presents anti-cancer potential, however its combination with other therapeutic agents contributes to a bigger success in the melanoma treatment. Key words: 2-deoxy-D-glucose, melanoma, glycolysis inhibition, therapeutic combination.

**Keywords:** 2-deoxy-D-glucose, melanoma, glycolysis inhibition, combinatory treatments

## Índice de conteúdo

1	Introdução .....	1
1.1	Melanoma .....	1
1.1.1	Diferentes subtipos de Melanoma.....	2
1.2	Terapêutica no Melanoma avançado .....	3
1.2.1	Quimioterapia citotóxica .....	5
1.2.2	Terapia medicamentosa direcionada.....	6
1.2.3	Imunoterapia .....	8
1.2.4	Administração de citocinas.....	10
1.2.5	Terapia viral oncolítica.....	10
1.3	A 2-deoxy-D-glucose no tratamento anticancerígeno .....	11
1.3.1	Metabolismo da glucose.....	11
1.3.2	A 2-deoxy-D-glucose na inibição da glicólise.....	11
	.....	13
1.3.3	A 2-deoxy-D-glucose no diagnóstico do cancro .....	13
2	Objetivos.....	14
3	Metodologia .....	14
3.1	Questão de investigação.....	14
3.2	Protocolo de Investigação .....	15
3.2.1	Bases de dados .....	15
3.2.2	Termos de pesquisa .....	16
3.2.3	Pesquisa da literatura .....	17
3.2.4	Critérios de inclusão e exclusão.....	17
3.2.5	Seleção dos artigos para o estudo .....	17
4	Resultados .....	18
4.1	Seleção dos estudos encontrados .....	18
4.1.1	Artigos excluídos.....	20
4.1.2	Artigos incluídos .....	22
4.1.3	Distribuição temporal das publicações .....	27
4.2	Tipo de amostra utilizada .....	27
4.2.1	Células e linhas celulares humanas e murinas .....	28
4.2.2	Agentes terapêuticos utilizados em combinação com 2-deoxy-D-glucose .....	29
4.3	Estudos <i>in vitro</i> .....	30
4.3.1	Tratamento do melanoma com 2-DG isolada.....	30

4.3.2	Tratamento do melanoma com 2-DG em combinação terapêutica .....	42
4.3.3	Alteração na molécula 2-DG (tetraacetato de 2-DG).....	57
4.3.4	Alteração das condições celulares .....	58
4.4	Estudos <i>in vivo</i> .....	64
5	Discussão .....	68
5.1	Ação da 2-deoxy-D-glucose na inibição da glicólise.....	69
5.2	Ação da 2-deoxy-D-glucose no stress do reticulo endoplasmático, resposta a proteínas não dobradas e autofagia .....	70
5.3	Ação da 2-deoxy-D-glucose na apoptose .....	71
5.4	Ação da 2-deoxy-D-glucose no potencial de membrana mitocondrial .....	73
5.5	Ação da 2-deoxy-D-glucose na paragem do ciclo celular .....	75
5.6	Ação da 2-deoxy-D-glucose na formação de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio	75
5.7	Ação da 2-deoxy-D-glucose na inibição dos processos de reparação do DNA pós-irradiação.....	76
5.8	Ação da 2-deoxy-D-glucose na proliferação, migração e invasão celular .....	76
5.9	Ação da 2-deoxy-D-glucose na viabilidade e toxicidade celular .....	77
5.10	Ação da 2-deoxy-D-glucose na peroxidação lipídica .....	79
5.11	Ação da 2-deoxy-D-glucose no crescimento tumoral <i>in vivo</i> .....	79
6	Conclusão .....	81
7	Bibliografia.....	83
8	Anexos .....	90
8.1	Artigos excluídos da revisão sistemática.....	90
8.1.1	Artigos de Revisão .....	90
8.1.2	Artigos que não apresentam os termos de pesquisa estabelecidos .....	91
8.1.3	Artigos em que a 2-DG é utilizada para a realização de técnicas de imagem .....	95
8.1.4	Artigos em que a 2-DG foi usada para avaliação da glucose.....	100
8.1.5	Artigos em que constam os termos de pesquisa, mas não existe uma relação entre eles	100
8.2	Linhas celulares de melanoma humano e melanócitos normais e respetivos fenómenos avaliados.....	102
8.3	Linhas celulares de melanoma de ratinho e respetivos fenómenos avaliados .....	106
9	Bibliografia dos anexos .....	107

## Índice de figuras

Figura 1- Terapêuticas sistêmicas no melanoma avançado.....	4
Figura 2 - ilustração esquemática dos mecanismos de ação dos diferentes fármacos utilizados no tratamento do melanoma. Terapia medicamentosa direcionada e imunoterapia .....	5
Figura 3- Estrutura molecular de D-glicose e 2-DG. A posição do grupo hidroxilo em 2-DG é indicada.....	12
Figura 4- Esquema geral da 2-deoxy-D-glucose e metabolismo de glicose em células cancerígenas .....	13
Figura 5 - Organograma do processo de metodologia.....	18
Figura 6 - Número de estudos encontrados em cada uma das diferentes bases de dados. ....	19
Figura 7 - Evolução do processo de triagem dos artigos encontrados.....	20
Figura 8 - distribuição temporal dos artigos incluídos .....	27
Figura 9 - Frequência de utilização das linhas celulares nos artigos incluídos.....	28

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Definição da questão de investigação utilizando o modelo PICO adaptado ..	14
Tabela 2 - Bases De Dados Utilizadas Na Seleção Dos Estudos.....	15
Tabela 3- Termos de pesquisa utilizados .....	16
Tabela 4 - Artigos sobrepostos em cada uma das bases de dados utilizadas .....	19
Tabela 5- Artigos excluídos nas diferentes bases de dados .....	21
Tabela 6 - Características dos artigos incluídos.....	23
Tabela 7 - Linhas celulares e respetivo fenómeno avaliado.....	28
Tabela 8 - Agentes terapêuticos usados em combinação com 2-DG e respetivos fenómenos avaliados .....	30
Tabela 9- Resultados da 2-DG isolada na diminuição de ATP celular.....	31
Tabela 10 - Resultados da 2-DG isolada no stress do RE/UPR e indução da autofagia ...	32
Tabela 11 - Resultados da 2-DG isolada na apoptose .....	34
Tabela 12 - Resultados da 2-DG isolada na análise do potencial de membrana mitocondrial.....	35
Tabela 13 - Resultados da 2-DG isolada na paragem do ciclo celular .....	36
Tabela 14 - Resultados da 2-DG isolada na formação de ROS e RNS .....	37
Tabela 15- Resultados da 2-DG isolada na inibição dos processos de reparo do DNA pós-irradiação .....	38
Tabela 16- Resultados da 2-DG isolada na inibição da proliferação, migração e invasão celular .....	39
Tabela 17 - Resultados da 2-DG isolada na viabilidade celular .....	41
Tabela 18 - Resultados da 2-DG isolada na citotoxicidade.....	41
Tabela 19 - Resultados da 2-DG isolada na peroxidação lipídica .....	42
Tabela 20 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na diminuição de ATP celular (inibição da glicólise).....	43
Tabela 21 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica no stress do RE/UPR e indução da autofagia.....	44
Tabela 22 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na apoptose .....	47

Tabela 23 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na análise de mitocôndrias (potencial de membrana mitocondrial) .....	50
Tabela 24 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na paragem do ciclo celular .....	51
Tabela 25 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na formação de ROS e RNS .....	52
Tabela 26 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na inibição da proliferação/migração celular .....	53
Tabela 27 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na diminuição da viabilidade celular .....	55
Tabela 28 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica no aumento da citotoxicidade.....	56
Tabela 29 - Resultados da 2-DG em combinação terapêutica na peroxidação lipídica... 57	
Tabela 30 - Resultados da alteração na molécula 2-DG.....	58
Tabela 31 - Resultados do tratamento com 2-DG com alteração na expressão de Muc4 .....	59
Tabela 32 - Tratamento com 2-DG em células resistentes à ADI-PEG-20.....	60
Tabela 33 - tratamento com 2-DG em células com knockdown no gene p53 .....	60
Tabela 34 - tratamento com 2-DG com alteração nos níveis de glucose no meio de cultivo celular .....	62
Tabela 35 - tratamento com 2-DG em meio anaeróbio.....	63
Tabela 36 - resultados do tratamento com 2-DG com alteração do soro fetal bovino no meio de cultivo celular.....	64
Tabela 37 - Resultados dos estudos in vivo com 2-DG isolada ou em combinação terapêutica.....	66

## Lista de Abreviaturas

2-DG	<i>2-deoxy-D-glucose</i>
2-DG-6-P	<i>2-deoxy-D-glucose-6-fosfato</i>
7-AAD	7-aminoactinomicina D
ADI-PEG20	Arginina desaminase peguilada
ADI <sup>R</sup>	Células resistentes à ADI-PEG20
BrdU	Bromodeoxiuridina
CTLA-4	Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína
DHR-123	Dihidrorodamina-123
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTIC	Dacarbazina
EBSS	Meio de sais equilibrados de Earle
ECAR	Taxa de acidificação extracelular
EMA	Agência Europeia do Medicamento (do inglês <i>European Medicines Agency</i> )
FBS	Soro fetal bovino (do inglês <i>Fetal bovine serum</i> )
FDA	<i>Food and drug Administration</i>
[ <sup>18</sup> F]FDG	<i>Fluorodeoxyglucose 18</i>
GLUTs	Transportadores de glucose
GM-CSF	Fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe o crescimento celular em 50%
IFN- $\alpha$	Interferão-alfa
IL-2	Inetrleucina-2
KD	<i>Knockdown</i>
LDH	Lactato desidrogenase
MAPK	Proteína quinase ativada por mitogénio

MDA	Malondialdeído
MTT	Ensaio de redução de tetrazólio
NDI	N-dodecilimidazol
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PD-1	Proteína de morte programada 1
PET	Tomografia por emissão de positrões
RE	Retículo endoplasmático
RNS	Espécies reativas de nitrogénio
ROS	Espécies reativas de oxigénio
SOD	Superóxido dismutase
TMRE	Perclorato de éster etílico de tetrametil-rodamina
TRAIL	Ligando indutor da apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
T-VEC	Talimogene laherparepvec
UPR	Resposta a proteínas não dobradas (do inglês <i>Unfolded protein response</i> )

# 1 Introdução

## 1.1 Melanoma

Os melanócitos são células derivadas da crista neural que produzem melanina. Esta é responsável pela pigmentação da pele e por conferir proteção contra os raios UV. Os melanócitos localizam-se principalmente na camada basal da epiderme, podendo ser encontrados também ao longo das superfícies mucosas, camada coróide do olho e meninges. A sua divisão descontrolada origina o melanoma (1–4).

O melanoma representa a forma mais letal de cancro de pele, tendo a sua incidência vindo a aumentar em todo o mundo. Em 2018, representou 22% dos diagnósticos de cancro de pele, com 300.000 novos casos a nível mundial. Constitui o 19º cancro mais comum em ambos os sexos, sendo a quinta principal causa de morte por cancro em homens e sexta em mulheres (5,6). A sua incidência aumenta dos 25 aos 50 anos e diminui a partir daí (7). Até aos 50 anos de idade a população feminina é a mais afetada, no entanto, a partir dos 55 anos afeta principalmente o sexo masculino (8). Para além disso, é responsável por 80% das mortes por cancro de pele em todo o mundo (9).

Existem diversos fatores de risco para o desenvolvimento deste cancro, tais como a presença de um elevado número de nevos melanocíticos benignos ou atípicos, imunossupressão, presença de história familiar de melanoma e predisposição genética (10). Certas características fenotípicas como pele, olhos e cabelo claros, presença de inúmeras sardas, sensibilidade ao sol e dificuldade em bronzear constituem fatores de risco na ordem dos 50% (2,11). Além do mais, existem fatores de risco ambientais onde se destaca a exposição intermitente aos raios UV (história de queimaduras solares) com efeito genotóxico, em particular ao espectro UV-B (7,12). A exposição aos raios UV-A de fontes artificiais, tais como fotoquimioterapia por radiação psoraleno-UV-A usada no tratamento de psoríase e a exposição artificial aos raios UV-A em solário, pode igualmente contribuir para o desenvolvimento deste cancro (13,14). Portanto, o melanoma caracteriza-se por ser uma doença multifatorial que resulta da suscetibilidade genética e da exposição ambiental.

O melanoma apresenta 5 estádios, sendo que a sua avaliação é fundamental para planejar um tratamento adequado. No estágio 0 o melanoma está restrito à epiderme e não existe interação com a circulação sanguínea. Por outro lado, no estágio I (fase de crescimento radial) há progressão dos melanócitos, originando lesões intra-epidérmicas. No estágio II (fase de crescimento vertical) há invasão da derme e risco aumentado de desenvolver melanoma metastático. No estágio III as células de melanoma metastizam para a circulação linfática, formando metástases locais. Por fim, no estágio IV ocorre disseminação do tumor, verificando-se metástases distantes. A gravidade dos estádios I-IV é determinada pela espessura do tumor, bem como pelo estado de ulceração (15,16).

No que concerne ao diagnóstico de melanoma, quanto mais precocemente este for realizado melhor, pois caso o tumor seja localizado e sem presença de metástases é possível a realização de excisão cirúrgica do tumor primário (8). O diagnóstico de melanoma pode ser realizado tanto pelo médico como pelo doente, recorrendo ao acrónimo ABCDE (A-assimetria, B-irregularidade, C-variação de cor, D-diâmetro > 6mm e E-evolução) (17). Poderá também ser realizada dermatoscopia ou Microscopia Confocal de Refletância, no entanto o diagnóstico de melanoma só poderá ser confirmado após realização de análise histológica através de biópsia (2,8). Dependendo das características clínicas e histológicas, os melanomas convencionais podem ser classificados em melanoma extensivo superficial, melanoma nodular, melanoma lentigo maligno e melanoma acral lentiginoso.

### **1.1.1 Diferentes subtipos de Melanoma**

#### **1.1.1.1 Melanoma extensivo superficial**

Este é o tipo mais comum de melanoma, representando 70% dos casos. Pode surgir a partir de um nevo melanocítico e deve-se essencialmente à exposição solar intermitente. Localiza-se maioritariamente na parte posterior das pernas das mulheres, bem como nas costas dos homens (18). Do ponto de vista clínico, caracteriza-se pela sua forma irregular e cor acastanhada ou preta, com estruturas vermelhas, brancas e/ou cinza-azuladas, apresentando geralmente disseminação pagetóide. Acima da superfície da pele poderá verificar-se uma pápula ou nódulo (2,8,19).

#### **1.1.1.2 Melanoma nodular**

O melanoma nodular representa 5% dos melanomas, tendo maior incidência em homens do que em mulheres. Surge maioritariamente entre os 50 e 60 anos de idade, em zonas do tronco e membros, resultante de uma exposição solar intermitente (2,20). Este melanoma é frequentemente ulcerado e tanto pode ser incolor ou apresentar diversas tonalidades como castanho, preto ou azul-preto (2,19,20).

#### **1.1.1.3 Melanoma lentigo maligno**

O melanoma lentigo maligno representa 4% a 15% dos melanomas cutâneos e correlaciona-se com a exposição solar prolongada e com o aumento da idade (2). Surge maioritariamente no pescoço e cabeça, nomeadamente na face, e caracteriza-se pela sua forma irregular e cor acastanhada ou preta (19,20). Acima da superfície da pele, poderá verificar-se uma pápula (8).

#### **1.1.1.4 Melanoma acral lentiginoso**

Constitui um tipo de melanoma incomum, representando apenas 4-6% dos melanomas em populações caucasianas, exibindo maior incidência na população asiática e africana (2,21–23). Tal como o nome indica, surge principalmente na pele acral, isto é, na palma das mãos, planta dos pés, bem como na placa ungueal (2,21). O melanoma acral lentiginoso afeta com maior predominância os idosos, nomeadamente do sexo feminino e caracteriza-se por apresentar cor escura, como preto-azulado ou vermelho-rosa (2,22).

### **1.2 Terapêutica no Melanoma avançado**

Tal como referido anteriormente, o melanoma constitui a forma mais agressiva de cancro de pele e a sua taxa de sobrevivência está associada ao estágio da doença no momento do diagnóstico (5,24). Caso o doente apresente doença localizada é possível realizar excisão cirúrgica do tumor primário (8). No entanto, poderão ser observadas metástases e, nesse caso, será necessário recorrer a terapias sistémicas tais como a quimioterapia citotóxica com Dacarbazina e Temozolamida, que é atualmente

considerada terapêutica de 2ª linha (Figura 1) (7,25). Existe também a terapia medicamentosa direcionada com inibidores de BRAF (Vemurafenib Dabrafenib) que é utilizada quando existem mutações no gene BRAFV600 que conduzem à proliferação descontrolada de células cancerígenas, e pode ser usada em monoterapia ou em combinação com inibidores de MEK (Trametinib e Cobimetinib). Existe também a imunoterapia que utiliza anticorpos anti proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (anti-CTLA-4) como é o exemplo do Ipilimumab, e anti proteína de morte programada 1 (anti-PD-1) como o Nivolumab e Pembrolizumab, tanto em monoterapia como em combinação terapêutica (25). A terapia medicamentosa direcionada apresenta altas taxas de resposta, enquanto que a imunoterapia está relacionada a taxas mais baixas, mas mais longas e duradouras. Ambas as terapias são atualmente as mais utilizadas (7). Para além disso, a administração das citocinas Interleucina-2 e Interferão-alfa e a terapia viral oncolítica com (T-VEC) são também estratégias terapêuticas no melanoma metastático (25).

Quimioterapia citotóxica	Terapia medicamentosa direcionada	Imunoterapia	Outras terapêuticas
<ul style="list-style-type: none"> <li>•Dacarbazina</li> <li>•Temozolamida</li> <li>•Carmustina; Lomustina</li> <li>•Cisplatina; Carboplatina</li> <li>•Paclitaxel; Docetaxel</li> <li>•Vincristina; Vimblastina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Inibidores de BRAF (Vemurafenib e Dabrafenib)</li> <li>•Inibidores de MEK (Trametinib e Cobimetinib)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Anticorpos anti-CTLA-4 (Ipilimumab)</li> <li>•Anticorpos anti-PD-1 (Nivolumab e Pembrolizumab)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Administração de citocinas (Interleucina-2 e Interferão-alfa)</li> <li>•Terapia viral oncolítica (T-VEC)</li> </ul>

**FIGURA 1- TERAPÊUTICAS SISTÊMICAS NO MELANOMA AVANÇADO. (CTLA-4-PROTEÍNA 4 ASSOCIADA A LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS; PD-1-PROTEÍNA DE MORTE PROGRAMADA 1; TVEC- TALIMOGENE IAHERPAREPVEC)**

Na Figura 2 está representada uma ilustração esquemática dos diferentes mecanismos correspondentes às opções de tratamento sistémico supracitadas. Todos eles serão abordados mais pormenorizadamente nas seguintes secções.

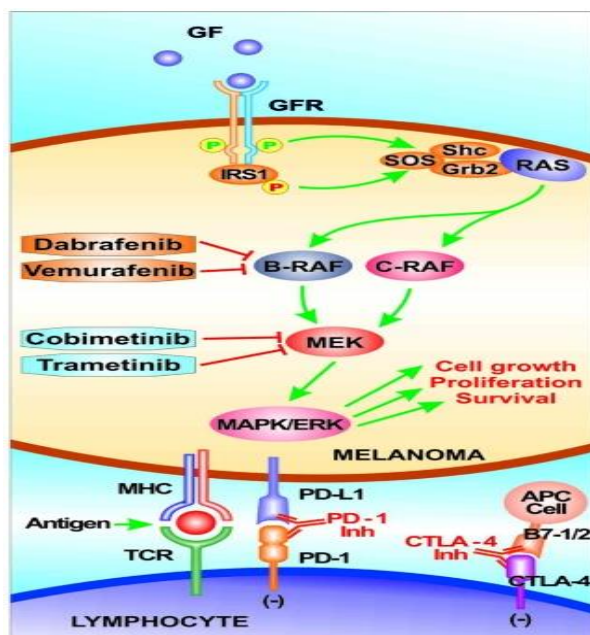


FIGURA 2 - ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS MECANISMOS DE AÇÃO DOS DIFERENTES FÁRMACOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DO MELANOMA. TERAPIA MEDICAMENTOSA DIRECIONADA E IMUNOTERAPIA (DABRAFENIB E VEMURAFENIB SÃO INIBIDORES SELETIVOS DE BRAF; TRAMETINIB E COBIMETINIB SÃO INIBIDORES SELETIVOS DE MEK; IPILIMUMAB É ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-CTLA-4; NIVOLUMAB E PEMBROLIZUMAB SÃO ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-PD-1; BRAF-PROTO-ONCOGENE B-RAF; MAPK-PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR MITOGÊNIO; PD-1-PROTEÍNA DE MORTE CELULAR PROGRAMADA 1; PD-L1-LIGANDO DE PD-1; APC-CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENOS; CTLA-4-PROTEÍNA 4 ASSOCIADA A LINFÓCITOS T CITOTÓXICOS)

### 1.2.1 Quimioterapia citotóxica

A quimioterapia citotóxica foi a primeira terapia a ser aplicada no melanoma, no entanto já não constitui a terapêutica de 1ª linha na doença em estado avançado, pois possui um papel mais proeminente em melanomas que não abrigam mutações somáticas. Por essa razão foram desenvolvidas novas terapêuticas para o melanoma metastático (26).

Existem diversos agentes citotóxicos utilizados na quimioterapia, destacando-se a Dacarbazina (DTIC), o primeiro fármaco aprovado no melanoma pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos da América em 1975 e pela *European Medicines Agency* (EMA) em 2014 (27,28). Esta molécula caracteriza-se por ser um agente alquilante que é ativado através da metabolização hepática, formando adutos de DNA. Ensaios clínicos demonstraram que a resposta ao tratamento com DTIC é inferior a 15%, no entanto esta continua a ser a opção padrão no tratamento quimioterápico do melanoma (25,26).

Vários estudos envolvendo a adição de agentes de modo a tentar aumentar a eficácia da DTIC, tais como quimioterapias, imunoterapias e anti-estrogénios, concluíram que essas combinações não revelaram resultados satisfatórios, e ao invés disso, provocaram aumento dos efeitos colaterais (29).

A Temozolamida é também um agente citotóxico utilizado no melanoma avançado e caracteriza-se por ser um agente alquilante e análogo da DTIC. Apesar de ser semelhante a esta, a Temozolamida diferencia-se da DTIC pelo facto de conseguir atravessar a barreira hematoencefálica e atuar no sistema nervoso central. Embora a sua resposta no cérebro seja mínima, pode ser utilizada em casos de melanoma com metástases cerebrais. Distinguem-se também pelo facto da DTIC ser administrada por via intravenosa, enquanto que a Temozolamida pode ser administrada por via oral (26). A Temozolamida foi aprovada pela FDA e pela EMA em 1999 (27,30).

Para além destes agentes citotóxicos, existem as nitrosureias (Carmustina e Lomustina), geralmente usadas em combinação terapêutica no melanoma metastático cerebral. Existem os análogos de platina, a Cisplatina e a Carboplatina que é citotóxica e resulta na inibição da replicação e transcrição. Os taxanos (Paclitaxel e Docetaxel) capazes de induzir morte celular, são também agentes citotóxicos e foram testados em monoterapia ou em combinação com outros agentes no melanoma avançado. Para além disso, existem ainda os alcalóides de vinca (Vincristina e Vimblastina) com ação anti-mitótica e anti-microtubular que apresentam uma resposta terapêutica de 14% no melanoma metastático (26,31).

### **1.2.2 Terapia medicamentosa direcionada**

A via de sinalização da proteína quinase ativada por mitogénio (MAPK), desempenha um papel crucial na proliferação e crescimento celular. Os genes BRAF e MEK fazem parte desta via e a presença de mutações nestes genes conduz à ativação da via MAPK que, por sua vez, promove a proliferação e crescimento das células cancerígenas de melanoma. Como tal, foi desenvolvida a Terapia Medicamentosa Direcionada com inibidores seletivos de BRAF e MEK, capazes de inibir esta via de sinalização, contribuindo assim para o tratamento do melanoma (25).

### 1.2.2.1 Inibidores de BRAF

O gene BRAF codifica para a proteína serina-treonina-quinase envolvida na via MAPK que desempenha um papel importante na proliferação descontrolada de células de melanoma. (32,33)

A ocorrência de mutações no gene BRAF é bastante comum e está presente em (37-50)% dos melanomas (34,35). A mutação BRAF mais recorrente ocorre no codão 600, em que há substituição de um aminoácido valina por ácido glutâmico, designada por mutação BRAFV600E, representando 80% das mutações neste gene. Depois desta, a mutação BRAFV600K representa 15% das mutações, em que ocorre a substituição de valina por lisina também no codão 600 (35). Para além destas, existem ainda as mutações BRAFV600D (substituição de valina por ácido aspártico) e BRAFV600R (substituição de valina por arginina) que ocorrem com uma frequência inferior a 5% (32,33).

Estas mutações no gene BRAF, conduzem à ativação constitutiva da via de sinalização MAPK, levando à proliferação das células cancerígenas do melanoma. Por outro lado, a inibição de BRAF promove a inativação desta via de sinalização, contribuindo para a interrupção do crescimento celular. De modo a inibir o crescimento celular do melanoma, surgiram então os inibidores seletivos de BRAF, tais como o Vemurafenib e Dabrafenib, aprovados pela FDA em 2011 e pela EMA em 2012 e 2013, respetivamente (36,37).

### 1.2.2.2 Inibidores de MEK

A proteína MEK é um substrato consecutivo de BRAF na via de sinalização MAPK e como tal, a inibição de MEK contribui igualmente para a inativação desta via de sinalização e, conseqüentemente, para tratamento do melanoma. Como tal, foram desenvolvidos inibidores seletivos de MEK (25).

No início dos anos 2000 foram avaliados dois inibidores de MEK, CI-1040 e PD0325901, no entanto revelaram ser bastante tóxicos e ineficazes no tratamento (38). Porém, mais tarde surgiu o Trametinib, um inibidor específico das proteínas MEK1 e MEK2, que demonstrou uma atividade clínica promissora em doentes com mutação

BRAFV600E e BRAFV600K (39,40). O Trametinib foi aprovado pela FDA em 2013 e pela EMA em 2014 (36,37). Para além disso, foi ainda desenvolvido o Cobimetinib, também inibidor seletivo de MEK1 e MEK2, que foi aprovado pela FDA e pela EMA em 2015 (37,41).

### **1.2.2.3 Combinação terapêutica entre inibidores de BRAF e inibidores de MEK**

Apesar de existir uma alta resposta terapêutica aos inibidores de BRAF, muitos dos doentes desenvolvem resistência a estes fármacos. Observou-se em estudos pré-clínicos que a combinação entre um inibidor de MEK e um inibidor de BRAF atrasa a resistência que existiria no tratamento em que é utilizado somente um inibidor de BRAF. Posto isto, foram avaliadas as combinações entre Dabrafenib e Trametinib e entre Vemurafenib e Cobimetinib, tendo-se verificado que existia uma melhoria do tratamento quando era aplicada a combinação terapêutica, em comparação com os inibidores de BRAF em monoterapia (25).

## **1.2.3 Imunoterapia**

A resposta imunológica constitui um fator importante na resposta terapêutica anti-tumoral. A proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos (CTLA-4) e a proteína de morte celular programada 1 (PD-1) são expressas pelos linfócitos T e funcionam como supressores celulares destes, conduzindo então a uma regulação negativa da resposta imunológica. Assim sendo, a utilização de inibidores de CTLA-4 e PD-1 constitui uma estratégia terapêutica anti-tumoral, pois favorece a resposta imunológica contra o tumor (25).

### **1.2.3.1 Terapêutica com anticorpos anti CTLA-4 (Proteína 4 associada a linfócitos T citotóxicos)**

O CTLA-4 é um recetor inibitório transmembranar expresso em linfócitos T ativados. Quando o CTLA-4 se liga aos ligandos B7-1 e B7-2 nas células dendríticas, conduz à inibição dos linfócitos T, impedindo a resposta imunológica anti-tumoral (42,43).

De forma a impedir esta atividade, foi desenvolvido o Ipilimumabe, que é um anticorpo monoclonal anti CTLA-4, capaz de bloquear a ligação entre esta proteína e os seus ligandos B7-1 e B7-2. Desta forma, os linfócitos T são ativados e é produzida uma resposta do sistema imunitário contra as células cancerígenas do melanoma. O Ipilimumab foi aprovado pela FDA e pela EMA em 2011 para o tratamento do melanoma avançado (25,37,42,44).

### **1.2.3.2 Terapêutica com anticorpos anti PD-1 (Proteína de morte programada 1)**

O PD-1 é uma proteína expressa pelos linfócitos T e essencial na regulação imunológica. O PD-1 liga-se ao seu ligando PD-L1 que se encontra em células cancerígenas e macrófagos associados ao tumor. Essa ligação leva à inibição dos linfócitos T citotóxicos, impedindo uma resposta do sistema imunitário contra o tumor (25,43). Os anticorpos monoclonais, Nivolumab e Pembrolizumab, são responsáveis por inibir essa ligação entre o PD-1 e PD-L1, promovendo a ativação dos linfócitos T e favorecendo a resposta anti-tumoral pelo sistema imunitário (45–47). Ambos foram aprovados pela FDA em 2014 e pela EMA em 2015, e representam uma terapêutica mais favorável no melanoma, comparativamente à quimioterapia e ao Ipilimumab (25,48,49). Para além disso, a terapêutica com anticorpos anti PD-1 é eficaz no tratamento do melanoma quando há resistência a inibidores de BRAF (7).

### **1.2.3.3 Combinação terapêutica entre inibidor de PD-1 e inibidor de CTLA-4**

Estudos pré-clínicos em que foi avaliado o potencial da combinação terapêutica entre o inibidor de PD-1, Nivolumab, juntamente como o inibidor de CTLA-4, Ipilimumab, demonstraram que essa combinação entre inibidores de PD-1 e de CTLA-4, conduzia a uma atividade anti-tumoral sinérgica (50,51). Tendo em conta estes resultados, a combinação terapêutica entre Nivolumab e Ipilimumab foi aprovada em 2015 pelo FDA para o tratamento de melanoma metastático (25). No entanto, está associada a uma elevada toxicidade incluindo efeitos adversos imunes e, por essa razão, este tratamento foi descontinuado (52).

## 1.2.4 Administração de citocinas

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

A interleucina-2 (IL-2) é uma citocina imunomoduladora capaz de ativar células *natural killer* (NK) e linfócitos T citotóxicos, aumentando a resposta anti-tumoral, tendo sido aprovada pela FDA em 1998 e pela EMA em 2013 (25,53). Quando em doses elevadas, geralmente apresenta uma resposta clínica duradoura a longo prazo, superior a 5 anos, no entanto conduz a toxicidade grave. Sendo assim, a terapia com altas doses de IL-2 requer uma monitorização elevada e, por essa razão, a sua utilização no tratamento do melanoma avançado caiu em desuso (25,54).

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

O interferão-alfa (IFN- $\alpha$ ) induz uma resposta anti-tumoral pelas células T *Helper*, inibe diretamente a proliferação das células de melanoma e é antiangiogénico (55,56). Foi aprovado pelo FDA em 1995 para tratamento em doentes tratados cirurgicamente e com risco de recidiva do tumor (25).

Em 2000 e 2011 a EMA e a FDA aprovaram, respetivamente, uma melhoria do interferão-alfa para interferão-alfa-2b peguilado que apresenta uma semivida mais longa. No entanto, foram observadas maiores reações adversas, não tendo sido demonstrado um maior benefício clínico na sua utilização (25,56,57).

## 1.2.5 Terapia viral oncolítica

### 1.2.5.1 *Talimogene laherparepvec* (T-VEC)

O T-VEC é um vírus oncolítico que pertence à classe do herpes simplex tipo I, o qual foi geneticamente modificado para expressar o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) após invadir as células tumorais (58). Este é diretamente injetado nas metástases cutâneas, onde conduz à expressão de GM-CSF,

atraindo células dendríticas e aumentando a resposta imunitária, conduzindo à regressão do tumor (43,59).

Este vírus demonstrou uma resposta clínica e um perfil de segurança favoráveis e por essa razão foi aprovado pela EMA em 2015 para o tratamento de lesões de melanoma na pele e nos linfonodos que não são passíveis de ressecção cirúrgica (25,60).

### **1.3 A *2-deoxy-D-glucose* no tratamento anticancerígeno**

#### **1.3.1 Metabolismo da glucose**

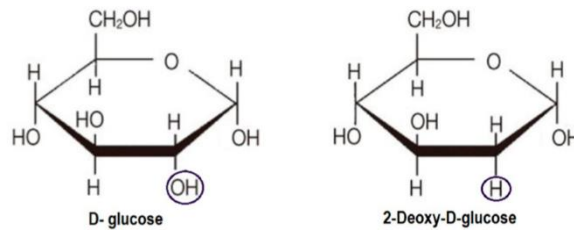
A glucose é a principal fonte de energia celular e pode ser obtida através da ingestão de hidratos de carbono ou da gluconeogénese (61). É captada pelos seus transportadores (GLUTs) e dentro da célula é metabolizada (glicólise), havendo produção de energia.

A respiração celular pode ocorrer na presença ou ausência de oxigénio. Caso seja na presença de oxigénio (respiração aeróbia), compreende 3 fases: glicólise, ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa. Na glicólise ocorrem 2 etapas, sendo que na primeira etapa, denominada fase de ativação, há gasto de energia, pois a glucose é fosforilada e recebe fosfato proveniente de 2 moléculas de ATP, tornando-se quimicamente ativa. Na segunda etapa, denominada fase de rendimento, a glucose é oxidada e há libertação de energia que é utilizada para a produção de 4 moléculas de ATP. São libertados eletrões na oxidação da glucose, que originam a redução de  $\text{NAD}^+$  em NADH. O saldo energético final da glicólise é então de 2 ATP (62,63). Por outro lado, na ausência de oxigénio (respiração anaeróbia), a glucose é metabolizada em ácido láctico ou etanol que participam na fermentação láctica ou alcoólica, respetivamente (61).

#### **1.3.2 A *2-deoxy-D-glucose* na inibição da glicólise**

A *2-deoxy-D-glucose* (2-DG) é um análogo da glucose no qual o grupo 2-hidróxilo é substituído por hidrogénio (Figura 3). Esta molécula foi reportada como potencial agente terapêutico no tratamento anticancerígeno, pois demonstrou ser capaz de

interferir em diversos processos biológicos, tais como depleção de ATP e energia celular, indução de stress oxidativo, interferência na glicosilação ligada ao N (conduz ao acúmulo de proteínas não dobradas/dobradas incorretamente no retículo endoplasmático), bem como indução da autofagia (61).



**FIGURA 3- ESTRUTURA MOLECULAR DE D-GLICOSE E 2-DG. A POSIÇÃO DO GRUPO HIDROXILO EM 2-DG É INDICADA. (61)**

O seu mecanismo foi estudado, chegando-se à conclusão de que a 2-DG é captada pelos GLUTs, entra na célula e é fosforilada pela hexoquinase II em *2-deoxy-D-glucose-6-fosfato* (2-DG-6-P) que, ao contrário da glucose, não pode ser metabolizado pela fosfoglucose isomerase (64). Posto isto, a 2-DG-6-P é acumulada dentro da célula, ocorrendo depleção de ATP, paragem do ciclo celular, inibição do crescimento celular e, eventualmente, morte celular. Quanto maior a quantidade de 2-DG-6-P acumulada, maior será esse efeito de inibição da glicólise (65).

Segundo o que é definido pelo “Efeito *Warburg*”, as células cancerígenas mesmo em condições aeróbicas utilizam a glucose para produção de ácido láctico (fermentação láctica) e, portanto, para matar as células tumorais, tanto a glucose como o oxigénio deveriam ser eliminados (66). Uma vez que a molécula *2-deoxy-D-glucose* é um análogo da glucose com potencial na inibição da glicólise, quando isolada ou em combinação com outros agentes terapêuticos esta molécula representa um promissor agente anticancerígeno (Figura 4) (67,68).

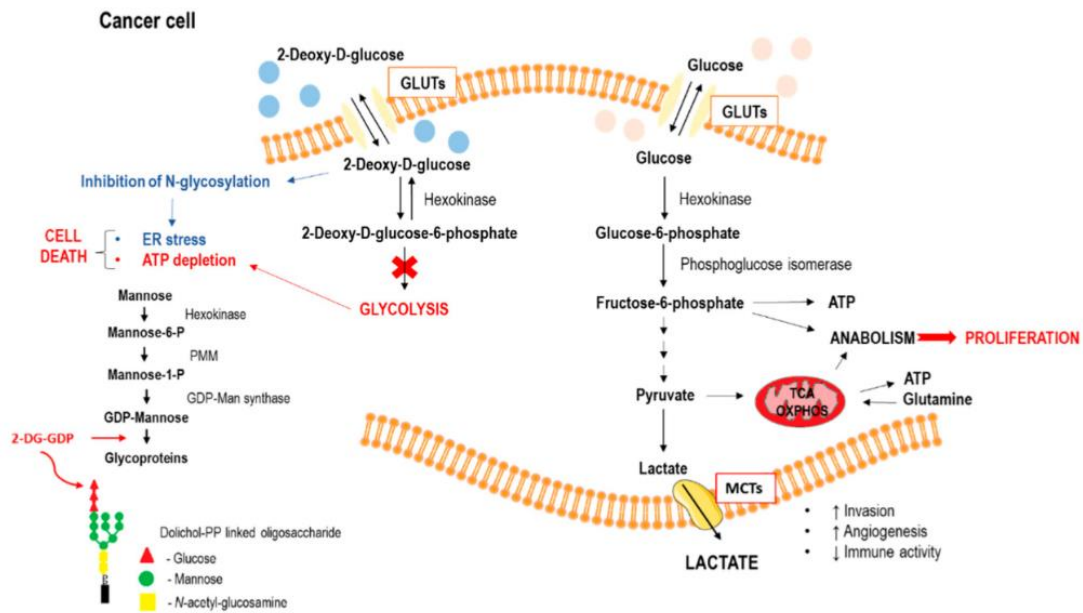


FIGURA 4- ESQUEMA GERAL DA 2-DEOXY-D-GLUCOSE E METABOLISMO DE GLICOSE EM CÉLULAS CANCERÍGENAS (GLUTs - TRANSPORTADORES DE GLICOSE; MCTs - TRANSPORTADORES DE MONOCARBOXILATO; ER - RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO) (61)

### 1.3.3 A 2-deoxy-D-glucose no diagnóstico do cancro

Segundo o Efeito *Warburg*, as células cancerígenas consomem mais glicose do que as células normais e por essa razão a utilização de análogos da glicose para realização de técnicas de imagem, como a Tomografia por Emissão de Positrões (PET), pode ser utilizada no diagnóstico do cancro (69).

A molécula 2-deoxy-D-glucose é um análogo da glicose e geralmente é utilizada na forma de fluorodeoxyglucose F 18 ([<sup>18</sup>F]FDG) (70). É captada pelas células cancerígenas, acumulando-se em tumores ou órgãos que metabolizam ou eliminam intensivamente a glicose, funcionando como um radiofármaco no diagnóstico do cancro (71). Devido à sua capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, pode ser utilizada também em diagnósticos cerebrais (72).

## 2 Objetivos

Esta monografia tem como objetivo primordial a elaboração de uma revisão sistemática, envolvendo estudos que visem a utilização da *2-deoxy-D-glucose*, isolada ou em combinação, como estratégia terapêutica no melanoma. Foi propósito reportar o tipo da amostra utilizada nesses estudos, os mecanismos de ação envolvidos, bem como os resultados verificados.

## 3 Metodologia

A revisão sistemática da literatura consiste numa investigação científica em que são reunidos todos os documentos publicados acerca de um determinado tema, de forma a responder a uma questão de investigação. Este tipo de revisão visa reduzir o viés através do uso de métodos sistemáticos explícitos para realizar uma pesquisa bibliográfica abrangente e avaliar a qualidade dos estudos individuais, extrair os dados e sintetizar os resultados (73).

### 3.1 Questão de investigação

De modo a estabelecer a questão de investigação desta revisão sistemática, foi adaptado o modelo definido pelo acrónimo PICO. Esta ferramenta define os quatro componentes “Problema” (originalmente “População”), “Intervenção”, “Comparação” e “Outcome” (Resultado), que serão os elementos fundamentais da questão de investigação (Tabela 1).

**TABELA 1 - DEFINIÇÃO DA QUESTÃO DE INVESTIGAÇÃO UTILIZANDO O MODELO PICO ADAPTADO**

<b>P</b>	<b>Problema</b>	Tratamento do melanoma
<b>I</b>	<b>Intervenção</b>	Utilização da <i>2-deoxy-D-glucose</i> no melanoma
<b>C</b>	<b>Comparação</b>	Comparar o efeito anticancerígeno da <i>2-deoxy-D-glucose</i> isolada, ou em combinação, com os respetivos controlos não tratados
<b>O</b>	<b>Outcome</b>	Sucesso no tratamento do melanoma; Efeito potenciado em combinação terapêutica

Através desta metodologia, foi possível formular a seguinte questão de investigação: “A molécula 2-deoxy-D-glucose, quando isolada ou em combinação terapêutica, apresenta potencial anticancerígeno no tratamento do melanoma?”.

## 3.2 Protocolo de Investigação

### 3.2.1 Bases de dados

Para a pesquisa dos artigos científicos analisados, foram utilizados motores de pesquisa online, nomeadamente *PubMed/MEDLINE*, *Web of Science*, *Cochrane Library* e *B-on* (Biblioteca online do conhecimento). Foi ainda considerada a *grey literature*, recorrendo ao RCAAP (Repositório Científico de Acesso Aberto em Portugal), bem como ao Open Grey. Para além disso, foi utilizado o *Clinical Trials* para a análise de ensaios clínicos (Tabela 2).

**TABELA 2 - BASES DE DADOS UTILIZADAS NA SELEÇÃO DOS ESTUDOS**

Base de dados	Documentos disponibilizados	Hiperligação
<b>Pubmed/MEDLINE</b>	Citações e resumos de artigos de investigação em biomedicina	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
<b>Web of Science</b>	Artigos científicos e de revisão	<a href="http://www.webofknowledge.com">www.webofknowledge.com</a>
<b>Cochrane Library</b>	Artigos de investigação em medicina e outras especialidades da área da saúde	<a href="http://www.cochranelibrary.com">www.cochranelibrary.com</a>
<b>B-on</b>	Textos integrais de revistas científicas e e-books	<a href="http://www.b-on.pt">www.b-on.pt</a>
<b>RCAAP</b>	Literatura científica e académica	<a href="http://www.rcaap.pt">www.rcaap.pt</a>
<b>Open Grey</b>	Relatórios técnicos ou de pesquisa, dissertações de doutorado, documentos de conferências e publicações oficiais	<a href="http://www.opengrey.eu">www.opengrey.eu</a>
<b>Clinical Trials</b>	Ensaio clínicos em desenvolvimento e completos	<a href="http://clinicaltrials.gov">clinicaltrials.gov</a>

### 3.2.2 Termos de pesquisa

Numa pesquisa preliminar verificou-se que muitos dos artigos encontrados utilizavam a 2-deoxy-D-glucose apenas para técnicas de imagem, nomeadamente Tomografia por Emissão de Positrões (PET) e *scanning*, não avaliando o seu efeito terapêutico no melanoma; por outro lado, nalguns artigos a inibição da glicólise através da utilização da 2-DG era realizada apenas como uma ferramenta farmacológica para avaliar a captação da glucose celular, independentemente do seu potencial anticancerígeno.

Os termos de pesquisa utilizados encontram-se descritos na Tabela 3 e foram adaptados consoante o número de artigos encontrados com os termos de pesquisa iniciais “2-deoxyglucose and melanoma” e “2 DG and melanoma”. Sempre que esse número ultrapassou os 500 artigos, foram adicionalmente aplicados os filtros “NOT PET”, “NOT scanning” e “NOT glucose uptake”, de modo a fazer um refinamento da informação disponível. Esta medida foi aplicada no motor de pesquisa *Pubmed*/MEDLINE, onde foram encontrados mais de 500 artigos. Por outro lado, no motor *Web of Science*, o número de artigos não excedeu os 500, mas esta medida foi aplicada nos termos de pesquisa “2-deoxyglucose and melanoma” e “2-deoxy-D-glucose and melanoma”, após ter sido verificada uma constante utilização de técnicas de imagem e avaliação da captação da glucose. Nos restantes motores de pesquisa não foi necessário aplicar esse refinamento, pois a pesquisa utilizando os termos estabelecidos não originou mais de 500 artigos. No repositório científico RCAAP, já que engloba estudos em português e inglês, foram utilizados os termos de pesquisa nestes dois idiomas.

**TABELA 3- TERMOS DE PESQUISA UTILIZADOS**

Termos de Pesquisa			
		Melanoma	<i>Skin cancer</i>
2 DG	and	X	
2-DG		X	X
<i>2 deoxy-glucose</i>		X	
<i>2-deoxy-glucose</i>		X	X
<i>2 deoxy-D-glucose</i>		X	
<i>2-deoxy-D-glucose</i>		X	X

### 3.2.3 Pesquisa da literatura

A pesquisa realizada para este estudo teve início no dia 21 de novembro de 2019, tendo sido encerrada no dia 31 de dezembro de 2019.

### 3.2.4 Critérios de inclusão e exclusão

Neste estudo foram considerados artigos publicados em inglês ou português, a partir de 1998, inclusive, tendo sido este o primeiro ano a surgir com uma publicação resultante da pesquisa. Foram incluídos estudos em que a 2-deoxy-D-glucose foi utilizada como agente terapêutico no melanoma, realizados em humanos, animais ou linhas celulares de melanoma.

Por outro lado, foram excluídos artigos de revisão, estudos em que a 2-DG foi utilizada no melanoma, mas não com a finalidade de avaliar o seu potencial terapêutico, ou seja, quando esta foi usada apenas para realizar técnicas de imagem, avaliação da captação de glucose ou para medição da taxa de acidificação extracelular (ECAR). Artigos onde não foram encontrados os termos de pesquisa ou em que não existia uma correlação entre eles, foram igualmente excluídos.

### 3.2.5 Seleção dos artigos para o estudo

Após ter sido definida a metodologia da análise, procedeu-se à seleção dos estudos. Os artigos disponibilizados nos diferentes motores de pesquisa foram analisados brevemente através do título e resumo (*abstract*), de modo a estabelecer quais seriam relevantes ou não, aplicando os critérios de inclusão e exclusão anteriormente descritos.

Depois de reunidos todos os artigos relevantes e removidos os duplicados, estes foram analisados na sua íntegra. Foi recolhida a informação acerca do autor, revista e ano de publicação, e feita análise dos dados, dos métodos utilizados, do tipo da amostra, bem como avaliados os resultados obtidos. Toda essa informação foi registada em tabelas. De forma a organizar todos os estudos selecionados, recorreu-se ao *Mendeley*, um sistema de gestão de referências bibliográficas (Figura 5).

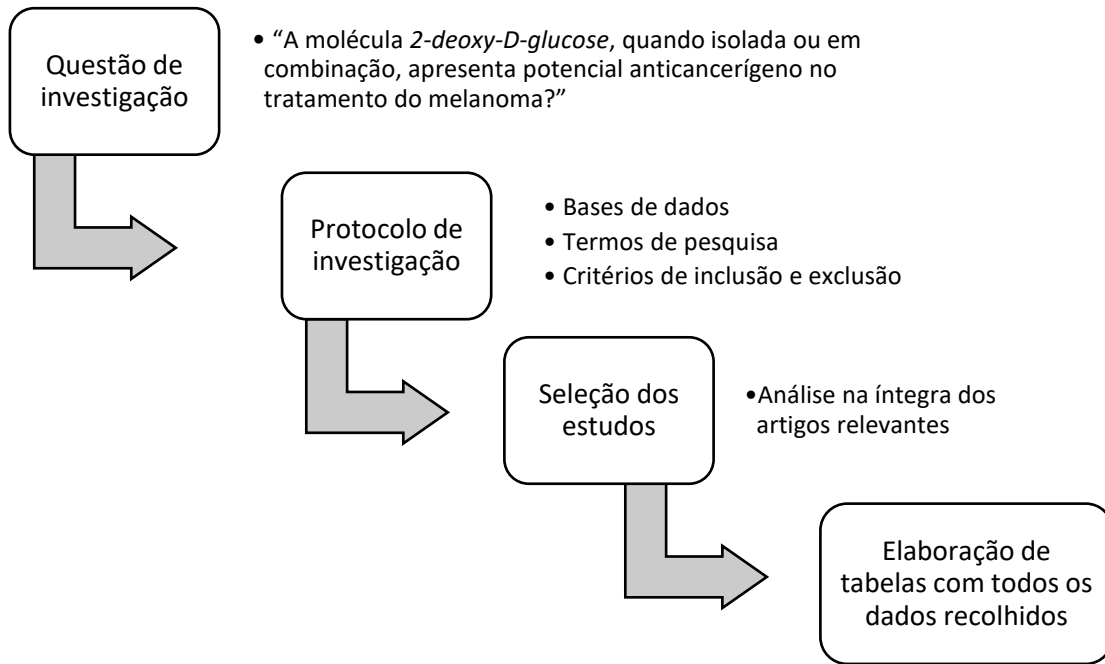


FIGURA 5 - ORGANOGrama DO PROCESSO DE METODOLOGIA

## 4 Resultados

### 4.1 Seleção dos estudos encontrados

Após ter sido efetuada a pesquisa em todas as bases de dados definidas, utilizando todos os termos de pesquisa e estratégia de refinamento, foram obtidos no total 170 resultados (Figura 6).



FIGURA 6 - NÚMERO DE ESTUDOS ENCONTRADOS EM CADA UMA DAS DIFERENTES BASES DE DADOS.

De todos os estudos encontrados, existiam artigos sobrepostos nas bases de dados *Pubmed/MEDLINE*, *Web of Science* e *B-on*. A base de dados *Pubmed/MEDLINE* apresentou 19 artigos em comum com a *Web of Science* e 20 artigos com a *B-on*, enquanto que a *Web of Science* apresentou 28 artigos em comum com a *B-on*. Esses artigos em duplicado, que perfaziam um total de 53 artigos, foram removidos (Tabela 4).

TABELA 4 - ARTIGOS SOBREPOSTOS EM CADA UMA DAS BASES DE DADOS UTILIZADAS

	Pubmed/MEDLINE	Web of Science	Cochrane Library	B-on	RCAAP	Clinical Trials
Pubmed/MEDLINE	34	19	-	20	-	-
Web of Science	19	62	-	28	-	-
Cochrane Library	-	-	3	-	-	-
B-on	20	28	-	58	-	-
RCAAP	-	-	-	-	1	-
Clinical Trials	-	-	-	-	-	12

Os 117 artigos obtidos após remoção dos duplicados, foram analisados brevemente através do título, resumo, materiais e métodos e observação das figuras, aplicando os critérios de inclusão e de exclusão, de modo a definir quais os que seriam relevantes para a análise. Foram eliminados 100 artigos, e os 17 que se mostraram relevantes, foram analisados na íntegra e em detalhe (Figura 7).

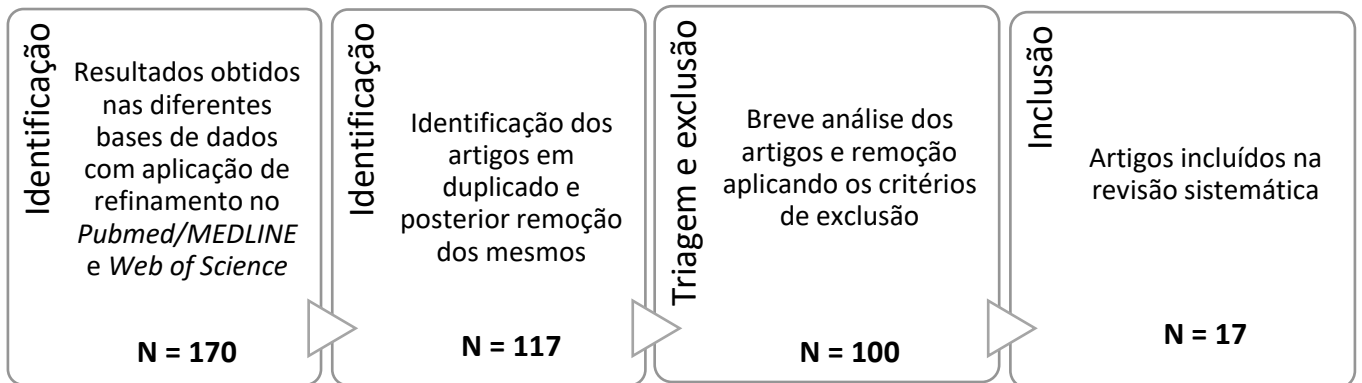


FIGURA 7 - EVOLUÇÃO DO PROCESSO DE TRIAGEM DOS ARTIGOS ENCONTRADOS

#### 4.1.1 Artigos excluídos

Durante o processo de aplicação dos critérios de exclusão anteriormente definidos, foram excluídos 100 artigos. Desses artigos excluídos, 5 eram artigos de revisão, 40 deles não apresentavam os termos de pesquisa previamente definidos, 42 utilizavam a 2-DG para realizar técnicas de imagem, 2 usavam-na para avaliação do metabolismo da glucose e 11 deles apresentavam os termos de pesquisa definidos, no entanto não existia uma correlação entre eles, isto é, não usavam a 2-DG no tratamento do melanoma (Tabela 5).

**TABELA 5- ARTIGOS EXCLUÍDOS NAS DIFERENTES BASES DE DADOS**

<i>Artigos excluídos da revisão sistemática</i>					
	Artigos de revisão	Ausência dos termos de pesquisa	2-DG usada para técnicas de imagem	2-DG usada para avaliação do metabolismo da glucose	Sem relação entre os termos de pesquisa
<i>Web of Science</i>	1	23	11	1	6
<i>Pubmed/MEDLINE</i>	2	7	6	1	3
<i>Cochrane Labrary</i>	-	1	2	-	-
<i>B-on</i>	2	8	11	-	2
<i>RCAAP</i>	-	1	-	-	-
<i>Clinical Trials</i>	-	-	12	-	-
<b>Total de Artigos</b>	<b>5</b>	<b>40</b>	<b>42</b>	<b>2</b>	<b>11</b>

#### 4.1.1.1 Artigos de Revisão

No processo de aplicação dos critérios de exclusão, foram inicialmente removidos os artigos de revisão, representando um total de 5 artigos. Para além de serem artigos de revisão, todos apresentam adicionalmente outro critério de exclusão que se encontra descrito na (Tabela S1, em anexo).

#### 4.1.1.2 Artigos que não apresentam os termos de pesquisa estabelecidos

Nesta fase, foram removidos todos os artigos que, ainda que tenham surgido na pesquisa, não continham um ou ambos os termos de pesquisa, isto é, que não apresentavam as diferentes designações da molécula 2-deoxy-D-glucose e/ou melanoma. Os artigos que apresentaram estas características perfazem um total de 40 (Tabela S2, em anexo).

#### 4.1.1.3 Artigos em que a 2-DG é utilizada para realização de técnicas de imagem

Todos os artigos em que a 2-DG foi utilizada somente para a realização de técnicas de imagem, nomeadamente para Tomografia por Emissão de Positrões (PET), que não foram automaticamente removidos da pesquisa pela estratégia de refinamento nas bases

de dados *Pubmed/MEDLINE* e *Web of Science*, ou que surgiram nas restantes bases de dados onde não foi aplicado refinamento, foram excluídos, perfazendo um total de 42 artigos (Tabela S3, em anexo).

#### **4.1.1.4 Artigos em que a 2-DG foi usada para avaliação do metabolismo da glucose**

Foram encontrados 2 artigos em que a 2-DG foi utilizada para avaliação do metabolismo celular. Num deles usaram a 2-DG para avaliação da captação da glucose e no outro para ECAR, uma técnica de avaliação da taxa de glicólise celular e, portanto, foram eliminados (Tabela S4, em anexo).

#### **4.1.1.5 Artigos em que constam os termos de pesquisa, mas não existe uma relação entre eles**

Em 11 dos artigos encontrados, apesar de constarem os termos de pesquisa estabelecidos, não existe uma correlação entre eles. Portanto, esses artigos foram removidos, pois a molécula 2-DG não foi utilizada no tratamento do melanoma (Tabela S5, em anexo).

### **4.1.2 Artigos incluídos**

Após terem sido aplicados os critérios de exclusão e inclusão, foram selecionados e incluídos 17 artigos das bases de dados *Web of Science* (1 artigo), *Pubmed/MEDLINE* (15 artigos) e *B-on* (1 artigo). Na Tabela 6 encontra-se discriminado o objetivo principal de cada estudo, bem como outras informações relevantes (nome do primeiro autor, revista e ano de publicação). Os artigos encontram-se apresentados por ordem de ano de publicação.

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS INCLUÍDOS

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista (ano)</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Referência</b>
<i>Cytotoxic action of 2-deoxy-D-glucose tetraacetate upon human lymphocytes, fibroblasts and melanoma cells</i>	Reinhold, U. e Malaisse, W. J.	International Journal of Molecular Medicine (1998)	Estudar o efeito citotóxico do tetraacetato de 2-DG em células de melanoma humano.	(74)
<i>Heterogeneity in 2-deoxy-d-glucose-induced modifications in energetics and radiation responses of human tumor cell lines</i>	Dwarkanath et al.	International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics (2001)	Avaliar o papel inibitório da 2-DG nos processos de reparação pós-irradiação em células de melanoma; examinar a relação entre a modificação do metabolismo energético induzida por 2-DG e a radiorresposta celular.	(75)
<i>Multidrug resistance correlates with overexpression of Muc4 but inversely with P-glycoprotein and multidrug resistance related protein in transfected human melanoma cells</i>	Hu et al.	Biochemical Pharmacology (2003)	Investigar se a expressão celular da glicoproteína Muc4 poderá influenciar a sensibilidade celular; verificar se as células de melanoma que expressam Muc4 são resistentes à 2-DG.	(76)
<i>2-Deoxy-D-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells through XBP-1-mediated up-regulation of TRAIL-R2</i>	Liu et al.	Molecular Cancer (2009)	Avaliar o potencial da combinação entre 2-DG e TRAIL no aumento da citotoxicidade em células de melanoma.	(68)

TABELA 6- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS INCLUÍDOS (CONTINUAÇÃO)

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista (ano)</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Referência</b>
<b><i>2-Deoxyglucose sensitizes melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis which is reduced by mannose</i></b>	Qin <i>et al.</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications (2010)	Avaliar a sinergia entre 2-DG e TRAIL na resposta pró-apoptótica em células de melanoma e melanócitos humanos normais; examinar a influência da adição de manose na morte das células tratadas com 2-DG e TRAIL.	(77)
<b><i>2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion</i></b>	Xi <i>et al.</i>	Cancer Chemotherapy and Pharmacology (2011)	Investigar o efeito da 2-DG na toxicidade em células de melanoma.	(78)
<b><i>Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response</i></b>	Giammarioli <i>et al.</i>	International Journal of Cancer (2012)	Avaliar o papel da 2-DG na indução da morte celular em células de melanoma; examinar os efeitos da 2-DG em combinação com vários agentes pró-apoptóticos: temozolomida, pirimetamina, cisplatina e estaurosporina.	(79)
<b><i>Arginine Deiminase Resistance in Melanoma Cells Is Associated with Metabolic Reprogramming, Glucose Dependence, and Glutamine Addiction</i></b>	Long <i>et al.</i>	Molecular Cancer Therapeutics (2013)	Estudar o efeito das variantes celulares resistentes à ADI-PEG20 na sensibilidade ao tratamento com 2-DG.	(80)

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS INCLUÍDOS (CONTINUAÇÃO)

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista (ano)</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Referência</b>
<b><i>Hypoxia and hypoxia mimetic cooperate to counteract tumor cell resistance to glucose starvation preferentially in tumor cells with mutant p53</i></b>	Chavez-Perez <i>et al.</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications (2014)	Avaliar o efeito da 2-DG nas células de melanoma <i>wild type</i> ou com <i>knockdown</i> do gene p53, na viabilidade celular, sob normoxia ou hipoxia e/ou adição de enzimas.	(81)
<b><i>Targeting aerobic glycolysis and HIF-1<math>\alpha</math> expression enhance imiquimod-induced apoptosis in cancer cells</i></b>	Huang <i>et al.</i>	Oncotarget (2014)	Avaliar o potencial da combinação terapêutica do imiquimod com 2-DG em células de melanoma.	(82)
<b><i>The repopulating cancer cells in melanoma are characterized by increased mitochondrial membrane potential</i></b>	Lee <i>et al.</i>	Cancer Letters (2016)	Analisar o efeito da 2-DG na viabilidade celular e no potencial de membrana mitocondrial.	(83)
<b><i>Synergistic Anticancer Action of Lysosomal Membrane Permeabilization and Glycolysis Inhibition</i></b>	Kosic <i>et al.</i>	Journal of Biological Chemistry (2016)	Investigar o efeito sinérgico entre 2-DG e NDI na viabilidade celular, proliferação, necrose, potencial de membrana mitocondrial, stress oxidativo e inibição da glicólise (depleção de ATP).	(84)
<b><i>Fasting boosts sensitivity of human skin melanoma to cisplatin-induced cell death</i></b>	Antunes <i>et al.</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications (2017)	Medir a taxa apoptótica em células de melanoma tratadas com cisplatina, em condições de baixa ou alta glucose, na presença ou ausência de 2-DG.	(85)

TABELA 6 - CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS INCLUÍDOS (CONTINUAÇÃO)

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista (ano)</b>	<b>Objetivo do estudo</b>	<b>Referência</b>
<b><i>BRAF-mutated cells activate GCN2-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib</i></b>	Nagasawa <i>et al.</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications (2017)	Analisar o efeito da 2-DG no aumento do stress do retículo endoplasmático, através da avaliação da expressão de GRP78 e GRP79.	(86)
<b><i>C-Terminal Binding Protein 1 Modulates Cellular Redox via Feedback Regulation of MPC1 and MPC2 in Melanoma Cells</i></b>	Deng <i>et al.</i>	Medical science monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research (2018)	Avaliar o papel da 2-DG na expressão de MPC1 e MPC2 e consequente alteração da proliferação, migração e invasão celular.	(87)
<b><i>Cloxiquine, a traditional antituberculosis agent, suppresses the growth and metastasis of melanoma cells through activation of PPAR<math>\gamma</math></i></b>	Zhang <i>et al.</i>	Cell Death & Disease (2019)	Investigar o potencial sinérgico entre a cloxiquina e a 2-DG em células de melanoma.	(88)
<b><i>Metabolic and lipidomic investigation of the antiproliferative effects of coronatine against human melanoma cells</i></b>	Kim <i>et al.</i>	Scientific Reports (2019)	Avaliar o efeito da combinação entre a 2-DG com metiljasmonato ou coronatina na proliferação e toxicidade em células de melanoma.	(89)

### 4.1.3 Distribuição temporal das publicações

Nesta revisão foram incluídos um total de 17 artigos (n=17). Os artigos foram publicados em datas compreendidas entre o ano de 1998 e 2019. Nos anos 1998, 2001, 2003, 2009, 2010, 2012, 2013 e 2018 foi apenas publicado um artigo incluído, enquanto que nos anos 2014, 2016, 2017 e 2019 foram publicados 2 artigos incluídos nesta revisão. Na Figura 8 encontra-se a representação gráfica da distribuição temporal destes estudos incluídos.

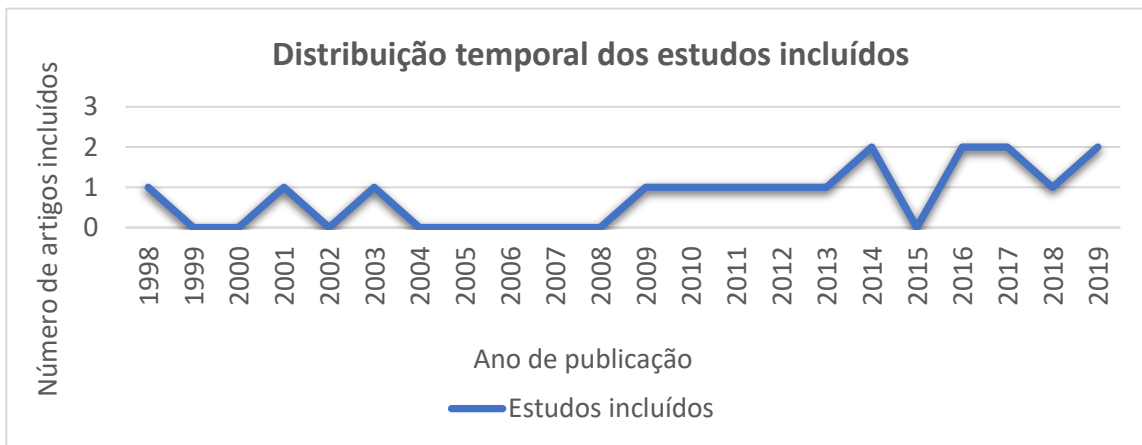


FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO TEMPORAL DOS ARTIGOS INCLUÍDOS

### 4.2 Tipo de amostra utilizada

Nos diferentes estudos analisados foram utilizadas diversas amostras, entre elas células e linhas celulares de melanoma humano (n=21) e de origem murina (n=2). Na Figura 9 encontram-se discriminadas todas essas linhas celulares por ordem alfabética, bem como a frequência da sua utilização nos estudos incluídos nesta revisão sistemática.

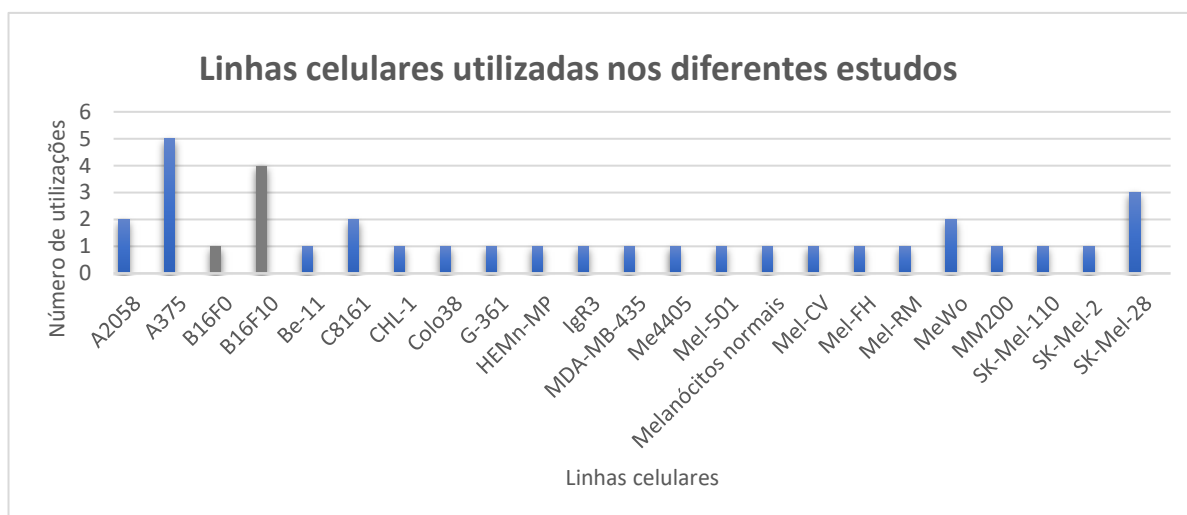


FIGURA 9 - FREQUÊNCIA DE UTILIZAÇÃO DAS LINHAS CELULARES NOS ARTIGOS INCLUÍDOS (COR AZUL- LINHAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO; COR CINZENTA - LINHAS CELULARES DE MELANOMA DE RATINHO)

#### 4.2.1 Células e linhas celulares humanas e murinas

Nos artigos incluídos foram utilizadas diversas linhas celulares de melanoma humano e de ratinho, e melanócitos normais. Na Tabela 7 encontram-se discriminadas todas essas linhas celulares, bem como os fenômenos avaliados em cada uma delas. Em anexo encontra-se uma tabela mais completa destes dados (Tabelas S6 e S7, em anexo).

TABELA 7 - LINHAS CELULARES E RESPECTIVO FENÔMENO AVALIADO

		Fenômeno avaliado										
Linhas celulares		Níveis de ATP celular	Stress do RE/UPR;	Apoptose	Potencial mitocondrial	Formação de ROS e RNS	Paragem do ciclo celular	Reparação de danos no	Proliferação; migração; invasão celular	Viabilidade; toxicidade celular	Peroxidação lipídica	Referência
	A2058								X	X		(80,89)
	A375	X	X	X					X	X		(76,77,86,87,89)
	B16F0	X			X	X				X	X	(84)
	B16F10			X	X				X	X		(82,83,88)
	Be-11							X				(75)
	C8161	X		X						X		(77,81)

**TABELA 7 - LINHAS CELULARES E RESPECTIVO FENÓMENO AVALIADO (CONTINUAÇÃO)**

<i>Fenómeno avaliado</i>												
<b>Linhas celulares</b>	CHL-1			X								(85)
	Colo38			X						X		(74)
	G-361		X									(86)
	HEMn-MP			X								(68)
	IgR3			X								(68)
	MDA-MB-435	X	X							X		(78)
	Me4405			X								(68)
	Mel-501			X	X		X					(79)
	Melanócitos normais			X								(77)
	Mel-CV			X								(68)
	Mel-RM			X						X		(68)
	Mel-FH			X								(68)
	MeWo	X	X	X	X	X	X	X				(75,79)
	MM200			X						X		(68)
	SK-Mel-110			X								(68)
	SK-Mel-2									X		(80)
SK-Mel-28			X					X			(68,85,87)	

#### 4.2.2 Agentes terapêuticos utilizados em combinação com 2-deoxy-D-glucose

Para além disso, na Tabela 8 estão indicados os agentes terapêuticos utilizados em combinação com a 2-DG e os respetivos fenómenos avaliados em cada uma dessas combinações. Em anexo, está presente uma tabela mais completa acerca destes dados (Tabelas S6 e S7, em anexo).

**TABELA 8 - AGENTES TERAPÊUTICOS USADOS EM COMBINAÇÃO COM 2-DG E RESPECTIVOS FENÓMENOS AVALIADOS**

		<i>Fenómeno avaliado</i>										
<i>Combinação com 2-DG</i>		Níveis de ATP celular	Stress do RE/UPR; Autofagia	Apoptose	Potencial mitocondrial	Formação de ROS e RNS	Paragem do ciclo celular	Reparação de danos no DNA	Proliferação; migração; invasão celular	Viabilidade; toxicidade celular	Peroxidação lipídica	Referência
		3-metiladenina								X		(78)
		Cisplatina		X	X	X						(79,85)
		Cloxiquina							X			(88)
		Coronatina							X	X		(89)
		Estaurosporina		X		X						(79)
		Imiquimod			X							(82)
		Manose		X								(77,78)
		Metiljasmonato								X		(89)
		N-dodecilimidazol	X			X	X			X	X	(84)
		Pirimetamina	X	X	X	X	X	X				(79)
		Temozolamida		X								(79)
	TRAIL			X							(68,77)	

### 4.3 Estudos *in vitro*

#### 4.3.1 Tratamento do melanoma com 2-DG isolada

##### 4.3.1.1 Ação anticancerígena: Diminuição de ATP celular (inibição da glicólise)

Em quatro dos artigos selecionados foram avaliados os níveis de ATP celular, de modo a investigar se a molécula 2-DG seria capaz de inibir a glicólise (77–79,84).

Num dos estudos, foi utilizada a linha celular MeWo, cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (20mM) durante (16-72)h. Através da avaliação temporal da produção de ATP por Ensaio de bioluminescência (onde é utilizada a enzima luciferase para a produção de luz na presença de ATP) verificou-se uma diminuição progressiva dos níveis de ATP em 60% a partir das 48h de tratamento, quando comparado com o controlo não tratado (Tabela 9) (79).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (10mM), durante 15h, 30h, 60h e 120h. A concentração intracelular de ATP foi determinada pelo ensaio de bioluminescência, no qual se observou uma redução dos níveis de ATP de cerca de 12,5% às 15h e 30h, de 25% às 60h e de 50% às 120h, quando comparado com os controlos não tratados (Tabela 9) (84).

As linhas celulares C8161 e A375 foram cultivadas em meio RPMI ou *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), respetivamente, e os níveis de ATP intracelular foram medidos. As células C8161 foram tratadas com 10mM de 2-DG e as células A375 com 20mM de 2-DG, durante 24h. Ambas as linhas celulares exibiram uma redução de aproximadamente 50% dos níveis de ATP, comparativamente com os controlos não tratados (Tabela 9) (77).

**TABELA 9- RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA DIMINUIÇÃO DE ATP CELULAR (INIBIÇÃO DA GLICÓLISE) (↓-DIMINUIÇÃO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (níveis de ATP celular)	Referência
MeWo	20mM	(16-72)h	Ensaio de bioluminescência	↓60%	(79)
B16F0	10mM	15h		↓≈12,5%	(84)
		30h			
		60h		↓≈25%	
		120h		↓≈50%	
A375	20mM	24h		↓≈50%	(77)
C8161	10mM				

#### 4.3.1.2 Ação anticancerígena: Stress do retículo endoplasmático, resposta a proteínas não dobradas e indução da autofagia

O stress do retículo endoplasmático (RE) e a indução da autofagia são processos citoprotetores que contribuem para a sobrevivência das células de melanoma. Estes

processos foram avaliados em 3 estudos distintos, com 3 linhas celulares diferentes na presença de 2-DG. Todos eles recorreram à análise de *Western blotting* (78,79,86).

No que diz respeito à linha celular MDA-MB-435, esta foi cultivada em meio DMEM. O stress do retículo endoplasmático, a resposta a proteínas não dobradas (UPR) e a autofagia foram avaliados com marcadores de stress do RE/UPR (Grp78 e CHOP) e de autofagia (LC3BII). Verificou-se que o tratamento com 2-DG (10mM) durante 16h, levou ao aumento da expressão dos marcadores Grp78, CHOP e LC3BII, o que indica que houve um aumento do stress do RE/UPR e indução da autofagia, comparativamente ao grupo de controlo não tratado (Tabela 10) (78).

No que respeita às células MeWo cultivadas em meio RPMI 1640, foram tratadas com 2-DG (20mM) durante 48h, tendo-se verificado um aumento da expressão do marcador LC3BII, o que indica que houve indução da autofagia, comparativamente ao grupo de controlo (Tabela 10) (79).

Por outro lado, as linhas celulares de melanoma humano A375 e G-361 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 10mM de 2-DG durante 18h. Através da avaliação dos marcadores Grp78 e Grp94 que aumentaram a sua expressão, foi possível verificar que houve indução do stress do retículo endoplasmático pela 2-DG, em relação ao controlo não tratado (Tabela 10) (86).

**TABELA 10 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NO STRESS DO RE/UPR E INDUÇÃO DA AUTOFAGIA (↑-AUMENTO; LC3BII-MARCADOR DE AUTOFAGIA; GRP78 E GRP79-MARCADORES DE STRESS DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Expressão dos marcadores de stress do RE e autofagia)	Referência
MeWo	20mM	48h	<i>Western blotting</i>	↑ LC3BII	(79)
A375; G-361	10mM	18h		↑ Grp78 e Grp94	(86)

#### 4.3.1.3 Ação anticancerígena: Apoptose

Em cinco estudos selecionados foi avaliada a indução da apoptose após tratamento celular com 2-DG. Nesses estudos foram utilizadas diferentes linhas celulares de melanoma.

As linhas celulares Mel-RM e MM200 foram cultivadas em meio DMEM e tratadas com 2-DG (10 $\mu$ M) durante 48h, onde não se observou indução da apoptose, em relação ao grupo de controlo (68). Por outro lado, foi realizado o tratamento das linhas celulares Mel-RM, MM200, IgR3, Mel-CV, Mel-FH, SK-Mel-110, SK-Mel-28, Me4405 e os melanócitos humanos HEMn-MP com 2-DG (10 $\mu$ M) durante 24h, que provocou um aumento da apoptose em aproximadamente 5% para todas as células, em relação ao grupo de controlo, no entanto este resultado não foi considerado estatisticamente significativo. Em ambos os casos, a apoptose foi avaliada por citometria de fluxo usando o corante iodeto de propídio (Tabela 11) (68).

Nas linhas celulares C8161, A375 e melanócitos normais a apoptose foi medida por citometria de fluxo após coloração com anexina-V-FITC e iodeto de propídio. As células C8161 e melanócitos normais foram tratados com 2-DG nas concentrações 10mM e as células A375 com 20mM, durante 24h. A linha celular C8161 exibiu um aumento da apoptose em  $\approx$ 5%, em comparação com o grupo de controlo, no entanto não foi considerado um valor estatisticamente significativo. Para as células A375 e para os melanócitos normais não se verificou nenhuma alteração dos níveis de apoptose, em relação ao grupo de controlo (Tabela 11) (77).

As linhas celulares MeWo e Mel-501 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 2-DG (20mM) durante 24h, 48h e 72h. A apoptose foi medida por citometria de fluxo após coloração com anexina-V-FITC e iodeto de propídio. Para ambas as células não se verificou indução da apoptose, quando comparado com os controlos não tratados (Tabela 11) (79).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F10 foi cultivada em meio DMEM e tratada com 2-DG (5mM), durante 24h. A apoptose foi medida por citometria de fluxo com o corante iodeto de propídio, não se tendo verificado aumento da apoptose, comparativamente ao controlo não tratado (Tabela11) (82).

**TABELA 11 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA APOPTOSE (N.S. – NÃO SIGNIFICATIVO; ↑-AUMENTO; O SÍMBOLO “-” INDICA QUE NÃO HOUVE ALTERAÇÃO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Apoptose)	Referência
Mel-RM e MM200	10µM	48h	Citometria de fluxo com o corante iodeto de propídio.	-	(68)
Mel-RM, MM200, IgR3, Mel-CV, Mel-FH, SK-Mel-110, SK-Mel-28, Me4405 e Melanócitos humanos HEMn-MP		24h		↑5% (n.s.)	
Melanócitos normais	10mM	24h	Citometria de fluxo com os corantes anexina-V-FITC e iodeto de propídio	-	(77)
C8161				↑≈5% (n.s.)	
A375	20mM			-	
MeWo; Mel-501	20mM	24h, 48h, 72h		-	(79)
B16F10	5mM	24h	Citometria de fluxo com corante iodeto de propídio	-	(82)

#### 4.3.1.4 Ação anticancerígena: Análise da função mitocondrial (potencial de membrana mitocondrial)

A hiperpolarização mitocondrial caracteriza-se pelo aumento do potencial da membrana mitocondrial e contribui para o desenvolvimento do tumor (90). Por outro lado, a diminuição do potencial de membrana mitocondrial contribui para a inibição destes fenómenos, ajudando então no tratamento do melanoma. Como tal, o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado nalguns dos estudos selecionados (79,83,84).

No que diz respeito às linhas celulares MeWo e Mel-501, estas foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 2-DG (20mM) durante 24, 48 e 72 horas. Foi medido o potencial de membrana mitocondrial através de citometria de fluxo usando sonda JC-1, que é um corante que se acumula nas mitocôndrias indicando o aumento do potencial mitocondrial. Para as células MeWo, foi possível observar um aumento do potencial de membrana mitocondrial em aproximadamente 20% às 24h e 50% às 48 e 72 horas de tratamento com 2-DG, comparativamente ao grupo de controlo não tratado. No que diz respeito à linha celular Mel-501, foi possível observar um aumento do potencial mitocondrial de cerca de 20% às 24h e de 40% às 48h e 72h, comparativamente ao grupo sem tratamento (Tabela 12) (79).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (10mM), durante 1h. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo por intensidade de fluorescência do corante *MitoTracker Red*, no qual não se verificou nenhuma alteração, relativamente ao grupo de controlo (Tabela 12) (84).

**TABELA 12 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA ANÁLISE DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (↑-AUMENTO; O SÍMBOLO “-” INDICA QUE NÃO HOUE ALTERAÇÃO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Potencial mitocondrial)	Referência
MeWo	20mM	24h	Citometria de fluxo usando sonda JC-1	↑ ≈20%	(79)
		48h; 72h		↑ ≈50%	
Mel-501	20mM	24h		↑ ≈ 20%	
		48h; 72h		↑ ≈40%	
B16F0	10mM	1h	Citometria de fluxo com corante <i>MitoTracker Red</i>	-	(84)

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

Num dos artigos selecionados, foi investigado o efeito da 2-DG no ciclo celular. Para isso, as células MeWo foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 2-DG (20mM) por 72h. Através da análise da distribuição do ciclo celular por citometria de fluxo

com bromodeoxiuridina (BrdU) e iodeto de propídio, verificou-se um aumento de células em fase G0/G1 e diminuição do número de células em fase S, comparativamente ao grupo sem tratamento (Tabela 13) (79).

**TABELA 13 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA PARAGEM DO CICLO CELULAR (↑-AUMENTO; ↓-DIMINUIÇÃO; BRDU-BROMODEOXIURIDINA)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Alterações no ciclo celular)	Referência
MeWo	20mM	72h	Citometria de fluxo com corante iodeto de propídio e BrdU	↑ células em fase G0/G1 ↓ células em fase S	(79)

#### 4.3.1.6 Ação anticancerígena: Formação de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio

As espécies reativas de oxigénio (ROS) e de nitrogénio (RNS) atuam em conjunto para provocar stress oxidativo e nitrosativo celular e, dessa forma, contribuir para danificar a célula. Desse modo, a formação de ROS e RNS foi avaliada nalguns dos estudos selecionados (79,84).

As células MeWo foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 20mM de 2-DG, durante 48h. A formação de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de espécies reativas de nitrogénio (RNS) foi avaliada através de citometria de fluxo da formação de espécies oxidantes reativas com dihidrorodamina-123 (DHR-123) e citometria de fluxo da produção de óxido nítrico (NO) medida por fluorescência 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), respetivamente. Não foi observada alteração significativa na formação de ROS ( $\approx 12,5\%$ ), no entanto verificou-se um aumento da formação de RNS de cerca 46,5% em relação ao grupo de controlo (Tabela 14) (79).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (10mM), durante 1h. A formação de ROS foi avaliada através da oxidação de DHR-123 por citometria de fluxo, tendo-se observado formação de ROS em aproximadamente 12,5%, em relação ao grupo sem tratamento. Este valor não foi considerado estatisticamente significativo (Tabela 14) (84).

**TABELA 14 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA FORMAÇÃO DE ROS E RNS (n.s.—NÃO SIGNIFICATIVO; ↑-AUMENTO; ROS-ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO; RNS-ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÉNIO; DAF-2-4,5-DIAMINOFLORESCÉINA; DHR-123-DIHDRORODAMINA-123)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Níveis de RNS e ROS)	Referência
MeWo	20mM	48h	Citometria de fluxo da produção de NO avaliada por fluorescência DAF-2	↑RNS ≈46,5%	(79)
B16F0	10mM	1h	Citometria de fluxo da formação de espécies oxidantes reativas com DHR-123	↑ ROS ≈12,5% (n.s.)	(84)

#### 4.3.1.7 Ação anticancerígena: Inibição dos processos de reparação do DNA pós-irradiação

Foi avaliado o potencial da 2-DG na inibição dos processos de reparação de DNA pós-irradiação (células expostas a 250KV de raios-X) nas linhas celulares de melanoma humano MeWo e Be-11 que foram cultivadas em meio DMEM. O dano no DNA foi avaliado através do Ensaio do cometa, onde se verificou que o tratamento com 5mM de 2-DG durante 4h aumentou os danos no DNA provocados pela radiação nas células Be-11 em aproximadamente 30%, inibindo os processos de reparação pós-irradiação, quando comparado com os controlos não tratados. Nas mesmas condições, o mesmo não sucedeu nas células MeWo, pois nestas células a 2-DG não provocou uma alteração no dano no DNA pós-irradiação, em comparação com os controlos não tratados (Tabela 15) (75).

**TABELA 15- RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA INIBIÇÃO DOS PROCESSOS DE REPARO DO DNA PÓS-IRRADIAÇÃO (↑-AUMENTO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Aumento do dano no DNA)	Referência
Mewo	5mM	4h	Ensaio do cometa	-	(75)
Be-11				↑≈30%	

#### 4.3.1.8 Ação anticancerígena: Inibição da proliferação, migração e invasão celular

A linha celular de melanoma de ratinho B16F10 foi cultivada em meio DMEM e tratada com 2-DG (5mM) durante 24h, resultando na inibição da migração e proliferação celular em aproximadamente 20% e 50%, respetivamente, quando comparado com o grupo de controlo. A migração foi analisada através de *wound healing assay*, enquanto que a proliferação foi analisada através de *EdU incorporation assay* (Tabela 16) (88).

Em relação às linhas celulares A375 e SK-Mel-28, foram cultivadas em meio DMEM e tratadas com 2-DG (10mM) durante 96h. Através do Ensaio de redução de Tetrazólio (MTT) foi avaliada a proliferação celular, tendo-se verificado inibição desta em aproximadamente 30% e 20% para as células A375 e SK-Mel-38, respetivamente, comparando com os controlos não tratados. Foi também avaliada a migração celular através do Ensaio de *Scratch*, em que o tratamento com 2-DG (10mM) durante 16h revelou a inibição da migração celular em cerca de 40% e 50% para as células A375 e SK-Mel-28, respetivamente, em relação ao grupo sem tratamento. Por outro lado, as linhas celulares A375 e SK-Mel-28 foram também cultivadas em meio DMEM e tratadas com 2-DG (10mM) durante 24h e foi avaliada a invasão celular através de *Transwell chamber assay*. A 2-DG exibiu efeito inibitório da invasão celular em cerca de 50% nas células A375 e 20% nas células SK-Mel-28, quando comparado com o controlo não tratado. (Tabela 16) (87).

Por outro lado, as linhas celulares de melanoma humano A375 e A2058 foram cultivadas em meio DMEM e tratadas com 0,5mM de 2-DG, durante 24h. Foi realizado o ensaio de proliferação celular com BrdU, onde se observou uma diminuição da proliferação celular, em aproximadamente 10% nas células A375 e de 5% nas células A2058, quando comparado com o controlo não tratado (Tabela 16) (89).

**TABELA 16- RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO, MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR (MTT- ENSAIO DE REDUÇÃO DE TETRAZÓLIO; BRDU-BROMODEOXIURIDINA)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados	Referência
B16F10	5mM	24h	<i>Wound healing assay</i>	Inibição da migração celular em ≈20%	(88)
			<i>EdU incorporation assay</i>	Inibição da proliferação celular em ≈50%	
A375	10mM	16h	<i>Scratch assay</i>	Inibição da migração celular em ≈40%	(87)
		24h	<i>Transwell chamber assay</i>	Inibição da invasão celular em ≈50%	
		96h	Ensaio MTT	Inibição da proliferação celular em ≈30%	
SK-Mel-28	10mM	16h	<i>Scratch assay</i>	Inibição da migração celular em ≈50%	(87)
		24h	<i>Transwell chamber assay</i>	Inibição da invasão celular em ≈20%	
		96h	Ensaio MTT	Inibição da proliferação celular em ≈20%	
A375	0,5mM	24h	Ensaio de proliferação celular com BrdU	Inibição da proliferação em ≈10%	(89)
A2058				Inibição da proliferação em ≈5%	

#### 4.3.1.9 Ação anticancerígena: Viabilidade e toxicidade celular

Nalguns dos estudos selecionados para esta análise, foi avaliada a viabilidade e toxicidade celular em células distintas, sujeitas ao tratamento com 2-DG em diferentes concentrações.

Em relação às linhas celulares Mel-RM e MM200 cultivadas em meio DMEM e tratadas com 2-DG (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 20 $\mu$ M) durante 48h, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular em aproximadamente 10% (1 $\mu$ M), 20% (5 $\mu$ M) e 50% (10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M) nas células Mel-RM e de 10% (1 $\mu$ M), 20% (5 $\mu$ M) e 60% (10 $\mu$ M e 20 $\mu$ M) nas MM200, quando comparado com o controlo não tratado. Por outro lado, o tratamento com 2-DG (10 $\mu$ M) durante 72h, provocou uma diminuição da viabilidade celular, tendo atingido o valor de aproximadamente 50% para ambas as linhas celulares, em comparação com o grupo sem tratamento. Em todos os casos a viabilidade celular foi medida pelo Ensaio MTT (Tabela 17) (68).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (5mM, 10mM, 20mM), durante 24h. A viabilidade celular foi analisada por ensaio de cristal violeta. Observou-se uma diminuição da viabilidade celular em aproximadamente 45%, 50% e 60% quando foi usada a 2-DG nas concentrações de 5mM, 10mM e 20mM, respetivamente, em relação aos controlos não tratados (Tabela 17). Foi também avaliada a citotoxicidade pelo ensaio de libertação de lactato desidrogenase (LDH), tendo-se verificado um aumento de aproximadamente 5%, em comparação com o grupo controlo, no entanto não foi considerado um valor estatisticamente significativo (Tabela 18) (84).

As linhas celulares A375 e A2058 foram cultivadas em meio DMEM e tratadas com 2-DG (0,5mM) durante 24h. A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio MTT. Para ambas as linhas celulares, a viabilidade celular diminuiu aproximadamente 10%, em relação ao controlo não tratado (Tabela 17) (89).

A linha celular de melanoma MDA-MB-435 foi cultivada em meio DMEM e foi submetida ao tratamento com 2-DG (16mM e 24mM), durante 48h. A citotoxicidade foi realizada pelo teste de exclusão de azul de tripano, onde não se verificou aumento desta (Tabela 18) (78).

**TABELA 17 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA VIABILIDADE CELULAR (MTT-ENSAIO DE REDUÇÃO DE TETRAZÓLIO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Diminuição da viabilidade celular)	Referência		
Mel-RM	1µM	48h	Ensaio MTT	≈10%	(68)		
	5µM			≈20%			
	10µM			≈50%			
	20µM						
	10µM	72h					
MM200	1µM	48h				≈10%	(68)
	5µM			≈20%			
	10µM			≈60%			
	20µM						
	10 µM	72h		≈ 50%			
B16F0	5mM	24h	Ensaio de cristal violeta	≈45%	(84)		
	10mM			≈50%			
	20mM			≈60%			
A375; A2058	0,5mM	24h	Ensaio MTT	≈10%	(89)		

**TABELA 18 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA CITOTOXICIDADE (N.S.- NÃO SIGNIFICATIVO; O SÍMBOLO “-” INDICA QUE NÃO HOUE ALTERAÇÃO; LDH-LACTATO DESIDROGENASE)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados (Aumento da citotoxicidade)	Referência
B16F0	5mM	24h	Ensaio de libertação de LDH	≈5% (n.s.)	(84)
	10mM				
	20mM				
MDA- MB-345	16mM; 24mM	48h	Teste de exclusão de azul de tripano	-	(78)

#### 4.3.1.10 Ação anticancerígena: Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é um fenómeno que contribui para o stress oxidativo e foi avaliada num dos estudos selecionados, no qual foi usada a linha celular de melanoma de ratinho B16F0, que foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (10mM) durante 1h. Verificou-se peroxidação lipídica nas células tratadas com 2-DG, avaliada através do ensaio de ácido tiobarbitúrico colorimétrico por medição de malondialdeído (MDA), quando comparado com os controlos não tratados (Tabela 19) (84).

**TABELA 19 - RESULTADOS DA 2-DG ISOLADA NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (MDA-MALONDIALDEÍDO; ↑-AUMENTO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados	Referência
B16F0	10mM	1h	Ensaio de ácido tiobarbitúrico colorimétrico por medição de MDA	↑ Peroxidação lipídica	(84)

#### 4.3.2 Tratamento do melanoma com 2-DG em combinação terapêutica

##### 4.3.2.1 Ação anticancerígena: Diminuição de ATP celular (inibição da glicólise)

As células MeWo foram cultivadas em meio RPMI 1640 durante um intervalo de tempo de (16-72)h e tratadas com 2-DG (20mM) e pirimetamina (64µM), um indutor da apoptose. A partir das 48h de tratamento verificou-se diminuição de 60% dos níveis de ATP, em relação ao grupo de controlo. O tratamento com pirimetamina isolada provocou uma diminuição dos níveis de ATP de 85%, em relação ao grupo de controlo. Esta análise foi realizada através do ensaio de bioluminescência (Tabela 20) (79).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 10mM de 2-DG e 40µM de N-dodecilimidazol (NDI), durante 15h, 30h, 60h e 120h. O NDI tem propriedades surfactantes e é capaz de romper a membrana lisossomal, levando à morte celular (91,92). A concentração intracelular de ATP foi determinada pelo ensaio de bioluminescência, no qual se observou uma redução dos níveis de ATP de cerca de 37,5% (15h), 50% (30h), 62,5% (60h) e 100% (120h) após o

tratamento com a combinação 2-DG / NDI, em relação ao grupo de controlo. O tratamento com NDI isolado diminui os níveis de ATP celular em aproximadamente 12,5%, 25%, 37,5% e 87,5%, após 15h, 30h, 60h e 120h, respetivamente, comparativamente ao grupo de controlo (Tabela 20) (84).

**TABELA 20 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA DIMINUIÇÃO DE ATP CELULAR (INIBIÇÃO DA GLICÓLISE) (↓-DIMINUIÇÃO; NDI-N-DODECILIMIDAZOL)**

Linhas celulares	Duração do tratamento	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Resultados (níveis de ATP celular)		Referência
				Agente terapêutico isolado	Combinação terapêutica	
MeWo	(16-72)h	20mM	Pirimetamina (64µM)	↓85%	↓ 60%	(79)
B16F0	15h	10mM	NDI (40µM)	↓≈12,5%	↓ ≈37,5%	(84)
	30h			↓≈25%	↓≈50%	
	60h			↓≈37,5%	↓≈62,5%	
	120h			↓≈87,5%	↓≈100%	

#### 4.3.2.2 Ação anticancerígena: Stress do RE/UPR e indução da autofagia

As células MeWo foram cultivadas em meio RPMI 1640 e foi realizado o tratamento combinado entre 2-DG e temozolamida, pirimetamina, estaurosporina ou cisplatina. Foi avaliada a autofagia por análise *Western blotting* com o marcador de autofagia LC3BII. Verificou-se que a combinação de 2-DG (20mM) com temozolamida (100µM), um medicamento quimioterápico utilizado no tratamento do melanoma, durante 48h, conduziu ao aumento da expressão do marcador LC3BII, quando comparado ao grupo de controlo. A temozolamida isolada não induziu nenhuma alteração na expressão deste marcador, quando comparado ao grupo de controlo (Tabela 21) (79).

O tratamento entre 2-DG (20mM) e pirimetamina (64µM) durante 48h levou ao aumento da expressão do marcador LC3BII, em relação ao grupo de controlo. Quando as células foram tratadas com pirimetamina isolada, verificou-se um aumento da expressão

do marcador, em relação ao grupo de controlo, no entanto esse aumento foi menor do que o observado para a combinação entre 2-DG e pirimetamina (Tabela 21) (79).

Por outro lado, as células foram expostas a 2-DG (20mM) com cisplatina (1µM), um fármaco capaz de se ligar diretamente ao DNA e conduzir à apoptose (93), por 48h, que provocou uma diminuição da expressão de LC3BII, em relação ao grupo de controlo. O tratamento com cisplatina isolada levou também a uma diminuição da expressão de LC3BII, em relação ao grupo de controlo, no entanto essa diminuição foi menor do que a observada para o tratamento combinado entre 2-DG e cisplatina (Tabela 21) (79).

Por fim, as células foram expostas ao tratamento entre 2-DG (20mM) e estaurosporina (1µM), um indutor da apoptose durante 48h. Verificou-se diminuição da expressão de LC3BII em relação ao grupo de controlo. Quando as células foram tratadas com estaurosporina isolada, também se observou diminuição da expressão do marcador, em relação ao grupo de controlo, porém essa diminuição foi em maior extensão do que a observada para a combinação entre 2-DG e estaurosporina (Tabela 21) (79).

**TABELA 21 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NO STRESS DO RE/UPR E INDUÇÃO DA AUTOFAGIA (↓-DIMINUIÇÃO; ↓↓-DIMINUIÇÃO SUPERIOR; ↑-AUMENTO; ↑↑-AUMENTO SUPERIOR; O SÍMBOLO “-” INDICA QUE NÃO HOUVE ALTERAÇÃO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (expressão de LC3BII)		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
MeWo	20mM	Cisplatina (1µM)	48h	↓	↓↓	(79)
		Estaurosporina (1µM)		↓↓	↓	
		Pirimetamina (64µM)		↑	↑↑	
		Temozolomida (100µM)		-	↑	

#### 4.3.2.3 Ação anticancerígena: Apoptose

A linha celular de melanoma de ratinho B16F10 foi cultivada em meio DMEM e tratada com 2-DG (5mM) e imiquimod, um composto sintético com atividade anti-tumoral (94), em diversas concentrações (10, 25, 50 µg/mL) durante 24h. Verificou-se que a combinação entre 2-DG e imiquimod conduziu ao aumento da apoptose em aproximadamente 8%, 13% e 38% para as doses de 10µg/mL, 25µg/mL e 50µg/mL, respetivamente, quando comparado com o grupo de controlo. Em relação ao imiquimod isolado, este provocou aumento da apoptose em aproximadamente 4%, 7% e 19% para as concentrações de 10µg/mL, 25µg/mL e 50µg/mL, respetivamente, quando comparado com o grupo de controlo. A apoptose foi medida por citometria de fluxo com o corante iodeto de propídio (Tabela 22) (82).

O ligando indutor da apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (TRAIL), demonstrou ser capaz de induzir a apoptose em células malignas (95–97). Dessa forma, nalguns estudos selecionados foi avaliado o potencial entre a combinação de 2-DG e TRAIL na indução da apoptose em células de melanoma. As linhas celulares Mel-RM e MM200 foram cultivadas em meio DMEM e tratadas com a combinação 2-DG (10µM) e TRAIL (200ng/mL) durante 48h. Verificou-se um aumento da percentagem de células apoptóticas em cerca de 60% e 80% nas células Mel-RM e MM200, respetivamente, comparando com o grupo de controlo. Em relação ao tratamento com TRAIL isolado, este foi capaz de aumentar a apoptose com valores de cerca de 30% e 40% para as células Mel-RM e MM200, respetivamente, em comparação com o controlo não tratado. Por outro lado, o tratamento com 2-DG (10µM) e TRAIL (200ng/mL) durante 24h provocou um aumento da apoptose nas linhas celulares Mel-RM (≈60%), MM200 (≈90%), Mel-CV(≈ 85%), Mel-FH (≈50%), SK-Mel-110 (≈40%), SK-Mel-28 (≈45%), Me4405 (≈90%), e nos melanócitos humanos HEMn-MP (≈15%), comparativamente aos controlos não tratados. Em relação ao tratamento com TRAIL isolado, este apresentou um aumento da apoptose nestas células de cerca de 30% (Mel-RM), 45% (MM200), 40% (Mel-CV), 25% (Mel-FH), 20% (SK-Mel-110), 22% (SK-Mel-28), 45% (Me4405) e 8% nos melanócitos humanos HEMn-MP, em relação aos controlos não tratados. Para as células IgR3, o tratamento com 2-DG e TRAIL provocou um aumento da apoptose em aproximadamente 10%, quando comparado ao controlo não tratado. Quando estas células foram tratadas

com TRAIL isolado observou-se uma indução da apoptose de aproximadamente 5%. Para as células IgR3 os valores da apoptose não foram considerados estatisticamente significativos. Em todos os casos a apoptose foi medida por citometria de fluxo usando o corante iodeto de propídio (Tabela 22) (68).

As linhas celulares de melanoma A375 e C8161, e melanócitos normais, foram tratados com 2-DG e TRAIL. As células C8161 e os melanócitos foram tratados com 10mM de 2-DG e as A375 com 20mM de 2-DG em combinação com TRAIL (100ng/mL), durante 24h. Para as células A375 verificou-se um aumento da apoptose de aproximadamente 40% e para as C8161 e de 55%, em relação aos controlos não tratados. Já para os melanócitos normais não se verificou aumento da apoptose, quando comparado com o controlo não tratado. Quando as células foram sujeitas ao tratamento com TRAIL isolado, observou-se aumento da apoptose em cerca de 10% nas células A375 e de 15% nas C8161, em relação aos controlos não tratados. Nos melanócitos não se verificou nenhum aumento da apoptose, em relação ao grupo sem tratamento (Tabela 22) (77).

Foi também avaliado o potencial terapêutico da combinação entre 2-DG com pirimetamina na indução da apoptose em células de melanoma. As linhas celulares MeWo e Mel-501 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 2-DG (20mM) e pirimetamina (64µM), durante 24h, 48h e 72h. A apoptose foi avaliada por citometria de fluxo após coloração com anexina-V-FITC e iodeto de propídio. Verificou-se um aumento da apoptose nas células MeWo de aproximadamente 5% às 48h e de 10% às 72h, não se verificando nenhum aumento às 24h, quando comparado com o grupo de controlo. O tratamento com pirimetamina isolada nestas células levou a um aumento da apoptose de cerca de 20% (24h), 30% (48h) e 40% (72h), relativamente aos controlos não tratados. Para as células Mel-501, a combinação entre 2-DG e pirimetamina nas mesmas concentrações, levou ao aumento da apoptose em cerca de 10% (48h), 25% (72h), não se tendo verificado nenhum aumento às 24h, comparativamente ao grupo de controlo. O tratamento com pirimetamina isolada conduziu a um aumento da apoptose de aproximadamente 35% (48h) e 45% (72h), não se tendo verificado aumento às 24h, em relação ao grupo de controlo não tratado (Tabela 22) (79).

**TABELA 22 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA APOPTOSE (N.S. – NÃO SIGNIFICATIVO; TRAIL- LIGANDO INDUTOR DA APOPTOSE RELACIONADO AO FATOR DE NECROSE TUMORAL; ↑-AUMENTO; O SÍMBOLO “-” INDICA QUE NÃO HOUVE ALTERAÇÃO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Apoptose)		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
B16F10	5mM	Imiquimod (10µg/mL)	24h	↑≈4%	↑≈8%	(82)
		Imiquimod (25µg/mL)		↑≈7%	↑≈13%	
		Imiquimod (50µg/mL)		↑≈19%	↑≈38%	
Mel-RM	10µM	TRAIL (200ng/mL)	48h	↑≈30%	↑≈60%	(68)
MM200				↑≈40%	↑≈80%	
Mel-RM			24h	↑≈30%	↑≈60%	
MM200				↑≈45%	↑≈90%	
Mel-CV				↑≈40%	↑≈85%	
Mel-FH				↑≈25%	↑≈50%	
SK-Mel-110				↑≈20%	↑≈40%	
SK-Mel-28				↑≈22%	↑≈45%	
Mel4405				↑≈45%	↑≈90%	
Melanócitos humanos HEMn-MP				↑≈8%	↑≈15%	
IgR3				↑≈5% (n.s.)	↑≈10% (n.s.)	
C8161	10mM	TRAIL (100ng/mL)	24h	↑≈15%	↑≈55%	(77)
A375	20mM			↑≈10%	↑≈40%	
Melanócitos normais	10mM			-	-	

**TABELA 22 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA APOPTOSE (N.S. – NÃO SIGNIFICATIVO; TRAIL- LIGANDO INDUTOR DA APOPTOSE RELACIONADO AO FATOR DE NECROSE TUMORAL; ↑-AUMENTO; O SÍMBOLO “-” INDICA QUE NÃO HOUVE ALTERAÇÃO) (CONTINUAÇÃO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Apoptose)		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
MeWo	20mM	Pirimetamina (64µM)	24h	↑ ≈20%	-	(79)
			48h	↑ ≈30%	↑ ≈5%	
			72h	↑ ≈40%	↑ ≈10%	
Mel-501			24h	-	-	
			48h	↑ ≈35%	↑ ≈10%	
			72h	↑ ≈45%	↑ ≈25%	

#### 4.3.2.4 Ação anticancerígena: Análise de mitocôndrias (potencial de membrana mitocondrial)

As linhas celulares MeWo e Mel-501 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 2-DG (20mM) durante 24h, 48h e 72h. O efeito da 2-DG no potencial de membrana mitocondrial em ambas as células, foi determinado por citometria de fluxo usando sonda JC-1. Nas células MeWo, a combinação de 2-DG (20mM) com cisplatina (1µM) provocou uma diminuição do potencial mitocondrial de ≈30% às 24h e de ≈40% às 48h e 72h, em relação aos controlos não tratados. O tratamento com cisplatina isolada fez com que houvesse diminuição do potencial mitocondrial em cerca de 25% às 24h e 35% às 48h e 72h, em relação ao grupo de controlo. Estas células foram também tratadas com 2-DG (20mM) e estaurosporina (1µM), tendo-se verificado uma diminuição do potencial em aproximadamente 40% às 24h e 50% às 48h e 72h, em relação ao grupo de controlo. O tratamento com estaurosporina isolada levou à diminuição do potencial em cerca de 20% às 24h, 30% às 48h e 40% às 72h, em relação ao grupo de controlo. Foram ainda tratadas com 2-DG (20mM) em combinação com pirimetamina (64µM) que conduziu ao aumento do potencial em aproximadamente 10% às 24h e 40% às 48h e 72h,

quando comparado aos controlos não tratados. O tratamento com pirimetamina isolada levou ao aumento do potencial em cerca de 5% às 24h, 10% às 48h e diminuição de 45% às 72h, comparando com o grupo de controlo (Tabela 23) (79).

Por outro lado, nas células Mel-501, a combinação de 2-DG (20mM) com cisplatina (1 $\mu$ M) provocou uma diminuição do potencial mitocondrial de  $\approx$ 30% às 24h e 48h e de 35% às 72h, em relação aos controlos não tratados. O tratamento com cisplatina isolada provocou uma diminuição do potencial mitocondrial em cerca de 25% às 24h, 48h e 72h, em relação ao grupo de controlo. Estas células foram também tratadas com 2-DG (20mM) e estaurosporina (1 $\mu$ M), tendo-se verificado uma diminuição do potencial em aproximadamente 35% às 24h e 40% às 48h e 72h, em relação aos controlos não tratados. O tratamento com estaurosporina isolada levou à diminuição do potencial em cerca de 22% às 24h, 30% às 48h e 72h, em relação ao grupo de controlo. Foram ainda tratadas com 2-DG (20mM) em combinação com pirimetamina (64 $\mu$ M) que conduziu ao aumento do potencial em aproximadamente 10% às 24h, 25% às 48h, e 30% às 72h, quando comparado aos controlos não tratados. O tratamento com pirimetamina isolada levou ao aumento do potencial em cerca de 5% às 24h, e diminuição em 35% às 48h e 40% às 72h, comparativamente ao grupo de controlo (Tabela 23) (79).

Ao tratar a linha celular de melanoma de ratinho B16F0, cultivada em meio RPMI 1640, com 2-DG (10mM) e NDI (40 $\mu$ M) durante 1h, verificou-se uma diminuição do potencial mitocondrial em cerca de 40%, quando comparado com o controlo não tratado. Quando as células foram expostas ao tratamento com NDI isolado, verificou-se uma diminuição do potencial mitocondrial em aproximadamente 10%, em relação ao grupo de controlo. O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por citometria de fluxo por intensidade de fluorescência do corante *MitoTracker Red* (Tabela 23) (84).

**TABELA 23 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA ANÁLISE DE MITOCÔNDRIAS (POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL) (↓-DIMINUIÇÃO; ↑-AUMENTO; NDI-N-DODECILIMIDAZOL)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Potencial mitocondrial)		Referência		
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica			
MeWo	20mM	Cisplatina (1µM)	24h	↓ ≈25%	↓ ≈30%	(79)		
			48h; 72h	↓ ≈35%	↓ ≈40%			
		Estaurosporina (1µM)	24h	↓ ≈20%	↓ ≈40%			
			48h	↓ ≈30%	↓ ≈50%			
			72h	↓ ≈40%				
		Pirimetamina (64µM)	24h	↑ ≈5%	↑ ≈10%			
			48h	↑ ≈10%	↑ ≈40%			
			72h	↓ ≈45%				
		Mel-501	20mM	Cisplatina (1µM)	24h		↓ ≈25%	↓ ≈30%
					48h			↓ ≈35%
72h								
Estaurosporina (1µM)	24h			↓ ≈22%	↓ ≈35%			
	48h; 72h			↓ ≈30%	↓ ≈40%			
Pirimetamina (64µM)	24h			↑ ≈5%	↑ ≈10%			
	48h			↓ ≈35%	↑ ≈25%			
	72h			↓ ≈40%	↑ ≈30%			
B16FO	10mM			NDI (40µM)	1h	↓ ≈10%	↓ ≈40%	(84)

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

As células MeWo foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com 2-DG (20mM) e pirimetamina (64µM) durante 72h. Na análise de citometria de fluxo com BrdU e iodeto de propídio, verificou-se um aumento do número de células em fase G0/G1 e diminuição de células em fase S após o tratamento com a combinação, quando comparado com o grupo de controlo. Por outro lado, quando as células foram sujeitas ao tratamento com pirimetamina isolada, observou-se uma diminuição do número de

células em fase G0/G1 e aumento de células em fase S, em relação ao grupo de controlo (Tabela 24) (79).

**TABELA 24 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA PARAGEM DO CICLO CELULAR (↓-DIMINUIÇÃO; ↓↓-DIMINUIÇÃO SUPERIOR; ↑-AUMENTO; ↑↑-AUMENTO SUPERIOR)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
MeWo	20mM	Pirimetamina (64µM)	72h	↓ células em fase G0/G1	↑↑ células em fase G0/G1	(79)
				↑ células em fase S	↓↓ células em fase S	

#### 4.3.2.6 Ação anticancerígena: Formação de oxigénio e nitrogénio

A linha celular MeWo foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com pirimetamina (64µM) e 2-DG (20mM) por 48h. Foi medida a formação de ROS e de RNS através de citometria de fluxo da formação de espécies oxidantes reativas com DHR-123 e citometria de fluxo da produção de NO medida por fluorescência DAF-2, respetivamente. A combinação entre 2-DG e pirimetamina provocou um aumento da formação de ROS em aproximadamente 6,3% (não estatisticamente significativo) e de RNS de 62%, em relação ao grupo de controlo. Quando as células foram tratadas com pirimetamina isolada, verificou-se um aumento da formação de ROS em aproximadamente 50% e de RNS de 19,5%, quando comparado ao grupo de controlo (Tabela 25) (79).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (10mM) e NDI (40µM) durante 1h. Foi provocado um aumento da formação de ROS em aproximadamente 50%, quando comparado com o grupo de controlo. O tratamento com NDI isolado provocou um aumento da formação de ROS em

15%, quando comparado com o controlo não tratado. A formação de ROS foi medida por oxidação de DHR-123 por citometria de fluxo (Tabela 25) (84).

**TABELA 25 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA FORMAÇÃO DE ROS E RNS (N.S. – NÃO SIGNIFICATIVO; ↑-AUMENTO; ↓-DIMINUIÇÃO; ROS-ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO; RNS-ESPÉCIES REATIVAS DE NITROGÉNIO; NDI-N-DODECILIMIDAZOL)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Formação de espécies reativas)		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
MeWo	20mM	Pirimetamina (64µM)	48h	↑ROS ≈50%	↑ROS ≈6,3% (n.s.)	(79)
				↑RNS ≈19,5%	↑RNS ≈62%	
B16F0	10mM	NDI (40µM)	1h	↑ROS ≈15%	↑ROS ≈50%	(84)

#### 4.3.2.7 Ação anticancerígena: Inibição da proliferação/migração celular

A linha celular de melanoma de ratinho B16F10 foi cultivada em meio DMEM e tratada durante 24h com 2-DG (5mM) e cloxiquina (1,5µM), um antibacteriano que exibe um efeito anti-tumoral. Tanto o tratamento com a combinação terapêutica, como o tratamento com a cisplatina isolada, conduziram à inibição da proliferação celular em aproximadamente 50% e da migração celular em 20%, quando comparado ao grupo de controlo. A análise da proliferação foi realizada através de *EdU incorporation assay* e a migração foi analisada utilizando *wound healing assay* (Tabela 26) (88).

As linhas celulares de melanoma humano A375 e A2058 foram cultivadas em meio DMEM e tratadas com 2-DG (0,5mM) e coronatina (0,01µM), um regulador do crescimento e da morte celular (89). Após 24h de tratamento, foi realizado o ensaio de proliferação celular com BrdU, onde se observou diminuição da proliferação celular, em aproximadamente 30% em ambas linhas, quando comparado com os grupos de controlo. Quando as células foram tratadas com coronatina isolada, verificou-se inibição da proliferação celular em 15% nas A375 e 5% nas A2058, comparativamente aos controlos não tratados (Tabela 26) (89).

**TABELA 26 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA INIBIÇÃO DA PROLIFERAÇÃO/MIGRAÇÃO CELULAR**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
B16F10	5 mM	Cloxiquina (1,5µM)	24h	Inibição da proliferação celular em ≈50%		(88)
				Inibição da migração celular em ≈20%		
A375	0,5mM	Coronatina (0,01µM)		Inibição da proliferação em ≈15%	Inibição da proliferação em ≈30%	(89)
A2058				Inibição da proliferação em ≈5%		

#### 4.3.2.8 Ação anticancerígena: Diminuição da viabilidade celular e aumento da citotoxicidade

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (5, 10, 20mM) e NDI (20, 40, 80µM), durante 24h. A viabilidade celular foi medida por ensaio de cristal violeta e a citotoxicidade pelo ensaio de libertação de LDH. Quando as células foram tratadas em combinação com 2-DG e NDI (20µM) verificou-se uma diminuição da viabilidade celular de 85% (5mM de 2-DG) e 95% (10mM e 20mM de 2-DG), em relação ao grupo de controlo. O tratamento com NDI (20µM) isolado provocou uma diminuição de 40%, em relação ao grupo de controlo. Quando as células foram tratadas com 2-DG e NDI (40µM), verificou-se uma diminuição da viabilidade celular em 90% (5mM de 2-DG) e 95% (10mM e 20mM de 2-DG), em relação ao grupo de controlo. O tratamento com NDI (40µM) isolado provocou uma diminuição de 50%, em relação ao grupo de controlo. O tratamento com 2-DG e NDI (80µM) diminuiu a viabilidade celular em 90% (5mM e 10mM de 2-DG) e 95% (20mM de 2-DG), em relação ao grupo de controlo. O tratamento com NDI (80µM) isolado provocou uma diminuição de 60%, em relação ao grupo de controlo (Tabela 27) (84).

No que diz respeito à citotoxicidade, quando as células foram tratadas com 2-DG e NDI (20 µM) verificou-se um aumento da citotoxicidade de 6% (5mM de 2-DG), 10% (10mM de 2-DG) e 15% (20mM de 2-DG), em relação ao grupo de controlo. Quando as

células foram tratadas com 2-DG e NDI (40 $\mu$ M), verificou-se um aumento da citotoxicidade em 15% (5mM de 2-DG), 25% (10mM de 2-DG) e 40% (20mM de 2-DG), em relação ao grupo de controlo. O tratamento com a combinação entre 2-DG e NDI (80 $\mu$ M) levou ao aumento da citotoxicidade em 55% (5mM de 2-DG), 65% (10mM de 2-DG) e 60% (20mM de 2-DG), comparativamente ao grupo de controlo. O tratamento com NDI isolado nas diferentes concentrações (20, 40, 80 $\mu$ M), não exibiu aumento da citotoxicidade, em relação aos controlos não tratados (Tabela 28) (84).

As linhas celulares A375 e A2058 foram cultivadas em meio DMEM e tratadas durante 24h com metiljasmonato (0,1; 0,3; 1 $\mu$ M), um indutor da morte celular, ou coronatina (0,01; 0,03; 0,1 $\mu$ M) em combinação com 2-DG (0,5mM). O efeito destes dois compostos em combinação com 2-DG foi avaliado através do ensaio MTT. Para as células A375, a combinação entre 2-DG e as diferentes concentrações de metiljasmonato diminuiu a viabilidade celular em cerca de 40% (0,1 $\mu$ M), 50% (0,3 $\mu$ M) e 55% (1 $\mu$ M). O tratamento com metiljasmonato isolado levou à redução de cerca de 10% (0,1 $\mu$ M), 20% (0,3 $\mu$ M) e 30% (1 $\mu$ M). O tratamento com 2-DG e as diferentes concentrações de coronatina levou à diminuição da viabilidade celular em cerca de 30% (0,01 $\mu$ M), 45% (0,03 $\mu$ M) e 50% (0,1 $\mu$ M). O tratamento com coronatina em monoterapia provocou uma diminuição de cerca de 10% (0,01 $\mu$ M), 20% (0,03 $\mu$ M) e 30% (0,1 $\mu$ M). Todos estes valores são comparados ao controlo não tratado (Tabela 27) (89).

Nas células A2058, a combinação entre 2-DG e as diferentes concentrações de metiljasmonato reduziu a viabilidade celular em cerca de 30% (0,1 $\mu$ M), 60% (0,3 $\mu$ M) e 65% (1,0 $\mu$ M). O tratamento com metiljasmonato em monoterapia levou à diminuição da viabilidade em cerca de 10% (0,1 $\mu$ M), 20% (0,3 $\mu$ M) e 25% (1,0 $\mu$ M). Por outro lado, o tratamento com 2-DG e diferentes concentrações de coronatina levou à diminuição da viabilidade celular em aproximadamente 30% (0,01 $\mu$ M), 50% (0,03 $\mu$ M) e 60% (0,1 $\mu$ M), enquanto que o tratamento com coronatina isolada conduziu à diminuição da viabilidade celular em cerca de 10% (0,01 $\mu$ M), 20% (0,03 $\mu$ M) e 30% (0,1 $\mu$ M). Estes resultados estão apresentados em relação ao grupo de controlo não tratado (Tabela 27) (89).

**TABELA 27 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA DIMINUIÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR (NDI-N-DODECILIMIDAZOL; MJ-METILJASMONATO; COR-CORONATINA)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Diminuição da viabilidade celular)		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
B16F0	5mM	NDI (20µM)	24h	≈40%	≈85%	(84)
		NDI (40µM)		≈50%	≈90%	
		NDI (80µM)		≈60%		
	10mM	NDI (20µM)		≈40%	≈95%	
		NDI (40µM)		≈50%		
		NDI (80µM)		≈60%	≈90%	
	20mM	NDI (20µM)		≈40%	≈95%	
		NDI (40µM)		≈50%		
		NDI (80µM)		≈60%		
A375	0,5mM	MJ (0,1 µM)	24h	≈10%	≈40%	(89)
		MJ (0,3 µM)		≈20%	≈50%	
		MJ (1 µM)		≈30%	≈55%	
		COR (0,01 µM)		≈10%	≈30%	
		COR (0,03 µM)		≈20%	≈45%	
		COR (0,1 µM)		≈30%	≈50%	
A2058		MJ (0,1 µM)		≈10%	≈30%	
		MJ (0,3 µM)		≈20%	≈60%	
		MJ (1 µM)		≈25%	≈65%	
		COR (0,01 µM)		≈10%	≈30%	
		COR (0,03 µM)		≈20%	≈50%	
		COR (0,1 µM)		≈30%	≈60%	

**TABELA 28 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NO AUMENTO DA CITOTOXICIDADE (NDI-N-DODECILIMIDAZOL)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Aumento da Citotoxicidade)		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
B16F0	5mM	NDI (20µM)	24h	-	≈6%	(84)
		NDI (40µM)			≈15%	
		NDI (80µM)			≈55%	
	10mM	NDI (20µM)			≈10%	
		NDI (40µM)			≈25%	
		NDI (80µM)			≈65%	
	20mM	NDI (20µM)			≈15%	
		NDI (40µM)			≈40%	
		NDI (80µM)			≈60%	

#### 4.3.2.9 Ação anticancerígena: Peroxidação lipídica

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi cultivada em meio RPMI 1640 e tratada com 2-DG (10mM) e NDI (40µM) durante 1h. Nestas condições, verificou-se um aumento da peroxidação lipídica, quando comparado com o grupo não tratado. Quando as células foram tratadas com NDI isolado, verificou-se também um aumento da peroxidação lipídica, em relação ao grupo de controle, no entanto foi inferior ao observado para a sua combinação com 2-DG. Esta análise foi realizada por ensaio de ácido tiobarbitúrico colorimétrico por medição de MDA (Tabela 29) (84).

**TABELA 29 - RESULTADOS DA 2-DG EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA NA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (NDI-N-DODECILIMIDAZOL; ↑-AUMENTO; ↑↑-AUMENTO SUPERIOR)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Peroxidação lipídica)		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
B16F0	10mM	NDI (40µM)	1h	↑peroxidação lipídica	↑↑peroxidação lipídica	(84)

#### 4.3.3 Alteração na molécula 2-DG (tetraacetato de 2-DG)

As células de melanoma Colo 38 foram cultivadas em meio RPMI 1640 e tratadas com tetraacetato de 2-DG nas concentrações de 100µM, 500µM e 1mM, por um período de 72h. Foi avaliada a citotoxicidade através do ensaio MTT, tendo-se verificado um aumento da citotoxicidade, que atingiu o máximo entre as 24 e as 48 horas de tratamento, quando a tetraacetato de 2-DG foi usada nas diferentes concentrações. O máximo de toxicidade celular ocorreu quando houve o tratamento com tetraacetato de 2-DG (500 µM) após 24h, que atingiu valores de aproximadamente 100%, relativamente ao grupo sem tratamento. De forma semelhante, o tratamento com 1mM de tetraacetato de 2-DG, revelou uma citotoxicidade às 24h com valores de cerca de 95%, em relação ao grupo de controlo. A exposição celular a tetraacetato de 2-DG (100µM) também aumentou a citotoxicidade, tendo atingido o valor máximo às 24h, com valores de aproximadamente 15%, no entanto permitiu a restauração da atividade metabólica e crescimento celular após 48h a 72h, em relação ao grupo não tratado. Foi também avaliada a apoptose quando as células foram tratadas com tetraacetato de 2-DG (500µM) durante 2h, 4h, 7h e 16h. Verificou-se indução da apoptose às 16h, comparativamente ao grupo sem tratamento. O mesmo não aconteceu para as durações de 2h, 4h e 7h. A apoptose foi avaliada usando citometria de fluxo com corante anexina-V-FITC e iodeto de propídio (Tabela 30) (74).

**TABELA 30 - RESULTADOS DA ALTERAÇÃO NA MOLÉCULA 2-DG (TETRAACETATO DE 2-DG) (MTT-ENSAIO DE REDUÇÃO DE TETRAZÓLIO)**

Linhas celulares	Concentração de tetraacetato de 2-DG	Duração do tratamento	Método	Resultados	Referência
Colo 38	100µM	72h	Ensaio MTT	Citotoxicidade de ≈15% às 24h e posterior restauração da atividade metabólica	(74)
	500 µM			Citotoxicidade de ≈100% a partir das 24h	
	1mM			Citotoxicidade de ≈95% a partir das 24h	
	500 µM	2h; 4h; 7h	Citometria de fluxo com corante anexina-V-FITC e iodeto de propídio	Sem indução da apoptose	
		16h		Com indução da apoptose	

#### 4.3.4 Alteração das condições celulares

##### 4.3.4.1 Alterações na expressão da glicoproteína Muc4

Nalguns dos estudos selecionados, foram alteradas as condições das células sujeitas ao tratamento com 2-DG. Num desses estudos, foi avaliado o papel da expressão da glicoproteína Muc4 na resistência à apoptose induzida pela 2-DG, nas células A375. Para isso a expressão celular de Muc4 foi induzida ou inibida e as células foram tratadas com 2-DG, por 72h. Recorrendo ao cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração de 2-DG que inibiu o crescimento celular em 50%), usando o método de exclusão de azul tripiano, foram obtidos os valores de IC<sub>50</sub> de 620µg/mL para as células em que foi inibida a expressão de Muc4 e de IC<sub>50</sub> superior a 2000µg/mL para as células em que foi induzida a expressão de Muc4 (Tabela 31) (76).

**TABELA 31 - RESULTADOS DO TRATAMENTO COM 2-DG COM ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO DE MUC4 (I – INHIBITORY, C – CONCENTRATION;)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Alteração celular	Duração do tratamento	Resultados	Referência
A375	IC <sub>50</sub> = >2000 µg/mL	Indução da expressão de Muc4	72h	Maior concentração de 2-DG para induzir apoptose	(76)
	IC <sub>50</sub> = 620 µg/mL	Inibição da expressão de Muc4		Menor concentração de 2-DG para induzir apoptose	

#### 4.3.4.2 Tratamento celular com 2-DG em células resistentes à arginina desaminase peguilada

O melanoma é um tumor auxotrófico para a arginina, isto é, necessita de arginina para sobreviver e crescer. A arginina desaminase peguilada (ADI-PEG20) degrada a arginina, tendo demonstrado resultados favoráveis no tratamento de tumores auxotróficos para a arginina. No entanto, a resistência celular à ADI-PEG20 constitui um problema para o uso desta no tratamento anticancerígeno. (80,98,99) As células resistentes à ADI-PEG20 (ADI<sup>R</sup>) possuem elevada captação de glicose (Efeito *Warburg*) e por esse motivo, foi averiguado neste estudo se a 2-DG, ao ser captada e sendo um inibidor glicolítico, seria capaz de atuar na morte de células resistentes à ADI-PEG20. Para isso as células de melanoma A2058 e SK-Mel-2 foram expostas à ADI-PEG20 durante 6 meses de modo a selecionar as variantes resistentes a esta, e de seguida foram tratadas com 2-DG por 72h, de modo a estudar o seu efeito. Através do cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração de fármaco que inibiu o crescimento celular em 50%) pela análise de regressão não linear das curvas de efeito de concentração, verificou-se que, as células ADI<sup>R</sup> apresentam sensibilidade aprimorada ao tratamento com 2-DG, havendo uma diminuição da viabilidade celular. Esta análise foi realizada através do ensaio MTT (Tabela 32) (80).

**TABELA 32 - TRATAMENTO COM 2-DG EM CÉLULAS RESISTENTES À ADI-PEG-20 (I – INHIBITORY, C – CONCENTRATION; ADI-PEG20- ARGININA DESAMINASE PEGULADA; ADI<sup>R</sup>-CÉLULAS RESISTENTES À ADI-PEG20)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Alteração celular	Duração do tratamento	Resultados	Referência
A2058 e SK-Mel-2	IC <sub>50</sub> de (0,4-1)µM	Resistência à ADI-PEG20 (ADI <sup>R</sup> )	72h	Diminuição da viabilidade celular	(80)

#### 4.3.4.3 Tratamento celular com 2-DG em células com *knockdown* no gene p53

Células de melanoma C8161 com *knockdown* (KD) no gene p53 foram cultivadas em meio DMEM e expostas ao tratamento com 2-DG (5mM) sob hipoxia ( $\leq 1\%$  de O<sub>2</sub>) ou normoxia durante 72h. Observou-se resistência celular ao tratamento com 2-DG em ambos os casos, tendo sido mais evidente sob normoxia do que hipoxia, quando comparado com os grupos de controlo não tratados com 2-DG. A resistência celular foi medida por ensaio de fluorescência de alamar blue, avaliando a atividade metabólica relativa. Por outro lado, as células com *knockdown* no gene p53 foram tratadas com 2-DG (3mM) e a enzima superóxido dismutase (SOD, 250U/mL), que possui efeito antioxidante, sob hipoxia e CoCl<sub>2</sub>, um mimético de hipoxia, durante 48h. Verificou-se uma diminuição da viabilidade celular em cerca de 60%, quando comparado com os controlos não tratados com 2-DG. Esta análise foi realizada através de citometria de fluxo com os corantes iodeto de propídio e calceína (Tabela 33) (81).

**TABELA 33 - TRATAMENTO COM 2-DG EM CÉLULAS COM KNOCKDOWN NO GENE P53 (↓-DIMINUIÇÃO, KD-KNOCKDOWN, SOD-SUPERÓXIDO DISMUTASE)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Alteração celular	Duração do tratamento	Resultados	Referência
C8161	5mM	KD p53 sob hipoxia ou normoxia	72h	Resistência celular ao tratamento com 2-DG	(81)
	3mM	KD p53 + SOD (250U/mL), sob hipoxia + CoCl <sub>2</sub>	48h	↓ viabilidade celular em ≈60%	

#### 4.3.4.4 Alteração nos níveis de glucose no meio de cultivo celular

As linhas celulares de melanoma SK-Mel-28 e CHL-1 foram expostas a condições diferentes de glucose no meio de cultura, isto é, foram cultivadas em meio DMEM (alta glucose) ou em meio de sais equilibrados de *Earle* (EBSS), com baixa glucose. Foram sujeitas ao tratamento com 2-DG (10mM) e cisplatina (50µM) durante 24h e a apoptose celular foi avaliada utilizando citometria de fluxo com os corantes anexina-V-FITC e iodeto de propídio. Quando as células SK-Mel-28 foram cultivadas em meio DMEM e sujeitas ao tratamento com 2-DG e cisplatina, observou-se um aumento da apoptose em aproximadamente 25% e quando tratadas com 2-DG isolada observou-se um aumento da apoptose em cerca de 5%, em relação ao grupo de controlo. Por outro lado, quando estas mesmas células foram cultivadas em meio com baixa glucose (EBSS) e sujeitas ao tratamento com 2-DG e cisplatina, observou-se um aumento da apoptose em aproximadamente 60% e quando estas foram tratadas com 2-DG isolada houve um aumento da apoptose em cerca de 50%, em relação ao grupo de controlo (Tabela 34) (85).

Quando as células CHL-1 foram cultivadas em meio DMEM e sujeitas ao tratamento com 2-DG e cisplatina, observou-se um aumento da apoptose em aproximadamente 60% e quando estas foram tratadas com 2-DG isolada observou-se um aumento da apoptose em cerca de 10%, em relação ao grupo de controlo. Por outro lado, quando as células CHL-1 foram cultivadas com níveis reduzidos de glucose (EBSS) e sujeitas ao tratamento com 2-DG e cisplatina, observou-se um aumento da apoptose em aproximadamente 70%, e quando estas foram tratadas com 2-DG isolada observou-se um aumento da apoptose em cerca de 20%, em relação ao grupo de controlo (Tabela 34) (85).

**TABELA 34 - TRATAMENTO COM 2-DG COM ALTERAÇÃO NOS NÍVEIS DE GLUCOSE NO MEIO DE CULTIVO CELULAR (↑-AUMENTO; DMEM-DULBECCO'S MODIFIED EAGLE MEDIUM; EBSS-MEIO DE SAIS EQUILIBRADOS DE EAGLE)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica (concentração)	Duração do tratamento	Resultados (Apoptose)		Referência
				Meio DMEM (alta glucose)	Meio EBSS (baixa glucose)	
SK-Mel-28	10mM	Cisplatina (50µM)	24h	↑ ≈25%	↑ ≈60%	(85)
	10mM			↑ ≈5%	↑ ≈50%	
CHL-1	10mM	Cisplatina (50µM)		↑ ≈60%	↑ ≈70%	
	10mM			↑ ≈10%	↑ ≈20%	

#### 4.3.4.5 Tratamento com 2-DG em condições anaeróbias

A linha celular de melanoma MDA-MB-435 foi cultivada em meio DMEM e sujeita ao tratamento com 2-DG (10mM) durante 5h. O ATP intracelular foi medido pelo ensaio de viabilidade celular *CellTiter-Glo Luminescent*, tendo-se verificado diminuição dos níveis de ATP em aproximadamente 40%, em relação ao grupo de controlo. Por outro lado, estas células foram expostas a condições anaeróbias fornecidas pelo tratamento com oligomicina (0,1µg/mL), um inibidor da ATP sintase, e tratadas com 2-DG (10mM) por 5h. Verificou-se uma diminuição dos níveis de ATP em aproximadamente 90%, quando comparado com o grupo de controlo não tratado. A exposição a oligomicina não alterou os níveis de ATP, relativamente ao grupo de controlo. Foi também avaliado o stress do RE e a resposta a proteínas não dobradas (UPR) e autofagia por análise de *Western Blotting* com marcadores de stress do RE/UPR (Grp78 e CHOP) e de autofagia (LC3BII), respetivamente. As células MDA-MB-435 foram tratadas com 2-DG (4mM) durante 16h, tendo-se observado um aumento da expressão dos marcadores Grp78, CHOP e LC3BII, em relação ao grupo de controlo. No entanto quando estas células foram tratadas com 2-DG (4mM) durante 16h e sob condições anaeróbias (fornecidas pelo tratamento com

oligomicina), houve diminuição da expressão dos marcadores Grp78, CHOP e LC3BII, comparativamente ao grupo de controlo. A exposição a oligomicina não provocou alteração na expressão destes (Tabela 35) (78).

**TABELA 35 - TRATAMENTO COM 2-DG EM MEIO ANAERÓBIO (↓-DIMINUIÇÃO; ↑-AUMENTO; O SÍMBOLO “-” INDICA QUE NÃO HOUVE ALTERAÇÃO; GRP78-MARCADOR DE STRESS DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO; CHOP-MARCADOR DE RESPOSTA A PROTEÍNAS NÃO DOBRADAS; LC3BII-MARCADOR DE AUTOFAGIA)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Alteração celular	Duração do tratamento	Resultados	Referência
MDA-MB-435	10mM		5h	↓ATP ≈40%	(78)
		Meio anaeróbio		↓ATP ≈90%	
		(0,1µg/mL de oligomicina)		-	
	4mM		16h	↑expressão de Grp78, CHOP e LC3BII	
		Meio anaeróbio		↓expressão de Grp78, CHOP e LC3BII	
		(0,1µg/mL de oligomicina)		-	

#### 4.3.4.6 Alteração da concentração de soro fetal bovino no meio de cultivo

As células de ratinho B16F10 foram cultivadas em meio DMEM com 10% ou 0,5% de soro fetal bovino (FBS) e tratadas com 2-DG (1mM, 5mM e 10mM) durante 72h. O tratamento com 1mM de 2-DG revelou um aumento do potencial de membrana mitocondrial de aproximadamente 10% (FBS 10%) e uma diminuição do potencial quando usado o FBS a 0,5%. Por outro lado, a concentração de 5mM de 2-DG provocou aumento do potencial mitocondrial em cerca de 36% (FBS 10%) e 21% (FBS 0,5%). A concentração de 10mM de 2-DG provocou um aumento de aproximadamente 70% (FBS 10%) e 28% (FBS 0,5%). Estes resultados são comparativamente aos seus controlos não tratados com 2-DG. Para a realização desta análise as células foram coradas com perclorato de éster etílico de tetrametil-rodamina (TMRE) e 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e foram, posteriormente, analisadas usando o citómetro FACSCalibur (Tabela 36) (83).

Foram também avaliadas a viabilidade e a toxicidade celular através de citometria de fluxo com os corantes TMRE e 7-AAD. Para a concentração de 1mM, houve diminuição da viabilidade celular em aproximadamente 30% (10% de FBS) e de 10% (0,5% de FBS). Em relação à concentração de 2-DG de 5mM observou-se uma redução de cerca de 90% (10% de FBS) e 25% (0,5% de FBS). Para a concentração de 10mM de 2-DG, observou-se uma diminuição da viabilidade celular em aproximadamente 99% (10% de FBS) e 30% (0,5% de FBS). Em relação à citotoxicidade, esta foi avaliada nas mesmas condições tendo-se verificado um aumento de 2% (1mM), 34% (5mM) e 60% (10mM) quando as células foram tratadas com FBS a 10%, no entanto quando tratadas com FBS a 0,5% houve diminuição de 7% (1mM) e aumento da citotoxicidade em 20% (5mM) e 26% (10mM). Todos estes resultados foram estimados em relação ao grupo de controlo não tratado (Tabela 36) (83).

**TABELA 36 - RESULTADOS DO TRATAMENTO COM 2-DG COM ALTERAÇÃO DO SORO FETAL BOVINO NO MEIO DE CULTIVO CELULAR (FBS-SORO FETAL BOVINO; ↓-DIMINUIÇÃO; ↑-AUMENTO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Fenómeno avaliado	Duração do tratamento	Resultados		Referência
				FBS a 10%	FBS a 0,5%	
B16F10	1mM	Potencial mitocondrial	72h	↑ ≈10%	↓	(83)
	5mM			↑ ≈36%	↑ ≈21%	
	10mM			↑ ≈70%	↑ ≈28%	
	1mM	Viabilidade celular		↓ ≈30%	↓ ≈10%	
	5mM			↓ ≈90%	↓ ≈25%	
	10mM			↓ ≈99%	↓ ≈30%	
	1mM	Citotoxicidade		↑ ≈2%	↓ ≈7%	
	5mM			↑ ≈34%	↑ ≈20%	
	10mM			↑ ≈60%	↑ ≈26%	

#### 4.4 Estudos *in vivo*

A linha celular de melanoma B16F10 foi injetada subcutaneamente em ratinhos e quando o tumor atingiu os 2mm<sup>2</sup> foi injetada diariamente 2-DG (65,2mg/Kg) no local do

tumor, durante 8 dias. O volume do tumor foi medido ao longo do tempo e calculado através da fórmula  $volume = (comprimento \times largura^2 \times \pi)/6$ . Após os ratinhos terem sido sacrificados ao fim dos 8 dias, a massa do tumor foi pesada. Quando foram tratados com 2-DG isolada, verificou-se uma diminuição do volume tumoral em cerca de 47% e da massa tumoral em 27%, em relação ao grupo de controlo. Por outro lado, o tratamento com 2-DG em combinação com imiquimod (25 mg/Kg), levou à supressão do crescimento do tumor, isto é, provocou uma diminuição do volume tumoral em cerca de 73% e da massa em 60%, em relação ao controlo não tratado. O tratamento com imiquimod isolado revelou uma diminuição de 33% do volume tumoral e de 10% da massa tumoral, relativamente ao grupo sem tratamento (Tabela 37) (82).

Um outro estudo utilizou também a linha celular de melanoma de ratinho B16F10 que foi injetada subcutaneamente em ratinhos e passados 7 dias foram tratados com 2-DG (500mg/Kg), intraperitonealmente, em dias alternados, durante um período de 14 dias. O tratamento com 2-DG provocou uma diminuição da massa tumoral em aproximadamente 33%, em relação ao grupo de controlo. Além disso foram tratados com 2-DG (500mg/Kg) e cloxiquina (25mg/Kg), injetados intraperitonealmente, por mais 14 dias. A cloxiquina foi injetada diariamente e a 2-DG foi injetada em dias alternados. Esta combinação terapêutica demonstrou uma diminuição da massa tumoral em cerca de 50%, relativamente ao grupo sem tratamento. Por outro lado, o tratamento com cloxiquina isolada levou à diminuição da massa tumoral em 40%, quando comparado com o controlo não tratado (Tabela 37) (88).

A linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi injetada subcutaneamente em ratinhos e passados 5 dias estes foram tratados com 2-DG (450mg/kg) diariamente, durante 16 dias. Observou-se diminuição do volume e massa tumoral, quando comparado ao grupo de controlo. Quando foi realizado o tratamento com NDI (100mg/kg) isolado também se verificou redução da massa e volume tumoral. Para além disso foi realizado o tratamento combinado entre 2-DG e NDI durante 16 dias, tendo-se observado uma maior redução da massa e do volume tumoral, em comparação com o grupo de controlo e com os dois agentes terapêuticos isolados (Tabela 37) (84).

**TABELA 37 - RESULTADOS DOS ESTUDOS IN VIVO COM 2-DG ISOLADA OU EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA (NDI-N-DODECILIMIDAZOL; ↓-DIMINUIÇÃO; ↓↓-DIMINUIÇÃO SUPERIOR)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica	Duração do tratamento	Resultados		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
B16F10	65,2 mg/Kg	Imiquimod (25mg/Kg)	8 dias	↓volume tumoral em ≈47%		(82)
				↓massa tumoral em ≈27%		
				↓volume tumoral em ≈73%		
				↓massa tumoral em ≈60%		
				↓volume tumoral em ≈33%		
				↓massa tumoral em ≈10%		
B16F10	500 mg/Kg	Cloxiquina (25mg/Kg)	14 dias	↓massa tumoral em ≈33%		(88)
					↓massa tumoral em ≈50%	
				↓massa tumoral em ≈40%		

**TABELA 37 - RESULTADOS DOS ESTUDOS IN VIVO COM 2-DG ISOLADA OU EM COMBINAÇÃO TERAPÊUTICA (NDI-N-DODECILIMIDAZOL; ↓-DIMINUIÇÃO; ↓↓-DIMINUIÇÃO SUPERIOR) (CONTINUAÇÃO)**

Linhas celulares	Concentração de 2-DG	Combinação terapêutica	Duração do tratamento	Resultados		Referência
				Agente terapêutico	Combinação terapêutica	
B16F0	450mg/kg	NDI (100mg/kg)	16 dias	↓ massa e volume tumoral		(84)
					↓↓ massa e volume tumoral	

## 5 Discussão

Foi elaborada pela primeira vez uma revisão sistemática com o propósito primordial de estudar o efeito anticancerígeno da molécula 2-DG no tratamento do melanoma. Ao longo desta análise foi objetivo responder à questão de investigação, inicialmente estabelecida, bem como fazer com que a revisão sistemática fosse reprodutível, imparcial, metodologicamente abrangente e transparente.

Após uma pesquisa detalhada e aplicados os critérios de exclusão e inclusão definidos, foram selecionados e avaliados 17 artigos compreendidos entre os anos 1998 e 2019, que correspondeu ao intervalo estabelecido para a pesquisa nas diferentes bases de dados. Nestes artigos foram objeto de estudo diversas linhas celulares de melanoma humano e de ratinho, sendo que as A375 e B16F10 foram as mais frequentemente utilizadas, respetivamente. Tal poderá dever-se ao facto de que estas células são transcricionalmente representativas dos seus respectivos tumores e que as células de ratinho podem ser implantadas no animal e constituir um modelo singénico de melanoma (100).

O tratamento *in vitro* com 2-DG em monoterapia foi avaliado em 13 artigos, dos quais 6 envolviam alterações das condições celulares, e o tratamento *in vivo* foi realizado em 3 artigos. Foi também utilizada a 2-DG em combinação terapêutica em 7 artigos, com os agentes terapêuticos capazes de induzir a apoptose, tais como pirimetamina (79), cisplatina (93), estaurosporina (79), TRAIL (95–97), metiljasmonato (89) e coronatina (89), com um fármaco quimioterápico usado no tratamento do melanoma, a temozolamida (79), com agentes terapêuticos que possuem efeito anti-tumoral, o imiquimod (94) e a cloxiquina (88), e com um surfactante capaz de romper a membrana lisossomal podendo conduzir à morte celular, o NDI (91,92). Para além disso, 1 dos artigos utilizou uma alteração da molécula 2-DG, a tetraacetato de 2-DG, no tratamento de células de melanoma.

No global, os fenómenos maioritariamente avaliados foram a apoptose (41,2% dos artigos, n=7) e a viabilidade celular (35,3% dos artigos, n=6), pois são os que possuem

maior interesse e garantem um maior sucesso no tratamento do melanoma. De seguida, surge a citotoxicidade e a inibição da glicólise (23,5% dos artigos, n=4), o stress do reticulo endoplasmático, resposta a proteínas não dobradas, autofagia, potencial mitocondrial, proliferação, migração e invasão celular e crescimento tumoral *in vivo* (17,6% dos artigos, n=3). Foram ainda avaliados a formação de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (11,8% dos artigos, n=2), paragem do ciclo celular, inibição dos processos de reparação do DNA e peroxidação lipídica (5,9% dos artigos n=1).

### 5.1 Ação da 2-deoxy-D-glucose na inibição da glicólise

A molécula 2-DG caracteriza-se por ser um análogo da glucose capaz de inibir a glicólise, conduzindo à depleção de ATP. Esta ação faz com que a 2-DG consiga levar as células cancerígenas à apoptose (67,68). Como tal, a inibição da glicólise pela 2-DG foi determinada através da diminuição dos níveis de ATP celular.

Esta ação foi avaliada em diversos estudos incluídos na revisão sistemática, recorrendo à utilização de diferentes linhas celulares e tratamentos com 2-DG. Foram utilizadas as linhas celulares de melanoma humano MDA-MB-435, MeWo, A375 e C8161 e a linha celular de melanoma de ratinho B16F0. A 2-DG foi usada na concentração de 10mM ou 20mM, durante intervalos de tempo compreendidos entre 5h a 120h (77–79,84).

Verificou-se inibição da glicólise para todas as células tratadas com 2-DG (77–79,84), sendo que a maior inibição ocorreu quando as células MeWo foram tratadas com 2-DG (20mM) durante (16h-72)h, que correspondeu a uma diminuição de 60%, em comparação com o grupo de controlo não tratado. Quando estas células foram tratadas com 2-DG na mesma concentração e intervalo de tempo, mas com pirimetamina (64µM), verificou-se que esta combinação não contribui para o aumento da inibição da glicólise, pois a redução dos níveis de ATP foi de 60% e o tratamento com pirimetamina isolada conduziu a uma diminuição de 85%, em comparação ao grupo de controlo (79).

Os resultados obtidos sugerem também que uma exposição mais prolongada ao tratamento com 2-DG poderá levar a uma maior redução dos níveis de ATP, pois duas linhas celulares distintas foram tratadas com a mesma concentração de 2-DG (10mM),

por períodos diferentes de 5h (MDA-MB-435) (78) e 24h (C8161) (77) e o tratamento mais prolongado levou a uma maior redução dos níveis de ATP ( $\approx 50\%$ ), em relação ao tratamento mais curto ( $\approx 40\%$ ). Além disso, a linha celular de ratinho B16F0 foi tratada com 2-DG (10mM) durante vários períodos, tendo-se observado uma maior diminuição de ATP consoante um maior período de tratamento (84). É possível afirmar ainda, que a combinação entre 2-DG (10mM) e NDI (40 $\mu$ M), um agente surfactante capaz de romper a membrana lisossomal levando à morte celular (91,92), nas células B16F0 potencia o efeito dos dois agentes terapêuticos na depleção de ATP, e que esta diminuição é igualmente dependente da duração do tratamento (84).

Foi também observado que a diminuição de oxigénio no meio promove o efeito da 2-DG na redução dos níveis de ATP, pois as células MDA-MB-435 foram tratadas com 2-DG (10mM) em meio anaeróbio, promovido pelo tratamento com oligomicina (0,1 $\mu$ g/mL), que é um inibidor da ATP sintase. Deste tratamento resultou uma diminuição dos níveis de ATP em  $\approx 90\%$ , que foi superior à obtida para o tratamento com 2-DG em condições normais ( $\approx 40\%$ .) ou com oligomicina isolada (sem alteração) (78).

## **5.2 Ação da *2-deoxy-D-glucose* no stress do reticulo endoplasmático, resposta a proteínas não dobradas e autofagia**

O stress do retículo endoplasmático, a resposta a proteínas não dobradas e a indução da autofagia são fenómenos que contribuem para a proteção e regeneração celular e a sua indução pode contribuir para a sobrevivência de células cancerígenas, como é o caso das células de melanoma (101). Como tal, estes fenómenos foram avaliados em diferentes estudos que realizaram o tratamento com 2-DG nas concentrações de 10mM ou 20mM, por períodos compreendidos entre 16h e 48h. Nestas análises utilizaram as linhas celulares de melanoma humano MDA-MB-435, MeWo, A375 e G-361. Através dos marcadores de stress do RE/UPR (Grp78, Grp79 e CHOP) e de autofagia (LC3BII), verificou-se que as células sofreram indução do stress do RE/UPR e autofagia quando tratadas com 2-DG (78,79,86).

Observou-se que o tratamento combinado entre 2-DG (20mM) e cisplatina (1 $\mu$ M), um agente capaz de induzir a apoptose, poderá ser uma alternativa favorável no tratamento do melanoma, uma vez que houve diminuição da autofagia nas células MeWo

tradas com esta combinação e que esta diminuição foi superior à observada para a 2-DG e a cisplatina em monoterapia. Tal deveu-se ao facto desta combinação resultar numa diminuição da formação de lisossomas (79). A combinação entre 2-DG (20mM) e estaurosporina (1 $\mu$ M) também demonstrou diminuir a autofagia, no entanto esta diminuição foi superior aquando o tratamento com estaurosporina isolada, pois deste tratamento combinado resultou uma menor diminuição da formação de lisossomas (79).

É possível afirmar também que a redução dos níveis de oxigénio no meio através do tratamento celular com oligomicina (0,1  $\mu$ g/mL) potencia o efeito da 2-DG, na medida em que faz com que haja diminuição do stress do RE/UPR e da autofagia em células MDA-MB-435, pois a oligomicina para além de ser um inibidor da ATP sintase também diminui a formação de lisossomas nas células de melanoma (78).

Por outro lado, verificou-se que as combinações entre 2-DG (20mM) e pirimetamina (64 $\mu$ M), um indutor da apoptose, ou temozolamida (100 $\mu$ M), um fármaco quimioterápico no tratamento do melanoma, são desfavoráveis, pois estes agentes isolados conduziram ao aumento da autofagia e quando combinados com 2-DG esse aumento torna-se superior, devido ao facto da 2-DG promover a formação de lisossomas contribuindo para uma maior sobrevivência celular (79).

Tomados em conjunto, estes dados sugerem que a cisplatina e a diminuição dos níveis de oxigénio no meio poderão ser aliados da 2-DG no tratamento do melanoma, pois fazem com que esta não promova os fenómenos citoprotetores, tais como o stress do RE/UPR e autofagia e que, desta forma, não haja resistência celular ao tratamento com 2-DG conduzindo a um maior sucesso no tratamento do melanoma.

### **5.3 Ação da *2-deoxy-D-glucose* na apoptose**

Em muitos dos estudos incluídos nesta revisão sistemática, foi avaliada a capacidade da 2-DG induzir a apoptose em diversas células de melanoma. Nessas análises foram utilizadas várias concentrações de 2-DG (10 $\mu$ M, 5mM, 10mM e 20mM), por vários períodos (24h, 48h e 72h). Foram utilizadas as linhas celulares de melanoma humano Mel-RM, MM200, IgR3, Mel-CV, Mel-FH, SK-Mel-110, SK-Mel-28, Me4405, C8161, A375, MeWo e Mel-501. A apoptose induzida pela 2-DG foi também avaliada na linha celular de

melanoma de ratinho B16F10, bem como em melanócitos humanos normais. Em todas elas a 2-DG não foi capaz de induzir a apoptose, independentemente da sua concentração ou duração do tratamento (68,76,77,79,82).

Num dos estudos selecionados foi utilizada uma alteração da molécula 2-DG, a tetraacetato de 2-DG (500 $\mu$ M), no tratamento das células de melanoma Colo38, durante 2h, 4h, 7h e 16h. Apenas o tratamento durante 16h, provocou a indução da apoptose, em comparação com os controlos não tratados. Estes dados sugerem que a esterificação da molécula 2-DG a tetraacetato de 2-DG torna-a mais eficiente na indução da apoptose e que o tratamento mais prolongado aumenta esse efeito, pois nos outros estudos selecionados a 2-DG não apresentou esse potencial (74).

Verificou-se que a 2-DG aumenta a sensibilidade celular à morte induzida por TRAIL em células de melanoma, através da regulação positiva da expressão dos recetores de TRAIL, e que uma maior concentração de TRAIL (200ng/mL) provoca toxicidade nos melanócitos normais, pelo que deve ser utilizada uma menor concentração deste (100ng/mL) para que haja uma melhor eficiência e segurança do tratamento (68,77). A combinação entre 2-DG (10 $\mu$ M) e TRAIL (200ng/mL) foi realizada nas células Mel-RM, MM200, IgR3, Mel-CV, Mel-FH, SK-Mel-110, SK-Mel-28, Me4405 e nos melanócitos normais, tendo-se verificado um aumento da indução da apoptose, exceto para a linha celular IgR3. Nesta análise foi utilizada uma concentração de 2-DG 1000x mais baixa que nos restantes estudos que permitiu provar que este efeito tóxico nos melanócitos normais parece ser maioritariamente devido à concentração elevada de TRAIL (68). Já a combinação entre 2-DG (10mM ou 20mM) e TRAIL (100ng/mL) por 24h foi realizada nas células C8161, A375 e nos melanócitos normais, onde se observou aumento da apoptose, em relação ao grupo de controlo, exceto nos melanócitos normais onde não se verificou nenhuma alteração (77). Quando o TRAIL foi usado em monoterapia, também revelou aumento da apoptose, em relação ao grupo de controlo, no entanto estes valores foram inferiores aos observados para os tratamentos combinados em ambos os estudos (68,77).

Além disso, o agente anti-tumoral imiquimod (10 $\mu$ g/mL, 25 $\mu$ g/mL e 50 $\mu$ g/mL ) foi usado em combinação com 2-DG (5mM) na linha celular de ratinho B16F10, tendo demonstrado aumentar o efeito da 2-DG na indução da apoptose de maneira dose-

dependente, pois quando as células foram tratadas com imiquimod ou 2-DG isolados também houve um aumento da apoptose, mas com valores inferiores (82).

A combinação entre 2-DG (20mM) e pirimetamina (64 $\mu$ M) nas células MeWo e Mel-501 não revelou ser vantajosa, pois conduziu a uma indução da apoptose menor do que o tratamento com pirimetamina isolada, ou seja, a 2-DG diminuiu o efeito da pirimetamina. Tal deve-se ao facto da 2-DG induzir os processos citoprotectores, tais como a autofagia que contribuem para a sobrevivência celular (79).

Demonstrou-se que os baixos níveis de glucose no meio (meio EBSS) poderão sensibilizar as células à indução da apoptose pela 2-DG, pois o tratamento com 2-DG (10mM) nas linhas celulares CHL-1 e SK-Mel-28 sob condições de baixa glucose provocou aumento da indução da apoptose, para ambas as células. Observou-se também que a combinação entre 2-DG e cisplatina (50 $\mu$ M) sob condições de baixa glucose potenciou esse efeito, tendo obtido resultados superiores do que sob condições de alta glucose (85). Estes dados estão de acordo com resultados anteriores que demonstraram que baixos níveis de glucose no meio associados à cisplatina, resultaram na indução de morte celular em células de neuroblastoma (102,103).

Foi ainda avaliado o potencial da 2-DG mediante alterações na expressão da glicoproteína MuC4, que inibe a adesão e reconhecimento de moléculas na superfície celular. Para isso a sua expressão foi inibida ou induzida nas células A375 e dessa análise concluiu-se que a expressão desta glicoproteína aumenta a resistência das células à apoptose induzida pela 2-DG, isto é, inibe a adesão e o reconhecimento da 2-DG na superfície das células de melanoma humano (76).

#### **5.4 Ação da *2-deoxy-D-glucose* no potencial de membrana mitocondrial**

A hiperpolarização mitocondrial (aumento do potencial de membrana mitocondrial) contribui para o desenvolvimento do tumor (90). Como tal, em vários estudos esta foi objeto de análise e, para isso foram realizados tratamentos com 2-DG nas concentrações de (1-20)mM, durante 1h, 24h, 48h ou 72h. Estes tratamentos foram realizados nas linhas celulares de melanoma humano MeWo e Mel-501 e nas linhas celulares de melanoma de ratinho B16F10 e B16F0. Em todas elas se verificou

hiperpolarização mitocondrial quando tratadas com 2-DG, exceto na linha celular B16F0 na qual não se observou alteração em relação ao grupo não tratado com 2-DG (79,83,84).

Verificou-se que as combinações entre 2-DG (20mM) e cisplatina (1 $\mu$ M) ou estaurosporina (1 $\mu$ M) em células MeWo e Mel-501 são favoráveis, pois destas resultou uma diminuição do potencial mitocondrial de maneira dependente do tempo, isto é, quanto maior a duração do tratamento, maior a despolarização mitocondrial e, conseqüentemente, maior é a inibição do desenvolvimento tumoral. Esta diminuição também se verificou para a cisplatina e a estaurosporina isoladas, no entanto foi em menor extensão, pelo que o tratamento combinado favorece a ação tanto da 2-DG, como da cisplatina e da estaurosporina (79).

A combinação entre 2-DG (10mM) e NDI (40 $\mu$ M) nas células B16F0 também demonstrou ser favorável para ambos os agentes terapêuticos, pois resultou na diminuição do potencial mitocondrial, o tratamento com 2-DG isolada não provocou nenhuma alteração e com NDI isolado a diminuição do potencial foi menor (84).

Por outro lado, o tratamento com 2-DG (20mM) e pirimetamina (64 $\mu$ M) nas células MeWo e Mel-501 demonstrou ser desfavorável, pois conduziu à hiperpolarização mitocondrial de maneira dependente do tempo, sendo que a 2-DG diminuiu o efeito da pirimetamina. Quando as células foram tratadas com pirimetamina isolada esse aumento foi menor nas MeWo tratadas por 24h e 48h e nas Mel-501 tratadas por 24h. Já quando as MeWo foram tratadas com pirimetamina por 72h e as Mel-501 por 48h e 72h verificou-se despolarização mitocondrial (79).

Observou-se ainda que uma menor percentagem de FBS no meio de cultivo acompanhada pelo tratamento com 2-DG, apresenta maior contribuição para que não haja desenvolvimento tumoral, pois a linha celular de ratinho B16F10 foi cultivada em meio com 10% ou 0,5% de FBS e exposta a 2-DG (1mM, 5mM e 10mM), tendo-se verificado despolarização mitocondrial quando tratada com 2-DG (1mM) e exposta a FBS a 0,5%. Por outro lado, da exposição a FBS a 10% resultou hiperpolarização mitocondrial com valores mais elevados consoante o aumento da concentração de 2-DG. Isto é explicado pelo facto do FBS contribuir para o crescimento celular (83).

### 5.5 Ação da *2-deoxy-D-glucose* na paragem do ciclo celular

Em apenas um dos artigos selecionados foi demonstrado que o tratamento com 2-DG (20mM) nas células MeWo e Mel-501 conduziu à paragem do ciclo celular na fase G0/G1. As mesmas células foram sujeitas ao tratamento com 2-DG (20mM) em combinação com pirimetamina (64µM), do qual resultou uma paragem do ciclo celular em fase G0/G1 em maior extensão. Quando a pirimetamina foi usada em isolamento, verificou-se um maior número de células em fase S e menor em fase G0/G1. Tal sugere que a 2-DG por si só, aumenta o número de células em fase G0/G1, contudo o seu tratamento combinado com pirimetamina favorece esse efeito (79).

### 5.6 Ação da *2-deoxy-D-glucose* na formação de espécies reativas de oxigénio e nitrogénio

A formação de espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio provoca o stress oxidativo e nitrosativo e, conseqüentemente, contribui para danificar a célula (79,84). Dado o seu contributo no processo anticancerígeno, alguns dos estudos incluídos avaliaram a formação de ROS e RNS pela 2-DG em células de melanoma, tendo-se verificado que esta é capaz de aumentar a formação de RNS, mas não de ROS (79,84).

Observou-se que a combinação entre 2-DG (20mM) e pirimetamina (64µM) nas células MeWo aumenta a formação de RNS, mas diminui a de ROS. Isto indica que esta combinação não será interessante neste aspeto, pois por um lado apresenta vantagens, mas por outro é desfavorável (79).

A combinação entre 2-DG (10mM) e NDI (40 µM) nas células B16F0 demonstrou contribuir para danificar as células de melanoma, pois provocou um aumento da formação de ROS e apresentou resultados superiores aos obtidos para os dois agentes isolados, ou seja, potenciou o efeito tanto da 2-DG como do NDI (84).

### 5.7 Ação da 2-deoxy-D-glucose na inibição dos processos de reparação do DNA pós-irradiação

Num único estudo selecionado, foi analisado o potencial da 2-DG nos processos de reparação do dano no DNA, depois das células serem expostas a 250KV de raios-X. O tratamento com 2-DG (5mM) durante 4h, não foi capaz de aumentar o dano no DNA nas células MeWo, mas sim produziu um aumento de cerca de 30% nas células Be-11. Isto indica que existe a possibilidade da 2-DG aumentar o dano no DNA em células que foram sujeitas a radiação (75). Estes resultados estão de acordo com um estudo já realizado que demonstrou que a 2-DG (1M) atua em células de carcinoma ascítico de *Ehrlich-Lette* aumentando o dano no DNA (104).

### 5.8 Ação da 2-deoxy-D-glucose na proliferação, migração e invasão celular

Foi avaliado o efeito da 2-DG (0,5-10)mM na inibição da proliferação, migração e invasão celular, recorrendo às linhas celulares A375, SK-Mel-38, A2058 e B16F10, durante (16-96)h. Para todos os ensaios a 2-DG demonstrou ser capaz de inibir a proliferação, a migração e a invasão celular (87–89).

A linha celular A375 foi tratada com diferentes concentrações de 2-DG durante períodos distintos, tendo-se verificado que, na mesma linha celular, a inibição da proliferação pela 2-DG é dependente da dose e do tempo de tratamento, pois uma maior concentração de 2-DG durante um período mais prolongado conduziu a uma maior inibição da proliferação celular (87,89).

Observou-se também que a combinação entre 2-DG (0,5mM) e coronatina (0,01µM) potencia o efeito de ambos os agentes terapêuticos na inibição da proliferação celular, pois quando as linhas celulares A375 e A2058 foram tratadas com estes agentes em combinação houve aumento da inibição da proliferação celular com valores superiores aos observados para cada um dos agentes terapêuticos isolados (89).

Verificou-se ainda, que a combinação entre 2-DG (5mM) e cloxiquina (1,5µM) não apresenta vantagens adicionais no tratamento do melanoma, na medida em que não aumenta a inibição da proliferação e migração celular em relação aos dois agentes terapêuticos isolados, pois este tratamento combinado na linha celular B16F10

apresentou valores iguais aos observados para tratamento com 2-DG e cloxiquina em monoterapia. Tal deveu-se ao facto de a 2-DG e a cloxiquina inibirem a expressão das proteínas PPAR $\gamma$  associadas à proliferação e migração celular (88).

### 5.9 Ação da 2-deoxy-D-glucose na viabilidade e toxicidade celular

Foi investigado o efeito da 2-DG na diminuição da viabilidade celular em células de melanoma humano Mel-RM, MM200, A375 e A2058 e em células de melanoma de ratinho B16F0. Foram utilizadas diferentes concentrações de 2-DG durante períodos de 24h a 72h. No global o tratamento com 2-DG conduziu à diminuição da viabilidade celular em todas as células. Dentro da mesma linha celular a diminuição da viabilidade foi dependente do aumento da concentração de 2-DG, isto é, quanto maior a concentração de 2-DG maior a diminuição da viabilidade celular (68,84,89).

Demonstrou-se que existe uma potenciação do efeito tanto da 2-DG como do metiljasmonato ou da coronatina (indutores da apoptose) quando em combinação terapêutica, pois as células A375 e A2058 foram sujeitas a estes tratamentos combinados, tendo resultado numa maior diminuição da viabilidade celular do que a observada para a 2-DG, metiljasmonato e coronatina isolados. Foram utilizadas várias concentrações de metiljasmonato ou coronatina, tendo-se observado que a diminuição da viabilidade está relacionada com a dose crescente de metiljasmonato ou coronatina em ambas as linhas celulares (89). Estes resultados vão ao encontro dos obtidos em estudos anteriores que provaram que existe um efeito sinérgico entre a 2-DG e o metiljasmonato em células do cancro do pulmão, do cólon, da mama e sarcoma (105,106).

Verificou-se também que existe um potencial na combinação entre 2-DG e NDI na diminuição da viabilidade celular, pois as células B16F0 foram sujeitas a este tratamento combinado, que resultou numa diminuição da viabilidade celular superior à observada tanto para o tratamento com 2-DG isolada, como para o tratamento com NDI isolado. O mesmo verificou-se para o aumento da citotoxicidade, isto é, o tratamento combinado entre 2-DG e NDI resultou num aumento superior em relação aos tratamentos com os

agentes terapêuticos em monoterapia. Tanto a diminuição da viabilidade celular como o aumento da citotoxicidade demonstraram ser dose-dependentes (84).

A citotoxicidade foi também avaliada na linha celular MDA-MB-435 tratada com 2-DG, no entanto não se observou nenhuma alteração, comparativamente ao grupo não tratado (78).

Foi avaliado o potencial da tetraacetato de 2-DG no aumento da citotoxicidade em células Colo38, em concentrações (10-100)x menores do que as concentrações de 2-DG utilizadas nos restantes estudos. Verificou-se um aumento da citotoxicidade, tendo-se registado os valores de aproximadamente 15% (100 $\mu$ M), 100% (500 $\mu$ M) e 95% (1mM) às 24h de tratamento. No entanto, a utilização de 100 $\mu$ M de tetraacetato de 2-DG permitiu posterior restauração metabólica após 48h de tratamento, pelo que será mais vantajoso utilizar as concentrações de 500 $\mu$ M e 1mM. Estes dados sugerem que a esterificação da molécula 2-DG a tetraacetato de 2-DG torna-a mais eficiente, pois em concentrações bastante inferiores esta foi capaz de produzir maior aumento na citotoxicidade, embora em células diferentes, quando comparada com a 2-DG (74).

Verificou-se que a 2-DG poderá constituir uma alternativa anticancerígena em tumores auxotróficos para a arginina, como é o caso do melanoma, e que são resistentes à ADI-PEG20, pois foi avaliado o potencial da 2-DG em células A2058 e SK-Mel-2 resistentes à ADI-PEG20, tendo-se verificado uma diminuição da viabilidade celular nestas células quando tratadas com 2-DG, comparativamente ao grupo não tratado. Tal deve-se ao facto destas células resistentes à ADI-PEG20 apresentarem uma elevada captação de glucose ou de seus análogos, tais como a 2-DG (80).

Foi possível observar também que as condições de hipoxia em células com *knockdown* no gene p53 melhoram o tratamento com 2-DG, porém não são suficientes para que exerça o seu efeito. Contudo a adição de CoCl<sub>2</sub>, um mimético de hipoxia, demonstrou ser vantajoso. As células C8161 com *knockdown* no gene p53 apresentaram resistência celular ao tratamento com 2-DG (5mM), em relação aos grupos de controlo não tratados com 2-DG, tanto sob normoxia como hipoxia ( $\leq 1\%$  de O<sub>2</sub>), sendo que esta resistência foi superior sob normoxia. No entanto, quando estas células foram tratadas com 2-DG (3mM) em condições de hipoxia e na presença de CoCl<sub>2</sub>, mesmo na presença

da enzima superóxido dismutase (antioxidante que previne o envelhecimento e a morte celular), exibiram uma diminuição da viabilidade celular, relativamente ao controlo não tratado com 2-DG (81).

Foi ainda investigado o efeito de duas percentagens diferentes de FBS no meio de cultivo, na viabilidade e toxicidade celular. Para isso as células B16F10 foram expostas a FBS a 10% e a 0,5% e a várias concentrações de 2-DG. Verificou-se que uma maior percentagem de FBS no meio e um aumento da concentração de 2-DG fazem com que haja uma maior diminuição da viabilidade celular e um maior aumento da citotoxicidade (83).

### **5.10 Ação da 2-deoxy-D-glucose na peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica é um fenómeno que contribui para o stress oxidativo e poderá ser vantajoso no processo anticancerígeno em células de melanoma. Como tal, esta foi avaliada num dos estudos selecionados, em que a linha celular de melanoma de ratinho B16F0 foi submetida ao tratamento com 2-DG (10mM), tendo-se observado indução da peroxidação lipídica, comparativamente ao grupo de controlo (84).

Este fenómeno é ainda mais vantajoso aquando o tratamento combinado entre 2-DG (10mM) e NDI (40µM), na medida em que há um aumento superior da peroxidação lipídica e, conseqüentemente, uma maior eficácia do tratamento anti-tumoral, pois as células B16F0 foram sujeitas a este tratamento combinado, tendo-se observado uma indução superior da peroxidação lipídica, tanto em relação à 2-DG como ao NDI isolados. Estes dados explicam o facto de existir um aumento da formação de ROS e da citotoxicidade nas células B16F0 submetidas ao tratamento combinado entre 2-DG e NDI (84).

### **5.11 Ação da 2-deoxy-D-glucose no crescimento tumoral *in vivo***

Para além dos estudos *in vitro*, foram também realizados estudos *in vivo* em tumores de ratinhos expostos a células B16F10 e B16F0. Os estudos *in vivo* apresentam uma grande importância, pois sustentam a maior fonte de informação para avaliar a segurança e eficácia dos agentes terapêuticos (82,84,88).

Os tratamentos com 2-DG (65,2mg/Kg) durante 8 dias e 2-DG (500mg/Kg) durante 14 dias foram realizados no tumor em ratinhos com células B16F10, tendo-se verificado em ambas as situações que ocorreu diminuição da massa e do volume tumoral, quando em comparação com os controlos não tratados com 2-DG (82,88). O mesmo se verificou no tumor de ratinhos com células B16F0 tratados com 2-DG (450mg/Kg) durante 16 dias, que resultou na supressão do crescimento tumoral (84).

Observou-se que o tratamento combinado entre 2-DG (65,2mg/Kg) e imiquimod (25mg/Kg) potencia o efeito de ambos os agentes terapêuticos na supressão tumoral, pois ocorreu uma maior diminuição da massa e do volume tumoral em relação aos valores obtidos para o tratamento com os dois agentes isolados, no tumor de ratinhos com células B16F10. Este aumento superior do tratamento combinado pode estar relacionado com o facto destes dois agentes terapêuticos juntos terem aumentado a apoptose nestas células *in vitro* e de o imiquimod ser um agente anti-tumoral (82).

Verificou-se também, que a combinação entre 2-DG (500mg/Kg) e cloxiquina (25mg/Kg) aumenta o efeito de ambos, pois foi possível observar que o tratamento combinado no tumor de ratinhos com células B16F10, resultou numa maior redução da massa e do volume tumoral do que os agentes terapêuticos isolados. Isto poderá dever-se ao facto da cloxiquina apresentar efeito anti-tumoral e de ambos os agentes terem sido capazes de inibir a proliferação, migração e invasão celular *in vitro* (88).

A combinação feita entre 2-DG (450mg/Kg) e NDI (100mg/Kg) no tumor de ratinhos expostos a células B16F0, resultou igualmente num aumento da supressão do crescimento tumoral, que foi superior à observada para os dois agentes em monoterapia. Estes resultados poderão estar relacionados com o facto desta combinação terapêutica nas células B16F0 *in vitro*, ter demonstrado uma maior redução dos níveis de ATP (inibição da glicólise), aumento da formação de ROS, diminuição da viabilidade celular, aumento da citotoxicidade e da peroxidação lipídica, quando comparado aos dois agentes terapêuticos utilizados em monoterapia e ao grupo de controlo não tratado (84).

Todos estes resultados vão ao encontro de um estudo anterior que provou que a 2-DG possui atividade supressora tumoral em modelos animais com cancro no fígado (107).

## 6 Conclusão

Em suma, os resultados obtidos sustentam a hipótese de que a 2-DG tem potencial em diversos fenómenos avaliados em células de melanoma e que, no global, o seu efeito é superior quando usada em combinação terapêutica. Depois de analisados e discutidos todos os resultados conclui-se então que:

- A 2-DG é capaz de inibir a glicólise, aumentar o potencial mitocondrial e a citotoxicidade, diminuir a viabilidade celular e suprimir o crescimento tumoral *in vivo*, por isso contribui para que não haja o desenvolvimento de células de melanoma.

- A 2-DG demonstrou aumentar a paragem do ciclo celular na fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, o dano no DNA pós-irradiação celular, a formação de RNS e a peroxidação lipídica, pelo que contribui para danificar as células de melanoma.

- A 2-DG foi capaz de inibir a proliferação, migração e invasão celular, sendo que esta inibição foi dose e tempo dependente, dentro da mesma linha celular.

- A 2-DG contribuiu para a indução dos fenómenos citoprotetores, tais como o stress do RE/UPR e autofagia e não foi capaz de induzir a apoptose nem de aumentar a formação de ROS, pelo que precisa de ser combinada com outros agentes terapêuticos para que estes fenómenos sejam potenciados.

- A esterificação da molécula 2-DG (tetraacetato de 2-DG) aumenta a citotoxicidade e potencia a indução da apoptose consoante a maior duração do tratamento.

- A 2-DG potencia os efeitos dos agentes terapêuticos NDI, cisplatina, imiquimod, TRAIL, coronatina, estaurosporina e metiljasmonato, pelo que estas combinações são favoráveis no tratamento do melanoma.

- A combinação entre 2-DG e pirimetamina ou temozolamida demonstrou ser desfavorável.

- A 2-DG sensibiliza as células à apoptose induzida por TRAIL, pois aumenta a expressão dos recetores de TRAIL nas células de melanoma.

- Uma elevada concentração de TRAIL (200ng/mL) em combinação com 2-DG conduz à apoptose nos melanócitos normais, pelo que devem ser utilizadas concentrações de TRAIL mais baixas em combinação com 2-DG para que haja eficiência e segurança no tratamento.

- O tratamento com 2-DG em meio anaeróbio promove a inibição da glicólise e a redução dos fenómenos citoprotetores, tais como o stress do reticulo endoplasmático, resposta a proteínas não dobradas e autofagia pela 2-DG.

- Em condições de hipoxia ( $\leq 1\%$  de  $O_2$ ) e na presença de  $CoCl_2$  (mimético de hipoxia), a 2-DG é capaz de diminuir a viabilidade celular em células com *knockdown* no gene p53, mesmo na presença da enzima superóxido dismutase que previne o envelhecimento e a morte celular.

- A 2-DG não é capaz de aderir e ser reconhecida na superfície de células de melanoma que expressam a glicoproteína Muc4. Isto faz com que estas células sejam resistentes à apoptose induzida pela 2-DG. Por essa razão a expressão celular da glicoproteína Muc4 deve ser inibida para que haja maior eficácia no tratamento com 2-DG em células de melanoma.

- O tratamento com 2-DG em meio com baixos níveis de glucose promove um aumento na indução da apoptose em células de melanoma.

- O soro fetal bovino contribui para o crescimento de células de melanoma, pelo que uma menor percentagem deste no meio potencia a ação da 2-DG, pois permite que esta reduza o potencial mitocondrial nestas células.

- A 2-DG constitui uma alternativa viável em tumores auxotróficos para a arginina, como é o caso do melanoma, e resistentes à ADI-PEG20, pois demonstrou ser capaz de diminuir a viabilidade nestas células.

## 7 Bibliografia

1. López F, Rodrigo JP, Cardesa A, Triantafyllou A, Devaney KO, William M. Update on primary head and neck mucosal melanoma This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting , typesetting , pagination and proofreading process which may lead to differences betwe. :1–27.
2. Markovic SN, Erickson LA, Rao RD, Weenig RH, Pockaj BA, Bardia A, et al. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: Epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(3):364–80.
3. Zuo L, Weger J, Yang Q, Goldstein AM, Tucker MA, Walker GJ, et al. Germline mutations in the p16(INK4a) binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet.* 1996;12(1):97–9.
4. Pelletier J, Thomas G, Volarevi S. Ribosome biogenesis in cancer: New players and therapeutic avenues. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2017;18(1):51–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2017.104>
5. World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research. Diet , nutrition , physical activity and skin cancer. *Expert Rep* [Internet]. 2018; Available from: [dietandcancerreport.org](http://dietandcancerreport.org)
6. Andrea MAD, Reddy GK. Systemic Antitumor Effects and Abscopal Responses in Melanoma Patients Receiving Radiation Therapy. *Oncology* [Internet]. 2020; Available from: [https://www.karger.com/Article/FullText/505487?utm\\_source=researcher\\_app&utm\\_medium=referral&utm\\_campaign=RESR\\_MRKT\\_Researcher\\_inbound](https://www.karger.com/Article/FullText/505487?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RESR_MRKT_Researcher_inbound)
7. Leonardi GC, Falzone L, Salemi R, Zanghì A, Spandidos DA, Mccubrey JA, et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol.* 2018;52(4):1071–80.
8. RASTRELLI M, SAVERIA T, ROSSI CR, ALAIBAC M. Melanoma: Epidemiology, Risk Factors, Pathogenesis, Diagnosis and Classification. *In Vivo (Brooklyn).* 2014;1012:1005–11.
9. Longvert C, Saiag P. Melanoma update. *Rev Med Interne* [Internet]. 2019;40(3):178–83. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2018.11.005>
10. Bevona C, Goggins W, Quinn T, Fullerton J, Tsao H, Corona R. Cutaneous Melanomas Associated with Nevi. *Arch Dermatol.* 2003;139(12):1620–4.
11. Titus-Ernstoff L, Perry AE, Spencer SK, Gibson JJ, Cole BF, Ernstoff MS. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer.* 2005;116(1):144–9.
12. Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer.* 2005;41(1):45–60.
13. Green A, Autier P, Boniol M, Boyle P, Doré JF, Gandini S, et al. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer.* 2007;120(5):1116–22.
14. Stern RS. The risk of melanoma in association with long-term exposure to PUVA. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44(5):755–61.

15. Pitcovski J, Shahar E, Aizenshtein E, Gorodetsky R. Melanoma antigens and related immunological markers. *Crit Rev Oncol Hematol* [Internet]. 2017;115:36–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.05.001>
16. Tracey EH, Vij A. Updates in Melanoma. *Dermatol Clin*. 2019;37(1):73–82.
17. Shaw HM, Rigel DS, Friedman RJ, Mccarthy WH, Kopf AW. Early Diagnosis of Cutaneous Melanoma Revisiting the ABCD Criteria. 2015;292(22):2771–6.
18. Newell GR, Sider JG, Kripke ML, Bergfelt L. Incidence of cutaneous melanoma in the united states by histology with special reference to the face. *Cancer Res*. 1988;48(17):5036–41.
19. Longo C, Pellacani G. Melanomas. *Dermatol Clin*. 2016;34(4):411–9.
20. Duncan LMD. The Classification of Cutaneous Melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am* [Internet]. 2009;23(3):501–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hoc.2009.03.013>
21. Goydos JS, Shoen SL. Acral lentiginous melanoma. *Cancer Treat Res*. 2016;167(4):321–9.
22. Piliang MP. Acral lentiginous melanoma. *Clin Lab Med* [Internet]. 2011;31(2):281–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2011.03.005>
23. Zell JA, Cinar P, Mobasher M, Ziogas A, Meyskens FL, Anton-Culver H. Survival for patients with invasive cutaneous melanoma among ethnic groups: The effects of socioeconomic status and treatment. *J Clin Oncol*. 2008;26(1):66–75.
24. Patel H, Yacoub N, Mishra R, White A, Yuan L, Alanazi S. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. 2020;1–38.
25. Swe T, Kim KB. Update on systemic therapy for advanced cutaneous melanoma and recent development of novel drugs. *Clin Exp Metastasis* [Internet]. 2018;35(5–6):503–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10585-018-9913-y>
26. Shannan B, Perego M, Somasundaram R, Herlyn M. Chemotherapy for Melanoma. *Cancer Treat Res* [Internet]. 2016;167:107–29. Available from: <http://www.springer.com/series/5808>
27. U. S. FOOD AND DRUG [Internet]. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=017575>
28. EUROPEAN MEDICINES AGENCY [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mekinist>
29. Eggermont AMM, Kirkwood JM. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: What have we learned in 30 years? *Eur J Cancer*. 2004;40(12):1825–36.
30. Temodal [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/temodal>
31. Bajetta E, Del Vecchio M, Bernard-Marty C, Vitali M, Buzzoni R, Rixe O, et al. Metastatic melanoma: Chemotherapy. *Semin Oncol*. 2002;29(5):427–45.
32. Lovly CM, Dahlman KB, Fohn LE, Su Z, Dias-Santagata D, Hicks DJ, et al. Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PLoS One*. 2012;7(4).

33. Rubinstein JC, Sznol M, Pavlick AC, Ariyan S, Cheng E, Bacchiocchi A, et al. Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *J Transl Med.* 2010;8:2–4.
34. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2135–47.
35. 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(6892):949–54.
36. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/mekinist>
37. No Title [Internet]. Available from: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=BasicSearch.process>
38. Salama AKS, Kim KB. MEK inhibition in the treatment of advanced melanoma. *Curr Oncol Rep.* 2013;15(5):473–82.
39. Falchook GS, Lewis KD, Infante JR, Gordon MS, Vogelzang NJ, DeMarini DJ, et al. Activity of the oral MEK inhibitor trametinib in patients with advanced melanoma: A phase 1 dose-escalation trial. *Lancet Oncol.* 2012;13(8):782–9.
40. Kim KB, Kefford R, Pavlick AC, Infante JR, Ribas A, Sosman JA, et al. Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol.* 2013;31(4):482–9.
41. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/cotellic>
42. Peggs KS, Quezada SA, Korman AJ, Allison JP. Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2006;18(2):206–13.
43. Maverakis E, Cornelius LA, Bowen GM, Phan T, Patel FB, Fitzmaurice S, et al. Metastatic melanoma – A review of current and future treatment options. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(5):516–24.
44. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/yervoy>
45. Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1-deficient mice: Implication of PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol.* 1998;10(10):1563–72.
46. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* 1999;5(12):1365–9.
47. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000;192(7):1027–34.
48. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/opdivo>
49. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/keytruda>

50. Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(9):4275–80.
51. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res*. 2013;73(12):3591–603.
52. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*. 2017;377(14):1345–56.
53. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/oncept-il-2>
54. Atkins BMB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-Dose Recombinant Interleukin 2 Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Analysis of 270 Patients Treated Between 1985 and 1993. 2016;
55. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015;15(7):405–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nri3845>
56. Testori AAE, Ribero S, Indini A, Mandalà M. Adjuvant Treatment of Melanoma: Recent Developments and Future Perspectives. *Am J Clin Dermatol* [Internet]. 2019;20(6):817–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40257-019-00456-4>
57. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/introna>
58. Liu BL, Robinson M, Han ZQ, Branston RH, English C, Reay P, et al. ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene Ther*. 2003;10(4):292–303.
59. Hu JCC, Coffin RS, Davis CJ, Graham NJ, Groves N, Guest PJ, et al. A phase I study of OncoVEXGM-CSF, a second-generation oncolytic herpes simplex virus expressing granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Clin Cancer Res*. 2006;12(22):6737–47.
60. No Title [Internet]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/imlygic>
61. Pajak B, Siwiak E, Sołtyka M, Priebe A, Zieliński R, Fokt I, et al. 2-Deoxy-D-Glucose and its analogs: From diagnostic to therapeutic agents. *Int J Mol Sci*. 2020;21(1).
62. 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* [Internet]. 2018;31(1):24–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2017.104>
63. Kong BY, Carlino MS, Menzies AM. Biology and treatment of BRAF mutant metastatic melanoma. *Melanoma Manag*. 2016;3(1):33–45.
64. Oh YT, Deng J, Yue P, Sun SY. Paradoxical activation of MEK/ERK signaling induced by B-Raf inhibition enhances DR5 expression and DR5 activation-induced apoptosis in Ras-mutant cancer cells. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(March):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep26803>

65. Poulidakos PI, Zhang C, Bollag G, Shokat KM, Rosen N. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* [Internet]. 2010;464(7287):427–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature08902>
66. Liberti M V., Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2016;41(3):211–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
67. Zhang D, Li J, Wang F, Hu J, Wang S, Sun Y. 2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy. *Cancer Lett* [Internet]. 2014;355(2):176–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.003>
68. Liu H, Jiang CC, Lavis CJ, Croft A, Dong L, Tseng HY, et al. 2-Deoxy-D-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells through XBP-1-mediated up-regulation of TRAIL-R2. *Mol Cancer*. 2009;8:1–17.
69. Hodis E, Watson IR, Kryukov G V., Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012;150(2):251–63.
70. Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, et al. Acquired Resistance to BRAF Inhibitors Mediated by a RAF Kinase Switch in Melanoma Can Be Overcome by Cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer Cell* [Internet]. 2010;18(6):683–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2010.11.023>
71. Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: Current challenges and future prospect. *Onco Targets Ther*. 2017;10:3941–7.
72. Carlino MS, Fung C, Shahheydari H, Todd JR, Boyd SC, Irvine M, et al. Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients. *Clin Cancer Res*. 2015;21(1):98–105.
73. Donato H, Donato M. Stages for undertaking a systematic review. *Acta Med Port*. 2019;32(3):227–35.
74. Reinhold U, Malaisse WJ. Cytotoxic action of 2-deoxy-D-glucose tetraacetate upon human lymphocytes, fibroblasts and melanoma cells. *Int J Mol Med*. 1998;1(2):427–30.
75. Dwarkanath BS, Zolzer F, Chandana S, Bauch T, Adhikari JS, Muller WU, et al. Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose-induced modifications in energetics and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;50(4):1051–61.
76. Hu YP, Haq B, Carraway KL, Savaraj N, Lampidis TJ. Multidrug resistance correlates with overexpression of Muc4 but inversely with P-glycoprotein and multidrug resistance related protein in transfected human melanoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(9):1419–25.
77. Qin JZ, Xin H, Nickoloff BJ. 2-Deoxyglucose sensitizes melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis which is reduced by mannose. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010;401(2):293–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.054>
78. Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M, Liu X, et al. 2-Deoxy-d-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(4):899–910.
79. Giammarioli AM, Gambardella L, Barbati C, Pietraforte D, Tinari A, Alberton M, et al. Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy- D -glucose on the activity of pro-

- apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective autophagic response. *Int J Cancer*. 2012;131(4).
80. Long Y, Tsai W Bin, Wangpaichitr M, Tsukamoto T, Savaraj N, Feun LG, et al. Arginine deiminase resistance in melanoma cells is associated with metabolic reprogramming, glucose dependence, and glutamine addiction. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(11):2581–90.
  81. Chavez-Perez VA, Strasberg-Rieber M, Rieber M. Hypoxia and hypoxia mimetic cooperate to counteract tumor cell resistance to glucose starvation preferentially in tumor cells with mutant p53. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014;443(1):120–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.065>
  82. Huang SW, Kao JK, Wu CY, Wang ST, Lee HC, Liang SM, et al. Targeting aerobic glycolysis and HIF-1' expression enhance imiquimod-induced apoptosis in cancer cells. *Oncotarget*. 2014;5(5):1363–81.
  83. Lee DG, Choi BK, Kim YH, Oh HS, Park SH, Bae YS, et al. The repopulating cancer cells in melanoma are characterized by increased mitochondrial membrane potential. *Cancer Lett*. 2016;382(2):186–94.
  84. Kasic M, Arskin-Csordas K, Paunovic V, Firestone RA, Ristic B, Mircic A, et al. Synergistic anticancer action of lysosomal membrane permeabilization and glycolysis inhibition. *J Biol Chem*. 2016;291(44):22936–48.
  85. Antunes F, Corazzari M, Pereira G, Fimia GM, Piacentini M, Smaili S. Fasting boosts sensitivity of human skin melanoma to cisplatin-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;485(1):16–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.149>
  86. Nagasawa I, Kunimasa K, Tsukahara S, Tomida A. BRAF-mutated cells activate GCN2-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;482(4):1491–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.062>
  87. Deng Y, Li H, Yin X, Liu H, Liu J, Guo D, et al. C-Terminal Binding Protein 1 Modulates Cellular Redox via Feedback Regulation of MPC1 and MPC2 in Melanoma Cells. *Med Sci Monit*. 2018;24:7614–24.
  88. Zhang W, Shao W, Dong Z, Zhang S, Liu C, Chen S. Cloxiquine, a traditional antituberculosis agent, suppresses the growth and metastasis of melanoma cells through activation of PPAR $\gamma$ . *Cell Death Dis* [Internet]. 2019;10(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1644-8>
  89. Kim HY, Jin H, Bae J, Choi HK. Metabolic and lipidomic investigation of the antiproliferative effects of coronatine against human melanoma cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
  90. Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? *Trends Cell Biol*. 2008;18(4):165–73.
  91. Wilson PD, Hreniuk D, Lenard J. Reduced Cytotoxicity of the Lysosomotropic Detergent N-Dodecylimidazole after Differentiation of HL60 Promyelocytes. *Cancer Res*. 1989;49(3):507–10.
  92. Miller DK, Griffiths E, Lenard J, Firestone RA. Cell killing by lysosomotropic detergents. *J Cell Biol*. 1983;97(6):1841–51.

93. Kurtoglu M, Gao N, Shang J, Maher JC, Lehrman MA, Wangpaichitr M, et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(11):3049–58.
94. Novak N, Yu C, Bieber T, Allam J. Toll-like receptor 7 agonists and skin. *Drug News Perspect.* 2008;158–165.
95. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* (80- ). 1998;281(5381):1305–8.
96. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell.* 1997;88(3):355–65.
97. Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res.* 2000;256(1):58–66.
98. Feun LG, Marini A, Walker G, Elgart G, Moffat F, Rodgers SE, et al. Negative argininosuccinate synthetase expression in melanoma tumours may predict clinical benefit from arginine-depleting therapy with pegylated arginine deiminase. *Br J Cancer.* 2012;106(9):1481–5.
99. Ott PA, Carvajal RD, Pandit-Taskar N, Jungbluth AA, Hoffman EW, Wu BW, et al. Phase I/II study of pegylated arginine deiminase (ADI-PEG 20) in patients with advanced melanoma. *Invest New Drugs.* 2013;31(2):425–34.
100. Vincent KM, Postovit LM. Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models. *Oncotarget.* 2017;8(6):10498–509.
101. Moreau K, Luo S, Rubinsztein DC. Cytoprotective roles for autophagy. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2010;22(2):206–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.002>
102. Lee C, Raffaghello L, Brandhorst S, Safdie FM, Bianchi G, Martin-Montalvo A, et al. Fasting cycles retard growth of tumors and sensitize a range of cancer cell types to chemotherapy. *Sci Transl Med.* 2012;4(124).
103. Longo VD, Mattson MP. Fasting: Molecular mechanisms and clinical applications. *Cell Metab* [Internet]. 2014;19(2):181–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.12.008>
104. Jha B, Pohlit W. Reversibility of inhibition of DNA double Strand break repair by 2-deoxy-d-glucose in ehrlich ascites tumour cells. *Int J Radiat Biol.* 1993;63(4):459–67.
105. Elia U, Flescher E. PI3K/Akt pathway activation attenuates the cytotoxic effect of methyl jasmonate toward sarcoma cells. *Neoplasia* [Internet]. 2008;10(11):1303–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1593/neo.08636>
106. Heyfets A, Flescher E. Cooperative cytotoxicity of methyl jasmonate with anti-cancer drugs and 2-deoxy-d-glucose. *Cancer Lett.* 2007;250(2):300–10.
107. Mack P, Ahrén B, Jeppsson B, Kan Z, Bengmark S. Influence of 2-deoxy-d-glucose and arterial ischaemia on glucose oxidation and growth of liver cancer in the rat. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1988;24(9):1433–7.

## 8 Anexos

### 8.1 Artigos excluídos da revisão sistemática

#### 8.1.1 Artigos de Revisão

TABELA S1- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS DE REVISÃO

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista (ano)</b>	<b>Critério de exclusão</b>	<b>Referência</b>
<i>Current therapy of cutaneous melanoma</i>	Wagner <i>et al.</i>	Plastic and reconstructive surgery (2000)	2-DG usada para técnicas de imagem (PET)	(18)
<i>Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug</i>	Cohen, S. e Flescher, E.	Phytochemistry (2009)	Sem correlação entre os termos de pesquisa	(19)
<i>F-18-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography (PET) and PET/computed tomography imaging in primary staging of patients with malignant melanoma: a systematic review</i>	Schröer-Günther <i>et al.</i>	Systematic Reviews (2012)	2-DG usada para técnicas de imagem (PET)	(20)
<i>Triple primary cancer of the head and neck, skin and prostate: A case report and literature review</i>	Maruyama <i>et al.</i>	Oncology Letters (2018)	2-DG usada para técnicas de imagem (PET)	(21)
<i>Sorcina: a novel potential target in therapies of cancers</i>	Zhou <i>et al.</i>	Cancer Management and Research (2019)	Ausência dos termos de pesquisa	(22)

## 8.1.2 Artigos que não apresentam os termos de pesquisa estabelecidos

TABELA S2- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS QUE NÃO APRESENTAM OS TERMOS DE PESQUISA ESTABELECIDOS

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Current therapy for cutaneous melanoma</i>	Johnson <i>et al.</i>	Journal of the American Academy of Dermatology (1995)	(23)
<i>DNA base adducts in urine and white blood cells of cancer patients receiving combination chemotherapies which include N-methyl-N-nitrosourea</i>	Prevost <i>et al.</i>	Biomarkers (1996)	(24)
<i>Cloning of a Human UDP-galactose:2-Acetamido-2-deoxy-D-glucose 3<math>\beta</math>-Galactosyltransferase Catalyzing the Formation of Type 1 Chains*</i>	Kolbinger <i>et al.</i>	Journal of Biological Chemistry (1998)	(25)
<i>Isolation and Characterization of Low Density Detergent-Insoluble Membrane (LD-DIM) Fraction from Sea Urchin Sperm</i>	Ohta <i>et al.</i>	Biochemical and Biophysical Research Communications (1999)	(26)
<i>O6-methylguanine formation, repair protein depletion and clinical outcome with a 4 hr schedule of temozolomide in the treatment of advanced melanoma: results of a phase ii study</i>	Middleton <i>et al.</i>	International Journal of Cancer (2000)	(27)
<i>Cholic Acid Derivatives as 1,2,4,5-Tetraoxane Carriers: Structure and Antimalarial and Antiproliferative Activity</i>	Opsenica <i>et al.</i>	Journal of Medicine Chemistry (2000)	(28)
<i>Expression of GM-CSF Receptors in Male Germ Cells and their Role in Signaling for Increased Glucose and Vitamin C Transport</i>	Zambrano <i>et al.</i>	Journal of Cellular Biochemistry (2001)	(29)
<i>Effect of eicosapentaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, on UVR-related cancer risk in humans. An assessment of early genotoxic markers</i>	L. Rhodes <i>et al.</i>	Carcinogenesis (2003)	(30)
<i>G-to-T Transversions and Small Tandem Base Deletions Are the Hallmark of Mutations Induced by Ultraviolet A Radiation in Mammalian Cells</i>	Besaratinia <i>et al.</i>	Biochemistry (2004)	(31)

**TABELA S2 - CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS QUE NÃO APRESENTAM OS TERMOS DE PESQUISA ESTABELECIDOS (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Homology modeling of four Y-family, lesion-bypass DNA polymerases: The case that E. coli Pol IV and human Pol <math>\kappa</math> are orthologs, and E. coli Pol V and human Pol <math>\eta</math> are orthologs</i>	Lee <i>et al.</i>	Journal of Molecular Graphics and Modelling (2006)	(32)
<i>Selective vitamin D receptor modulators and their effects on colorectal tumor growth</i>	Spina <i>et al.</i>	Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (2007)	(33)
<i>Redox effector factor-1, combined with reactive oxygen species, plays an important role in the transformation of JB6 cells</i>	Yang <i>et al.</i>	Carcinogenesis (2007)	(34)
<i>The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin</i>	Chakravarti <i>et al.</i>	Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis (2008)	(35)
<i>Efficient and accurate bypass of N<sup>2</sup>-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine by DinB DNA polymerase in vitro and in vivo</i>	Yuan <i>et al.</i>	Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2008)	(36)
<i>2-Deoxy-D-glucose as a potential drug against fusogenic viruses including HIV</i>	Parris, George E.	Medical Hypotheses (2008)	(37)
<i>The Sequence Dependence of Human Nucleotide Excision Repair Efficiencies of Benzo[a]pyrene-derived DNA Lesions: Insights into the Structural Factors that Favor Dual Incisions</i>	Kropachev <i>et al.</i>	Journal of Molecular Biology (2009)	(38)
<i>A 4-deoxy analogue of N-acetyl-D-glucosamine inhibits heparan sulfate expression and growth factor binding in vitro</i>	van Wijk <i>et al.</i>	Experimental Cell Research (2010)	(39)
<i>Effect of Human Cell Malignancy on Activity of DNA Polymerase <math>\iota</math></i>	Kazakov <i>et al.</i>	Biochemistry (Moscow) (2010)	(40)
<i>Targeting Cancer Cell Metabolism: The Combination of Metformin and 2-Deoxyglucose Induces p53-Dependent Apoptosis in Prostate Cancer Cells</i>	Sahra <i>et al.</i>	American Association for Cancer Research (2010)	(41)
<i>A phase I study of BMS-690514 in Japanese patients with advanced or metastatic solid tumors</i>	Nokihara <i>et al.</i>	Cancer Chemotherapy and Pharmacology (2012)	(42)
<i>Inhibition of autophagy by 3-MA enhances endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells</i>	Song <i>et al.</i>	Oncology Letters (2013)	(43)

**TABELA S2- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS QUE NÃO APRESENTAM OS TERMOS DE PESQUISA ESTABELECIDOS (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Delivery Rate Affects Uptake of a Fluorescent Glucose Analog in Murine Metastatic Breast Cancer</i>	Rajaram <i>et al.</i>	PLoS ONE (2013)	(44)
<i>Delivery-Corrected Imaging of Fluorescently-Labeled Glucose Reveals Distinct Metabolic Phenotypes in Murine Breast Cancer</i>	Frees <i>et al.</i>	PLoS ONE (2014)	(45)
<i>p53 inactivation decreases dependence on estrogen/ERK signalling for proliferation but promotes EMT and susceptibility to 3-bromopyruvate in ERα+ breast cancer MCF-7 cell</i>	Rieber <i>et al.</i>	Biochemical Pharmacology (2014)	(46)
<i>'Immunosequencing' of heparan sulfate from human cell lines and rat kidney: the (GlcNS6S-IdoA2S)3 motif, recognized by antibody NS4F5, is located towards the non-reducing end</i>	van Wijk <i>et al.</i>	Biochemical Journal (2014)	(47)
<i>Delivery-Corrected Imaging of Fluorescently-Labeled Glucose Reveals Distinct Metabolic Phenotypes in Murine Breast Cancer</i>	Frees <i>et al.</i>	PLoS ONE (2014)	(48)
<i>Protective effect of 2-deoxy-D-glucose on the cytotoxicity of cyclosporin A in vitro</i>	Ouyang <i>et al.</i>	Molecular Medicine Reports (2015)	(49)
<i>Preventing Allograft Rejection by Targeting Immune Metabolism</i>	Lee <i>et al.</i>	Cell Reports (2015)	(50)
<i>mTOR masters monocytic myeloid-derived suppressor cells in mice with allografts or tumors</i>	Wu <i>et al.</i>	Scientific Reports (2016)	(51)
<b>Cancro Ginecológico</b>	Lacerda <i>et al.</i>	Sociedade Portuguesa de Ginecologia (2016)	(52)
<i>Functional characterization of six aspartate (D) recombinant mojastin mutants (r-Moj): A second aspartate amino acid carboxyl to the RGD in r-Moj-D_ peptides is not sufficient to induce apoptosis of SK-Mel- 28 cells.</i>	Ramos <i>et al.</i>	Toxicon (2016)	(53)
<i>Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells</i>	Blanquer-Rosselló <i>et al.</i>	BBA - General Subjects (2017)	(54)
<i>Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling</i>	Kim <i>et al.</i>	Scientific Reports (2017)	(55)
<i>Enhanced Repair of UV-Induced DNA Damage by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Skin Is Linked to Pathways that Control Cellular Energy</i>	Rybchyn <i>et al.</i>	Journal of Investigative Dermatology (2018)	(56)

**TABELA S2- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS QUE NÃO APRESENTAM OS TERMOS DE PESQUISA ESTABELECIDOS (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Metabolic reprogramming in keloid fibroblasts: Aerobic glycolysis and a novel therapeutic strategy</i>	Li <i>et al.</i>	<i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> (2018)	(57)
<i>Exploiting TERT dependency as a therapeutic strategy for NRASmutant melanoma</i>	Reyes-Uribe <i>et al.</i>	Oncogene (2018)	(58)
<i>Induction of Telomere Dysfunction Prolongs Disease Control of Therapy-Resistant Melanoma</i>	Zhang <i>et al.</i>	Clinical Cancer Research (2018)	(59)
<i>Membrane-enriched solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1/GLUT1) in psoriatic keratinocytes confers sensitivity to 2-deoxy-D-glucose (2-DG) treatment</i>	Huang <i>et al.</i>	Experimental Dermatology (2019)	(60)
<i>Diacylglycerol kinase <math>\alpha</math>-selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines</i>	Yamaki <i>et al.</i>	Jornal of Cellular Biochemistry (2019)	(61)
<i>MiR-145 inhibited lipopolysaccharide-induced apoptosis of gastric mucosal via up-regulating JNK-mediated cytoprotective autophagy</i>	Meng <i>et al.</i>	Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences (2019)	(62)

### 8.1.3 Artigos em que a 2-DG é utilizada para a realização de técnicas de imagem

**TABELA S3- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE A 2-DG É UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE IMAGEM**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Malignant Melanoma: Staging with whole-body Positron Emission Tomography and 2-[F-18]-Fluoro-2-deoxy-D-glucose</i>	Steinert <i>et al.</i>	Radiology (1995)	(63)
<i>Functional Imaging with Positron Emission Tomography in Patients with Malignant Melanoma</i>	Eil <i>et al.</i>	Oncology Research and Treatment (1996)	(64)
<i>Assessment of Axillary Lymph Node Involvement in Breast Cancer Patients With Positron Emission Tomography Using Radiolabeled 2-(Fluorine-18)-fluoro-2-deoxy-D-glucose</i>	Avril <i>et al.</i>	Journal of the National Cancer Institute (1996)	(65)
<i>Prospective Evaluation of 2-[18F]-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography in Staging of Regional Lymph Nodes in Patients With Cutaneous Malignant Melanoma</i>	Macfarlane <i>et al.</i>	Journal of Clinical Oncology (1998)	(66)
<i>Combined FDG and [F-18]Fluoride whole-body PET: A feasible two-in-one approach to cancer imaging?</i>	Hoegerle <i>et al.</i>	Radiology (1998)	(67)
<i>How platelet aggregation affects B16BL6 melanoma cell trafficking</i>	Koike <i>et al.</i>	FEBS Letters (1998)	(68)

**TABELA S3- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE A 2-DG É UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE IMAGEM (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Malignant melanoma staging using whole-body positron emission tomography</i>	Paquet <i>et al.</i>	Melanoma Research (1998)	(69)
<i>PET Scanning with <sup>18</sup>F 2-Fluoro-2-Deoxy-d-Glucose (FDG) in Patients with Melanoma: Benefits and Limitations</i>	Nguyen <i>et al.</i>	Clinical Positron Imaging (Netherlands) (1999)	(70)
<i>Primary Staging and Follow-Up of High Risk Melanoma Patients with Whole-Body <sup>18</sup>F-Fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography</i>	Rinne <i>et al.</i>	American Cancer Society (1999)	(71)
<i>Prospective Study of Fluorodeoxyglucose–Positron Emission Tomography Imaging of Lymph Node Basins in Melanoma Patients Undergoing Sentinel Node Biopsy</i>	Wagner <i>et al.</i>	Journal of Clinical Oncology (1999)	(72)
<i>Positron Emission Tomography Scanning in Malignant Melanoma: Clinical utility in patients with Stage III disease</i>	Tyler <i>et al.</i>	American Cancer Society (2000)	(73)

**TABELA S3- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE A 2-DG É UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE IMAGEM (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>F-18 FDG Positron Emission Tomography in Primary Breast Non-Hodgkin's Lymphoma</i>	Bakheet <i>et al.</i>	Clinical Nuclear Medicine (2001)	(74)
<i>Diagnostic Accuracy of 2-[Fluorine-18] Fluro-2-Deoxy-D-Glucose Positron Emission Tomography Imaging in Nonsquamous Tumors of the Head and Neck</i>	Bui <i>et al.</i>	Investigative Radiology (2003)	(75)
<i>Factors Influencing [F-18] 2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose (F-18 FDG) Uptake in Melanoma Cells: The Role of Proliferation Rate, Viability, Glucose Transporter Expression and Hexokinase Activity</i>	Yamada <i>et al.</i>	The Journal of Dermatology (2005)	(76)
<i>Near-Infrared Fluorescent Deoxyglucose Analogue for Tumor Optical Imaging in Cell Culture and Living Mice</i>	Cheng <i>et al.</i>	Bioconjugate Chemistry (2006)	(77)
<i>Routine use of FDG-PET scans in melanoma patients with positive sentinel node biopsy</i>	Horn <i>et al.</i>	European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging (2006)	(78)
<i>Efficacy of imatinib mesylate in advanced medullary thyroid carcinoma</i>	Frank-Raue <i>et al.</i>	European Journal of Endocrinology (2007)	(79)
<i>PET Imaging to Determine the Role of PET in the Assessment of Regional Disease in Breast Cancer (PET PREDICT Trial)</i>	Pritchard, <i>et al.</i>	National Library of Medicine (2007)	(80)
<i>Unusual 2-[18F]-Xuoro-2-deoxy-D-glucose accumulation induced by postoperative intestinocutaneous Wstula in the patient with uterine cervical cancer and SLE</i>	Kim <i>et al.</i>	Archives of Gynecology and Obstetrics (2009)	(81)
<i>Whole-body F-18-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography/computed tomography imaging in the follow-up of metastatic uveal melanoma</i>	Klingenstein <i>et al.</i>	Melanoma Research (2010)	(82)
<i>Melanoma of the middle ear: initial presentation, Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography imaging and follow up</i>	Huellner <i>et al.</i>	Journal of Laryngology & Otology (2011)	(83)

**TABELA S3- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE A 2-DG É UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE IMAGEM (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Phase I dose-escalation study to determine the safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of brivanib alaninate in combination with full-dose cetuximab in patients with advanced gastrointestinal malignancies who have failed prior therapy</i>	Garrett <i>et al.</i>	British Journal of Cancer (2011)	(84)
<i>Preclinical investigation of tolerance and antitumour activity of new fluorodeoxyglucose-coupled chlorambucil alkylating agents</i>	Miot-Noirault <i>et al.</i>	Investigational New Drugs (2011)	(85)
<i>Phase II trial of the regulatory T cell-depleting agent, denileukin diftitox, in patients with unresectable stage IV melanoma</i>	Telang <i>et al.</i>	BMC Cancer (2011)	(86)
<i>A Prospective Study to Evaluate FDG-PET, Breast MRI, and Breast Ultrasonography in Monitoring Tumour Responses in Patients With Locally Advanced Breast Cancer (LABC) Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy (PETLAB)</i>	Som Mukherjee	National Library of Medicine (2011)	(87)
<i>Transcutaneous computed bioconductance measurement in lung cancer: A treatment enabling technology useful for adjunctive risk stratification in the evaluation of suspicious pulmonary lesions</i>	Yung <i>et al.</i>	Journal of Thoracic Oncology (2012)	(88)
<i>Comparison of Diagnostic Performance of an Algorithm and a High Definition Classical Iterative Algorithm Positron Emission Tomography (PET) to 18Fluoro-deoxy-glucose (18FDG) in the Evaluation of Axillary Lymph Node Invasion of Breast Tumors (TEP-Sein)</i>	Switsers Odile	National Library of Medicine (2012)	(89)
<i>A phase I, first-in-human dose-escalation study of amuvatinib, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors</i>	Tibes <i>et al.</i>	Cancer Chemotherapy and Pharmacology (2013)	(90)
<i>Radiation induces aerobic glycolysis through reactive oxygen species</i>	Zhong <i>et al.</i>	Radiotherapy and Oncology (2013)	(91)
<i>Perineural Spread in Head and Neck Malignancies: Clinical Significance and Evaluation with 18F-FDG PET/CT</i>	Paes <i>et al.</i>	Radiographics (2013)	(92)

**TABELA S3- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE A 2-DG É UTILIZADA PARA REALIZAÇÃO DE TÉCNICAS DE IMAGEM (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Clinicopathological correlation for the role of fluorodeoxyglucose positron emission tomography computed tomography in detection of choroidal malignant melanoma</i>	Matsuo <i>et al.</i>	International Journal of Clinical Oncology (2014)	(93)
<i>Complete resection of isolated hepatic metastatic uveal melanoma with a notably long disease-free period: A case report and review of the literature</i>	Lin <i>et al.</i>	Oncology Letters (2015)	(94)
<i>PET-MR for Prediction and Monitoring of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer</i>	Woo Kyung Moon	National Library of Medicine (2015)	(95)
<i>Factors Linked to the Metastatic Spread of Malignant Cutaneous Melanoma to the Lower Extremities in a Retrospective <sup>18</sup>F-FDG PET/CT Cohort</i>	Plouznikoff, N. e Arsenault, F.	Clinical Skin Cancer (2017)	(96)
<i>FDG-PET in Advanced Melanoma</i>	Tom Yankeelov	National Library of Medicine (2017)	(97)
<i>FES (16<math>\alpha</math>-[18F]-Fluoro-17<math>\beta</math>-estradiol)-PET: Towards a New Standard to Stage Locally Advanced and Recurrent, Estrogen Receptor Positive (ER+) Breast Cancer? Pilot Study to Compare [18F]FES-PET and [18F]FDG-PET (FORESIGHT)</i>	C. Menke- van der e Houven van Oordt	National Library of Medicine (2018)	(98)
<i>Triple Negative Breast Cancer: Identification Pilot Study of Predictive Transcriptome Profiles of Early Tumor Drug Resistance Observed in 18F-Fluorodeoxyglucose (FDG) PET (TRANSTEP)</i>	Pierre Fumoleau	National Library of Medicine (2018)	(99)
<i>Positron Emission Tomography Imaging Using Copper Cu 64 TP3805 in Patients With Breast Cancer</i>	Madhukar Thakur	National Library of Medicine (2018)	(100)
<i>Hybrid PET/MR Imaging of Acute Cardiac Inflammation After Left-Sided Breast Cancer Radiotherapy (RICT-BREAST)</i>	Stewart Gaede	National Library of Medicine (2018)	(101)
<i>Interim FDG PET-CT in Melanoma Metastatic Patient's Treated by Anti-PD1 Therapy (TEP-ANTI-PD1)</i>	Micheline Razzouk-Cadet	National Library of Medicine (2019)	(102)
<i>18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) Positron Emission Tomography in Oncology</i>	Don C Wilson	National Library of Medicine (2019)	(103)
<i>Imaging Patients for Cancer Drug selection - Metastatic Breast Cancer (IMPACT-MBC)</i>	Schröder, <i>et al.</i>	National Library of Medicine (2019)	(104)

### 8.1.4 Artigos em que a 2-DG foi usada para avaliação da glucose

TABELA S4- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE A 2-DG FOI USADA PARA AVALIAÇÃO DA GLUCOSE

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Fundamentação</b>	<b>Referência</b>
<i>Extracellular Calcium Stimulates Na<sup>+</sup>-dependent Putrescine Uptake in B16 Melanoma Cells</i>	Minchin, R. e Martin, R.	International Journal of Biochemistry and Cell Biology (1997)	Utilização da 2-DG para ensaio de avaliação da recaptação de glucose	(105)
<i>Emodin, as a mitochondrial uncoupler, induces strong decreases in adenosine triphosphate (ATP) levels and proliferation of B16F10 cells, owing to their poor glycolytic reserve</i>	Sugiyama <i>et al.</i>	Genes to Cells (2019)	Utilização da 2-DG para avaliação da taxa de acidificação extracelular	(106)

### 8.1.5 Artigos em que constam os termos de pesquisa, mas não existe uma relação entre eles

TABELA S5- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE CONSTAM OS TERMOS DE PESQUISA, MAS NÃO EXISTE UMA RELAÇÃO ENTRE ELES

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Role of ATP in the sensitivity to heat and the induction of apoptosis in mammalian cells</i>	Miyazaki <i>et al.</i>	International Journal of Hyperthermia (2002)	(107)
<i>LKB1 mutation in large cell carcinoma of the lung</i>	Zhong <i>et al.</i>	Lung Cancer (2006)	(108)
<i>Berberine combined with 2-deoxy-D-glucose synergistically enhances cancer cell proliferation inhibition via energy depletion and unfolded protein response disruption</i>	Fan <i>et al.</i>	Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects (2013)	(109)
<i>Down-regulation of RIP1 by 2-deoxy-D-glucose sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis</i>	Huang <i>et al.</i>	European Journal of Pharmacology (2013)	(110)
<i>Inhibition of autophagy by 3-MA enhances endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells</i>	Song <i>et al.</i>	Oncology Letters (2013)	(43)

**TABELA S5- CARACTERÍSTICAS DOS ARTIGOS EM QUE CONSTAM OS TERMOS DE PESQUISA, MAS NÃO EXISTE UMA RELAÇÃO ENTRE ELES (CONTINUAÇÃO)**

<b>Título do artigo</b>	<b>Autores</b>	<b>Revista</b>	<b>Referência</b>
<i>Inhibition of cancer cell growth by GRP78 siRNA lipoplex via activation of Unfolded Protein Response</i>	Matsumura <i>et al.</i>	Biological and Pharmaceutical Bulletin (2014)	(111)
<i>Protective effect of 2-deoxy-D-glucose on the cytotoxicity of cyclosporin A in vitro</i>	Ouyang <i>et al.</i>	Molecular Medicine Reports (2015)	(49)
<i>Regulation of glucose uptake in lymphoma cell lines by c-MYC and PI3K-dependent signaling pathways and impact of glycolytic pathways on cell viability</i>	Broecker-Preuss <i>et al.</i>	Journal of Translational Medicine (2017)	(112)
<i>Chemosensitization by Ursolic Acid: A New Avenue for Cancer Therapy</i>	Prasad <i>et al.</i>	Role of Nutraceuticals in Cancer Chemosensitization (2018)	(113)
<i>Liver kinase B1/adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling axis induces p21/WAF1 expression in a p53-dependent manner</i>	Ma <i>et al.</i>	Oncology Letters (2018)	(114)
<i>2-Deoxy-d-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancer cells through downregulating JNK-mediated cytoprotective autophagy</i>	Xu <i>et al.</i>	Cancer Chemotherapy and Pharmacology (2018)	(115)

## 8.2 Linhas celulares de melanoma humano e melanócitos normais e respectivos fenômenos avaliados

TABELA S6- LINHAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO

Células de melanoma	Fenómeno avaliado no estudo	Referência
A375	Influência da expressão celular de Muc4 na resistência à apoptose induzida pela 2-DG	(1)
	Efeito da 2-DG isolada na inibição da glicólise; Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com TRAIL na apoptose	(2)
	Efeito da 2-DG no stress do retículo endoplasmático	(3)
	Efeito da 2-DG na proliferação, migração e invasão celular	(4)
	Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com metiljasmonato ou coronatina na proliferação, viabilidade e toxicidade celular	(5)
SK-Mel-28	Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com TRAIL na apoptose	(6)
	Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com cisplatina e/ou meio EBSS (baixo nível de glucose) na indução da apoptose	(7)
	Efeito da 2-DG na proliferação, migração e invasão celular	(4)

**TABELA S6- LINHAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO (CONTINUAÇÃO)**

Células de melanoma	Fenómeno avaliado no estudo	Referência
C8161	Efeito da 2-DG isolada na inibição da glicólise, potencial mitocondrial e apoptose; Efeito da 2-DG em combinação com TRAIL na apoptose	(2)
	Efeito do <i>knockdown</i> no gene p53 na resistência celular ao tratamento com 2-DG sob hipoxia ou normoxia; Efeito do <i>knockdown</i> no gene p53, com adição da enzima superóxido dismutase sob hipoxia e CoCl <sub>2</sub> na viabilidade celular ao tratamento com 2-DG	(8)
A2058	Efeito da 2-DG na viabilidade celular em células com variantes celulares resistentes à ADI-PEG20	(9)
	Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com metiljasmonato ou coronatina na proliferação e viabilidade celular	(5)
MeWo	Efeito da 2-DG nos processos de reparação do dano no DNA pós-irradiação	(10)
	Efeito da 2-DG na inibição da glicólise, apoptose, autofagia, potencial mitocondrial, paragem do ciclo celular e formação de ROS e RNS, quando isolada ou em combinação com pirimetamina, cisplatina, temozolomida ou estaurosporina	(11)

**TABELA S6- LINHAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO (CONTINUAÇÃO)**

<b>Células de melanoma</b>	<b>Fenómeno avaliado no estudo</b>	<b>Referência</b>
<b>Colo 38</b>	Efeito do tetraacetato de 2-DG na citotoxicidade e apoptose celular	(12)
<b>Be-11</b>	Efeito da 2-DG nos processos de reparação do dano no DNA pós-irradiação	(10)
<b>MDA-MB-435</b>	Efeito da 2-DG na inibição da glicólise, stress do RE/UPR e autofagia e citotoxicidade, quando isolada ou em combinação com manose ou 3-metiladenina; Efeito da 2-DG em meio anaeróbio	(13)
<b>Mel-501</b>	Efeito da 2-DG na apoptose, potencial mitocondrial e paragem do ciclo celular, quando isolada ou em combinação com cisplatina, estaurosporina ou pirimetamina	(11)
<b>CHL-1</b>	Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com cisplatina e/ou meio EBSS (baixo nível de glucose) na indução da apoptose	(7)
<b>SK-Mel-2</b>	Efeito da 2-DG na viabilidade celular em células com variantes celulares resistentes à ADI-PEG20	(9)
<b>G-361</b>	Efeito da 2-DG no stress do retículo endoplasmático	(3)

**TABELA S6- LINHAS CELULARES DE MELANOMA HUMANO (CONTINUAÇÃO)**

Células de melanoma	Fenómeno avaliado no estudo	Referência
Mel-RM, MM200	Efeito da 2-DG isolada na apoptose e viabilidade celular	(6)
Mel-RM, MM200, IgR3, Mel-CV, Mel-FH, SK-Mel-110, ME4405, Melanócitos humanos HEMn-MP	Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com TRAIL na indução da apoptose	
Melanócitos humanos normais	Efeito da 2-DG isolada ou em combinação com TRAIL na indução da apoptose	(2)

### 8.3 Linhas celulares de melanoma de ratinho e respectivos fenômenos avaliados

TABELA S7- LINHAS CELULARES DE MELANOMA DE RATINHO

Células de melanoma	Fenómeno avaliado no estudo	Referência
<b>B16F10</b>	Efeito da 2-DG isolada na apoptose quando isolada ou em combinação com Imiquimod <i>in vitro</i> ; Efeito da 2-DG na massa e volume tumoral isolada ou em combinação com Imiquimod <i>in vivo</i>	(14)
	Efeito da 2-DG no potencial mitocondrial, viabilidade celular	(15)
	Efeito da 2-DG na proliferação e migração celular quando isolada ou em combinação com cloxiquina <i>in vitro</i> ; Efeito da 2-DG no crescimento e metástase tumoral quando isolada ou em combinação com cloxiquina <i>in vivo</i>	(16)
<b>B16F0</b>	Efeito da 2-DG na inibição da glicólise, formação de ROS, potencial mitocondrial, viabilidade celular, citotoxicidade, peroxidação lipídica, quando isolada ou em combinação com NDI <i>in vitro</i> ; Efeito da 2-DG na massa, volume tumoral e necrose <i>in vivo</i>	(17)

## 9 Bibliografia dos anexos

1. Hu YP, Haq B, Carraway KL, Savaraj N, Lampidis TJ. Multidrug resistance correlates with overexpression of Muc4 but inversely with P-glycoprotein and multidrug resistance related protein in transfected human melanoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2003;65(9):1419–25.
2. Qin JZ, Xin H, Nickoloff BJ. 2-Deoxyglucose sensitizes melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis which is reduced by mannose. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2010;401(2):293–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.09.054>
3. Nagasawa I, Kunimasa K, Tsukahara S, Tomida A. BRAF-mutated cells activate GCN2-mediated integrated stress response as a cytoprotective mechanism in response to vemurafenib. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;482(4):1491–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.12.062>
4. Deng Y, Li H, Yin X, Liu H, Liu J, Guo D, et al. C-Terminal Binding Protein 1 Modulates Cellular Redox via Feedback Regulation of MPC1 and MPC2 in Melanoma Cells. *Med Sci Monit*. 2018;24:7614–24.
5. Kim HY, Jin H, Bae J, Choi HK. Metabolic and lipidomic investigation of the antiproliferative effects of coronatine against human melanoma cells. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–13.
6. Liu H, Jiang CC, Lavis CJ, Croft A, Dong L, Tseng HY, et al. 2-Deoxy-D-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells through XBP-1-mediated up-regulation of TRAIL-R2. *Mol Cancer*. 2009;8:1–17.
7. Antunes F, Corazzari M, Pereira G, Fimia GM, Piacentini M, Smaili S. Fasting boosts sensitivity of human skin melanoma to cisplatin-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2017;485(1):16–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.149>
8. Chavez-Perez VA, Strasberg-Rieber M, Rieber M. Hypoxia and hypoxia mimetic cooperate to counteract tumor cell resistance to glucose starvation preferentially in tumor cells with mutant p53. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2014;443(1):120–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.065>
9. Long Y, Tsai W Bin, Wangpaichitr M, Tsukamoto T, Savaraj N, Feun LG, et al. Arginine deiminase resistance in melanoma cells is associated with metabolic reprogramming, glucose dependence, and glutamine addiction. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(11):2581–90.
10. Dwarkanath BS, Zolzer F, Chandana S, Bauch T, Adhikari JS, Muller WU, et al. Heterogeneity in 2-deoxy-D-glucose-induced modifications in energetics and radiation responses of human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;50(4):1051–61.
11. Giammarioli AM, Gambardella L, Barbati C, Pietraforte D, Tinari A, Alberton M, et al. Differential effects of the glycolysis inhibitor 2-deoxy- D -glucose on the activity of pro-apoptotic agents in metastatic melanoma cells, and induction of a cytoprotective

- autophagic response. *Int J Cancer*. 2012;131(4).
12. Reinhold U, Malaisse WJ. Cytotoxic action of 2-deoxy-D-glucose tetraacetate upon human lymphocytes, fibroblasts and melanoma cells. *Int J Mol Med*. 1998;1(2):427–30.
  13. Xi H, Kurtoglu M, Liu H, Wangpaichitr M, You M, Liu X, et al. 2-Deoxy-d-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011;67(4):899–910.
  14. Huang SW, Kao JK, Wu CY, Wang ST, Lee HC, Liang SM, et al. Targeting aerobic glycolysis and HIF-1' expression enhance imiquimod-induced apoptosis in cancer cells. *Oncotarget*. 2014;5(5):1363–81.
  15. Lee DG, Choi BK, Kim YH, Oh HS, Park SH, Bae YS, et al. The repopulating cancer cells in melanoma are characterized by increased mitochondrial membrane potential. *Cancer Lett*. 2016;382(2):186–94.
  16. Zhang W, Shao W, Dong Z, Zhang S, Liu C, Chen S. Cloxiquine, a traditional antituberculosis agent, suppresses the growth and metastasis of melanoma cells through activation of PPAR $\gamma$ . *Cell Death Dis* [Internet]. 2019;10(6). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-1644-8>
  17. Kasic M, Arskin-Csordas K, Paunovic V, Firestone RA, Ristic B, Mircic A, et al. Synergistic anticancer action of lysosomal membrane permeabilization and glycolysis inhibition. *J Biol Chem*. 2016;291(44):22936–48.
  18. Wagner JD, Gordon MS, Chuang TY, Coleman 3rd JJ. Current therapy of cutaneous melanoma. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(5):1774–99.
  19. Cohen S, Flescher E. Methyl jasmonate: A plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry* [Internet]. 2009;70(13–14):1600–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.06.007>
  20. Schröer-Günther MA, Wolff RF, Westwood ME, Scheibler FJ, Schürmann C, Baumert BG, et al. F-18-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography (PET) and PET/computed tomography imaging in primary staging of patients with malignant melanoma: A systematic review. *Syst Rev*. 2012;1(1):1–11.
  21. Maruyama N, Nakasone T, Arakaki O, Matsumoto H, Maruyama T, Matayoshi A, et al. Triple primary cancer of the head and neck, skin and prostate: A case report and literature review. *Oncol Lett*. 2018;16(4):5249–56.
  22. Zhou X, Wu X, Chen B. Sorcin: A novel potential target in therapies of cancers. *Cancer Manag Res*. 2019;11:7327–36.
  23. Johnson TM, Smith JW, Nelson BR, Chang A. Current therapy for cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 1995;32(5 PART 1):689–707.
  24. Prevost V, Likhachev AJ, Loktionova NA, Bartsch H, Wild CP, Kazanova OI, et al. DNA base adducts in urine and white blood cells of cancer patients receiving combination chemotherapies which include N-methyl-N-nitrosourea. *Biomarkers*. 1996;1(4):244–51.
  25. Kolbinger F, Streiff MB, Katopodis AG. Cloning of a human UDP-galactose:2-acetamido-2-deoxy-D-glucose  $\beta$ -galactosyltransferase catalyzing the formation of type 1 chains. *J Biol Chem*. 1998;273(1):433–40.
  26. Ohta K, Sato C, Matsuda T, Toriyama M, Lennarz WJ, Kitajima K. Isolation and characterization of low density detergent-insoluble membrane (LD-DIM) fraction from

- sea urchin sperm. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258(3):616–23.
27. Middleton MR, Lee SM, Arance A, Wood M, Thatcher N, Margison GP. O6-methylguanine formation, repair protein depletion and clinical outcome with a 4 hr schedule of temozolomide in the treatment of advanced melanoma: Results of a phase II study. *Int J Cancer.* 2000;88(3):469–73.
  28. Opsenica D, Pocsfalvi G, Juranic Z, Tinant B, Declercq JP, Kyle DE, et al. Cholic acid derivatives as 1,2,4,5-tetraoxane carriers: Structure and antimalarial and antiproliferative activity. *J Med Chem.* 2000;43(17):3274–82.
  29. Zambrano A, Noli C, Rauch MC, Werner E, Brito M, Amthauer R, et al. Expression of GM-CSF receptors in male germ cells and their role in signaling for increased glucose and vitamin C transport. *J Cell Biochem.* 2001;80(4):625–34.
  30. Rhodes LE, Shahbakhti H, Azurdia RM, Moison RMW, Steenwinkel MJST, Homburg MI, et al. Effect of eicosapentaenoic acid, an omega-3 polyunsaturated fatty acid, on UVR-related cancer risk in humans. An assessment of early genotoxic markers. *Carcinogenesis.* 2003;24(5):919–25.
  31. Besaratinia A, Synold TW, Xi B, Pfeifer GP. G-to-T transversions and small tandem base deletions are the hallmark of mutations induced by ultraviolet A radiation in mammalian cells. *Biochemistry.* 2004;43(25):8169–77.
  32. Lee CH, Chandani S, Loechler EL. Homology modeling of four Y-family, lesion-bypass DNA polymerases: The case that *E. coli* Pol IV and human Pol  $\kappa$  are orthologs, and *E. coli* Pol V and human Pol  $\eta$  are orthologs. *J Mol Graph Model.* 2006;25(1):87–102.
  33. Spina CS, Ton L, Yao M, Maehr H, Wolfe MM, Uskokovic M, et al. Selective vitamin D receptor modulators and their effects on colorectal tumor growth. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103(3–5):757–62.
  34. Yang S, Misner BJ, Chiu RJ, Meyskens FL. Redox effector factor-1, combined with reactive oxygen species, plays an important role in the transformation of JB6 cells. *Carcinogenesis.* 2007;28(11):2382–90.
  35. Chakravarti D, Venugopal D, Mailander PC, Meza JL, Higginbotham S, Cavalieri EL, et al. The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2008;649(1–2):161–78.
  36. Yuan B, Cao H, Jiang Y, Hong H, Wang Y. Efficient and accurate bypass of N2-(1-carboxyethyl)- 2'-deoxyguanosine by DinB DNA polymerase in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(25):8679–84.
  37. Parris GE. 2-Deoxy-d-glucose as a potential drug against fusogenic viruses including HIV. *Med Hypotheses.* 2008;70(4):776–82.
  38. Kropachev K, Kolbanovskii M, Cai Y, Rodríguez F, Kolbanovskii A, Liu Y, et al. The Sequence Dependence of Human Nucleotide Excision Repair Efficiencies of Benzo[a]pyrene-derived DNA Lesions: Insights into the Structural Factors that Favor Dual Incisions. *J Mol Biol* [Internet]. 2009;386(5):1193–203. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.082>
  39. van Wijk XMR, Oosterhof A, van den Broek SAMW, Griffioen AW, ten Dam GB, Rutjes FPJT, et al. A 4-deoxy analogue of N-acetyl-d-glucosamine inhibits heparan sulphate expression and growth factor binding in vitro. *Exp Cell Res* [Internet]. 2010;316(15):2504–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.04.025>

40. Kazakov AA, Grishina EE, Tarantul VZ, Gening L V. Effect of human cell malignancy on activity of DNA polymerase  $\alpha$ . *Biochem*. 2010;75(7):905–11.
41. Sahra I Ben, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, et al. Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Am Assoc Cancer Res*. 2010;70(6):2465–75.
42. Nokihara H, Yamamoto N, Yamada Y, Yamada K, Hirata T, Goto Y, et al. A phase I study of BMS-690514 in Japanese patients with advanced or metastatic solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;70(4):559–65.
43. Song L, Liu H, Ma L, Zhang X, Jiang Z, Jiang C. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncol Lett*. 2013;6(4):1031–8.
44. Rajaram N, Frees AE, Fontanella AN, Zhong J, Hansen K, Dewhirst MW, et al. Delivery Rate Affects Uptake of a Fluorescent Glucose Analog in Murine Metastatic Breast Cancer. *PLoS One*. 2013;8(10).
45. Frees AE, Rajaram N, McCachren SS, Fontanella AN, Dewhirst MW, Ramanujam N. Delivery-corrected imaging of fluorescently-labeled glucose reveals distinct metabolic phenotypes in murine breast cancer. *PLoS One*. 2014;9(12):1–21.
46. Rieber M, Strasberg-Rieber M. P53 inactivation decreases dependence on estrogen/ERK signalling for proliferation but promotes EMT and susceptibility to 3-bromopyruvate in ER $\alpha$ + breast cancer MCF-7 cells. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2014;88(2):169–77. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.025>
47. Van Wijk XMR, Oosterhof A, Versteeg EMM, Van De Westerlo EMA, Van Kuppevelt TH. “Immunosequencing” of heparan sulfate from human cell lines and rat kidney: The (GlcNS6S-IdoA2S)<sub>3</sub> motif, recognized by antibody NS4F5, is located towards the non-reducing end. *Biochem J*. 2014;461(3):461–8.
48. Frees AE, Rajaram N, McCachren SS, Fontanella AN, Dewhirst MW, Ramanujam N. Delivery-corrected imaging of fluorescently-labeled glucose reveals distinct metabolic phenotypes in murine breast cancer. *PLoS One*. 2014;9(12):1–20.
49. Ouyang Z, Cao W, Zhu S, Liu X, Zhong Z, Lai X, et al. Protective effect of 2-deoxy-D-glucose on the cytotoxicity of cyclosporin A in vitro. *Mol Med Rep*. 2015;12(2):2814–20.
50. Lee CF, Lo YC, Cheng CH, Furtmüller GJ, Oh B, Andrade-Oliveira V, et al. Preventing Allograft Rejection by Targeting Immune Metabolism. *Cell Rep*. 2015;13(4):760–70.
51. Wu T, Zhao Y, Wang H, Li Y, Shao L, Wang R, et al. MTOR masters monocytic myeloid-derived suppressor cells in mice with allografts or tumors. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(February):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep20250>
52. Sociedade Portuguesa de Ginecologia. *Cancro Ginecológico. Consensos Nac* 2016. 2016;1–167.
53. Ramos CJ, Gutierrez DA, Aranda AS, Koshlaychuk MA, Carrillo DA, Medrano R, et al. Functional characterization of six aspartate (D) recombinant mojastin mutants (r-Moj): A second aspartate amino acid carboxyl to the RGD in r-Moj-D- peptides is not sufficient to induce apoptosis of SK-Mel-28 cells. *Toxicon* [Internet]. 2016;118:36–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.04.038>

54. Blanquer-Rosselló M del M, Hernández-López R, Roca P, Oliver J, Valle A. Resveratrol induces mitochondrial respiration and apoptosis in SW620 colon cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2017;1861(2):431–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.10.009>
55. Kim HY, Lee H, Kim SH, Jin H, Bae J, Choi HK. Discovery of potential biomarkers in human melanoma cells with different metastatic potential by metabolic and lipidomic profiling. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-08433-9>
56. Rybchyn MS, De Silva WGM, Sequeira VB, McCarthy BY, Dilley AV, Dixon KM, et al. Enhanced Repair of UV-Induced DNA Damage by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in Skin Is Linked to Pathways that Control Cellular Energy. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2018;138(5):1146–56. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.11.037>
57. Li Q, Qin Z, Nie F, Bi H, Zhao R, Pan B, et al. Metabolic reprogramming in keloid fibroblasts: Aerobic glycolysis and a novel therapeutic strategy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;496(2):641–7.
58. Reyes-Uribe P, Adrianzen-Ruesta MP, Deng Z, Echevarria-Vargas I, Mender I, Saheb S, et al. Exploiting TERT dependency as a therapeutic strategy for NRAS-mutant melanoma. *Oncogene* [Internet]. 2018;37(30):4058–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0247-7>
59. Zhang G, Wu LW, Mender I, Barzily-Rokni M, Hammond MR, Ope O, et al. Induction of telomere dysfunction prolongs disease control of therapy-resistant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24(19):4771–84.
60. Huang X, Chen J, Zeng W, Wu X, Chen M, Chen X. Membrane-enriched solute carrier family 2 member 1 (SLC2A1/GLUT1) in psoriatic keratinocytes confers sensitivity to 2-deoxy-D-glucose (2-DG) treatment. *Exp Dermatol*. 2019;28(2):198–201.
61. Yamaki A, Akiyama R, Murakami C, Takao S, Murakami Y, Mizuno S, et al. Diacylglycerol kinase  $\alpha$ -selective inhibitors induce apoptosis and reduce viability of melanoma and several other cancer cell lines. *J Cell Biochem*. 2019;120(6):10043–56.
62. Meng F, Chen J, Long Q, Liu D. MiR-145 inhibited lipopolysaccharide-induced apoptosis of gastric mucosal via up-regulating JNK-mediated cytoprotective autophagy. *Pak J Pharm Sci*. 2019;32(1):285–91.
63. Steinert HC, Boni RAH, Buck A, Boni R, Berthold T, Marincek B, et al. Malignant Melanoma: Staging with whole-body Positron Emission Tomography and 2-[F-18]-Fluoro-2-deoxy-D-glucose. *Radiology*. 1995;195:705–9.
64. Eil A, Dimitrakopoulou-Strauss AD, Tilgen W, Oberdorfer F, Doll J, Strauss LG. Functional Imaging with Positron Emission Tomography in Patients with Malignant Melanoma. *Oncol Res Treat*. 1996;19(3):253–9.
65. Avril N, Dose J, Jänicke F, Ziegler S, Römer W, Weber W, et al. Assessment of axillary lymph node involvement in breast cancer patients with positron emission tomography using radiolabeled 2-(fluorine-18)-fluoro-2-deoxy-D-glucose. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(17):1204–9.
66. Macfarlane DJ, Sondak V, Johnson T, Wahl RL. Prospective evaluation of 2-[18F]-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography in staging of regional lymph nodes in patients with cutaneous malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 1998;16(5):1770–6.

67. Hoegerle S, Juengling F, Otte A, Althoefer C, Moser EA, Nitzsche EU. Combined FDG and [F-18]fluoride whole-body PET: A feasible two-in-one approach to cancer imaging? *Radiology*. 1998;209(1):253–8.
68. Koike C, Watanabe M, Isoai A, Kumagai H, Tsukada H, Irimura T, et al. How platelet aggregation affects B16BL6 melanoma cell trafficking. *FEBS Lett*. 1998;427(2):286–90.
69. Paquet P, Hustinx R, Rigo P, Piérard EG. Malignant melanoma staging using whole-body positron emission tomography. *Melanoma Res*. 1998;59–62.
70. Nguyen AT, Akhurst T, Larson SM, Coit DG, Brady MS. PET scanning with 18F 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) in patients with melanoma: Benefits and limitations. *Clin Positron Imaging*. 1999;2(2):93–8.
71. Mijnhout GS, Pijpers R, Hoekstra OS, Teule GJJ, Borgstein PJ, Meijer S, et al. Primary staging and follow-up of high risk melanoma patients with whole-body 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography: Results of a prospective study of 100 patients [2] (multiple letters). *Am Cancer Soc*. 1999;85(5):1199–200.
72. Wagner BJD, Schauwecker D, Davidson D, Iii JJC, Saxman S, Hutchins G, et al. Prospective Study of Fluorodeoxyglucose–Positron Emission Tomography Imaging of Lymph Node Basins in Melanoma Patients Undergoing Sentinel Node Biopsy. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1508–15.
73. Tyler DS, Onaitis M, Kherani A, Hata A, Nicholson E, Keogan M, et al. Positron emission tomography scanning in malignant melanoma: Clinical utility in patients with Stage III disease. *Am Cancer Soc*. 2000;89(5):1019–25.
74. Bakheet SM, Bakheet R, Ezzat A, Tulbah A, Durakovic A, Hussain S. F-18 FDG positron emission tomography in primary breast non-Hodgkin’s lymphoma. *Clin Nucl Med*. 2001;26(4):299–301.
75. Bui CD, Ching ASC, Carlos RC, Shreve PD, Mukherji SK. Diagnostic accuracy of 2-[fluorine-18]fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography imaging in nonsquamous tumors of the head and neck. *Invest Radiol*. 2003;38(9):593–601.
76. Yamada K, Brink I, Bissé E, Epting T, Engelhardt R. Factors Influencing [F-18] 2-Fluoro-2-Deoxy-D-Glucose (F-18 FDG) Uptake in Melanoma Cells: The Role of Proliferation Rate, Viability, Glucose Transporter Expression and Hexokinase Activity Kiyoshi. *J Dermatol*. 2005;32:316–34.
77. Cheng Z, Levi J, Xiong Z, Gheysens O, Keren S, Chen X, et al. Near-infrared fluorescent deoxyglucose analogue for tumor optical imaging in cell culture and living mice. *Bioconjug Chem*. 2006;17(3):662–9.
78. Horn J, Lock-Andersen J, Sjøstrand H, Loft A. Routine use of FDG-PET scans in melanoma patients with positive sentinel node biopsy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2006;33(8):887–92.
79. Frank-Raue K, Fabel M, Delorme S, Haberkorn U, Raue F. Efficacy of imatinib mesylate in advanced medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(2):215–20.
80. Pritchard K, Holloway C, McCready D, Julian J, N Levine M, Wendy S, et al. PET Imaging to Determine the Role of PET in the Assessment of Regional Disease in Breast Cancer (PET PREDICT Trial). *Natl Libr Med*. 2017;
81. Kim M, Lim MC, Seo SS, Kang S, Kim SK, Park SY. Unusual 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-d-

- glucose accumulation induced by postoperative intestinocutaneous fistula in the patient with uterine cervical cancer and SLE. *Arch Gynecol Obstet*. 2009;280(1):141–4.
82. Klingenstein A, Haug AR, Nentwich MM, Tiling R, Schaller UC. Whole-body F-18-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography/computed tomography imaging in the follow-up of metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res*. 2010;20(6):511–6.
  83. Huellner MW, Cousin M, Linder T, Soyka JD, Bussmann C, Eberle L, et al. Melanoma of the middle ear: Initial presentation, Fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography/computed tomography imaging and follow up. *J Laryngol Otol*. 2011;125(5):536–9.
  84. Garrett CR, Siu LL, El-Khoueiry A, Buter J, Rocha-Lima CM, Marshall J, et al. Phase I dose-escalation study to determine the safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of brivanib alaninate in combination with full-dose cetuximab in patients with advanced gastrointestinal malignancies who have failed prior therapy. *Br J Cancer* [Internet]. 2011;105(1):44–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.182>
  85. Miot-Noirault E, Reux B, Debiton E, Madelmont JC, Chezal JM, Coudert P, et al. Preclinical investigation of tolerance and antitumour activity of new fluorodeoxyglucose-coupled chlorambucil alkylating agents. *Invest New Drugs*. 2011;29(3):424–33.
  86. Telang S, Rasku MA, Clem AL, Carter K, Klarer AC, Badger WR, et al. Phase II trial of the regulatory T cell-depleting agent, denileukin diftitox, in patients with unresectable stage IV melanoma. *BMC Cancer*. 2011;11.
  87. Mukherjee S. A Prospective Study to Evaluate FDG-PET, Breast MRI, and Breast Ultrasonography in Monitoring Tumour Responses in Patients With Locally Advanced Breast Cancer (LABC) Undergoing Neoadjuvant Chemotherapy (PETLAB). *Natl Libr Med*. 2011;
  88. Yung RC, Zeng MY, Stoddard GJ, Garff M, Callahan K. Transcutaneous computed bioconductance measurement in lung cancer: A treatment enabling technology useful for adjunctive risk stratification in the evaluation of suspicious pulmonary lesions. *J Thorac Oncol* [Internet]. 2012;7(4):681–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/JTO.0b013e31824a8dcd>
  89. Odile S. Comparison of Diagnostic Performance of an Algorithm and a High Definition Classical Iterative Algorithm Positron Emission Tomography (PET) to 18Fluoro-deoxyglucose (18FDG) in the Evaluation of Axillary Lymph Node Invasion of Breast Tumors (TEP-Sein). *Natl Libr Med*. 2012;
  90. Tibes R, Fine G, Choy G, Redkar S, Taverna P, Oganessian A, et al. A phase I, first-in-human dose-escalation study of amuvatinib, a multi-targeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013;71(2):463–71.
  91. Zhong J, Rajaram N, Brizel DM, Frees AE, Ramanujam N, Batinic-Haberle I, et al. Radiation induces aerobic glycolysis through reactive oxygen species. *Radiother Oncol* [Internet]. 2013;106(3):390–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radonc.2013.02.013>
  92. Paes FM, Singer AD, Checkver AN, Palmquist RA, de la Vega G, Sidani C. Perineural spread in head and neck malignancies: Clinical significance and evaluation with 18F-FDG PET/CT. *Radiographics*. 2013;33(6):1717–36.
  93. Matsuo T, Ogino Y, Ichimura K, Tanaka T, Kaji M. Clinicopathological correlation for the role of fluorodeoxyglucose positron emission tomography computed tomography in

- detection of choroidal malignant melanoma. *Int J Clin Oncol*. 2014;19(2):230–9.
94. Lin S, Wan D, Chen H, Chen K, Zheng S. Complete resection of isolated hepatic metastatic uveal melanoma with a notably long disease-free period: A case report and review of the literature. *Oncol Lett*. 2015;10(1):196–200.
95. Kyung Moon W. PET-MR for Prediction and Monitoring of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Natl Libr Med*. 2015;
96. Plouznikoff N, Arsenault F. Factors Linked to the Metastatic Spread of Malignant Cutaneous Melanoma to the Lower Extremities in a Retrospective 18F-FDG PET/CT Cohort. *Clin Ski Cancer* [Internet]. 2017;2(1–2):48–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clsc.2017.10.002>
97. Yankeelov T. FDG-PET in Advanced Melanoma. *Natl Libr Med*. 2017;
98. Menke- van der C, van Oordt H. FES (16 $\alpha$ -[18F]-Fluoro-17 $\beta$ -estradiol)-PET: Towards a New Standard to Stage Locally Advanced and Recurrent, Estrogen Receptor Positive (ER+) Breast Cancer? Pilot Study to Compare [18F]FES-PET and [18F]FDG-PET (FORESIGHT). *Natl Libr Med*. 2018;
99. Fumoleau P. Triple Negative Breast Cancer: Identification Pilot Study of Predictive Transcriptome Profiles of Early Tumor Drug Resistance Observed in 18F-Fluorodeoxyglucose (FDG) PET (TRANSTEP). *Natl Libr Med*. 2018;
100. Thakur M. Positron Emission Tomography Imaging Using Copper Cu 64 TP3805 in Patients With Breast Cancer. *Natl Libr Med*. 2018;
101. Gaede S. Hybrid PET/MR Imaging of Acute Cardiac Inflammation After Left-Sided Breast Cancer Radiotherapy (RICT-BREAST). *Natl Libr Med*. 2018;
102. Razzouk-Cadet M. Interim FDG PET-CT in Melanoma Metastatic Patient's Treated by Anti-PD1 Therapy (TEP-ANTI-PD1). *Natl Libr Med*. 2019;
103. Wilson DC. 18F-fluorodeoxyglucose (18F-FDG) Positron Emission Tomography in Oncology. *Natl Libr Med*. 2019;
104. Schröder C, Menke W, vd Graaf W. Imaging Patients for Cancer Drug selection - Metastatic Breast Cancer (IMPACT-MBC). *Natl Libr Med*. 2019;
105. Minchin RF, Martin RL. Extracellular calcium stimulates Na<sup>+</sup>-dependent putrescine uptake in B16 melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997;29(3):447–54.
106. Sugiyama Y, Shudo T, Hosokawa S, Watanabe A, Nakano M, Kakizuka A. Emodin, as a mitochondrial uncoupler, induces strong decreases in adenosine triphosphate (ATP) levels and proliferation of B16F10 cells, owing to their poor glycolytic reserve. *Genes to Cells*. 2019;24(8):569–84.
107. Miyazaki N, Kurihara K, Nakano H, Shinohara K. Role of ATP in the sensitivity to heat and the induction of apoptosis in mammalian cells. *Int J Hyperth*. 2002;18(4):316–31.
108. Zhong D, Guo L, de Aguirre I, Liu X, Lamb N, Sun SY, et al. LKB1 mutation in large cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer*. 2006;53(3):285–94.
109. Fan LX, Liu CM, Gao AH, Zhou YB, Li J. Berberine combined with 2-deoxy-d-glucose synergistically enhances cancer cell proliferation inhibition via energy depletion and unfolded protein response disruption. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2013;1830(11):5175–83. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.010>

110. Huang YY, Liu H, Li Y, Pu LJ, Jiang CC, Xu JC, et al. Down-regulation of RIP1 by 2-deoxy-D-glucose sensitizes breast cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2013;705(1–3):26–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.005>
111. Matsumura K, Sakai C, Kawakami S, Yamashita F, Hashida M. Inhibition of cancer cell growth by GRP78 siRNA lipoplex via activation of unfolded protein response. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(4):648–53.
112. Broecker-Preuss M, Becher-Boveleth N, Bockisch A, Dührsen U, Müller S. Regulation of glucose uptake in lymphoma cell lines by c-MYC- and PI3K-dependent signaling pathways and impact of glycolytic pathways on cell viability. *J Transl Med*. 2017;15(1):1–15.
113. Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Chemosensitization by Ursolic Acid: A New Avenue for Cancer Therapy [Internet]. 1st ed. Vol. 2, Role of Nutraceuticals in Cancer Chemosensitization. Elsevier Inc.; 2018. 99–109 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812373-7.00005-X>
114. Ma Q, Xiao P, Sun L, Wang J, Zhong D. Liver kinase B1/adenosine monophosphate-activated protein kinase signaling axis induces P21/WAF1 expression in a p53-dependent manner. *Oncol Lett*. 2018;16(1):1291–7.
115. Xu Y, Wang Q, Zhang L, Zheng M. 2-Deoxy-d-glucose enhances TRAIL-induced apoptosis in human gastric cancer cells through downregulating JNK-mediated cytoprotective autophagy. *Cancer Chemother Pharmacol* [Internet]. 2018;81(3):555–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00280-018-3526-7>