



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

Nanomedicina: Aplicação de nanossistemas na terapêutica do melanoma

Andreia Sousa Labaredas

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Ana Grenha

2017



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

Nanomedicina: Aplicação de nanossistemas na terapêutica do melanoma

Andreia Sousa Labaredas

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação da Professora Doutora Ana Grenha

2017

Nanomedicina: Aplicação de nanossistemas na terapêutica do melanoma

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.

Andreia Labaredas

© 2017 Andreia Sousa Labaredas

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

Agradecimentos

A realização deste mestrado assim como a respetiva dissertação não teria sido possível sem a ajuda de todas as pessoas que me apoiaram em mais uma etapa da minha vida académica.

Em primeiro lugar, quero deixar um especial agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Ana Grenha, agradeço o rigor científico com que me orientou, disponibilidade, apoio e recomendações essenciais para a elaboração deste trabalho. Obrigada por ser a responsável pelo meu interesse na Nanotecnologia Farmacêutica.

À Professora Doutora Isabel Ramalinho, pela amizade sentida que dedica aos seus alunos e pelo entusiasmo na profissão farmacêutica.

Obrigada a todos os professores, em especial à Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano, que contribuíram para a nossa formação tanto a nível académico como pessoal.

A todos os que acreditaram sempre em mim e me tornaram uma pessoa mais forte. A todos os meus amigos, que longe ou perto sempre me deram o seu apoio e acreditaram que chegaria mais longe e que atingiria os patamares a que sempre me propus alcançar.

Agradeço ainda à minha segunda família do Algarve, pelas gargalhadas e lágrimas partilhadas nos bons e maus momentos, e por todo o acompanhamento que fazem de mim a pessoa que sou hoje. Em especial, à Inês, Jéssica e Maria, pela paciência e consolo nas horas difíceis, estiveram presentes em momentos cruciais. Ao André, por me fazer acreditar que eu tenho tempo para descobrir o meu rumo. À Bota, Carri, Patrícia e Pinho, pelo sofá e por todo o convívio e histórias partilhadas ao longo destes anos. Às minhas afilhadas, Filipa e Mariana, pela amizade que nos une, por todos os momentos e por estarem sempre presentes quando precisei. À Bia, Erica e Simão por todos os bons momentos de convívio que me ajudaram a ultrapassar os momentos mais difíceis destes anos.

À minha família e em particular à minha irmã, por me apoiar incondicionalmente em todos os aspetos da minha vida e inesgotável paciência. Não há palavras que descrevam a gratidão que tenho pelo vosso apoio, incentivo e motivação durante este percurso. Obrigada por toda a força que sempre me transmitiram, impulsionando-me sempre a alcançar os meus sonhos.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais sincero agradecimento.

Resumo

O cancro da pele é a forma mais comum de malignidade, principalmente na população caucasiana. A sua incidência tem vindo a aumentar a nível global de forma progressiva e preocupante ao longo das últimas quatro décadas. Os principais tipos de cancro da pele são o melanoma, o carcinoma basocelular e o carcinoma de células escamosas.

O melanoma em fase inicial, não metastizado, pode ser removido através de intervenção cirúrgica. Porém, em estadio avançado e em fase metastática, é frequentemente irremovível ou reaparece após excisão, anunciando um mau prognóstico. Desta forma, a sua cura requer a utilização de terapias que incluem a terapêutica anticancerígena, radioterapia, terapia alvo e imunoterapia. No entanto, verifica-se que os resultados destas abordagens são frequentemente insatisfatórios.

Desta forma, têm-se procurado alternativas e a nanomedicina tem-se revelado uma área promissora, na medida em que a aplicação da nanotecnologia no tratamento do melanoma tem aumentado a eficácia experimental das terapêuticas. Este efeito positivo ocorre através da concentração de agentes anticancerígenos no local do tumor, bem como por melhoria dos seus perfis de segurança e redução dos efeitos secundários. Para além disso, tem sido amplamente estudada para melhorar o diagnóstico e tratamento da doença. Muitos sistemas nanométricos são estudados para o tratamento do melanoma, incluindo os que têm composição baseada em polímeros e em lípidos.

Esta monografia explora a aplicação da nanotecnologia no tratamento do melanoma, os diferentes nanossistemas existentes e que são mais utilizados, as suas potenciais vantagens, abordando também a influência na terapia anticancerígena, imunoterapia e na terapia alvo. Para além disso, serão explorados os benefícios da administração simultânea de múltiplos fármacos através de nanossistemas, bem como do desenvolvimento de nanossistemas seletivamente vetorizados para o microambiente tumoral com ligandos/anticorpos para antígenos tumorais específicos, ou sensíveis a estímulos desse microambiente, de forma a aumentar a especificidade para o melanoma.

Palavras-chave: Imunoterapia, melanoma, nanomedicina, terapêutica anticancerígena, terapia alvo.

Abstract

Skin cancer is the most common form of malignancy, principally in caucasians. Its incidence has been progressively and worryingly increasing globally in the last four decades. The main types of skin cancer are melanoma, basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma.

Early-stage, non-metastatic melanoma can be removed through surgical intervention. However, in advanced stage and in the metastatic phase, it is often irremovable or reappears after excision, announcing a poor prognosis. Thus, its cure requires the use of therapies that include chemotherapy, radiotherapy, target therapy and immunotherapy. However, the outcomes of all these approaches are often unsatisfactory.

In this way, alternatives have been searched and nanomedicine has been shown a promising area, as the application of nanotechnology in the treatment of melanoma has increased the experimental effectiveness of therapeutics. This positive effect occurs through the concentration of anticancer agents at the tumor site, as well as by improving their safety profiles and reducing side effects. In addition, it has been extensively studied to improve the diagnosis and treatment of the disease. Many nanometric systems are studied for the treatment of melanoma, including those having polymer and lipid-based composition.

This monograph explores the application of nanotechnology in the treatment of melanoma, the different nanosystems that are most widely used, their potential advantages, as well as the influence on anticancer therapy, immunotherapy and target therapy. In addition, will be explored the benefits of simultaneous administration of multiple drugs and of selectively vectored nanosystems for the tumor-specific microenvironment with ligands/antibodies to precise tumor antigens or stimulus-sensitive to that microenvironment, in order to increase specificity for melanoma.

Keywords: Anticancer therapy, chemotherapy, immunotherapy, melanoma, nanomedicine, target therapy.

Índice

Índice de Figuras.....	vii
Índice de Tabelas.....	ix
Lista de abreviaturas	x
1. Introdução	1
2. Metodologia	3
3. Melanoma.....	4
3.1. Epidemiologia e etiologia	4
3.2. Diagnóstico e classificação clínica	7
3.3. Tratamento convencional e limitações	7
4. Nanomedicina.....	16
4.1. Contextualização e potenciais usos clínicos no melanoma	17
4.2. Tipos de nanossistemas.....	20
4.3. Nanossistemas para vetorização específica.....	23
4.3.1. Vetorização passiva	23
4.3.2. Vetorização ativa.....	28
4.4. A nanotecnologia na terapêutica anticancerígena do melanoma	29
4.5. A nanotecnologia na imunoterapia do melanoma	34
4.6. A nanotecnologia na terapia alvo contra melanoma.....	38
4.6.1. Vetorização para RAS	40
4.6.2. Vetorização para BRAF	40
4.6.3. Vetorização para MEK e ERK	43
4.6.4. Vetorização para VEGF.....	43
4.6.5. Vetorização para Stat3	44
4.6.6. Vetorização para c-Myc.....	46

4.7. Nanopartículas sensíveis a estímulos.....	47
4.8. A nanotecnologia na terapia combinada no melanoma.....	51
4.9 A nanomedicina nos ensaios clínicos no melanoma.....	54
5. Conclusão.....	56
6. Referências bibliográficas.....	59

Índice de Figuras

Figura 3.1 Ilustração esquemática das mutações genéticas e alterações imunobiológicas no desenvolvimento do melanoma. Adaptado de (26).	9
Figura 3.2 Vias de sinalização no melanoma. Adaptado de (3).	11
Figura 4.1 Ilustração dos tamanhos relativos no contexto da dermatologia. Adaptado de (49).	16
Figura 4.2 Esquematização de estratégias nanoterapêuticas para o tratamento do melanoma metastático. Adaptado de (48).	18
Figura 4.3 Ilustração dos vários nanossistemas mencionados. Adaptado de (56).	23
Figura 4.4 Esquematização do efeito de permeabilidade e retenção. Adaptado de (7).	24
Figura 4.5 Supressão tumoral e sobrevivência dos ratinhos. Adaptado de (51).	26
Figura 4.6 Indução da atividade antitumoral in vivo. Foram observadas taxas de sobrevivência significativamente prolongadas nos ratinhos tratados com a nanoformulação do que com a citocalasina D e PBS. Adaptado de (54).	27
Figura 4.7 Ilustração da sobrevivência livre de progressão na população tratada. Adaptado de (60).	30
Figura 4.8 Distribuição da sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão no grupo sem tratamento prévio com terapias antineoplásicas (A) e para os doentes com tratamento prévio (B). Adaptado de (44).	31
Figura 4.9 Crescimento do volume do tumor após a administração IV das diversas formulações. Adaptado de (61).	32
Figura 4.10 O efeito da cisplatina isolada e da nanoformulação no crescimento tumoral nos dois modelos de xenotransplante in vivo. Adaptado de (62).	33
Figura 4.11 Efeitos da vetorização dos lipossomas com DOX, da não vetorização e da solução salina no tamanho do tumor no modelo de melanoma B16F10 em ratinhos. Adaptado de (45).	34
Figura 4.12 Comparação do crescimento tumoral nos ratinhos implantados com as nanocápsulas com IFN- α ou PBS. Adaptado de (68).	36
Figura 4.13 Variação do volume tumoral em cada grupo ao longo do tempo. Adaptado de (69).	37

Figura 4.14 Variação do crescimento tumoral de acordo com a administração das diferentes formulações. Adaptado de (78).	42
Figura 4.15 Estrutura do GO-PEI-PEG. Adaptado de (77).	45
Figura 4.16 Variação do volume do tumor nos ratinhos tratados com PBS (A), GO-PEI-PEG (B), GO-PEI-PEG e radiação de infravermelho simultânea (C), si-controlo transportado por GO-PEI-PEG e radiação infravermelha (D) e si-Stat3 transportado por GO-PEI-PEG e irradiação de infravermelho simultânea (E). Adaptado de (75).	45
Figura 4.17 Comparação da eficácia terapêutica de c-Myc e do controlo com siRNA nas nanopartículas vetorizadas. Adaptado de (74).	47
Figura 4.18 Probabilidade de sobrevivência livre de progressão e de sobrevivência na população tratada. Adaptado de (91).	55

Índice de Tabelas

Tabela 1 Vantagens e desvantagens do uso de nanoterapêuticas para o tratamento do melanoma metastático em relação às terapias medicamentosas convencionais. Adaptado de (48). 19

Lista de abreviaturas

Ag	Antigénio
APCs	Células apresentadoras de antígenos (do inglês <i>Antigen-presenting cells</i>)
CDK4	Cinase dependente de ciclina 4 (do inglês <i>Cyclin-dependent kinase 4</i>)
CDKN2A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (do inglês <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>)
CTLA-4	Antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico (do inglês <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>)
ADN	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DOX	Doxorrubicina
DTIC	Dacarbazina
E	Ácido glutâmico
EMA	Agência Europeia do Medicamento (do inglês <i>European Medicines Agency</i>)
EPR	Permeabilidade e retenção aumentada (do inglês <i>Enhanced permeability and retention</i>)
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
GO	Óxido de grafeno
IFN	Interferão
IL	Interleucina
IV	Intravenosa
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógenos (do inglês <i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MC1R	Recetor de melanocortina 1 (do inglês <i>Melanocortin-1-receptor</i>)
mRNA	RNA mensageiro
NIR	Infravermelho próximo (do inglês <i>Near Infrared</i>)
NK	Do inglês <i>Natural killer</i>
NLCs	Transportadores lipídicos nanoestruturados (do inglês <i>Nanostructured lipid carriers</i>)
NNI	Do inglês <i>National Nanotechnology Initiative</i>
PD-1	Recetor de morte programada 1 (do inglês <i>Programmed cell death-1</i>)
PEG	Polietilenoglicol
PEI	Polietilenimina

PFS	Sobrevivência livre de progressão (do inglês <i>Progression-free survival</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol 3-cinase (do inglês <i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>)
PTX	Paclitaxel
RES	Sistema reticuloendotelial
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA de interferência
RON	Registo Oncológico Nacional
ROS	Espécies reativas de oxigénio
siRNA	RNA de pequena interferência (do inglês <i>Small interfering RNA</i>)
SLNs	Nanopartículas lipídicas sólidas (do inglês <i>Solid lipid nanoparticles</i>)
Stat3	Transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (do inglês <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>)
UV	Ultravioleta
V	Valina
VEGF factor)	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i>)

1. Introdução

O transporte de fármacos através da utilização de nanossistemas para aplicações terapêuticas tem sido amplamente estudado, em particular no contexto da terapia do cancro (1).

O melanoma maligno ou cutâneo é uma neoplasia com origem nos melanócitos que se manifesta principalmente ao nível da pele, podendo contudo surgir também noutros tecidos. Representa uma pequena proporção dos casos de cancro da pele, sendo no entanto o mais letal na sua forma metastática (2–6).

Nos últimos anos, o constante incremento registado nas taxas de incidência e de mortalidade tem resultado numa crescente preocupação acerca desta temática (7). O melanoma em fase inicial pode ser removido através de intervenção cirúrgica, com uma taxa de sucesso de 97-99,8%. Porém, em estadios avançados – fase metastática – é frequentemente irremovível ou reaparece após excisão, anunciando um mau prognóstico, com uma sobrevivência média inferior a 1 ano e uma sobrevivência de 5 anos abaixo dos 20% (8).

Desta forma, a sua cura requer a utilização de diversas abordagens terapêuticas que incluem a terapêutica anticancerígena, radioterapia, terapia alvo e imunoterapia. No entanto, os resultados destas abordagens são frequentemente insatisfatórios. Os avanços no tratamento do melanoma metastático baseiam-se na compreensão das suas mutações oncogénicas e das propriedades imunobiológicas (3). Por um lado, verificou-se que a aplicação da terapia alvo contra o gene mais frequentemente mutado no melanoma, BRAF, demonstrou aumentar significativamente a taxa de resposta, em mais de 80%. No entanto, quase todos os doentes desenvolvem resistência aos fármacos utilizados e apresentam recidiva 6 meses após o tratamento (3,9–11). Paralelamente, a taxa de resposta para a maioria dos fármacos anticancerígenos mais utilizados e aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) é cerca de 5-10%, que inclui a administração de dacarbazina (DTIC), cisplatina, temozolomida, vinblastina e paclitaxel (PTX) (5,12).

Os extensos avanços na imunologia e a compreensão da resposta imune levaram a uma alteração no dogma predominante e, atualmente, o melanoma é considerado não só uma doença genética, mas também um transtorno imunológico (5). Assim, a aplicação de imunoterapia também tem sido promissora, porém apenas um reduzido número de doentes apresenta uma resposta a esta terapêutica (12).

Apesar dos progressos consideráveis no tratamento clínico, os métodos de tratamento atuais para o melanoma apresentam a eficácia e os perfis de toxicidade como principais limitações. Conseqüentemente, o desenvolvimento de tratamentos específicos é essencial para melhorar a sobrevivência ao melanoma (7,8). O sucesso limitado do tratamento convencional realça a importância da compreensão do papel do microambiente tumoral do melanoma, no desenvolvimento do tumor e na resistência a fármacos. A nanomedicina tem-se revelado uma estratégia promissora na otimização da biodisponibilidade dos fármacos e da sua seletividade para as células tumorais e/ou ambiente tumoral, contribuindo para a melhoria dos perfis de eficácia e segurança das terapêuticas instituídas na vertente oncológica, em geral, e no melanoma, em particular (5,7).

Assim, esta monografia tem como principal objetivo abordar os diversos nanossistemas usados na terapêutica do melanoma, salientando as suas características, as suas vantagens e desvantagens, bem como analisar os resultados obtidos através da sua aplicação experimental como transportadores de fármacos anticancerígenos.

2. Metodologia

Pretende-se com esta dissertação de mestrado a elaboração de uma revisão bibliográfica que esclareça quais as aplicações da nanomedicina na terapêutica do melanoma, fornecendo informação atualizada e resumida de modo a encontrar resposta ao objetivo colocado. Por fim, sugere-se também apontar, com base nos artigos consultados, aqueles que poderão ser os caminhos futuros desta terapêutica.

A metodologia utilizada consistiu numa revisão sistemática de diversas fontes bibliográficas. Desta forma, para uma pesquisa de carácter mais geral e recolha de definições e conceitos chave foram utilizados alguns livros, entre eles *Nanoscience in Dermatology*, *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics* e *Melanoma 2013*. Por outro lado, foi realizada uma pesquisa de artigos científicos, presentes em revistas nas áreas de Dermatologia e Oncologia, em várias bases de dados, nomeadamente, *PubMed*, *Web of Knowledge*, *B-On*, entre outras. Após a seleção dos artigos a informação dos mesmos foi posteriormente cruzada de forma a aumentar a exatidão das conclusões retiradas. Os termos de pesquisa utilizados foram: melanoma, nanomedicina, nanotecnologia e nanossistemas. Além disso foram consultadas páginas web de organizações relevantes no que diz respeito ao tema em causa, como a FDA, a Agência Europeia do Medicamento (EMA), a *World Health Organization* e a *American Cancer Society*, com vista a completar a informação com dados de particular relevo.

Por fim, a estrutura das referências bibliográficas foi realizada com recurso ao programa Mendeley.

3. Melanoma

Entre os cancros da pele, o melanoma metastático representa a forma mais mortal, caracterizada por uma alta resistência aos fármacos (1). O melanoma maligno ou cutâneo é uma neoplasia com origem nos melanócitos que se manifesta principalmente ao nível da pele, podendo surgir também noutros tecidos derivados da ectoderme, nomeadamente nas mucosas da cavidade oral, conjuntiva e genital (2,6).

3.1. Epidemiologia e etiologia

A incidência de melanoma tem vindo a aumentar nos últimos 40 anos. Segundo a *American Cancer Society*, em 2017, serão diagnosticados, nos Estados Unidos cerca de 87 110 novos casos de melanoma (cerca de 52 170 em homens e 34 940 em mulheres) e estima-se que 9 730 pessoas possam morrer da doença (cerca de 6 380 homens e 3 350 mulheres) (6).

Na Europa, a taxa de incidência é < 10-25 novos casos de melanoma por 100 000 habitantes (13). Em Portugal, os dados mais recentes do Registo Oncológico Nacional (RON) relativos a 2010, publicados em 2016, revelam que a taxa de incidência do melanoma maligno da pele, é de 8,6/100 000 habitantes nos homens e de 9,1 nas mulheres, com maior prevalência a partir da sexta década de vida. Para além disso, registaram-se 938 novos casos de melanoma maligno da pele no ano de 2010 em Portugal (14).

A Austrália é a região do mundo onde se registam as maiores taxas de incidência do melanoma, com cerca de 50-60 novos casos por 100 000 habitantes (2,13).

O melanoma afeta sobretudo as populações de pele clara, de origem caucasiana, ao contrário das populações de pele escura, de origem africana e asiática, onde a incidência continua a ser muito baixa (2). A doença tem, assim, incidência variável, segundo as características fenotípicas, o tipo de exposição solar e a localização geográfica (15).

Embora as causas exatas para o aparecimento do melanoma ainda não sejam totalmente conhecidas, têm havido nos últimos anos progressos notáveis na compreensão da etiopatogenia desta neoplasia maligna. O reconhecimento da existência de fatores de risco para o desenvolvimento do melanoma tem enorme importância em termos de saúde pública. A identificação de indivíduos portadores de fatores de risco é importante para a prevenção, quer através da sua vigilância clínica regular, quer através do aconselhamento, nomeadamente em relação à fotoproteção e aos sinais de alarme de uma lesão cutânea

suspeita. Os fatores de risco podem ser classificados em três categorias: ambientais, genéticos e fenotípicos (2).

1 - Fatores ambientais

A principal causa para o aumento da incidência do melanoma está relacionada com a exposição excessiva à radiação ultravioleta (UV), nomeadamente de forma intermitente aguda, associada a queimaduras solares (2,13,16).

Embora cerca de 80% dos melanomas surjam em áreas expostas, a relação entre a exposição solar e o aparecimento deste cancro não é linear. O melanoma é uma neoplasia multifatorial existindo uma comprovada interação entre fatores genéticos predisponentes e a exposição à radiação UV (2).

Alguns autores consideram que as diferenças na epidemiologia do melanoma podem ser devidas ao fenómeno da apoptose. Após a exposição solar intensa, os queratinócitos com maiores danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) sofrem apoptose, ou morte celular programada, enquanto nos restantes se verifica uma reparação quase integral do ADN. Pelo contrário, os melanócitos, que têm o genoma protegido pela melanina, são mais resistentes à apoptose, podendo sobreviver com algumas mutações no ADN e originar mais tarde um clone celular atípico (2).

2 - Fatores genéticos

Existem vários tipos de mutações genéticas e polimorfismos que podem predispor para o desenvolvimento do melanoma (2). Os desenvolvimentos no sequenciamento do genoma completo permitiram identificar uma série de alterações genéticas no melanoma que foram identificadas como envolvidas na via da proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) e na via fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K)/AKT (3,16–19). Associam-se quatro genes com maior suscetibilidade para a doença, o inibidor de cinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A), também conhecido por p16, o ARF ou p14, a cinase dependente de ciclina 4 (CDK4) e por fim, o recetor de melanocortina 1 (MC1R) (2,13,16). Além disso, a existência de polimorfismo no gene da tirosinase e respetiva proteína (TYRP1), está também associada a um aumento significativo do risco de melanoma (2).

Os fatores genéticos afetam a incidência da doença, estimando-se que existe história familiar em cerca de 5-12% da população com melanoma maligno (16). O melanoma familiar está associado em cerca de 25% dos casos a uma mutação no locus do gene CDKN2A, que codifica as proteínas p16 e p14 que intervêm na regulação da progressão do ciclo celular (2). O MC1R é um recetor transmembranar expresso nos melanócitos, que regula a produção de melanina após irradiação UV ou estimulação hormonal (16). Nos casos de polimorfismo de MCR1 o risco de desenvolvimento de melanomas com mutações BRAF é 17 vezes maior do que quando essas variantes não estão presentes (2).

3- Fatores fenotípicos

Os fatores fenotípicos são um indicador da interação genético-ambiental, representando a face visível da exposição ambiental à radiação UV, em indivíduos geneticamente suscetíveis. Os sinais fenotípicos de maior risco em relação a melanoma esporádico são, os nevos melanocíticos vulgares, os nevos melanocíticos atípicos, efélides (sardas) e lentigos solares (2). Os nevos ou sinais são proliferações benignas de melanócitos que inicialmente proliferaram e que posteriormente pararam de crescer (18).

Vários estudos têm referido de forma consistente a associação entre um elevado número de sinais melanocíticos adquiridos e o risco de melanoma, sobretudo quando esse número é superior a 50. Os nevos melanocíticos adquiridos são um indicador da exposição aos UV e podem eventualmente ser precursores do melanoma. Todavia, o risco de um nevo vulgar se transformar em melanoma é extremamente reduzido (2).

Os sinais melanocíticos atípicos foram inicialmente descritos no contexto de síndromas associadas ao melanoma familiar, onde o risco de desenvolvimento de melanoma é cerca de 500 vezes superior ao da população geral. No entanto, os nevos melanocíticos clinicamente atípicos são muitas vezes encontrados de forma esporádica em indivíduos aparentemente normais. Nestes casos, o risco de melanoma é relativamente elevado, podendo ser cerca de 32 vezes superior ao normal quando coexistem mais de 10 sinais atípicos. Os nevos melanocíticos atípicos são um importante marcador de risco em relação ao melanoma esporádico, justificando-se a sua vigilância regular, nomeadamente através da dermatoscopia digital computadorizada (2).

3.2. Diagnóstico e classificação clínica

O objetivo do diagnóstico médico consiste em identificar o melanoma maligno no seu estadio inicial de desenvolvimento, quando este é realmente curável. O melanoma maligno pode surgir “de novo”, numa pele sã, ou sobre uma lesão pré-existente. Algumas características típicas do melanoma maligno são a lesão assimétrica, com bordos irregulares, diferentes tonalidades de cor, diâmetro superior a 6 mm, ocorrência de alteração das características de uma lesão, assim como ocorrer hemorragia da mesma ou estar associada a prurido (16,20). Existe a regra “ABCD”, que resume estas características, e que é uma ajuda clínica importante no diagnóstico – Assimetria; Bordos irregulares; Variação na coloração (heterogeneidade da cor); Diâmetro (> 6 mm, com crescimento rápido) (13,16,20,21).

A classificação da *World Health Organization* distingue quatro variantes principais de melanoma (22):

- Melanoma maligno de crescimento superficial
- Melanoma nodular
- Lentigo maligno melanoma
- Melanoma lentiginoso acral

Estas quatro variantes distinguem-se de acordo com as suas características clínicas e patológicas, diferindo também no seu perfil de distribuição sobre a pele e nos locais onde surgem. Assim, o mais comum é o melanoma de crescimento superficial que compõe 50% a 60% dos melanomas, seguido pelo melanoma nodular, responsável por 15% a 30% dos melanomas. Por outro lado, o lentigo maligno melanoma representa 5% a 10% dos casos e o melanoma lentiginoso acral tem uma frequência de 5% a 10% na raça caucasiana, 30% na 50% na Asiática e 60% a 70% na negra, não parecendo ter qualquer relação com a exposição solar (13,23,24).

3.3. Tratamento convencional e limitações

A abordagem para o tratamento do melanoma mudou drasticamente nos últimos anos. Durante décadas, a terapêutica anticancerígena com DTIC e doses elevadas de interleucina (IL) -2 foram os únicos agentes aprovados pela FDA para esta doença, porém ambos são limitados na sua eficácia e aplicação. Assim, com o surgimento de agentes que visam ter como

alvo a via MAPK e a descoberta de agentes imunológicos mais efetivos, vários novos fármacos foram aprovados nos últimos anos (25).

O objetivo do tratamento convencional inclui o controle local da doença e prevenção, quando possível, da disseminação à distância (16). O tratamento de escolha para metástases cutâneas é a cirurgia, mas as terapias sistêmicas devem ser consideradas quando existem metástases regionais inoperáveis, metástases à distância e lesões numerosas ou extensas não passíveis de cirurgia. Os dois principais objetivos da terapia sistêmica são o prolongamento da sobrevivência e a redução do tamanho do tumor ou carga, sem sintomas ou uma diminuição nos sintomas (13). Desta forma, o diagnóstico precoce e a cirurgia primária adequada são fatores determinantes (16).

Além disso, o melanoma em estadió avançado e em fase metastática é frequentemente irremovível ou reaparece após excisão (3,9). Assim, a sua cura requer a utilização de terapias sistêmicas que incluem a terapêutica anticancerígena, radioterapia, terapia alvo e imunoterapia (3).

Recentemente surgiram novas estratégias terapêuticas, no campo da imunoterapia e da terapia alvo, para a terapia sistêmica. Os agentes inibidores do antigénio 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), como o ipilimumab, os anticorpos anti-recetor de morte programada 1 (PD-1), como o nivolumab e o pembrolizumab, bem como os inibidores seletivos de BRAF, como vemurafenib e dabrafenib (usados sozinhos e/ou em combinação com inibidores de MEK, como cobimetinib e trametinib), demonstraram impressionante atividade antitumoral. Estes mecanismos encontram-se representados na Figura 3.1 As recomendações para o tratamento de primeira linha da doença metastática ainda estão em debate. Abordagens razoáveis incluem terapias anti-PD1 e, para melanomas com BRAF mutado, combinações de inibidores de BRAF com inibidores de MEK (21).

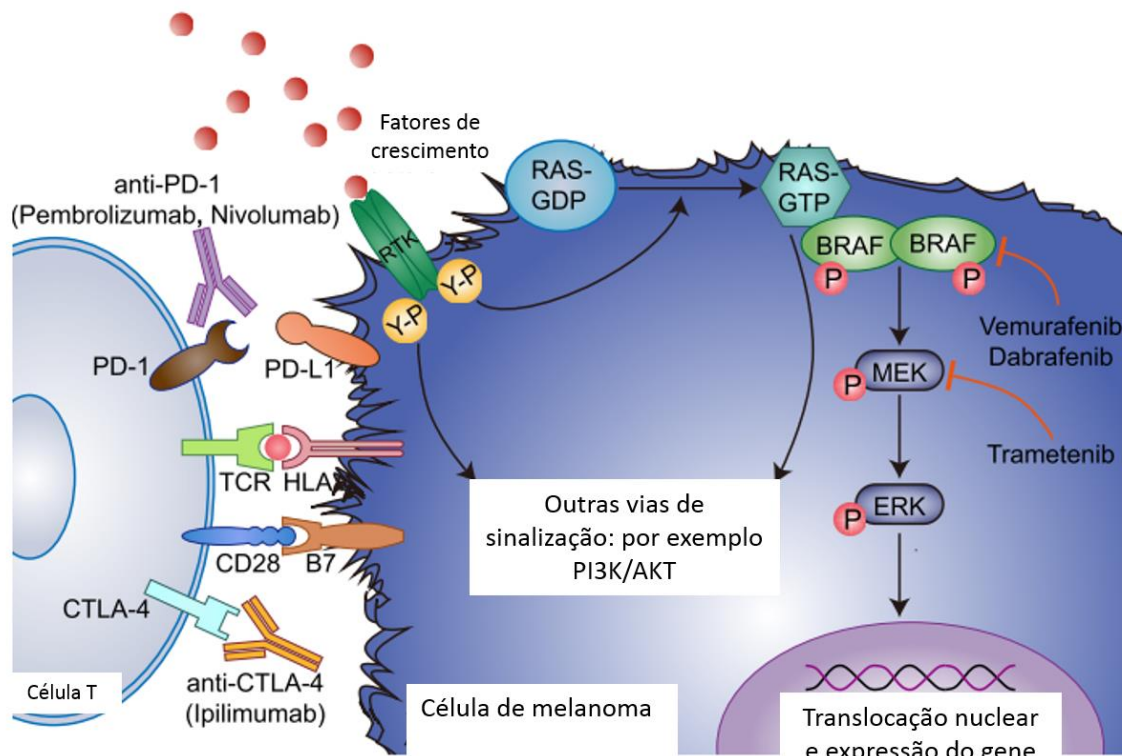


Figura 3.1 Ilustração esquemática das mutações genéticas e alterações imunobiológicas no desenvolvimento do melanoma. Adaptado de (26).

Terapia alvo

Um dos principais objetivos da pesquisa no ramo do melanoma tem sido identificar alvos moleculares para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento (3,16–19).

As vias de sinalização intracelulares desempenham um papel fundamental na carcinogênese e progressão do cancro, metástase e resistência a fármacos. Estas vias são irregularmente ativadas nas células cancerígenas, de forma a promover o cancro. Assim, alterações nas vias de sinalização podem estar associadas a mutações genéticas, a infeções virais, a fatores de crescimento/citocinas presentes no sangue, ao microambiente tumoral e a fatores ambientais, como a obesidade. Deste modo, as vias de sinalização foram associadas com o prognóstico de muitos cancros, incluindo o melanoma, e a inibição destas foi estudada para o tratamento do cancro (3,27).

No melanoma, várias vias de sinalização são constitutivamente ativadas. Entre elas, as vias de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT são ativadas através de múltiplos mecanismos e parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão do melanoma (3,17–19). A desregulação da via MAPK ocorre com frequência devido a

mutações nos genes BRAF e RAS ou outros eventos genéticos, promovendo processos chave regulados pela via MAPK, como a proliferação celular, invasão, metástase, sobrevivência e angiogênese, que estão envolvidos no desenvolvimento do melanoma (12). Como resultado, a via MAPK evoluiu como um foco de intensa investigação para o desenvolvimento de pequenos inibidores de moléculas como terapêuticas alvo (3). Na via MAPK, as frequências de mutação de BRAF, NRAS, KRAS e HRAS são de 50-70%, 15-30%, 2% e 1%, respetivamente, sendo a mais comum a ^{V600E}BRAF (>90%). A oncoproteína RAS ativa ambas as vias MAPK e PI3K/AKT. Nesse sentido, pode estimular a atividade de BRAF, que ativa MEK e ERK1/2. E também ativa PI3K que catalisa PIP2 em PIP3. Por outro lado, PIP3 aumenta a atividade de AKT via PDK. Tanto AKT como ERK1/2 atuam sobre a via de sinalização mitocondrial da apoptose e mTORC1. A AKT também aumenta a expressão de VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), ciclina D1, myc e NF-κB. O ERK1/2 pode também ativar o transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (Stat3) e outros fatores transcricionais tais como MNK1/2, MSK1/2, RSK, PPAR, ELK1 e ETS (Figura 3.2) (3,12,16–19).

Nos melanomas positivos para a mutação ^{V600E}BRAF, está presente uma forma anormal de BRAF que contribui para o desenvolvimento do cancro ao permitir a multiplicação descontrolada das células tumorais. Assim, os inibidores de BRAF ao bloquearem a ação da proteína BRAF anormal, ajudam a abrandar o crescimento e a disseminação do cancro (28,29). Por outro lado, a forma anormal da proteína BRAF ativa uma outra proteína chamada MEK, envolvida na multiplicação celular. Desta forma, o mecanismo dos inibidores MEK, consiste em bloquear diretamente a MEK e em prevenir a sua ativação pelo BRAF (30,31).

A identificação destas alterações genéticas somáticas, que contribuem para a transformação dos melanócitos através da modulação da via MAPK, levou ao desenvolvimento de abordagens de terapia alvo. Estas novas terapias, baseadas na utilização de múltiplos inibidores moleculares seletivos orientados para as principais mutações genéticas na via de sinalização MAPK, incluem os inibidores de BRAF, vemurafenib (2011) e dabrafenib (2013), juntamente com os inibidores de MEK, trametinib (2013) e cobimetinib (2015) todos aprovados pela FDA e pela EMA para doentes com melanomas metastáticos, portadores da mutação genética específica ^{V600E}BRAF (7,12,13,16,26,28–32).

Contudo, verifica-se com frequência o desenvolvimento de resistência adquirida/secundária a estes tratamentos com inibidores de BRAF, pelo que vários grupos de investigação estão a tentar determinar quais os mecanismos que levam ao aparecimento de

resistência (32). Os inibidores de MEK complementam a inibição da via MAPK, portanto, a combinação de inibidores BRAF e MEK é o padrão atual no tratamento de doentes com mutações BRAF onde esta estratégia de tratamento é indicada (13).

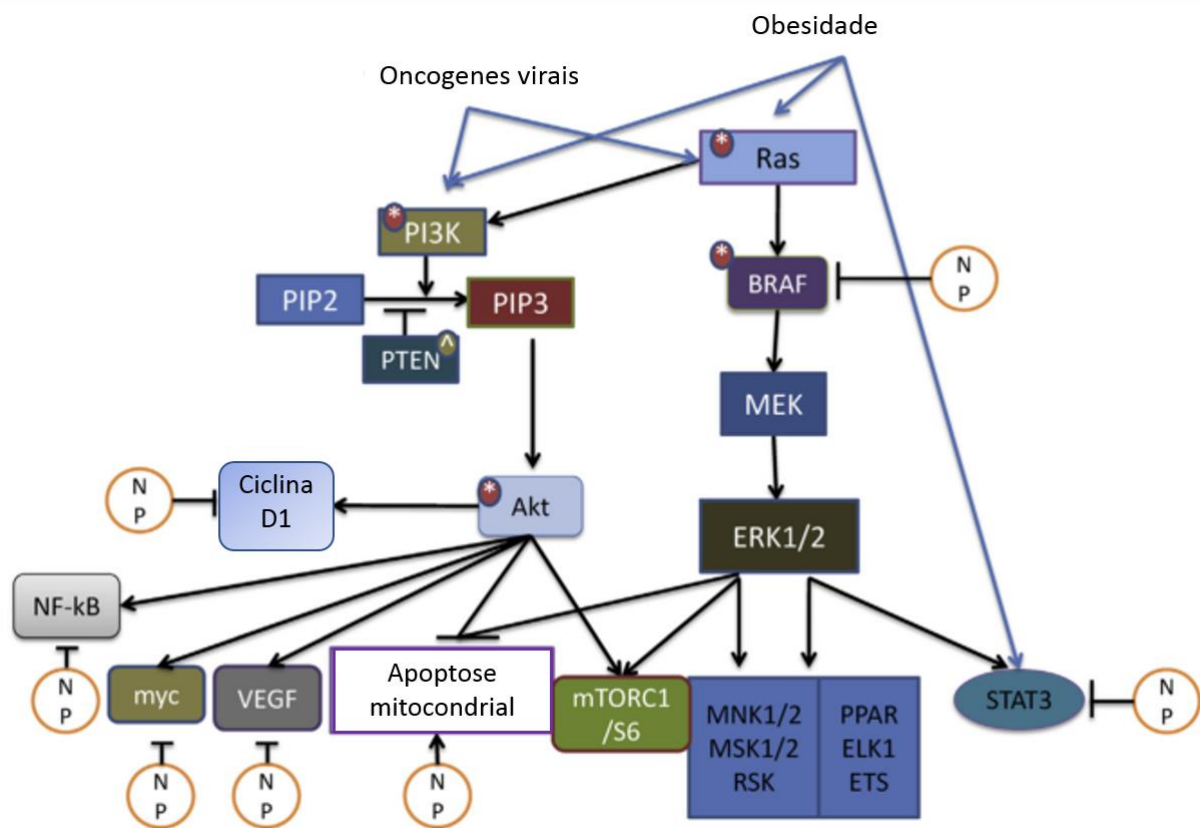


Figura 3.2 Vias de sinalização no melanoma. Adaptado de (3).

Imunoterapia

A resposta imune é essencial no desenvolvimento e tratamento do cancro, pelo que deficiências no sistema imunitário estão associadas a uma maior incidência de cancro e resistência a fármacos (3). Assim, a imunoterapia foi desenvolvida para o tratamento do cancro, que através da estimulação ou supressão do sistema imunitário é utilizada para melhorar a resposta imune dos doentes com melanoma e aumentar a eliminação de células cancerígenas, promovida pelos macrófagos ou linfócitos T citotóxicos, nomeadamente, em células danificadas por terapia alvo e terapêuticas anticancerígenas. Deste modo, sem a imunoterapia para eliminar as células cancerígenas danificadas, a eficácia do tratamento não seria alcançada, uma vez que estas células danificadas têm a possibilidade de se autorreparar e tornar-se mais malignas (3,27).

A forte imunogenicidade do melanoma, assim como a ineficácia da terapêutica anticancerígena convencional (como a DTIC), estimulam fortemente a investigação imunológica nesta patologia neoplásica (33).

A ativação do sistema imunitário para benefício terapêutico em oncologia, é desde longa data, um objetivo exaustivamente procurado. A compreensão dos mecanismos imunológicos subjacentes, permitiram esclarecer de que forma a tolerância imunológica e a imunossupressão regulam as resposta imune antitumoral. A conjugação da imunoterapia ativa com o aparecimento de terapêuticas alvo, sugere que esta última representa um caminho para alcançar respostas duradouras no tratamento dos doentes com cancro (34).

Entre as mais promissoras abordagens para a ativação do sistema imune e obtenção de uma resposta antitumoral, está o bloqueio de alguns pontos reguladores do sistema imune. São cruciais para a manutenção da tolerabilidade imunitária, porque exercem imunomodulação, permitindo que os processos fisiológicos da resposta imune não sejam exacerbados com consequências nefastas para os tecidos restantes, minimizando os efeitos secundários do processo inflamatório imune. As células tumorais conseguem atuar sobre esses pontos de controlo imunológico, com benefício a nível da resistência tumoral, sobretudo através da ação sobre os linfócitos T. A maioria desses pontos de controlo funciona através de conjuntos de ligando-recetor e podem ser bloqueados por anticorpos ou modelados por diferentes formas de ligandos ou recetores (34).

Em contraste com a maioria dos anticorpos atualmente aprovados para o tratamento do cancro, os anticorpos que bloqueiam os pontos de controlo imune não atuam diretamente sobre as células tumorais. Estes agentes atuam sobre os recetores linfocitários ou sobre os seus ligandos, a fim de aumentar a atividade antitumoral endógena (34).

As abordagens recentes para a terapêutica do melanoma metastático aumentam a imunidade antitumoral ao inibir os pontos de controlo imunitário, como o CTLA-4 e o PD-1 (34,35). Deste modo, foram aprovados pela EMA e FDA para o tratamento do melanoma metastático não ressecável, os anticorpos anti-PD-1 nivolumab e pembrolizumab, bem como o ipilimumab que inibe o CTLA-4 (13,33–36). O ipilimumab é um anticorpo monoclonal concebido para se ligar a uma proteína denominada CTLA-4 e bloquear a sua atividade. Esta proteína encontra-se à superfície das células T e inibe a atividade das mesmas. Ao bloquear a CTLA-4, o ipilimumab conduz à ativação e propagação das células T, as quais se infiltram nos tumores e eliminam as células cancerígenas (12,33,34,36,37).

Os anticorpos monoclonais anti-PD-1, nivolumab e pembrolizumab são concebidos para reconhecerem e bloquearem o recetor PD-1, que se encontra em determinadas células T. As células cancerígenas podem produzir proteínas (PD-L1 e PD-L2) que se ligam a este recetor e inibem a atividade das células T, impedindo-as de combater o cancro. Os anticorpos anti-PD-1 ao se ligarem ao recetor, bloqueiam o PD-1 e impedem que as PD-1 e PD-2 inibam a atividade das células T, aumentando assim a capacidade do sistema imunitário eliminar as células cancerígenas (33,37–39).

Assim, o bloqueio do CTLA-4 e das moléculas PD-1 expressas por linfócitos suprimem a regulação negativa da resposta imune e levam à ativação contínua de linfócitos, permitindo a morte das células tumorais. Esta imunestimulação não é específica e pode levar a toxicidade imunologicamente mediada (13). Todos os promotores deste tipo de bloqueio têm como finalidade aumentar a atividade imunitária antitumoral, de modo a perpetuá-la, potenciando a resposta antitumoral e a sua durabilidade, com a consequente destruição tumoral (34).

A compreensão do papel destas várias interações em configurações diferentes é altamente relevante para a seleção dos anticorpos e ligandos recombinantes para uso na clínica (34).

Outro tratamento aprovado para melanomas metastáticos é a imunoterapia com citocinas, particularmente o interferão (IFN) α e a IL-2, porém a sua eficácia ainda é controversa e a toxicidade elevada (32).

Por último, o Talimogene laherparepvec (Imlygic[®]) é um medicamento anticancerígeno aprovado pela EMA e FDA para a sua utilização no tratamento de adultos com melanoma metastático. Trata-se de um medicamento de terapia avançada e utiliza os mecanismos das células do melanoma para se multiplicar, acabando por sobrecarregar e afetar as células do melanoma. Além disso, faz com que as células infetadas produzam uma proteína que estimula o sistema imunitário do doente a reconhecer e destruir as células do melanoma (40,41).

Apesar das respostas serem mais duráveis, apenas uma minoria dos doentes obtêm respostas claras e objetivas em contraste com a terapia alvo, na qual a maioria dos doentes alcança uma resposta objetiva. Além disso, as reações adversas relacionadas com o bloqueio tanto de CTLA-4 como de PD-1, limitam a sua aplicação clínica (26). A aprovação de todas estas terapêuticas originou uma nova consciência acerca da potencial atividade antitumoral do sistema imunológico do doente. No entanto, tendo em conta o custo elevado e a toxicidade destas terapêuticas, é necessária a identificação de potenciais biomarcadores que poderão

determinar em cada tumor quais os pontos de controle imune ou vias predominantes, essenciais para melhor orientação da decisão terapêutica (12,34).

Radioterapia

A radioterapia do tumor primário raramente é indicada. No entanto, em doentes onde a cirurgia levará à desfiguração severa, a radioterapia pode ser aplicada com intenção curativa (13). A radioterapia paliativa deve ser considerada, especialmente para cérebro sintomático ou metástases ósseas localizadas e dolorosas (21).

Terapêutica anticancerígena

A terapêutica anticancerígena foi o único tratamento sistêmico disponível, antes do desenvolvimento da terapia alvo e da imunoterapia. Nas últimas décadas têm sido testadas terapias anticancerígenas, sem aumento significativo nas taxas de sobrevida global de doentes com melanoma metastático (13,32).

Atualmente, a terapêutica anticancerígena pode ser considerada como segunda e terceira linha em doentes com resistência à imunoterapia e terapia alvo. Pode ainda ter um papel a desempenhar como tratamento de primeira linha nos países onde os novos fármacos não estão disponíveis. Esta terapêutica pode levar à regressão do tumor e à redução dos sintomas associados (13,21).

Segundo a *American Cancer Society* vários fármacos podem ser usados para tratar o melanoma, entre eles, a DTIC, temozolomida, nab-paclitaxel, PTX, cisplatina, carboplatina e vinblastina (42). Porém, a DTIC é o único fármaco citotóxico aprovado pela FDA para o tratamento de doentes com melanoma maligno metastático, embora as taxas de resposta à DTIC como tratamento único não excedam os 12% (13,32,43).

A resistência à apoptose é considerada uma das principais causas de resistência à terapia anticancerígena em doentes com melanoma (32). Por outro lado, os agentes anticancerígenos, devido à limitada seletividade, atuam tanto nas células malignas como nas sãs, em divisão. Esta abordagem terapêutica inespecífica traduz-se por uma toxicidade elevada destes fármacos, o que limita a dosagem que pode ser administrada com segurança. Desta forma, existe uma necessidade urgente em desenvolver novas estratégias terapêuticas que permitam dirigir especificamente o fármaco para o tumor, melhorando não só a sua eficácia como também os próprios perfis de segurança (3,27,44,45).

Atualmente podem ser reconhecidos alguns princípios gerais para o tratamento da doença metastática sistêmica:

- Teste da mutação do tecido tumoral (pelo menos BRAF, NRAS) é um pré-requisito para as decisões de tratamento (13,21).

- O bloqueio do PD-1, seja em monoterapia ou em combinação com o bloqueio de CTLA-4, deve ser considerado como uma boa opção para o tratamento de primeira linha para todos os doentes com melanoma metastático não ressecável, independentemente da presença/ausência de BRAF mutado (13,21).

- Quando os inibidores de BRAF são considerados para doentes com BRAF mutado, devem ser administrados em combinação com inibidores de MEK (13,21).

- A terapêutica anticancerígena pode ser considerada em doentes com resistência a inibidores de cinases e bloqueio de ponto de controlo (13,21).

Décadas de investigação translacional estão agora a culminar em grandes avanços com tradução clínica. Apesar do elevado custo associado e da dificuldade de utilização, incluindo a gestão dos efeitos secundários, espera-se que a aquisição de experiência clínica e a eventual descida dos custos, gerada pela intensa competição em desenvolvimento farmacêutico nesta área, conduzam a uma implementação clínica generalizada das opções terapêuticas para o melanoma metastático (33).

4. Nanomedicina

De acordo com a *National Nanotechnology Initiative* (NNI), a nanotecnologia compreende a ciência, engenharia, tecnologia e o desenvolvimento de dispositivos de transporte ou sistemas dimensionados na escala de 1 a 100 nm (embora alguns autores estendam este limite até 1000 nm). Essas características, juntamente com a sua elevada relação superfície-volume e a possibilidade de modificação das suas propriedades, aumentaram o interesse na sua aplicação na área biomédica, com potenciais aplicações em imagiologia, diagnóstico e terapêutica (46,47).

Assim, as nanopartículas podem atuar como plataformas multimodais, que abrangem várias propriedades clinicamente relevantes para o tratamento do cancro. Neste contexto, as nanopartículas podem ser consideradas *agentes teranósticos* funcionando simultaneamente como dispositivos terapêuticos e de diagnóstico (por exemplo em imagiologia), que podem melhorar significativamente o prognóstico do doente numa série de doenças (48).

A escala demonstrada na Figura 4.1 fornece uma perspetiva da dimensão dos diferentes componentes do ponto de vista dermatológico (49).

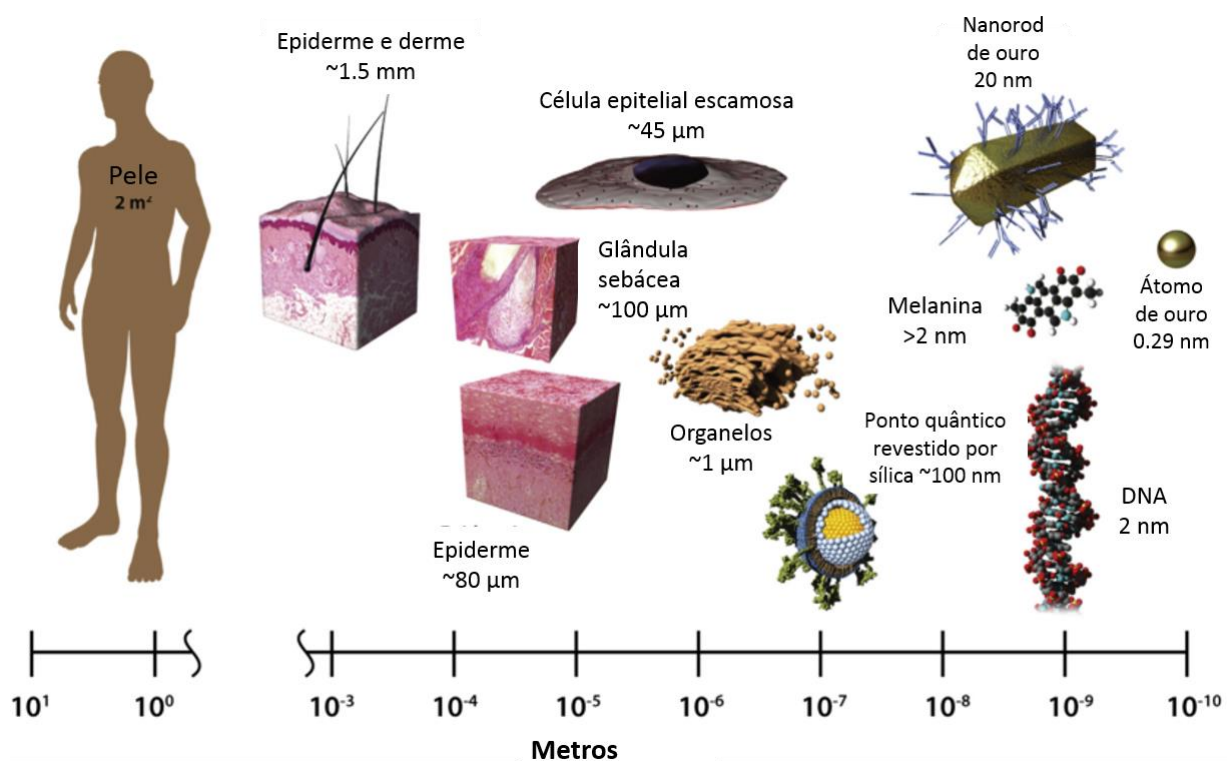


Figura 4.1 Ilustração dos tamanhos relativos no contexto da dermatologia. Adaptado de (49).

4.1. Contextualização e potenciais usos clínicos no melanoma

Considerando o uso cada vez maior de diversas terapêuticas em dimensões nano e a identificação de uma grande variedade de possíveis moléculas alvo na terapêutica do melanoma, estamos perante um momento ideal para o desenvolvimento de nanomedicinas que incorporem benefícios multifuncionais para tratar doentes com melanoma (48).

Tendo em conta que a disseminação metastática do melanoma atua numa ampla gama de órgãos, o objetivo terapêutico ideal seria atuar de forma seletiva sobre as células tumorais, sem afetar as células normais. A nanomedicina, através das suas propriedades de encapsulação de muitos agentes anticancerígenos, pode proporcionar um aumento da acumulação de fármacos no ambiente tumoral, uma dosagem melhorada e uma toxicidade sistémica mais reduzida, com maior controlo sobre a carga de fármaco que poderia ser administrada e tolerada pelo doente (7,48).

Para atingir este objetivo, os nanossistemas devem ser formulados com moléculas, anticorpos, péptidos ou ligandos específicos à superfície, os quais se ligam especificamente a proteínas sobre expressas nas células cancerígenas ou que provoquem o reconhecimento de marcadores de superfície celulares em células de melanoma. Deste modo, devido à elevada propensão das células tumorais para adquirir mecanismos de resistência, a identificação de vários marcadores de superfície celular de melanoma adequados para a vetorização de nanossistemas será essencial para proporcionar um tratamento eficaz a longo prazo (3,48). Neste contexto, a funcionalização da superfície também poderia ajudar a superar alguns dos problemas relacionados com as terapias convencionais. Os nanossistemas com propriedades superficiais como polímeros hidrofílicos e flexíveis, tal como o polietilenoglicol (PEG), poderiam prolongar o tempo de circulação na corrente sanguínea, resultando na acumulação desses nanossistemas carregados com fármaco no local do tumor sob o efeito de vetorização passiva. Contudo, com a adição de uma componente de vetorização na superfície, a nanoentrega poderia ser melhorada através de uma vetorização ativa (50). Por exemplo, as formas não peguilladas serão reconhecidas pelos leucócitos e transportadas para a linfa, sendo essencial evitar esta via para conseguir a vetorização para outros órgãos. A gestão dessas considerações para a nanoentrega, juntamente com a vetorização seletiva para as células de melanoma, aumentará, sem dúvida, a capacidade de entrega para órgãos específicos (48). A

Figura 4.2 resume estas considerações para a conceção de futuras nanoformulações para o tratamento eficaz do melanoma metastático.

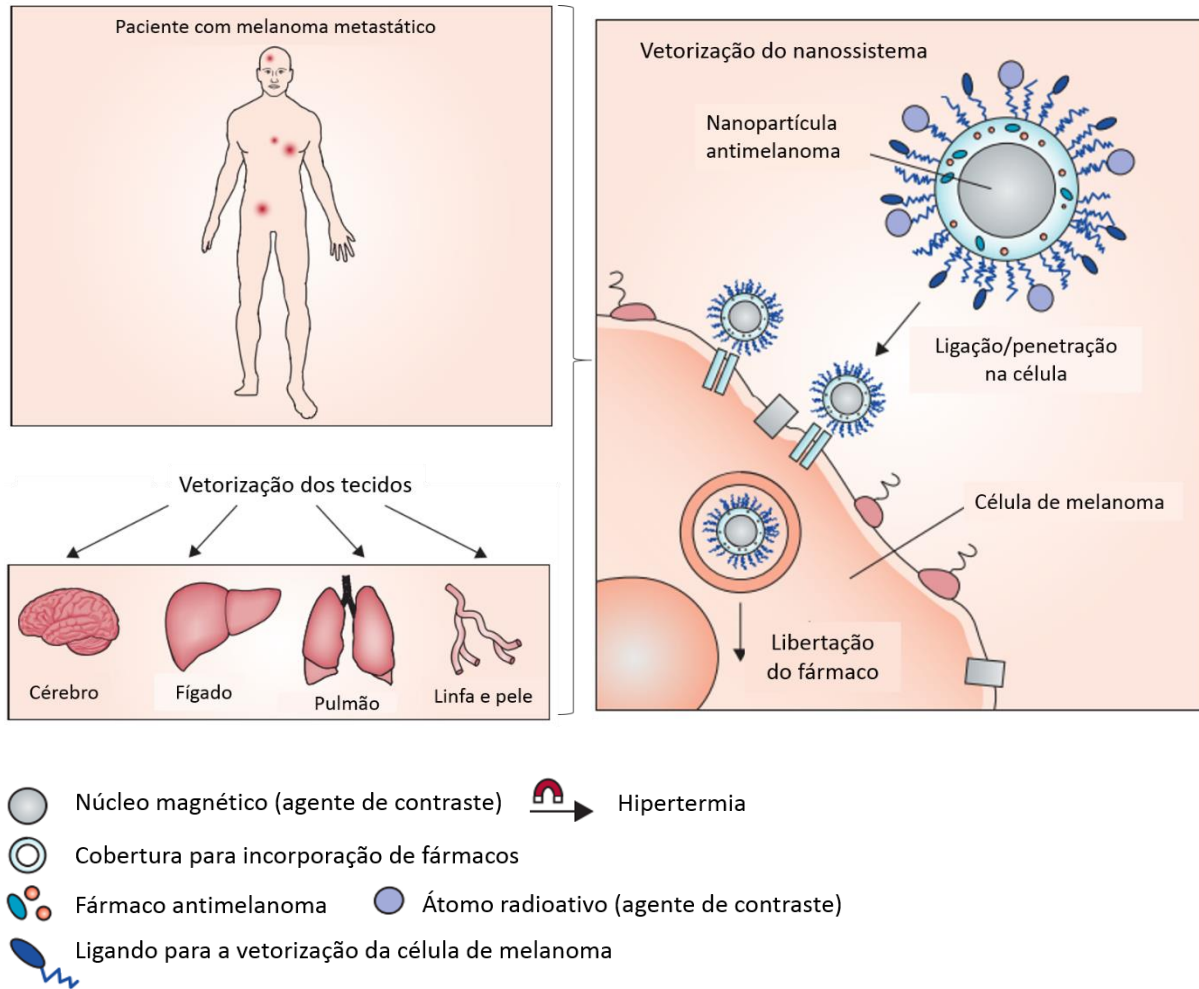


Figura 4.2 Esquematização de estratégias nanoterapêuticas para o tratamento do melanoma metastático. Adaptado de (48).

Algumas proteínas sobre expressas foram selecionadas como alvos para a vetorização do melanoma, tais como os recetores da transferrina, recetor do ácido fólico, recetor CD44, recetor MC1R, recetor do fator de crescimento dos fibroblastos, recetor de laminina, recetor de somatostatina e o recetor sigma (3,48).

A tecnologia existente permite produzir nanossistemas de grande alcance, para melhorar a vetorização para os tecidos. Os nanossistemas com menos de 100 nm de tamanho favorecerão a vetorização cerebral e hepática, enquanto que a administração intravenosa (IV) sistêmica de nanossistemas com mais de 200 nm será retida em capilares pulmonares, favorecendo a vetorização pulmonar. No entanto, os nanossistemas maiores que 200 nm geralmente são sequestrados pelo sistema reticuloendotelial (RES), aumentando a

acumulação no fígado e baço, com implicações óbvias de toxicidade, além de que são eliminados perdendo o seu efeito terapêutico (48).

A tabela 1 fornece um resumo das vantagens e desvantagens do uso de nanoterapias no tratamento do melanoma. Em geral, as vantagens compensam claramente as desvantagens, sugerindo que os nanossistemas têm grande potencial para o tratamento eficaz do melanoma metastático (48).

Tabela 1 Vantagens e desvantagens do uso de nanoterapêuticas para o tratamento do melanoma metastático em relação às terapias medicamentosas convencionais. Adaptado de (48).

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none">• Transportadores de fármacos antimelanoma com capacidade para um ou mais compostos.	<ul style="list-style-type: none">• Custos de produção superiores, devido à formulação complexa dos nanomateriais.
<ul style="list-style-type: none">• Os fármacos hidrófilos e hidrofóbicos podem ser incorporados simultaneamente.	<ul style="list-style-type: none">• Ativação indesejada da resposta imune que leva a reações alérgicas.
<ul style="list-style-type: none">• Melhoria da circulação sistêmica de fármacos e permeabilidade tecidual ampliada para melhorar a biodisponibilidade de fármacos antimelanoma em tumores metastáticos.	<ul style="list-style-type: none">• Necessidade de avaliar cuidadosamente os níveis de toxicidade das novas formulações antes dos ensaios clínicos.
<ul style="list-style-type: none">• Imagiologia simultânea e propriedades terapêuticas para o diagnóstico e tratamento da doença metastática.	<ul style="list-style-type: none">• A remoção de nanossistemas pelo RES e outros mecanismos de eliminação.
<ul style="list-style-type: none">• Libertação controlada de fármaco(s) antimelanoma dentro das células tumorais.	<ul style="list-style-type: none">• Os nanossistemas devem ser concebidos de forma a reduzir a opsonização e otimizar as propriedades da superfície para reduzir a eliminação.
<ul style="list-style-type: none">• Vetorização eficaz para reduzir a toxicidade sistêmica de agentes anticancerígenos, reduzindo assim os efeitos secundários indesejados.	
<ul style="list-style-type: none">• Os doentes com melanoma podem ser protegidos contra o desenvolvimento de resistências a múltiplos fármacos, reduzindo a capacidade de efluxo pelas células cancerígenas.	

4.2. Tipos de nanossistemas

Diversos tipos de nanossistemas foram concebidos como métodos de administração de fármacos para a terapia do cancro, de forma a aumentar a atividade anticancerígena e minimizar os efeitos secundários dos fármacos. Entre estes estão os lipossomas, as nanopartículas lipídicas, as nanoemulsões, as nanopartículas poliméricas, os dendrímeros, as micelas, bem como as nanopartículas metálicas e magnéticas (9,51,52). Porém, apenas serão detalhadas as características dos nanossistemas de maior relevo para a aplicação em causa, ilustrados na Figura 4.3.

Lipossomas

Os lipossomas são vesículas anfifílicas compostas por uma bicamada lipídica (parte hidrofóbica), semelhante à das membranas biológicas, que encerra uma cavidade aquosa interna (parte hidrofílica) (46,52). São classificados de acordo com o tamanho e o número de camadas em multi, oligo ou unilamelares (46,53). O núcleo aquoso interno pode ser usado para a encapsulação de fármacos solúveis em água, enquanto que as bicamadas lipídicas podem reter compostos hidrofóbicos ou anfifílicos (4,5,46). A possibilidade de ligar à superfície dos lipossomas ligandos e/ou polímeros aumenta significativamente a especificidade de entrega dos fármacos encapsulados (4,46). Os lipossomas são bons veículos para a administração de uma variedade de fármacos, incluindo agentes citotóxicos, antibióticos e agentes antifúngicos (1,54). Estes sistemas têm muitas vantagens, por exemplo, são biocompatíveis, biodegradáveis e não imunogénicos e podem ser utilizados de forma eficaz para a vetorização e transporte de fármacos através das membranas biológicas (5,52,55). Por outro lado, as desvantagens incluem o alto custo de produção e a sua rápida eliminação do organismo através do RES (52,55). Porém, de modo a escapar à captação pelo RES, após administração IV, foram desenvolvidos lipossomas revestidos com polímeros biocompatíveis inertes, tais como o PEG, os quais se dizem peguilados. Estes lipossomas, designados por "lipossomas *stealth*", não são reconhecidos pelas opsoninas, o que retarda a subsequente eliminação pelas células imunitárias, permitindo uma exposição prolongada às células tumorais e uma maior eficácia dos fármacos encapsulados (1,46,54).

Atualmente, várias formulações lipossomais com agentes anticancerígenos, ácidos ribonucleicos (RNAs) de pequena interferência (siRNA), ADN ou partículas radioativas que

poderiam vetorizar a via MAPK, estão em diversas fases de desenvolvimento para a terapêutica do melanoma (17,46).

Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas de transporte com tamanho inferior a 1 μm e são constituídas por polímeros naturais ou sintéticos. Entre as nanopartículas poliméricas, podem-se distinguir as nanocápsulas e as nanoesferas. As nanocápsulas consistem em estruturas esféricas compostas por um núcleo oleoso circundado por uma cobertura polimérica. Assim, o fármaco pode ser retido no núcleo e/ou adsorvido na parede do polímero. Por outro lado, as nanoesferas são apenas compostas por uma matriz polimérica contínua. As nanopartículas poliméricas são um dos sistemas mais utilizados hoje em dia, onde o fármaco pode ser encapsulado, disperso ou dissolvido dentro da matriz ou adsorvido à superfície de nanopartículas (52).

Dendrímeros

Os dendrímeros são uma classe única de macromoléculas poliméricas com uma estrutura 3D regular e altamente ramificada, onde uma variedade de moléculas, incluindo fármacos, podem ser incorporados (5,55). A sua superfície pode ser projetada com uma variedade de funcionalidades, aumentando a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade para aplicações biomédicas generalizadas (1). Os dendrímeros têm um tamanho de partícula de 1-100 nm, o que os torna menos suscetíveis à captação pelo RES (55). Em geral, os dendrímeros têm um grande potencial em nanoformulações de fármacos para a terapia do melanoma devido às suas vantagens, como o tamanho controlável, a estabilidade termodinâmica, a alta solubilidade em água e a possibilidade de utilizar vários grupos funcionais na sua superfície externa, o que permite a sua vetorização para um local específico no organismo. Porém, são necessários avanços em métodos sintéticos para produzir dendrímeros biocompatíveis e biodegradáveis (5,55).

Nanopartículas lipídicas

As nanopartículas lipídicas surgiram para melhorar algumas das desvantagens dos lipossomas (46,53). Podem distinguir-se duas gerações deste tipo de nanopartículas: as

nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) - primeira geração e os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) - segunda geração (4).

As SLNs são transportadores nanoparticulados à base de lípidos sólidos à temperatura ambiente, com dimensões entre 50 a 1000 nm (3,4,53). As vantagens mais importantes incluem a estabilidade física e química, proporcionando maior proteção contra a degradação de fármacos lábeis; a biotolerabilidade e biodegradabilidade associadas a baixa toxicidade devido à sua composição lipídica fisiológica; e por fim, a sua matriz lipídica permite incorporar principalmente fármacos lipofílicos, o que proporciona uma libertação controlada. Estes sistemas lipídicos são semelhantes a emulsões, no entanto, a fase oleosa é substituída por lípidos sólidos e é estabilizada por agentes tensoativos, constituindo também um sistema de duas fases (52).

Por outro lado, os NLCs são compostos por uma mistura de lípidos sólidos e líquidos (3,4,53). Os NLCs em comparação com as SLNs são capazes de encapsular uma maior quantidade de fármaco e também prevenir a sua expulsão durante o armazenamento (52).

Micelas

As micelas são formadas quando o surfactante anfifílico ou moléculas poliméricas se associam espontaneamente em meio aquoso para formar vesículas (55). As micelas poliméricas são constituídas por duas ou mais cadeias de polímero com hidrofobicidade diferente (46). Assim, os blocos hidrofóbicos formam o núcleo interno da micela para minimizar a sua exposição a um ambiente aquoso, enquanto que os polímeros hidrofílicos formam o invólucro, tal como o PEG. Desta forma, o núcleo hidrofóbico permite a incorporação de fármacos pouco solúveis em água e anfifílicos, enquanto o invólucro hidrofílico prolonga o tempo de circulação no sangue, aumenta a acumulação nos tecidos tumorais e permite uma proteção para a micela, o que reduz a sua toxicidade sistémica (46,55). Os grupos funcionais adequados para ligandos, tais como péptidos, aptâmeros de ácidos nucleicos, carboidratos e moléculas pequenas, aumentam ainda mais a sua especificidade e eficácia (46). Por último, devido ao seu tamanho consideravelmente grande, estes sistemas podem também ser usados para co-entregar dois ou mais fármacos para terapêuticas de associação (1).

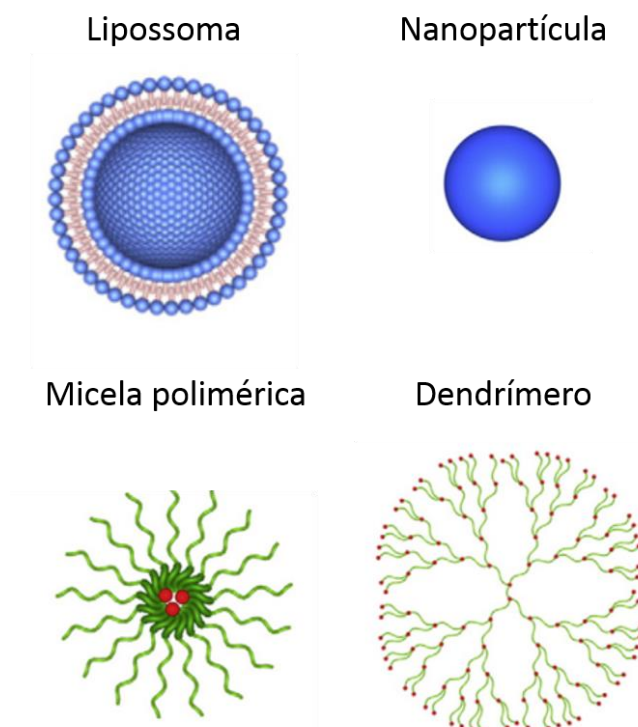


Figura 4.3 Ilustração dos vários nanossistemas mencionados. Adaptado de (56).

4.3. Nanossistemas para vetorização específica

4.3.1. Vetorização passiva

Para que o seu potencial terapêutico seja alcançado, os nanossistemas necessitam abranger não só as células tumorais, mas também atingir os locais das metástases. No melanoma, as metástases estão presentes numa variedade de tipos de tecidos, e cada tecido tem as suas próprias e únicas dificuldades para a penetração dos nanossistemas. Para muitos tumores, a nanoentrega através da administração IV é promovida pelo efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) (48).

O efeito EPR é causado pela vasculatura desorganizada encontrada nos tumores, desta forma existem, portanto, maiores fendas entre as células endoteliais. O resultado é um sistema vascular defeituoso com drenagem linfática diminuída que permite que os sistemas nanométricos penetrem preferencialmente no espaço extravascular do tumor e acumulem dentro do local do mesmo (Figura 4.4). Assim, com base apenas no efeito EPR, o uso de nanossistemas resulta num aumento de 10 vezes na retenção de fármacos no local do tumor (9,26). Deste modo, os nanossistemas escapam à eliminação renal e não conseguem penetrar nas junções estreitas das células endoteliais em vasos normais, mas podem extravasar no

tecido tumoral com arquitetura vascular anormal (48). O tempo de circulação prolongado dos nanossistemas é de grande importância para uma ótima vetorização passiva, de forma a assegurar uma libertação de fármaco e concentrações relativamente altas de nanossistemas carregados com fármaco suficiente no local do tumor (26,57).

Desta forma, os fármacos encapsulados nos nanossistemas podem proporcionar um tempo de circulação mais longo na corrente sanguínea, maior estabilidade, libertação controlada de fármaco, redução da dose e aumento da concentração do fármaco no ambiente tumoral ao vetorizar passivamente os tumores através do efeito EPR (7).

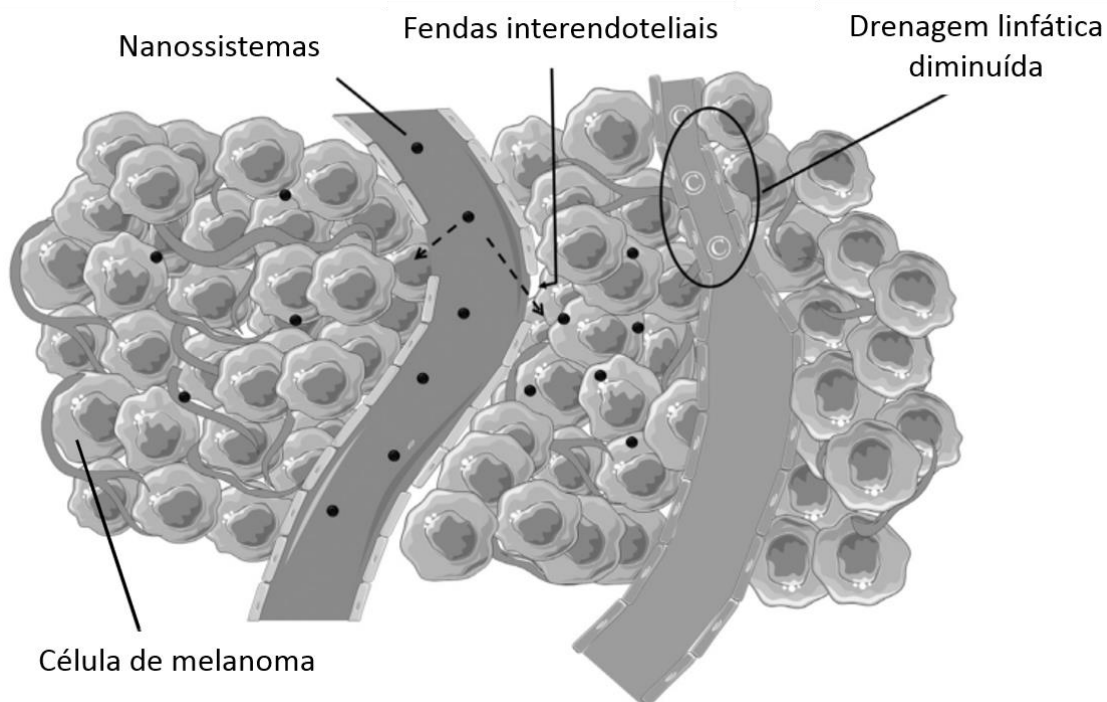


Figura 4.4 Esquematização do efeito de permeabilidade e retenção. Adaptado de (7).

Para este fim, pelo menos três propriedades dos nanossistemas são muito importantes. O seu tamanho ideal deve estar entre 10 e 100 nm, permitindo-lhes atravessar a vasculatura tumoral, mas não os vasos normais. A carga das partículas deve ser neutra ou aniônica para uma fuga eficiente da eliminação renal. Os nanossistemas devem ser omitidos do RES, que elimina quaisquer partículas estranhas através da opsonização. Assim, o tamanho da partícula dos nanossistemas é um fator chave para afetar a área de superfície em contacto com o meio. Portanto, quanto maior área de contato com o meio, mais rápida a libertação de fármacos do nanossistema (48,57).

A doxorubicina (DOX) é um dos agentes antineoplásicos mais utilizados e altamente eficazes, mas a sua aplicação clínica é amplamente dificultada pela sua fraca estabilidade e toxicidade sistémica, especialmente a toxicidade cardíaca. Por isso, é essencial melhorar o efeito terapêutico e diminuir a toxicidade sistémica para a sua administração. Estratégias para melhorar a eficácia e a segurança moveram-se ao longo de duas linhas de química medicinal, o desenvolvimento de formulações vetorizadas para o tumor e o desenvolvimento de novos análogos. O desenvolvimento farmacêutico da primeira estratégia é melhor exemplificado pelas formulações lipossômicas amplamente utilizadas de DOX, que parecem melhorar os efeitos terapêuticos. No entanto, a utilidade desta formulação é limitada pelo aumento da absorção pelo RES. Alterações na carga superficial lipossômica e hidrofília produzem "lipossomas *stealth*" com semi-vida de circulação prolongada, libertação lenta de fármaco e alterações na distribuição nos tecidos com deposição aumentada em tumores e cardiotoxicidade reduzida. Além disso, tem sido descrito que esses lipossomas podem causar reações de hipersensibilidade imediata geralmente desenvolvidas no início da infusão num número relativamente grande (até 7%) dos doentes. Portanto, encontrar um novo sistema de administração de fármacos é imperativo para superar esses obstáculos e aumentar a eficácia anticancerígena da DOX (51).

Deste modo, Zheng *et al.* (2011) avaliaram a potencial aplicação de DOX incorporada numa micela de PEG-poli(ϵ -caprolactona) no tratamento de ratinhos com melanoma, comparativamente com a administração de DOX isolada e de micelas sem DOX. Os resultados indicaram que a encapsulação da DOX na micela aumentou a sua atividade citotóxica, levou à inibição significativa do crescimento das células de melanoma maligno e prolongou a sobrevivência dos ratinhos tratados, como se pode verificar na figura 4.5. Do mesmo modo, a formulação aumentou a captação celular na célula B16F10 e verificou-se baixa toxicidade sistémica. Assim, os dados sugerem que a administração das micelas afeta fortemente a proliferação, a apoptose e a angiogénese do melanoma maligno. Uma vez que a formulação preparada é suficientemente pequena (~ 20 nm), pode aumentar a seletividade dos agentes citotóxicos, entregando-os especificamente no tecido tumoral, o que permite a máxima acumulação e uma penetração mais profunda nos tumores. Na circulação sanguínea, o pH é neutro (pH 7,4), enquanto que o pH do ambiente dentro do tumor é muito menor. Assim, a libertação do fármaco é desencadeada mais rapidamente no local do tumor do que no tecido normal e, conseqüentemente, resultou numa dose local alta de fármaco no tumor. Assim, o

efeito antitumoral melhorado da formulação pode ser devido aos efeitos combinados da citotoxicidade melhorada, à vetorização passiva de DOX visando os tecidos tumorais induzidos pelo efeito EPR e ao perfil de liberação dependente do pH. Dado o efeito promissor antitumoral e a mínima toxicidade, estes resultados indicam fortemente que a formulação pode ser uma abordagem válida e segura no tratamento de tumores (51).

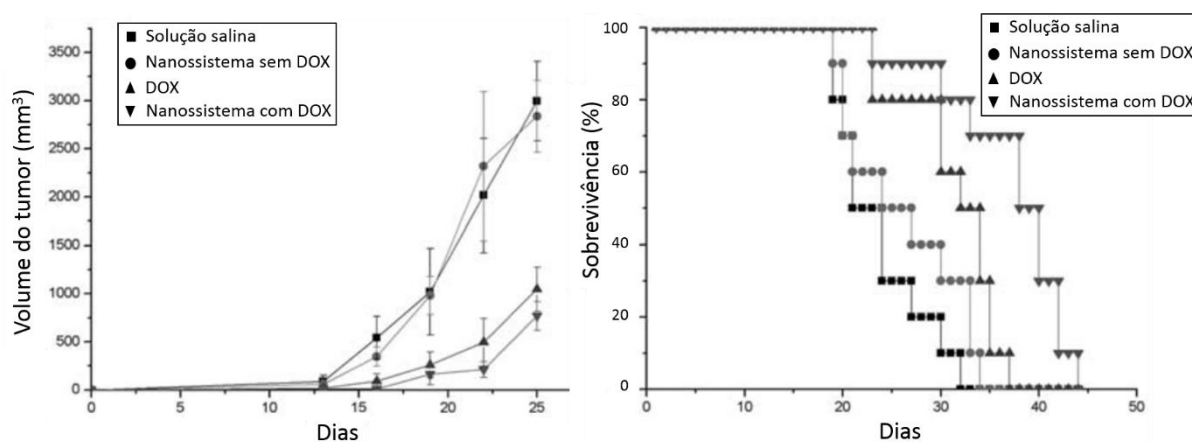


Figura 4.5 Supressão tumoral e sobrevivência dos ratinhos. Adaptado de (51).

O Caelyx® (DOX lipossomal peguilado) e o nab-paclitaxel (ABI-007, Abraxane®), que irão ser abordados posteriormente em maior detalhe, são dois exemplos representativos de nanomedicinas de primeira geração baseados em vetorização passiva (26).

Por outro lado, a citocalasina D, uma toxina fúngica, pode ser um potencial agente citotóxico devido à sua atividade no filamento de actina. No entanto, este composto químico é insolúvel em água, dificultando a sua utilização por via IV. Além disso, a citocalasina D visa os microfilamentos de actina que estão localizados em todas as células e, portanto, pode causar efeitos secundários significativos (7,54). Para superar esses problemas, Huang *et al.* (2012) desenvolveram lipossomas peguilados com citocalasina D e administraram em ratinhos portadores de melanoma B16, carcinoma colorretal CT26 e hepatoma H22. Desta forma, comparou-se os resultados com a administração via IV de citocalasina D isolada e de DTIC. Assim, verificou-se que os lipossomas poderiam acumular-se eficazmente nos tecidos tumorais, prolongar o tempo de retenção no local do tumor, inibir eficazmente os vários tipos de crescimento tumoral e prolongar o tempo de sobrevivência dos ratinhos portadores de tumores (Figura 4.6). Além disso, verificou-se que a acumulação pronunciada e seletiva de citocalasinas nos tecidos tumorais é essencial para o sucesso da terapia do cancro e para evitar

efeitos secundários *in vivo*. Assim, a citocalasina D lipossomal mostrou também melhorar significativamente a solubilidade e a biodisponibilidade, diminuindo a incidência de efeitos secundários e melhorando os efeitos antitumorais, o que demonstra o seu potencial como um agente alternativo na terapia do cancro (7,54).

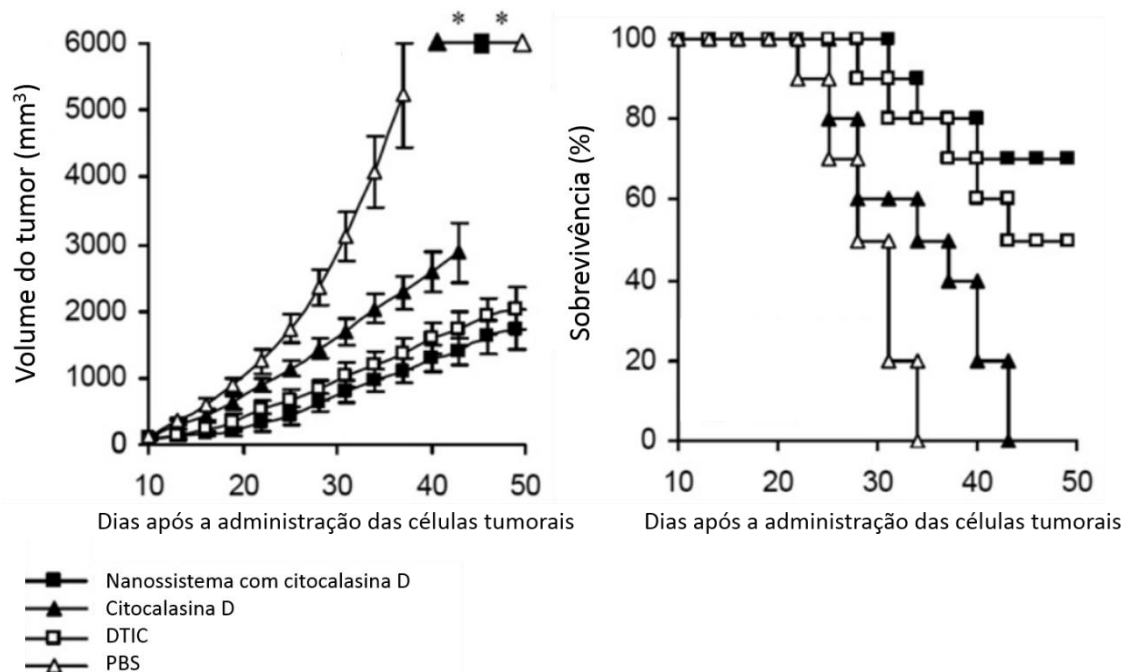


Figura 4.6 Indução da atividade antitumoral *in vivo*. Foram observadas taxas de sobrevivência significativamente prolongadas nos ratinhos tratados com a nanoformulação do que com a citocalasina D e PBS. Adaptado de (54).

Apesar da vetorização passiva baseada no efeito EPR permitir que os nanossistemas se acumulem e libertem as suas cargas terapêuticas dentro dos tumores, este efeito fornece uma especificidade relativamente modesta oferecendo somente aumentos de 20 a 30% no transporte. É de salientar que o efeito EPR não aumenta a captação dos sistemas nanométricos pelas células tumorais ou a concentração intracelular do fármaco. Portanto, o desenvolvimento de nanossistemas de próxima geração com multifuncionalidades é certamente justificado. (26). Embora o efeito EPR possa ser amplificado pela angiotensina II, induzida pela vasoconstrição nos doentes com cancro, é difícil a previsão do nível de acumulação dos nanossistemas no local das metástases, promovido pelo efeito EPR por si só (48). Também é ineficaz para a acumulação de nanossistemas se os tumores metastáticos forem pequenos e pouco vascularizados, especialmente em micrometástases (tumores <2 mm de tamanho). Além disso, a fibrose intersticial, que ocorre frequentemente em

metástases de melanoma, pode limitar a difusão de compostos e transportadores de fármacos a tumores da vasculatura. Por conseguinte, mecanismos para aumentar o extravasamento em tumores pouco vascularizados, juntamente com a vetorização direta para locais tumorais secundários são necessários para desenvolver terapias com nanossistemas com maior eficácia para doentes com melanoma (48).

4.3.2. Vetorização ativa

A vetorização ativa mediada por interações ligando-recetor específicas complementa as falhas da vetorização passiva uma vez que não só aumenta a afinidade entre a nanoformulação e as células tumorais, mas também facilita a captação dos sistemas nanométricos por células tumorais através de endocitose mediada por recetor (26). A vetorização ativa envolve uma grande variedade de moléculas para vetorização, incluindo pequenas moléculas tais como o ácido fólico e carboidratos, ou macromoléculas, como péptidos, proteínas e anticorpos, ou outras moléculas pequenas relevantes de forma a permitir a vetorização do fármaco para um local alvo específico (9,26). Igualmente, como referido anteriormente, nanossistemas orientados para o recetor de transferrina, recetor CD44, recetor MC1R, recetor do fator de crescimento dos fibroblastos, recetor de laminina, recetor de somatostatina e o recetor sigma e recetor de hialuronanos têm potencial capacidade de vetorização no caso do melanoma (3,9,48). Tais sistemas de entrega de fármacos podem ser particularmente úteis promovendo a acumulação de fármaco intracelular através do processo de endocitose mediada pelo recetor, embora a expressão basal de muitas moléculas alvo em células normais possa servir como um fator limitante (9).

Há desafios consideráveis para a conceção de sistemas de vetorização ativa, sendo o principal a escolha do alvo e do ligando de vetorização. Idealmente, deve ser selecionado um par de ligando-recetor que estará presente apenas nas células cancerígenas de interesse, permitindo que as nanopartículas visem somente as células tumorais (9).

Um número crescente de ensaios pré-clínicos em nanotecnologias ativamente vetorizadas para o tratamento do melanoma têm sido realizados com muitos dados interessantes e impressionantes, bem como inumeráveis publicações (26). Porém, embora tenham sido feitos progressos significativos, são necessárias mais pesquisas para determinar alvos moleculares específicos expressos pelas células de melanoma para permitir o desenvolvimento de nanossistemas mais eficientes.

4.4. A nanotecnologia na terapêutica anticancerígena do melanoma

Múltiplas terapêuticas anticancerígenas têm sido avaliadas para o tratamento de melanoma avançado. Estes fármacos circulam no organismo através da corrente sanguínea e penetram nos tumores através da difusão passiva. Porém, como referido anteriormente, apesar de serem capazes de eliminar células de melanoma *in vitro* com alta eficiência, a baixa solubilidade/estabilidade química e a sua citotoxicidade em células saudáveis, associada a graves efeitos secundários, dificultaram o seu uso clínico (3,7,57). Assim a resistência a estas terapêuticas e a inespecificidade desta abordagem reforça a necessidade de desenvolver novos sistemas de tratamento para o melanoma metastático, pelo que estão a decorrer numerosos ensaios clínicos para avaliar diferentes estratégias (32). Desta forma, e para o tratamento do melanoma, têm sido testados nanossistemas contendo vários agentes anticancerígenos, nomeadamente DOX, etoposido, cisplatina e PTX (3).

O PTX é um taxano que se encontra disponível como fármaco anticancerígeno desde 1993 (58). Os taxanos têm fraca solubilidade em água e requerem a utilização de um solvente para a sua solubilização e distribuição. O PTX é formulado com óleo de rícino polioxiethylado (Cremophor®), porém este solvente está associado a toxicidade grave. Deste modo, para melhorar a eficiência e superar o risco de segurança, é necessária uma formulação isenta de solvente. Assim, desenvolveu-se o nab-paclitaxel, em que o PTX, ao contrário dos fármacos convencionais que contêm este princípio ativo, está ligado a albumina, numa formulação de nanopartículas, com um tamanho médio de 130 nm. Esta formulação é usada no tratamento de uma variedade de cancros, incluindo o uso *off-label* em melanoma (3,58,59). Neste contexto, diversos ensaios clínicos investigaram o potencial do nab-paclitaxel, pelo que alguns ensaios clínicos de fase II revelaram ser bem tolerado e apresentou atividade em doentes com melanoma metastático (44,48,59,60). Neste contexto, num ensaio clínico de fase II Hersh *et al.* (2010) testaram a aplicação de nab-paclitaxel, em dois grupos distintos, ambos com 37 doentes com melanoma metastático. Num dos grupos, tratado previamente com terapias antineoplásicas, foi administrada via IV uma dose de 100 mg/m². No outro grupo, não tratado previamente com terapias antineoplásicas, foi administrada uma dose de 150 mg/m² de nab-paclitaxel. A taxa de resposta global, para o grupo tratado previamente com e o grupo não tratado, foi de 2,7% e de 21,6%. A sobrevivência global foi de 12,1 meses para doentes previamente tratados e de 9,6 meses para doentes não tratados com terapia antineoplásica, comparativamente à sobrevivência global inferior a 8 meses demonstrado da utilização de

DTIC ou temozolomida. Do mesmo modo, as taxas de sobrevivência livre de progressão (PFS) foram superiores no grupo não tratado previamente com terapias antineoplásicas, comparativamente com o grupo tratado previamente (Figura 4.7) e com as abordagens padrão com DTIC, PTX e terapia combinada. Assim, conclui-se que o nab-paclitaxel apresenta atividade em ambos os doentes previamente tratados e não tratados com terapias antineoplásicas (60).

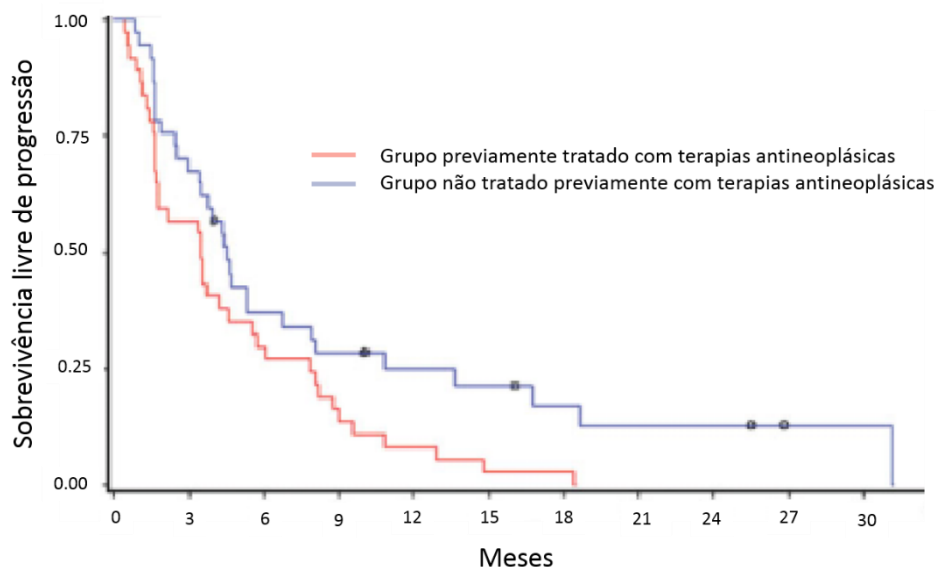


Figura 4.7 Ilustração da sobrevivência livre de progressão na população tratada. Adaptado de (60).

Paralelamente, Kottschade *et al.* (2011) concluíram que a combinação de nab-paclitaxel e carboplatina apresenta uma atividade clínica promissora como terapia em doentes com melanoma metastático, sem tratamento prévio com terapias antineoplásicas. Este ensaio clínico de fase II, englobou 76 doentes, divididos em duas coortes, os tratados previamente com terapias antineoplásicas e não tratados. Em ambos os grupos foi administrado, num regime semanal, uma combinação de carboplatina (AUC 2) e de nab-paclitaxel (100 mg/m²). Nos doentes previamente tratados e não tratados com terapias antineoplásicas, a taxa de PFS foi 4,1 meses e 4,5 meses, respetivamente. A sobrevivência global foi de 10,9 meses para os doentes com tratamento prévio e 11,1 meses, para os sem tratamento prévio com terapias antineoplásicas (Figura 4.8) (44).

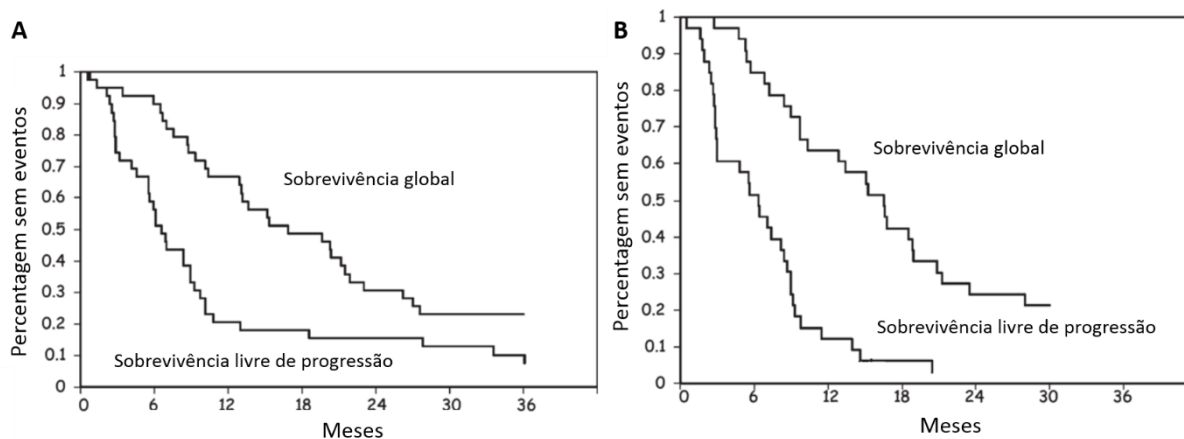


Figura 4.8 Distribuição da sobrevivência global e sobrevivência livre de progressão no grupo sem tratamento prévio com terapias antineoplásicas (A) e para os doentes com tratamento prévio (B). Adaptado de (44).

Apesar de ambos os estudos revelarem melhorias significativas na atividade clínica e nos resultados clínicos, como as taxas de PFS, demonstraram também que os efeitos secundários tais como a neuropatia, alopecia, neutropenia, trombocitopenia, fadiga, náuseas e vômitos tinham sido registados com alguma frequência, o que demonstra a necessidade da elaboração de novas investigações nesta vertente de forma a permitir otimizar os perfis de toxicidade destes agentes antineoplásicos (44,60).

Uma das principais causas de resistência a fármacos citotóxicos é a insuficiente penetração destes fármacos, em concentrações letais, numa massa tumoral. Nesse sentido, alguns estudos propuseram a fraca penetração como uma limitação principal na terapêutica anticancerígena com DOX (61). Por exemplo, Al-Jamal *et al.* (2013) realizaram ensaios em ratinhos portadores de um modelo de tumor de melanoma B16F10, onde foi administrado DOX via IV (0,5 mg/kg), dendrímeros de poli-L-lisina (50 mg/kg) ou DOX complexada com o dendrímero (0,5 mg/kg:50 mg/kg). Os ratinhos tratados com o complexo apresentaram tempos de sobrevivência médios significativamente aumentados em comparação com os grupos de DOX livres e não tratados. O tempo médio de sobrevivência para o grupo onde foi administrado o complexo foi de 16 dias comparado com 13 dias para outros grupos tratados e não tratados. A administração IV de apenas duas doses de DOX complexada com o dendrímero resultou numa acumulação, redução na vascularização, apoptose/necrose extensa no local do tecido tumoral e redução estatisticamente significativa do volume tumoral (Figura 4.9). Este estudo sugere que as moléculas de poli-L-lisina dos dendrímeros poderiam

complexar fármacos anticancerígenos, tal como a DOX, e melhorar a sua acumulação e citotoxicidade em tumores sólidos *in vivo*. Tal abordagem oferece novas capacidades para a conceção de terapias combinatórias antiangiogénicas/anticancerígenas (61).

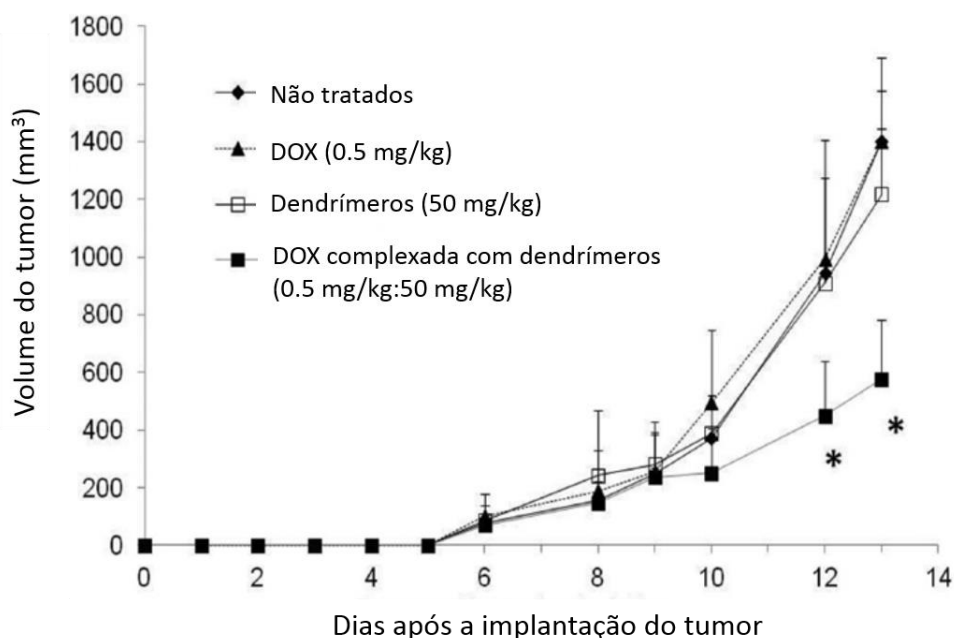


Figura 4.9 Crescimento do volume do tumor após a administração IV das diversas formulações. Adaptado de (61).

A cisplatina é uma terapia de primeira linha contra um amplo espectro de neoplasias. No entanto, as toxicidades sistémicas, incluindo nefro e neurotoxicidades, juntamente com a resistência ao fármaco, limitam severamente o uso de cisplatina na prática clínica. Com o objetivo de superar a referida toxicidade, foram realizadas tentativas de encapsular a cisplatina em nanossistemas. Desta forma, foram desenvolvidas formulações nanoparticuladas de forma a aumentar a acumulação de cisplatina nos tumores através do efeito EPR, ao mesmo tempo que reduzem os efeitos secundários através de uma distribuição restrita de fármacos. No entanto, estas tentativas foram dificultadas pela fraca solubilidade da cisplatina em água e óleo (62,63). Neste contexto, Guo *et al.* (2014) analisaram a utilização de uma formulação com cisplatina insolúvel iodada em nanopartículas lipídicas, comparativamente à utilização de cisplatina isolada, em dois modelos de xenotransplante de melanoma em ratinhos. Neste estudo, concluiu-se que a administração da formulação por via IV *in vivo* aumentou marcadamente a eficácia da cisplatina na inibição do crescimento tumoral, comparativamente com a cisplatina isolada, como se pode verificar na figura 4.10, e

verificou-se uma acumulação elevada nos tecidos tumorais, pelo que a vetorização poderá ser necessária para melhorar ainda mais a eficácia da formulação. Estes resultados sugerem que a formulação é altamente tóxica para células cancerígenas de melanoma, pelo que estes efeitos potentes observados *in vitro* podem ser atribuídos à captação aumentada das nanopartículas (62).

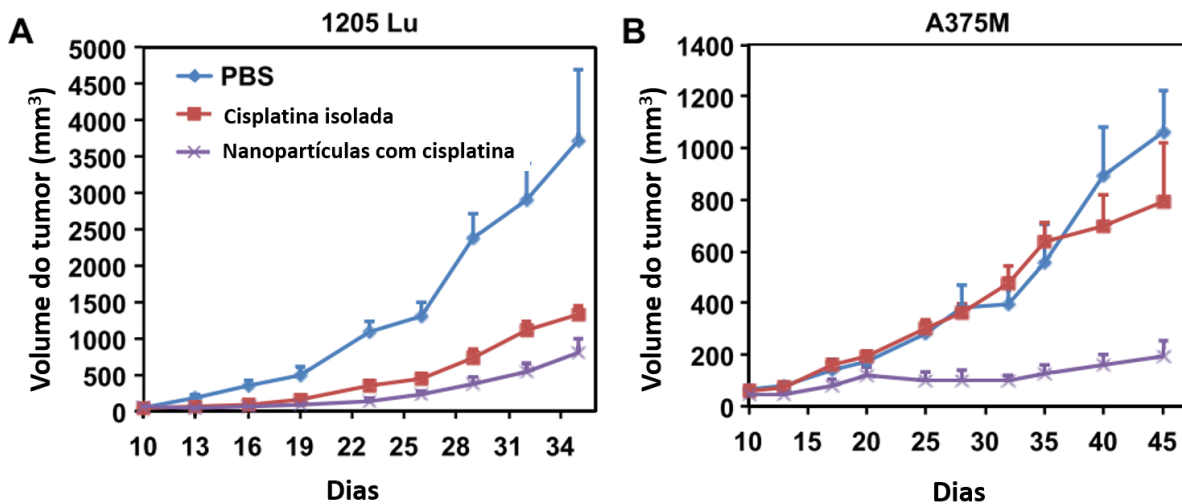


Figura 4.10 O efeito da cisplatina isolada e da nanoformulação no crescimento tumoral nos dois modelos de xenotransplante *in vivo*. Adaptado de (62).

A glicoproteína CD44 encontra-se sobre expressa numa variedade de células tumorais, pelo que tem sido estudada e associada como um potencial marcador em várias neoplasias (45). Desta forma, Ndinguri *et al.* (2012) testaram a utilização de lipossomas contendo DOX e um anticorpo adicional contra CD44, visando especificamente células malignas, num modelo de ratinho inoculado com células de melanoma, B16F10. A formulação, administrada via IV nos dias 0, 3, 5, 6 e 8 numa dose de 5 mg/kg, permitiu reduzir o tamanho do tumor em 60% em comparação com o controlo de solução salina, e os lipossomas não vetorizados foram ineficazes (Figura 4.11). Assim, devido à diminuição dos efeitos secundários, a dose máxima tolerada da formulação aumentou cinco vezes (45).

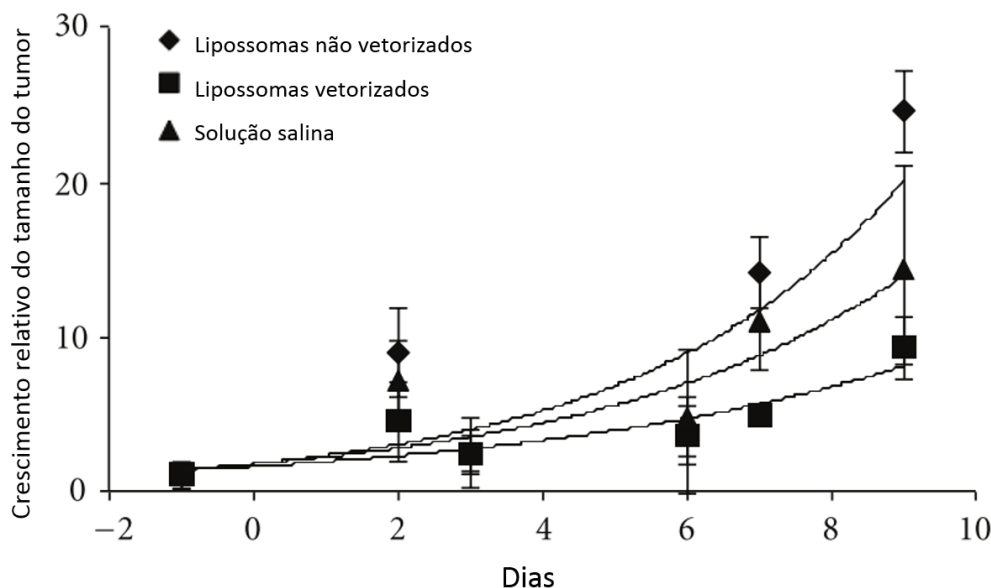


Figura 4.11 Efeitos da vetorização dos lipossomas com DOX, da não vetorização e da solução salina no tamanho do tumor no modelo de melanoma B16F10 em ratinhos. Adaptado de (45).

Desta forma, estes estudos pré-clínicos revelam-se de grande importância para o desenvolvimento de ensaios clínicos para a entrega de fármacos anticancerígenos mediada por nanossistemas no melanoma. Os nanossistemas vetorizados podem representar a "próxima geração" de sistemas com potencial para aumentar a seletividade e eficácia de tratamentos anticancerígenos contra melanoma metastático no corpo humano.

4.5. A nanotecnologia na imunoterapia do melanoma

As evidências indicam que durante a progressão, as células tumorais sobreviventes são capazes de desenvolver vários mecanismos diferentes para evitar o reconhecimento e eliminação imunológica (64,65). Portanto, o desenvolvimento de terapias para aumentar a imunidade tumoral é uma estratégia de tratamento racional (37). Assim, a nanotecnologia tem sido utilizada para melhorar as abordagens em imunoterapia e, desta forma, aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos adversos (3,27,64).

Como referido anteriormente, os imunomoduladores usualmente utilizados no melanoma são a IL-2, IFN- α , ipilimumab, pembrolizumab e nivolumab. A IL-2, uma glicoproteína imunomoduladora, possui forte atividade antitumoral estimulando a atividade dos linfócitos T e induzindo a proliferação de células *natural killer* (NK) e linfócitos B (36,66,67).

De acordo com a literatura, numerosos estudos pré-clínicos e clínicos têm demonstrado a atividade antitumoral da IL-2, porém a reduzida semi-vida desta molécula, no soro, implica administrações regulares de doses elevadas, resultando em efeitos secundários graves (66,67). Para ultrapassar essas limitações, Yao *et al.* (2011) desenvolveram nanopartículas poliméricas para a entrega de IL-2 em ratinhos com enxertos de melanoma. As nanopartículas foram formuladas a partir de polietilenimina (PEI) de baixo peso molecular (600Da) ligada por β -ciclodextrina, conjugada com ácido fólico, e ainda misturada com o plasmídeo IL-2. Assim, foi demonstrado que com a administração peritumoral da formulação era possível inibir o crescimento tumoral e prolongar a sobrevivência dos ratinhos com melanoma. O efeito antitumoral da formulação pode ser atribuído principalmente à ativação, proliferação e infiltração de células T efectoras e células NK no tumor. Esses resultados mostram que uma expressão contínua de IL-2 é necessária para a sua atividade antitumoral (27,66).

Estudos anteriores demonstram que a utilização de IL-2 e anticorpos anti-CD137, sendo o CD137 um recetor exposto na superfície de células T ativadas, células NK e células dendríticas, provocam uma potente resposta imune antitumoral, nomeadamente quando usadas em combinação. No entanto, o seu uso clínico é limitado devido à toxicidade inflamatória resultante da administração sistémica (67). Por exemplo, Kwong *et al.* (2013) mostraram que usando num modelo de ratinho de melanoma B16F10, uma terapêutica local com lipossomas peguilados anti-CD137 e lipossomas IL-2 era possível desencadear uma potente atividade antitumoral sem evidência de toxicidade sistémica. Assim, ao localizar a biodistribuição da terapia, os regimes imunoterapêuticos altamente potentes, mas anteriormente intoleráveis, podem ser administrados em grandes doses dentro de uma lesão acessível, para a indução de imunidade antitumoral sistémica sem inflamação sistémica detetável. Além disso, esta abordagem pode ser sinérgica em combinação com a administração de agentes de imunoterapia de melhor tolerância tais como os inibidores de CTLA-4 ou PD-1 que são conhecidos por promover a regressão tumoral em humanos (67).

O IFN- α é um agente antitumoral comumente usado no tratamento do melanoma metastático, como referido anteriormente. Esta citocina é conhecida por melhorar a atividade de células efectoras imunes, bem como mediar efeitos antiproliferativos e pró-apoptóticos contra células tumorais. No entanto, a administração sistémica de IFN- α pode ser acompanhada por toxicidade significativa e esta abordagem é limitada pelo desconforto induzido pelas repetidas administrações intratumorais e pela necessidade de uma

monitorização clínica regular (68). Nesse sentido, foi desenvolvido por He *et al.* (2011) uma nanocápsula com base em um polímero biodegradável, poli (policaprolactona) de forma a controlar a entrega local de IFN- α ao microambiente tumoral. Os estudos *in vitro* demonstraram uma liberação constante de IFN- α , e por outro lado através de estudos *in vivo*, usando um modelo de xenotransplante humano de melanoma em ratinhos foi possível proceder à implantação subcutânea da formulação, que foi bem tolerada e associada a um crescimento tumoral diminuído, em comparação com aqueles implantados com as nanocápsulas com PBS, como se pode verificar na Figura 4.12 (68).

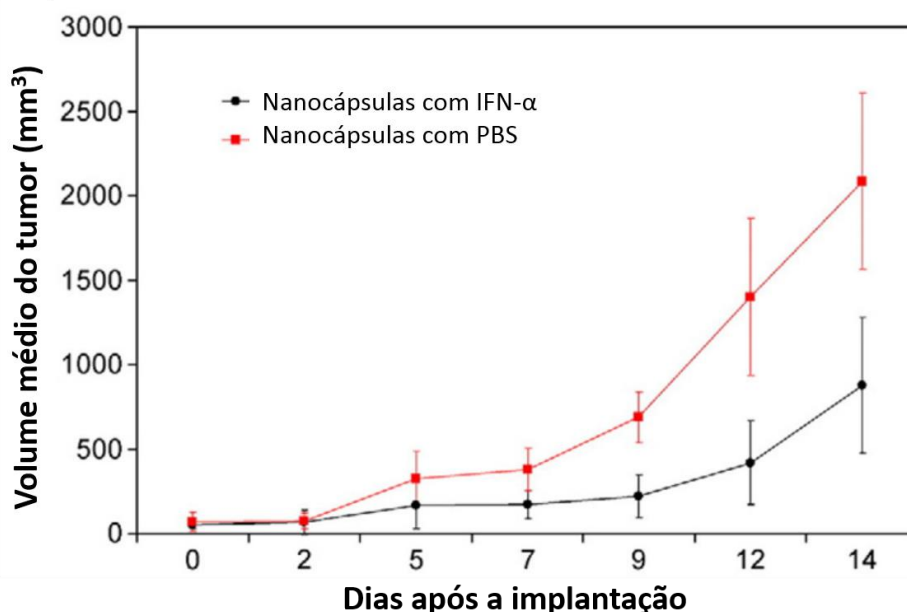


Figura 4.12 Comparação do crescimento tumoral nos ratinhos implantados com as nanocápsulas com IFN- α ou PBS. A implantação cirúrgica ocorreu no dia 0. foi observada uma inibição estatisticamente significativa (começando no dia 9) no crescimento do tumor nos ratinhos tratados com IFN- α , este efeito continuou até ao seu sacrifício no dia 14 ($p < 0,01$). Adaptado de (68).

Por outro lado, a encapsulação de antigénios (Ags) em nanopartículas poliméricas demonstrou entregar diretamente Ags incorporados a células apresentadoras de antigénios (APCs), de forma a conferir a sua liberação sustentada, evitando a degradação proteolítica e melhorando a sua estabilidade. Além disso, demonstrou-se que os nanossistemas carregados com Ag facilitam a captação do Ag pelas células dendríticas e poderiam evitar respostas inflamatórias excessivas causadas por algumas formulações. Neste contexto, a administração de Ags à base de nanotecnologia pode ser uma das estratégias promissoras para a imunoterapia contra o cancro (69). Assim, Tan *et al.* (2013) utilizaram múltiplas nanopartículas

poliméricas revestidas com lípidos para demonstrar a viabilidade da entrega em combinação ou isolada de três Ags de melanoma diferentes, representados na figura 4.14 por Ag A, B e C, de forma a induzir eficientemente uma resposta imune antitumoral num modelo de ratinho com melanoma. Embora as nanopartículas carregadas com um único péptido possam induzir uma resposta de células T forte, não foi demonstrada supressão significativa do crescimento tumoral, em contraste, a entrega combinada de nanopartículas com diferentes péptidos suprimiu significativamente o crescimento das células de melanoma B16, em comparação com os imunizados com PBS, apesar de mostrarem reduzidas respostas de células T específicas de Ag. Assim, comprovou-se que a combinação de múltiplos Ags pode tornar mais difícil para as células tumorais escapar da vigilância do sistema imunológico do que com um único Ag e melhorar a eficiência anticancerígena (69).

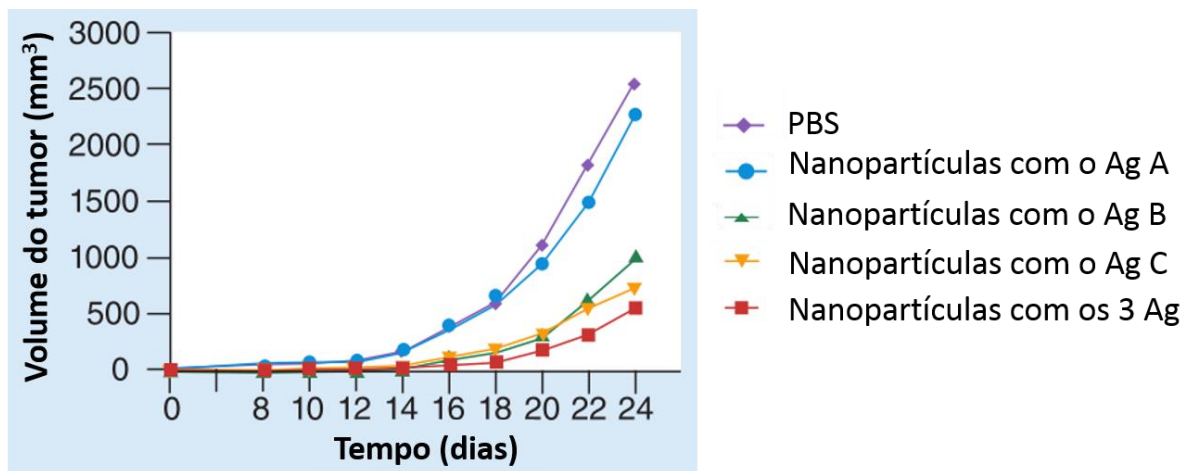


Figura 4.13 Variação do volume tumoral em cada grupo ao longo do tempo. Adaptado de (69).

Embora as células de melanoma exibam uma imunogenicidade bem definida, os resultados globais da imunoterapia clínica não é satisfatório. As observações paradoxais sugerem um microambiente imunossupressivo no tumor que é mediado por mecanismos diferentes, decorrentes da secreção de fatores imunossupressores pelas células ou linfócitos. O microambiente também pode ser criado pela tolerância imune adquirida das células de melanoma (70). Assim, de acordo com os estudos supracitados, é notória a importância da nanotecnologia e dos seus avanços científicos para a melhoria da imunoterapia no melanoma.

4.6. A nanotecnologia na terapia alvo contra melanoma

No melanoma, as metástases ocorrem inicialmente nos gânglios linfáticos. A disseminação sistêmica para um ou vários órgãos, como o cérebro e os órgãos viscerais, pode ocorrer com frequência e geralmente é fatal. A próxima geração de nanossistemas precisará abordar o desafio de identificar tumores não ressecáveis, metástases e de estadios tardios, o que exigirá a execução eficaz da vetorização dos tecidos tumorais em órgãos específicos (principalmente a vetorização passiva) e subsequente vetorização direta das células cancerígenas (vetorização ativa), e claramente essas considerações são específicas para tipos individuais de cancro. São necessárias estratégias distintas para alcançar esses dois requisitos de vetorização. Assim, a vetorização efetiva do tumor específico em doentes com melanoma é essencial para o desenvolvimento de nanoterapias suficientemente eficientes para curar a doença (48).

Como descrito anteriormente, estudos moleculares em curso identificaram as vias de sinalização envolvidas na progressão do melanoma e os genes que codificam os seus componentes. Estes estudos forneceram alvos moleculares para a terapêutica do melanoma (71).

Embora os alvos na via MAPK sejam melhor compreendidos hoje do que nunca, não existem opções de tratamento eficientes para doentes que sofram de melanoma metastático através da inibição destas proteínas. Os principais obstáculos para resolver este problema incluem a falta de agentes farmacológicos clinicamente eficazes e veículos de entrega para obter o fármaco nas células de melanoma. Consequentemente, terapias ou sistemas de administração que transportam um ou mais agentes terapêuticos com toxicidade mínima são urgentemente necessários para os doentes (17). Para resolver este problema, é necessário explorar os nanossistemas para a entrega preferencial de fármacos no tumor (72).

As terapêuticas baseadas em nanossistemas não se limitam à entrega de pequenas moléculas, que normalmente são necessárias para tratamentos anticancerígenos sistêmicos, mas podem ser usadas para administrar grandes moléculas bioativas, como proteínas e ácidos nucleicos, incluindo siRNAs (48).

O RNA de interferência (RNAi), um processo biológico de silenciamento de sequências de genes específicos, desenvolveu-se rapidamente numa tecnologia para investigar a função de genes fisiológicos e fisiopatológicos, bem como para o potencial tratamento de doenças humanas (73). Esta terapêutica surgiu como uma estratégia com grande potencial para

revolucionar o tratamento dos cancros, incluindo o melanoma, com toxicidade reduzida comparada com a que é comumente encontrada com os fármacos citotóxicos convencionais (74). A técnica de RNAi é um método eficaz que suprime a expressão de proteínas por clivagem do RNA mensageiro (mRNA) alvo (75). Assim, a utilização de pequenos siRNA é uma abordagem terapêutica bastante promissora para silenciar genes causadores de doenças (76). No entanto, é um facto amplamente aceite que o uso *in vivo* de pequenos siRNA, os mediadores do RNAi, continuam a ser uma barreira para o sucesso terapêutico. As suas aplicações clínicas são limitadas devido à sua rápida degradação pelas RNases no plasma, rápida eliminação da circulação sanguínea e também principalmente devido à falta de métodos seguros e eficientes para a transmissão do gene. Assim, para se obter uma terapêutica eficaz, é necessário o desenvolvimento de um seguro, mas eficiente sistema de entrega de siRNA (3,73,75).

A penetração inadequada, a farmacocinética sub-ótima e a toxicidade associada aos métodos atuais para a administração de siRNA tornaram a maioria destes impraticáveis para a aplicação clínica. No entanto, para tratar a maioria das doenças "inabordáveis" e "incuráveis", incluindo infeções virais, distúrbios sanguíneos e cancros, disseminados ou localizados em tecidos que não são facilmente acessíveis, a administração direta é muito difícil ou impossível. Portanto, o desenvolvimento de abordagens de entrega sistémica efetiva e segura é de extrema importância (73).

Para ultrapassar estes obstáculos, vários nanomateriais têm sido amplamente utilizados como vetores de genes (75). As nanopartículas possuem várias características favoráveis, incluindo a replicabilidade favorável, melhor biocompatibilidade e estabilidade. Além disso, os nanomateriais são altamente acumulados nos tumores *in vivo*, devido ao efeito EPR (75,77). Assim, o uso da tecnologia RNAi vetorizada para as vias MAPK está indicada como uma potencial abordagem. O siRNA pode inibir especificamente genes alvo na via MAPK, porém a sua rápida degradação em animais tem sido um grande desafio (17). Desta forma, os nanossistemas têm sido utilizados para administrar siRNAs ou pequenos inibidores para inibir estas vias de sinalização para o tratamento de melanoma (3).

4.6.1. Vetorização para RAS

A família RAS consiste em K-RAS, H-RAS e N-RAS, que ativam a sinalização MAPK e as proteínas *downstream* tais como RAF e PI3K. As proteínas RAS funcionam como interruptores moleculares que controlam a proliferação e sobrevivência das células. Nos melanomas, a substituição de leucina por glutamina no resíduo 61 é a mutação mais comum observada no N-RAS. O RAS mutante permanece ativo levando a proliferação celular descontrolada e a um fenótipo transformado. A introdução de RAS ativado nos melanócitos pode levar à formação de tumores de melanomas em ratinhos. Além disso, a expressão de RAS pode inibir os supressores tumorais p16INK4A, p53 e p14ARF e o *knockdown* da expressão de H-RAS utilizando siRNAs pode levar a regressão de melanoma em modelos de melanoma. As tentativas para inibir farmacologicamente o RAS ou os seus componentes reguladores para a terapia do cancro têm até agora alcançado pouco sucesso. Assim, o tratamento terapêutico de RAS no melanoma é relativamente ineficaz, sugerindo que outros pontos na via MAPK possam ser alvos mais promissores (17).

4.6.2. Vetorização para BRAF

A maioria dos eventos que promovem o desenvolvimento precoce do melanoma ainda não foram identificados, mas a desregulação das cascatas de sinalização MAPK e AKT3 são importantes reguladores deste processo, como descrito no capítulo 3.3 (78).

Enquanto que mais de 65 mutações diferentes ocorrem em cerca de 30 codões BRAF, uma substituição de *missense* de T-A no nucleótido 1799, que altera a valina (V) para ácido glutâmico (E) no codão 600, V600E, é a mutação mais comum no BRAF no melanoma. O V600E BRAF desempenha um papel importante na ativação da via MAPK, desencadeado a divisão celular, angiogênese, invasão e metástase para promover o desenvolvimento do tumor, sendo portanto, um potencial alvo terapêutico para o tratamento de melanoma (17,18,79,80).

Por outro lado, o V600E BRAF mostrou estimular inicialmente a proliferação de melanócitos, indicando que contribui para a melanogênese e desenvolvimento de nevos (17,79,80). Aproximadamente 90% dos nevos expressam V600E BRAF, mas raramente progridem em melanomas (18). Isto deve-se à intensa ativação da via MAPK causada pela proteína mutante, que desencadeia uma forma de senescência induzida por oncogenes nos

melanócitos, atuando como um mecanismo protetor para inibir a progressão do melanoma. Em contraste, níveis moderados de ativação da via MAPK promovem a progressão do ciclo celular e o desenvolvimento do cancro. Conseqüentemente, as células contendo o BRAF oncogénico isolado não são suficientes para induzir melanoma, pelo que necessitam de alterações genéticas adicionais para as células melanocíticas senescentes reentrarem no ciclo celular (17,18,79,80). Além disso, cerca de 70% dos melanomas têm elevada sinalização de AKT3, levando à desregulação da apoptose e promovendo assim a quimiorresistência. Desta forma, genes como AKT3 demonstraram cooperar com ^{V600E}BRAF na transformação melanocítica, tornando-o também um atraente alvo terapêutico em melanomas metastáticos (18,78).

A nanotecnologia tem sido utilizada para desenvolver um sistema capaz de transportar siRNAs para silenciar simultaneamente estas duas moléculas sinalizadoras (3). Assim, Tran *et al.* (2008) demonstraram que a combinação de ultrassons de baixa frequência com a administração tópica de lipossomas contendo siRNA especificamente concebidos para inibir ^{V600E}BRAF e AKT3 reduziu a expressão destas proteínas, diminuindo significativamente o desenvolvimento de melanoma em ratinhos. Deste modo a formulação tem o potencial de diminuir o desenvolvimento precoce de lesões melanocíticas na pele ou prevenir a propagação de metástases de melanoma cutâneo. A inibição simultânea mediada por siRNA de AKT3 e BRAF diminuiu significativamente o crescimento de células em comparação com a vetorização de AKT3 ou BRAF sozinhos (Figura 4.14). Assim, esta formulação poderia ser utilizada como uma abordagem não-cirúrgica para diminuir o número de nevos benignos ou inibir o desenvolvimento da lesão cutânea melanocítica precoce. Este último teria a consequência de diminuir a propagação nas fases iniciais, prolongando assim a sobrevivência através da prevenção de metástases. Neste estudo, o ultrassom foi utilizado para permeabilizar a pele, permitindo a libertação da formulação ao longo das camadas epidérmica e dérmica (78).

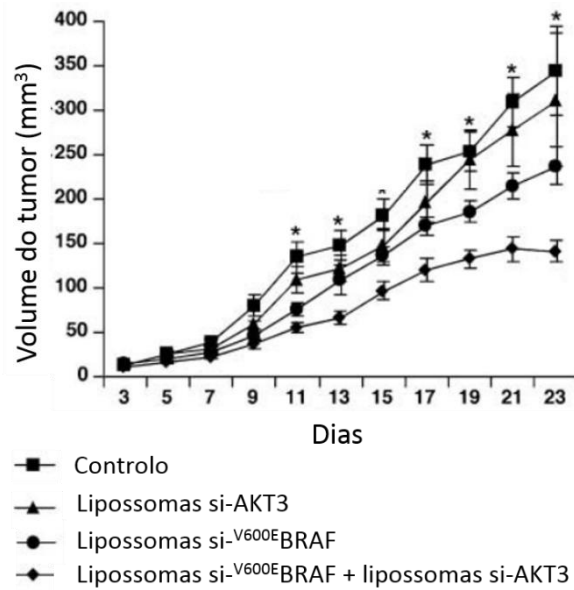


Figura 4.14 Variação do crescimento tumoral de acordo com a administração das diferentes formulações. Adaptado de (78).

Considerando que a inibição mediada por siRNA de $V600E$ BRAF e AKT3 em células de melanoma diminui o desenvolvimento de tumores de melanoma e a inibição simultânea pode levar a uma inibição de tumores cooperativamente, os agentes que visam especificamente $V600E$ BRAF e/ou AKT3 poderiam ter um potencial significativo para tratar sinais, lesões melanocíticas precoces ou metástases cutâneas nas quais estas proteínas são desreguladas. Assim, são necessários agentes vetorizados simultaneamente para estas vias de sinalização específicas para maximizar a eficácia clínica, porém com menos efeitos secundários que aqueles que inibem a proteína BRAF normal e mutante ou que têm como alvo todas as três isoformas de AKT (18,78). Além disso, pode ser necessário uma abordagem que combine os siRNAs com agentes anticancerígenos ou imunoterapia de forma a erradicar as células cancerígenas enfraquecidas pela inibição das vias de sinalização (3).

A resistência a inibidores de BRAF mutado pode ser causada por ativação de MEK/ERK ou outras vias de sinalização tais como a via PI3K/AKT. Além disso, o desenvolvimento de mutações em outros genes, como NRAS ou MEK, também foram propostas como um potencial mecanismo de resistência ao restabelecerem a sinalização RAS-MEK-ERK em tumores expostos a inibidores de BRAF. Desta forma, torna-se imperativo determinar fatores que promovam a resistência aos inibidores de BRAF e identificar potenciais terapias para ultrapassar essa resistência (3,79–82).

Embora se tenham registado progressos no desenvolvimento de fármacos que visam o BRAF, é necessário avaliar mais a fundo o resultado clínico no que respeita ao uso a longo prazo, ao mecanismo de ação, à especificidade, à eficácia terapêutica e à toxicidade relacionada com o fármaco. Portanto, são requeridas abordagens combinatórias para tratar esta doença (17).

4.6.3. Vetorização para MEK e ERK

MEK1/2 são quinases de especificidade dupla que fosforilam e ativam ERK. Estas quinases encontram-se a *downstream* de RAS/RAF, os membros mais mutados da via MAPK, como referido anteriormente. Como resultado, o alvo MEK ou ERK oferece a possibilidade de exercer um efeito antitumoral, mesmo na ausência de mutações RAS/RAF (72). MEK-1 e MEK-2 são proteínas que se encontram ativas em aproximadamente 30% de todos os cancros humanos com sinalização MAPK ativada. Assim, MEK 1/2 permanecem alvos terapêuticos promissores em melanomas (17).

Por outro lado, a atividade elevada de ERK é frequentemente observada na proliferação de linhas celulares de melanoma metastático, bem como em tumores humanos, pelo que é um bom indicador da progressão tumoral. A ativação constante de ERK em células de melanoma mostrou atribuir resistência a vários agentes terapêuticos (17).

Neste contexto, Basu *et al.* (2009) desenvolveram nanopartículas a partir de um polímero de ácido hexadentado-poliD,L-láctico ácido-co-glicólico quimicamente conjugado com PD98059, um inibidor seletivo de MEK. Assim, demonstraram que a vetorização das nanopartículas para MAPK levou à inibição da proliferação das células de melanoma, induziu a apoptose *in vitro* e retardou o crescimento do tumor *in vivo*. A inibição da proliferação celular e a indução da apoptose após tratamento com nanopartículas de PD98059 são consistentes com a inibição da fosforilação de ERK e o bloqueio resultante destes sinais proliferativos e antiapoptóticos (17,72).

4.6.4. Vetorização para VEGF

O VEGF, uma citocina e molécula de sinalização, é o mediador chave da angiogénese e é libertado neste processo à medida que os tumores crescem e começam a ultrapassar o suprimento de oxigénio e nutrientes disponíveis. Por conseguinte, a supressão de VEGF inibe

a formação de novos vasos sanguíneos e subsequente sobrevivência do tumor. Desta forma, a regulação positiva do VEGF inter-relacionada com a angiogénese do tumor proporciona um alvo estratégico para a terapêutica anticancerígena (73,76). Deste modo, Yang *et al.* (2011) estudaram a viabilidade da utilização de nanopartículas de quitosano para o transporte de VEGF-siRNA de forma a reduzir o nível de VEGF em células de melanoma de ratinho. Os resultados demonstraram que as nanopartículas vetorizadas efetivamente transportaram, protegeram o siRNA da degradação das RNases e libertaram siRNA em células de melanoma de ratinho (B16F10), pelo que apresentaram uma eficiência de silenciamento do gene VEGF de 40%, sem toxicidade aparente (76).

4.6.5. Vetorização para Stat3

Em geral, os mecanismos moleculares que controlam a progressão do melanoma humano e as metástases estão relacionados com alterações de vários oncogenes, genes supressores de tumor, genes supressores de metástases e fatores de crescimento e seus recetores. Estas anormalidades afetam o *downstream* das vias de transdução de sinal envolvidas no controlo do crescimento celular e outras propriedades malignas (75,83).

O Stat3 foi reconhecido como um oncogene, que se encontra sobre expresso em vários tipos de tumores humanos, incluindo o melanoma maligno (75,77,83). O Stat3 desempenha um papel crucial na promoção da proliferação, diferenciação, anti-apoptose e progressão do ciclo celular. A ativação constitutiva de Stat3 confirmou promover a sobrevivência do cancro e estar associada à fuga imunológica do mesmo. Por estas razões, a via de sinalização Stat3 pode ser aplicada como um potencial alvo na terapia cancerígena (75,77,83).

Como descrito anteriormente, o processo de RNAi envolve o silenciamento específico da proteína alvo (77). Assim, o silenciamento da expressão da proteína Stat3 utilizando a técnica de RNAi suprimiria eficazmente a proliferação celular e induziria apoptose tumoral, conduzindo à inibição do crescimento do cancro e prolongamento da sobrevivência dos doentes (75,77).

Por outro lado, o óxido de grafeno (GO), um promissor nanomaterial de carbono de duas dimensões, tem sido amplamente estudado devido a potenciais aplicações biomédicas nos últimos anos. Este possui várias vantagens, como grupos hidroxilo, ácido carboxílico e outros grupos reativos, que são facilmente conjugados com outras modificações, tornando-o personalizável para os campos biomédicos, tem grupos hidrofílicos ricos, possuindo assim

uma boa biocompatibilidade. Do mesmo modo, a preparação de GO pode ser desenvolvida de forma fácil e barata (75,77). Nesse sentido, Yin *et al.* (2013) estudaram o comportamento antitumoral *in vivo* do plasmídeo Stat3 siRNA entregue por GO quimicamente funcionalizado com PEI e PEG (GO-PEI-PEG), representado na figura 4.15, em melanoma maligno de ratinho. Os resultados *in vivo* indicaram uma regressão significativa no crescimento (Figura 4.16) e peso do tumor após a administração da formulação. Além disso, o tratamento simultâneo com irradiação infravermelha no tumor também estimulou a apoptose celular em tumores e exibiu um efeito antitumoral. Este estudo demonstra que o plasmídeo Stat3 siRNA administrado por GO-PEI-PEG inibe eficazmente a expressão do gene Stat3, conduzindo à supressão do crescimento e indução da apoptose em melanoma maligno de ratinho (75).

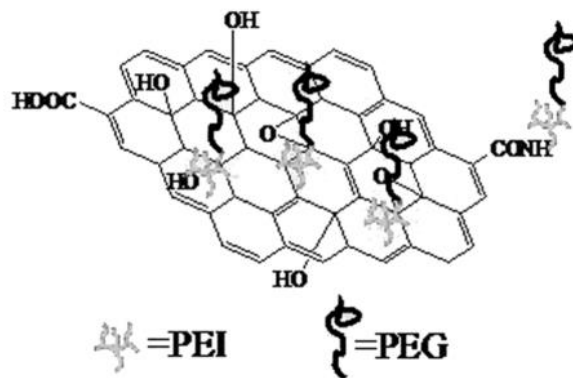


Figura 4.15 Estrutura do GO-PEI-PEG. Adaptado de (77).

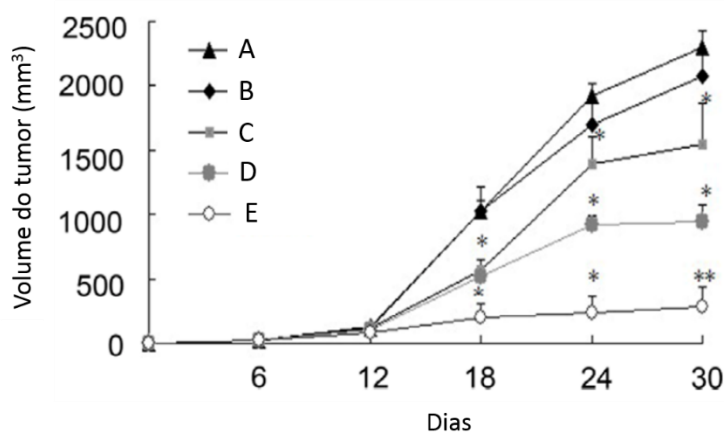


Figura 4.16 Variação do volume do tumor nos ratinhos tratados com PBS (A), GO-PEI-PEG (B), GO-PEI-PEG e radiação de infravermelho simultânea (C), si-controlo transportado por GO-PEI-PEG e radiação infravermelha (D) e si-Stat3 transportado por GO-PEI-PEG e irradiação de infravermelho simultânea (E). Adaptado de (75).

Posteriormente, Yin *et al.* (2016) sintetizaram e utilizaram novamente o GO-PEI-PEG para entregar um siRNA Stat3 baseado em plasmídeo para o silenciamento genético efetivo de células B16 de melanoma maligno, na esperança de construir um sistema de administração de genes baseado em GO para estudos futuros intensivos *in vivo* na clínica da terapia do cancro. Desta forma, os resultados experimentais revelaram que os nanovetores baseados em GO para a libertação do plasmídeo si-Stat3 silenciaram especificamente a expressão de Stat3 nas células B16 de forma eficaz, sugerindo que a formação de complexos GO-PEI-PEG poderia ser utilizado como um nanovetor génico eficiente na terapia do cancro. Assim, os níveis de expressão de proteínas relacionadas com Stat3, Bcl-2, c-Myc e VEGF nas células B16 foram marcadamente diminuídos. Pelo que uma possível explicação para este fenómeno é que o silenciamento do gene Stat3 levou à inibição de fatores antiapoptóticos como Bcl-2 e VEGF e também de fatores relacionados com o ciclo celular, como c-Myc (77). Nos últimos anos, verificou-se que a terapia genética possui um enorme potencial para uma vasta gama de aplicações biomédicas, incluindo o tratamento de doenças genéticas tais como o cancro e a imunodeficiência severa. Em suma, o GO-PEI-PEG mostrou ser um sistema de transporte de genes eficaz e seguro, com propriedades favoráveis tais como elevada estabilidade em soluções fisiológicas e citotoxicidade reduzida em células (75). Assim, estes siRNA Stat3 baseados em plasmídeos administrados por complexos funcionais de GO deverão ser aplicados na terapia clínica do melanoma no futuro (77).

4.6.6. Vetorização para c-Myc

O c-Myc é um fator de transcrição e a sua sobre expressão foi encontrada em mais de metade dos cancros humanos. No melanoma, a expressão e a ativação de c-Myc são também essenciais para a proliferação de células cancerígenas. A sobre expressão de c-Myc durante a progressão do melanoma suprime continuamente a senescência induzida por oncogenes nas células. A regulação negativa da proteína c-Myc induz apoptose em células de melanoma e sensibiliza as células tumorais para fármacos anticancerígenos (73,74).

Os recetores sigma são proteínas ligadas à membrana e são sobre expressas em muitos tumores humanos, incluindo o melanoma (63). Desta forma, Chen *et al.* (2010) desenvolveram uma formulação de nanopartículas contendo cloreto de amónio aminoetil N,N-diestearil-N-metil-N-2-(N'-arginil) DSAA e vetorizadas com anisamida, uma molécula que possui alta afinidade para os recetores sigma, de forma a entregar especificamente siRNA contra o

oncogene c-Myc no citoplasma de células B16F10 de melanoma de ratinho, que expressam o recetor sigma 1. Os resultados indicam que as nanopartículas mostraram uma inibição significativa no crescimento do tumor, como se pode verificar na figura 4.16, e o transporte foi significativamente aumentado pela presença do ligando de vetorização. Assim, a formulação suprimiu eficazmente a expressão de c-Myc no tumor e induziu elevada apoptose (74).

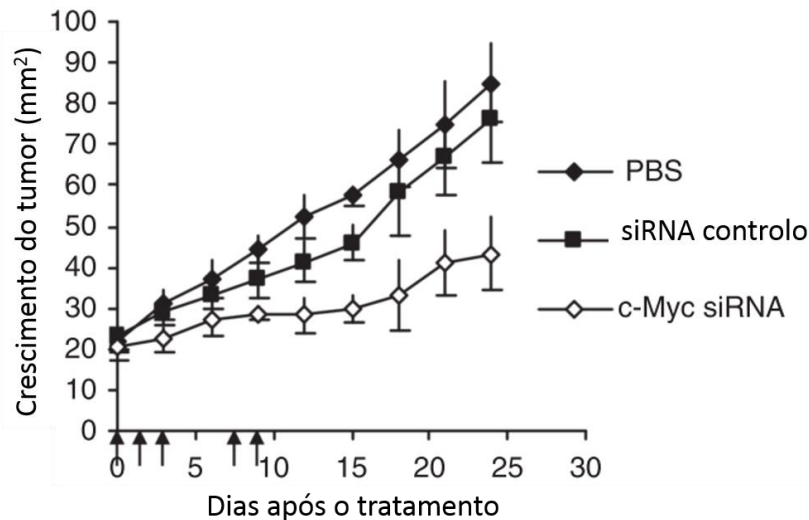


Figura 4.17 Comparação da eficácia terapêutica de c-Myc e do controlo com siRNA nas nanopartículas vetorizadas. Adaptado de (74).

A atividade antimelanoma aumentada está provavelmente relacionada com o facto de o DSAA, induzir espécies reativas de oxigénio (ROS) e desencadear apoptose em células de melanoma B16F10. As ROS têm funções importantes que afetam o crescimento celular, morte, desenvolvimento e sobrevivência. Deste modo, a formulação mostra uma grande promessa como um agente terapêutico eficaz para melanoma (74).

4.7. Nanossistemas sensíveis a estímulos

O sistema de entrega do fármaco pode ser formulado de forma a melhorar a carga útil, como a administração de pró-fármacos com enzimas ativadoras e a libertação do fármaco propriamente dito sendo desencadeada pelo microambiente do tumor ou através de estímulos aplicados, como campos eletromagnéticos, ultrassons, luz ou radiofrequências.

Essas técnicas são especialmente úteis para melhorar a liberação de fármacos baseados em sistemas nanométricos, uma vez que a ineficiência na fuga aos endossomas pode ser problemática na nano-entrega do fármaco (48).

A capacidade de resposta a estímulos é atualmente uma das abordagens mais impressionantes e promissoras para a terapia alvo do cancro. A entrega de fármacos sensíveis a estímulos é uma forma popular de vetorização ativa com a capacidade de entregar a carga no local desejado e no tempo requerido. As propriedades fisiopatológicas características dos tumores, como um microambiente extracelular mais ácido e uma maior sensibilidade à hipertermia, podem atuar como "estímulos intrínsecos". Da mesma forma, alguns estímulos podem ser induzidos no local do tumor, como por meio da aplicação de campos magnéticos, espectroscopia de infravermelho próximo (NIR), ou ultrassons para provocar a entrega local da carga, e são chamados de "estímulos extrínsecos". Após a exposição a estímulos extrínsecos e/ou intrínsecos, os nanossistemas sensíveis ao estímulo sofrem alterações físicas e químicas que atuam como desencadeantes para a liberação da carga associada (26).

Sensibilidade ao pH

O microambiente extracelular dos tumores é ligeiramente ácido (pH ~6.5-7.2) em comparação com os tecidos saudáveis (pH ~7.4) devido ao metabolismo ativo e glicólise anormal das células tumorais. Desta forma, a sensibilidade ao pH é uma estratégia comumente utilizada para conseguir uma administração e liberação controlada do fármaco. As alterações conformacionais e/ou de solubilidade dos nanossistemas com grupos ionizáveis em resposta à variação de pH e a clivagem de ligações sensíveis a ácidos à sua superfície são duas estratégias principais para a liberação do fármaco desencadeada pelo pH. A eficiência da entrega e o efeito terapêutico de uma variedade de sistemas sensíveis ao pH foram investigados em modelos animais de melanoma. Por exemplo, micelas sensíveis a ácido com agentes anticancerígenos (por exemplo a DOX) demonstraram ser suscetíveis a hidrólise sensível ao pH sob microambientes tumorais e apresentaram maior citotoxicidade e melhor atividade antitumoral num modelo de rato de melanoma em comparação com micelas insensíveis ao ácido e a fármacos livres (26,48).

Sensibilidade à temperatura

Idealmente, os nanossistemas termo-sensíveis permanecem estáveis à temperatura corporal ($\sim 37^{\circ}\text{C}$), e libertam rapidamente o fármaco dentro dos tecidos tumorais sob uma hipertermia local ($\sim 40\text{-}42^{\circ}\text{C}$) para evitar que as suas cargas úteis passem por uma rápida eliminação da circulação. Quando exposto a campos magnéticos alternados ou a aquecimento com campos de radiofrequência de ondas curtas, o calor produzido a partir da energia eletromagnética aplicada pode eliminar células de melanoma diretamente ou através da libertação do fármaco desencadeado pelo calor a partir de nanossistemas com resposta térmica (26). Assim, a terapia de hipertermia explora o calor exógeno para eliminar as células tumorais, que tendem a ser mais sensíveis a aumentos de temperatura do que as células saudáveis. A termoablação fornece uma estratégia livre de fármacos para destruir células cancerígenas, proporcionando opções de tratamento melhoradas para doentes com melanoma e resistência a múltiplos fármacos, cujos tumores poderiam ter adquirido mecanismos para resistir aos efeitos de uma variedade de tipos de fármacos com diversas propriedades estruturais (48). Neste contexto, uma estratégia promissora foi desenvolvida por Lu *et al.* (2009), na qual a ablação fototérmica *in vivo* obtida através de nanoesferas de ouro irradiadas por infravermelho com um análogo da hormona estimulante de alfa-melanócito, um potente agonista do MC1R sobre expresso em melanoma, induziram destruição seletiva de células de melanoma B16 (84).

Por outro lado, num estudo realizado por Balivada *et al.* (2010) foram utilizadas nanopartículas de Fe/Fe₃O₄ revestidas com porfirina, administradas tanto por via intratumoral como IV, em ratinhos com tumores de melanoma B16, pelo que se verificou uma diminuição substancial no volume do tumor por termoablação sob exposição a um campo magnético alternado. De facto, esta abordagem fornece um efeito hipertérmico local no tumor, resultando em apoptose das células de melanoma e, desse modo, desencadeia a regressão tumoral (85).

Sensibilidade à luz

A terapia fotodinâmica é agora considerada como uma das estratégias mais promissoras para o tratamento de cancro da pele por ser menos invasiva do que a cirurgia, sem efeitos secundários a longo prazo e devido à possibilidade de controlo espacial e remoto preciso. Os nanossistemas sensíveis à luz podem ser projetados combinando substâncias opticamente

ativas (por exemplo, corantes funcionais, metais e materiais fotossensíveis). Estes são capazes de alterar a energia da luz para o calor (fototérmico) e desta forma libertar os fármacos quando irradiados por luz UV, visível ou NIR. Para tumores grandes e profundos, esses fotossensibilizadores de luz visível são menos efetivos, enquanto a luz NIR pode proporcionar maiores profundidades de penetração do que a luz visível (26).

Sensibilidade aos ultrassons

A sensibilidade ao ultrassom representa um método atraente e eficaz para a libertação de fármacos, devido aos efeitos secundários menos prejudiciais relativamente aos tecidos normais circundantes e à ausência de radiação ionizante. Além disso, a profundidade de penetração é de fácil regulação pela modulação da frequência do ultrassom, energia e tempo de exposição. A energia acústica absorvida pelos tecidos pode produzir um efeito térmico, que desencadeia a libertação de fármacos (26). A exposição ao ultrassom demonstrou também estimular a entrega intracelular de fármacos por nanopartículas em células de melanoma, com implicações claras para a farmacodinâmica da libertação de fármacos nas nanopartículas num ambiente clínico (48).

A administração tópica na pele leva à captação confinada nas camadas epidérmicas superiores sem penetração total da pele. Isto é devido, em parte, à estrutura da pele, com a epiderme e a derme protegidas por uma camada superficial queratinizada, que impede que a maioria dos agentes aplicados topicamente chegue a lesões melanocíticas precoces que se desenvolvem na junção epidérmica ou de chegar localmente a metástases invasivas de melanoma cutâneo localmente na derme da pele. Assim, uma estratégia promissora para o transporte através da camada queratinizada é o uso de ultrassom de baixa frequência para permeabilizar a pele, permitindo a passagem de macromoléculas, sem danos significativos na pele. A combinação das qualidades protetoras dos nanossistemas com a capacidade permeabilizante do ultrassom de baixa frequência é uma estratégia para o transporte de fármacos em lesões melanocíticas presentes na pele para prevenir ou tratar o melanoma cutâneo (78).

Por fim, apesar de ser obtido um controlo espacial e temporal muito melhor sobre a libertação de fármacos, em comparação com os sistemas de entrega convencionais, os sistemas responsivos ao estímulo não estão completamente desprovidos de efeitos

secundários. Por exemplo, um pH mais baixo pode também estar presente *in vivo* em alguns órgãos e tecidos normais, bem como em locais inflamatórios. Como resultado, a extensão da sensibilidade ao estímulo dos nanossistemas desenvolvidos precisa de ser cuidadosamente considerada. Além disso, a procura de nanossistemas cada vez mais complexos de resposta a estímulos geralmente ignora os perfis de segurança (por exemplo, a utilização de biomateriais com excelente multifuncionalidade, mas com baixa biocompatibilidade/biodisponibilidade para modificação), o que irá dificultar o desenvolvimento de um nanossistema mais seguro (26).

4.8. A nanotecnologia na terapia combinada no melanoma

Como o melanoma é altamente heterogêneo, um único agente anticancerígeno não é suficiente para levar à sua cura, geralmente devido ao desenvolvimento de resistência tumoral. A terapia de combinação foi assim explorada para aumentar ainda mais a eficácia do tratamento de fármacos nano-fornecidos (3,26,82).

De facto, a nanomedicina prometeu revolucionar o tratamento de doentes com cancro no futuro. Várias nanopartículas estão em fase de desenvolvimento e em testes para a imagiologia de tumores e entrega de fármacos vetorizados para o melanoma (48).

As terapias combinadas podem fornecer resultados positivos *in vitro* que nem sempre são reproduzidos em ensaios clínicos. O principal motivo dessa inconsistência está relacionado com as diferentes propriedades farmacocinéticas dos fármacos combinados, que podem ter diferentes vias metabólicas específicas nos doentes. Esta situação torna muito difícil a conceção da correta formulação, dosagem e via de administração de tais terapias (48).

Uma das principais razões para o insucesso de muitas terapias combinadas em ensaios clínicos prende-se com as diferentes vias metabólicas dos fármacos. Assim, a encapsulação num nanossistema evita esse obstáculo ao proteger as substâncias de serem metabolizadas até atingirem o seu alvo. Diferentes nanoformulações foram utilizadas para fornecer simultaneamente combinações de diversos fármacos, geralmente com melhores efeitos terapêuticos do que as terapias combinadas convencionais para o tratamento de tumores multirresistentes (48).

A interação entre dois fármacos depende da relação de dose entre eles e pode ser sinérgica ou potencialmente antagonista. Portanto, a importância de manter a relação

terapêutica sinérgica ao longo da nanoformulação não pode ser ignorada. O processo de coencapsular dois fármacos em um único nanossistema revela-se difícil se os fármacos diferirem consideravelmente nas suas propriedades físico-químicas. Assim, são desejadas formulações, capazes de encapsular e entregar múltiplos fármacos com propriedades físico-químicas diversas, mantendo a relação sinérgica controlada (63).

A vantagem da terapia de combinação através de nanossistemas em relação à terapia de combinação convencional reside na sua capacidade de aumentar a entrega no local do tumor de forma a reduzir toxicidades inespecíficas e limitantes de dose para os tecidos saudáveis, enquanto contornam muitos mecanismos de resistência para superar a resistência a múltiplos fármacos (26).

Relativamente à terapia combinada com siRNA, a capacidade de um único transportador entregar diversos subtipos de ácido nucleico com toxicidade associada mínima pode potencialmente expandir a sua aplicação de forma a abranger aplicações terapêuticas de genes a longo prazo, bem como aplicações de tratamento de curto prazo (26,73). Neste contexto, Beloor *et al.* (2012) demonstraram a eficácia de uma estratégia combinada, utilizando nanopartículas que co-transportam siRNAs visando os três genes Bcl-2, VEGF e c-Myc, envolvidos em vias distintas da progressão do cancro, como abordado anteriormente. A formulação foi testada como uma plataforma de entrega tanto *in vitro* como *in vivo* em tumores sólidos após a sua administração sistémica num modelo de melanoma de ratinho. A administração IV resultou numa acumulação preferencial e melhorada das nanopartículas no tecido tumoral. A expressão genética para todas as três proteínas foi marcadamente diminuída e observou-se regressão tumoral significativa de 35-50%, tanto em termos de área tumoral e peso do tumor estabelecido em comparação com os ratos de controlo não tratados (73).

A terapêutica anticancerígena convencional pode resultar no efeito de resistência a fármacos após a administração a longo prazo. Essa resistência constitui uma barreira para um melhor tratamento do cancro, logo, para evitar o seu surgimento, é racional projetar uma modalidade de tratamento onde a terapia multidimensional é possível (50,86).

O conhecimento atual sugere que os regimes anticancerígenos-imunoterapêuticos combinados podem ter um grande potencial para melhorar o resultado clínico de doentes com cancro. Assim, está estabelecido que o crescimento do tumor suprime a resposta imune anticancerígena no seu microambiente local para facilitar o seu crescimento. A imunoterapia

estimula o sistema imune e, portanto, ajuda a induzir uma resposta antitumoral efetiva. Deste modo, a tolerância imune e a regulação induzida por células tumorais podem ser manipuladas por terapêuticas anticancerígenas para gerar uma ativação imune mais potente com imunoterapia quando é utilizada a abordagem anticancerígena-imunoterapêutica combinada. Desta forma, a imunoterapia com terapia anticancerígena é uma estratégia de tratamento emergente. Embora a anticancerígena-imunoterapia combinada seja conhecida por ser melhor do que terapêutica anticancerígena ou imunoterapia isoladas para o tratamento de cancro, foram feitas poucas tentativas para o desenvolvimento de um conjugado com atividade combinada anticancerígena-imunoterapêutica. Por exemplo, Roy *et al.* (2011) incorporaram um lipossacarídeo imunoestimulante e PTX na mesma nanopartícula para formar um conjugado anticancerígeno-imunoterapêutico e avaliaram a sua atividade anticancerígena, após a administração IV, num modelo de tumor de ratinho. A atividade antitumoral *in vivo* foi significativamente maior e uma maior percentagem de células imunes ativadas foi encontrada no microambiente tumoral dos ratinhos tratados com o conjugado em comparação com o grupo tratado com a formulação comercial da solução de PTX (Taxol®). Cerca de 80% dos ratinhos portadores de tumor tratados com a formulação sobreviveram 30 dias após o tratamento, enquanto apenas 50% dos ratinhos tratados com PTX sobreviveram esse tempo. Em geral, estes resultados sugerem o desenvolvimento de um novo composto anticancerígeno-imunoterapêutico com o potencial de abrir novos caminhos para a terapia do cancro no futuro próximo (86).

Embora promissor, o desenvolvimento de nanoterapias combinadas tem os seus próprios desafios. A caracterização físico-química da combinação de cargas úteis pela determinação da capacidade de carga ótima dos nanossistemas no contexto da relação sinérgica é o primeiro aspeto que precisa de ser considerado. Além disso, os componentes terapêuticos combinados não devem ter interações farmacocinéticas e devem ser bem tolerados nas razões e concentrações utilizadas. Do mesmo modo, a sequência errada da libertação do fármaco poderia reduzir o efeito sinérgico dos fármacos terapêuticos co-encapsulados. Apesar das dificuldades, os avanços na compreensão do sinergismo dos fármacos e a evolução da nanotecnologia podem permitir o desenvolvimento de nanossistemas combinados robustos com uma eficácia terapêutica melhorada e um potencial reduzido para problemas de toxicidade não desejadas e desconhecidas (3,26).

4.9. A nanomedicina nos ensaios clínicos no melanoma

Uma grande variedade de nanomedicinas baseadas em proteínas, bioconjugados de polímeros, micelas, lipossomas e muitos outros tipos de nanomateriais foram investigados nos doentes com melanoma metastático, incluindo o nab-paclitaxel, Taxoprexina (ácido docosahexaenóico-PTX), Marqibo® (sulfato de vincristina lipossomal), Caelyx®, ADI-PEG-20 (arginina desiminase peguilado), PegIntron (interferão alfa-2b recombinante com monometoxiPEG) (26,87,88). No entanto, a maioria dos ensaios clínicos centrou-se em produtos comercializados, como o Caelyx® ou o nab-paclitaxel, referidos anteriormente na secção 4.3.1, quer investigando novas indicações ou testando terapias em combinação com outros agentes anticancerígenos (26).

Primeiramente, é importante clarificar que a angiogénese pode ser um alvo importante no melanoma, dado o seu papel na progressão do melanoma e na metástase. O VEGF é sobre expresso em melanomas metastáticos e pode contribuir para a progressão da doença, como referido na secção 4.6.4. O bevacizumab (Avastin) é um anticorpo monoclonal que visa incidir no VEGF humano, ligando-se a ele e inibindo o seu efeito. Como resultado, as células cancerígenas não conseguem estimular a angiogénese e são privadas de oxigénio e de nutrientes, impedindo o crescimento dos tumores. Os ensaios com bevacizumab em monoterapia no melanoma foram limitados, mas foram observados resultados promissores em doentes com melanoma metastático. O bevacizumab não é diretamente citotóxico, portanto, combiná-lo com um agente citotóxico pode melhorar a sua eficácia antitumoral (89,90). Desta forma, Spitler *et al.* (2015) realizaram um ensaio de fase II de forma a investigar a eficácia e segurança da combinação de nab-paclitaxel (150 mg/m²) por via IV administrado semanalmente durante 3 semanas e bevacizumab (10 mg/kg) IV a cada 2 semanas como terapia de primeira linha em cinquenta doentes com melanoma metastático não ressecável. Neste estudo, a combinação demonstrou atividade significativa e foi bem tolerada, com notável melhoria na taxa de resposta. A taxa de PFS aos 4 meses foi de 75%. O PFS médio foi de 7,6 meses e a sobrevida média global foi de 16,8 meses. A taxa de sobrevivência global foi de 64% no 1 ano e 30% até aos 2 anos seguintes. Assim e de acordo com este estudo, o tratamento com esta combinação pode desempenhar um papel no tratamento de doentes com doença rapidamente progressiva cujos tumores não possuam a mutação BRAF ou em doentes cuja doença progrida na terapêutica com um inibidor de BRAF (90).

Com base na utilidade promissora do nab-paclitaxel, como abordado anteriormente, no melanoma metastático, um estudo de fase III desenvolvido por Hersh *et al.* (2015) comparou a eficácia e a segurança do nab-paclitaxel (150 mg/m²) administrado via IV nos dias 1, 8 e 15 a cada 4 semanas com a DTIC (1000 mg/m²) administrada a cada 3 semanas em doentes com melanoma metastático sem tratamento prévio com terapêuticas anticancerígenas. Desta forma, verificou-se uma PFS de 4,8 meses e de 2,5 meses, com nab-paclitaxel e a DTIC, respetivamente. Por outro lado, a sobrevida global média foi de 12,6 meses com nab-paclitaxel e de 10,5 meses com a DTIC, como se pode verificar na figura 4.18. Os eventos adversos mais comuns relacionados com o tratamento foram neuropatia e neutropenia. Assim, em comparação com a DTIC, o nab-paclitaxel reduziu em mais de 20% o risco de progressão da doença ou morte, pelo que o tratamento com este fármaco demonstrou um benefício clínico superior à DTIC com um perfil de segurança controlável (91).

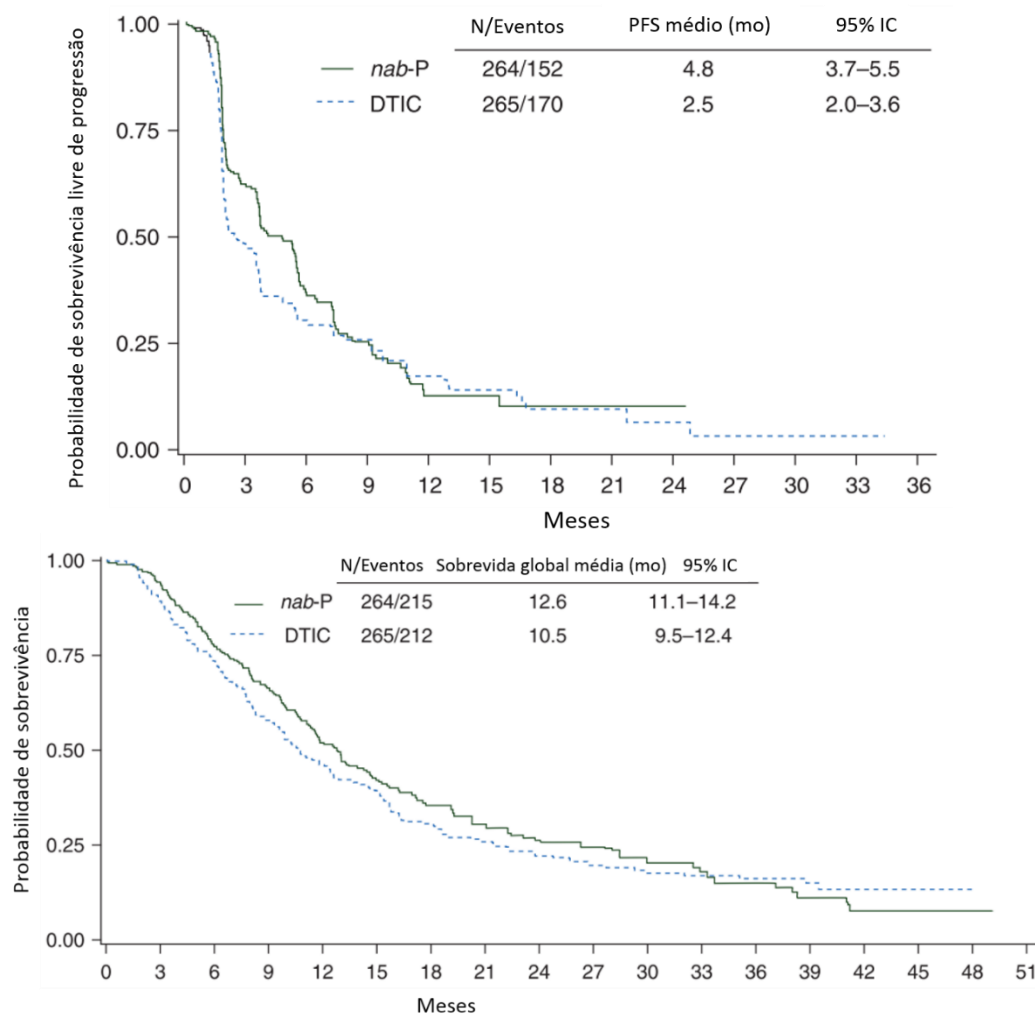


Figura 4.18 Probabilidade de sobrevivência livre de progressão e de sobrevivência na população tratada. Adaptado de (91).

Por outro lado, o Caelyx[®] é uma formulação que contém cloridrato de DOX contido em lipossomas peguizados. Desta forma, podem evitar a captação pelo RES e permanecer indetetáveis pelo sistema imunológico. Como resultado, esta formulação tem um longo tempo de circulação, e os lipossomas eventualmente extravasam através dos vasos anormalmente permeáveis característicos de muitos tumores e acumulam-se no tecido tumoral. Uma vez concentrado nos tumores, há a desagregação dos lipossomas e a entrega de altas concentrações de DOX ao tumor (92,93). Nos últimos anos, o Caelyx[®] emergiu como um novo medicamento importante para o tratamento de uma ampla gama de cânceros, pelo que tem sido utilizado a nível experimental na terapêutica do melanoma (94). Neste contexto, num ensaio clínico de fase II, Fink *et al.* (2004) avaliaram a eficácia de Caelyx[®] em 30 doentes com melanoma metastático tratados anteriormente com terapias antineoplásicas. O Caelyx[®] foi administrado numa dose de 50 mg/m² por via IV nos dias 1, 22, 43 e 64, seguido de uma terapia de manutenção com 40 mg/m² a partir do dia 85 num intervalo de 4 semanas. O Caelyx[®] como monoterapia é bem tolerado, mas de eficácia clínica limitada. O tempo médio de sobrevivência foi de 214 dias (94). Por outro lado, também Smylie *et al.* (2007) reportaram num estudo de fase II a eficácia e tolerabilidade de Caelyx[®] administrado via IV numa dose de 20 mg/m² a cada 2 semanas, em doentes com melanoma maligno avançado não tratados previamente com terapias antineoplásicas (92). No entanto, estes dois estudos de fase II confirmam a falta de atividade clínica do Caelyx[®] como monoterapia nos doentes avaliados com melanoma maligno avançado, pelo que os ensaios foram interrompidos (92,94).

Assim, embora o nab-paclitaxel tenha provado ser benéfico, nem todas as nanomedicinas anticancerígenas são eficazes para doentes com melanoma maligno (3,92,94).

5. Conclusão

Embora alguns progressos tenham sido alcançados no uso da nanomedicina para o tratamento do melanoma metastático, a doença continua a ser incurável.

Os novos fármacos contra o melanoma, que visam alterações moleculares específicas ou características imunológicas, provaram ser muito superiores à terapêutica anticancerígena convencional, porém a sua maior toxicidade e o aparecimento de resistências são as principais limitações para o seu uso. Portanto, é necessário desenvolver estratégias terapêuticas que possam aumentar a eficácia do fármaco, superar a resistência e reduzir os efeitos secundários, de forma a lidar efetivamente com a doença após a sua disseminação metastática.

Até ao momento, relativamente poucos nanossistemas anticancerígenos para a terapêutica do melanoma entraram no mercado, embora os nanossistemas tenham demonstrado um potencial experimental promissor. A discrepância entre a grande quantidade de pesquisas experimentais dedicadas aos nanossistemas na terapia do melanoma e a quantidade de nanomedicinas antimelanoma comercializadas, poderá ser, em primeiro lugar, devido à limitada translação de muitos dados pré-clínicos promissores para os seres humanos. Por exemplo, o efeito EPR é muito mais heterogêneo em doentes com melanoma humano do que o observado nos modelos de animais com melanoma devido à maior heterogeneidade na permeabilidade vascular tumoral e no fluxo sanguíneo. Entretanto, a falta de padronização de estudos pré-clínicos muitas vezes dificulta a comparação desses resultados entre diferentes grupos experimentais. Além disso, a questão de os nanossistemas vetorizados serem mais eficientes na administração de fármacos do que os nanossistemas não vetorizados, ainda está em debate, visto que o ligando ou anticorpo por si só não consegue vetorizar o nanossistema para o tumor alvo, apesar da maior probabilidade em se ligar e ser internalizado pelas células tumorais. Por outro lado, a inconsistência geral de lote para lote e a complexidade do processo de concepção e síntese dos nanossistemas também prejudica a sua produção industrial em escala comercial. Do mesmo modo, a plasticidade fenotípica dos tumores de melanoma resultantes da interação de alterações genéticas, epigenéticas e fatores ambientais traz grandes desafios para a criação de um nanossistema "de tamanho único" que seja aplicável a todos os diferentes subgrupos de melanoma. Além disso, a diversidade do melanoma também pode influenciar a quantidade, densidade e agrupamento dos recetores que são sobre expressos em células de melanoma. Assim, a diferente expressão

do recetor entre indivíduos ou em estadios de melanoma distintos pode explicar o motivo de um efeito "fora do alvo" ainda poder ocorrer apesar do uso de ligandos de alta afinidade que se ligam a esses recetores.

Em conclusão, é necessário uma compreensão aprofundada sobre a interação das mutações genéticas e imunobiológicas envolvidas na melanomagénes. Como aproveitar ao máximo o efeito EPR e aumentá-lo, e como combinar a nanotecnologia com o progresso clínico recentemente destacado no melanoma são os problemas mais urgentes que precisam ser resolvidos.

No âmbito histórico da pesquisa farmacêutica, o campo da nanotecnologia e a sua aplicação na medicina ainda está no seu início. Assim, prevê-se que no futuro os obstáculos à comercialização das nanomedicinas sejam entretanto ultrapassados.

6. Referências bibliográficas

1. Pizzimenti S, Dianzani C, Zara GP, Ferretti C, Rossi F, Gigliotti CL, et al. Challenges and Opportunities of Nanoparticle-Based Theranostics in Skin Cancer. In: Hamblin M, Avci P, Prow T, editors. *Nanoscience in Dermatology*. 2016. p. 177–85.
2. Amaro J. Melanoma maligno da pele epidemiologia. In: Silva M, editor. *Melanoma 2013*. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 25–9.
3. Chen J, Zhang XD. Nanodelivery of Anticancer Agents in Melanoma: Encouraging, But a Long Way to Go. In: Hamblin M, Avci P, Prow T, editors. *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier; 2016. p. 189–98.
4. Simões MCF, Sousa JJS, Pais AACC. Skin cancer and new treatment perspectives: A review. *Cancer Lett*. 2014;357(1):10.
5. Bei D, Meng J, Youan B-BC. Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: progress and promises. *Nanomedicine*. 2010;5(9):1385–99.
6. American Cancer Society. Key Statistics for Melanoma Skin Cancer [Internet]. 2017 [cited 2017 Mar 1]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/about/key-statistics.html>
7. Pautu V, Leonetti D, Lepeltier E, Clere N, Passirani C. Nanomedicine as a potent strategy in melanoma tumor microenvironment. *Pharmacol Res*. 2017;1–23.
8. Wadajkar AS, Bhavsar Z, Ko CY, Koppolu B, Cui W, Tang L, et al. Multifunctional particles for melanoma-targeted drug delivery. *Acta Biomater*. 2012;8(8):2996–3004.
9. Brys AK, Gowda R, Loriaux DB, Robertson GP, Mosca PJ. Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. *Biotechnol Adv*. 2016;34(5):565–77.
10. Brose MS, Volpe P, Feldman M, Kumar M, Rishi I, Gerrero R, et al. BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res*. 2002;62(23):6997–7000.
11. 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.
12. Augusto J, Barroso S. Melanoma- terapêutica adjuvante. In: Silva M, editor. *Melanoma 2013*. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 209–22.
13. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. *Eur J Cancer*. 2016;63:201–17.
14. Registo Oncológico Regional do Norte. Registo Oncológico Nacional 2010. 2016;16–31. Available from: <http://www.roreno.com.pt/pt/publicacoes/publicacoes-nacionais.html>
15. Moura C, Fragoso S. Risco familiar de melanoma. In: Silva M, editor. *Melanoma 2013*. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 67–74.
16. Vilares M. Melanoma maligno. In: Silva M, editor. *Melanoma 2013*. 1st ed. Estoril:

- Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 142–50.
17. Inamdar GS, Madhunapantula S V., Robertson GP. Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochem Pharmacol.* 2010;80(5):624–37.
 18. Cheung M, Sharma A, Madhunapantula S V., Robertson GP. Akt3 and mutant V600E-Braf cooperate to promote early melanoma development. *Cancer Res.* 2008;68(9):3429–39.
 19. Meier F, Busch S, Lasithiotakis K, Kulms D, Garbe C, Maczey E, et al. Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment. *Br J Dermatol.* 2007;156(6):1204–13.
 20. Cortes P, Amaral T, Sousa R. Melanoma maligno avaliação comparativa de guidelines internacionais. In: Manuel José Guedes da Silva, editor. *Melanoma 2013*. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 310–24.
 21. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015;26:v126–32.
 22. World Health Organization. International Classification of Diseases for Oncology - Melanoma [Internet]. 2011 [cited 2017 Jul 30]. Available from: <http://codes.iarc.fr/code/3236>
 23. Martins C. Melanoma classificação clínica. In: Silva M, editor. *Melanoma 2013*. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 53–8.
 24. Schadendorf D, Kochs C, Livingstone E. *Handbook of Cutaneous Melanoma*. 1st ed. 2013. 13-26 p.
 25. Agarwala SS. Intralesional therapy for advanced melanoma: promise and limitation. *Curr Opin Oncol.* 2015;27(2):151–6.
 26. Li J, Zhang Y, Tao J. Targeted Nanoparticles for Drug Delivery to Melanoma: From Bench to Bedside. In: Hamblin M, Avci P, Prow T, editors. *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier; 2016. p. 203–13.
 27. Chen J, Shao R, Zhang X, Chen C. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. *Int J Nanomedicine.* 2013;2677–88.
 28. European Medicines Agency. Tafinlar. 2017;1–3. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500149741.
 29. European Medicines Agency. Zelboraf. 2012;1–3. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500124383
 30. European Medicines Agency. Mekinist. 2017;1–3. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500169939

31. European Medicines Agency. Cotellic. 2015;1–3. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003960/WC500198615.pdf
32. Pópulo H, Soares P, Lopes J. Vias de sinalização e novas perspectivas terapêuticas em melanoma cutâneo. In: Silva M, editor. Melanoma 2013. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 292–302.
33. Santos B, McGuire T, Martins A. Imunoterapia do melanoma metastático. In: Silva M, editor. Melanoma 2013. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 226–242.
34. Jesus E. Imunoterapia e melanoma avançado. In: Silva M, editor. Melanoma 2013. 1st ed. Estoril: Intergrupo Português de Melanoma; 2014. p. 245–259.
35. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015;372(21):2006–17.
36. European Medicines Agency. Yervoy. 2011;1–3. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002213/WC500109303.pdf
37. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow M a, Rizvi N a, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013;369(2):122–33.
38. European Medicines Agency. Opdivo. 2017;1–5. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003985/WC500189768.pdf
39. European Medicines Agency. Keytruda. 2017;1–4. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/003820/WC500190993.pdf
40. AIM at Melanoma Foundation. FDA Approved Drugs for Melanoma [Internet]. 2014 [cited 2017 Jul 30]. Available from: <https://www.aimatmelanoma.org/melanoma-treatment-options/fda-approved-drugs-for-melanoma/>
41. European Medicines Agency. Imlygic (talimogene laherparepvec). 2015;1–3. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/002771/WC500201080.pdf
42. American Cancer Society. Chemotherapy for Melanoma Skin Cancer [Internet]. 2016 [cited 2017 Jul 30]. Available from: <https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/treating/chemotherapy.html>
43. European Medicines Agency. Dacarbazine Faulding [Internet]. 2002 [cited 2017 Jul 30]. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/referrals/Dacarbazine_Faulding/human_referral_000093.jsp&mid=WC0b01ac0580024e9a
44. Kottschade LA, Suman VJ, Amatruda T, McWilliams RR, Mattar BI, Nikcevich DA, et al. A phase II trial of nab-paclitaxel (ABI-007) and carboplatin in patients with unresectable

- stage IV melanoma. *Cancer*. 2011;117(8):1704–10.
45. Ndinguri MW, Zheleznyak A, Lauer JL, Anderson CJ, Fields GB. Application of Collagen-Model Triple-Helical Peptide-Amphiphiles for CD44-Targeted Drug Delivery Systems. *J Drug Deliv*. 2012;2012:1–13.
 46. Dianzani C, Zara GP, Maina G, Pettazzoni P, Pizzimenti S, Rossi F, et al. Drug delivery nanoparticles in skin cancers. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–13.
 47. National Nanotechnology Initiative. What It Is and How It Works [Internet]. [cited 2017 Jul 30]. Available from: <https://www.nano.gov/nanotech-101/what>
 48. Bombelli FB, Webster CA, Moncrieff M, Sherwood V. The scope of nanoparticle therapies for future metastatic melanoma treatment. *Lancet Oncol*. 2014;15(1):e22–32.
 49. Hornyak GL, A.K R. Fundamentals of Nanoscience (and Nanotechnology). In: Hamblin M, Avci P, Prow T, editors. *Nanoscience in Dermatology*. Elsevier; 2016. p. 16.
 50. Wang Z, Chui WK, Ho PC. Nanoparticulate delivery system targeted to tumor neovasculature for combined anticancer and antiangiogenesis therapy. *Pharm Res*. 2010;28(3):585–96.
 51. Zheng L, Gou M, Zhou S, Yi T, Zhong Q, Li Z, et al. Antitumor activity of monomethoxy poly(ethylene glycol)-poly (ϵ -caprolactone) micelle-encapsulated doxorubicin against mouse melanoma. *Oncol Rep*. 2011;25(6):1557–64.
 52. Severino P, Figueiro JF, Chaud M V., Cordeiro J. Advances in nanobiomaterials for topical administrations: new galenic and cosmetic formulations. In: *Nanobiomaterials in Galenic Formulations and Cosmetics*. 2016. p. 4–11.
 53. Gupta V, Trivedi P. Dermal Drug Delivery for Cutaneous Malignancies: Literature at a Glance. *J Pharm Innov*. 2016;11:1–33.
 54. Huang FY, Mei WL, Li YN, Tan GH, Dai HF, Guo JL, et al. The antitumour activities induced by pegylated liposomal cytochalasin D in murine models. *Eur J Cancer*. 2012;48(14):2260–9.
 55. Rani V. Nanomedicine and its applications. *J Chem Pharm Res*. 2015;7(7):216–27.
 56. Li J, Wang Y, Liang R, An X, Wang K, Shen G, et al. Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;11(3):769–94.
 57. Zhang W, Shi Y, Chen Y, Hao J, Sha X, Fang X. The potential of Pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models. *Biomaterials*. 2011;32(25):5934–44.
 58. European Medicines Agency. Abraxane. 2015;1–4. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000778/WC500020431.pdf
 59. Montana M, Ducros C, Terme T, Verhaeghe P, Rathelot P. Albumin-bound paclitaxel: the benefit of this new formulation in the treatment of various cancers. 2011;23(2):59–

- 66.
60. Hersh EM, O'Day SJ, Ribas A, Samlowski WE, Gordon MS, Shechter DE, et al. A phase 2 clinical trial of nab-Paclitaxel in previously treated and chemotherapy-naive patients with metastatic melanoma. *Cancer*. 2010;116(1):155–63.
61. Al-Jamal KT, Al-Jamal WT, Wang JTW, Rubio N, Buddle J, Gathercole D, et al. Cationic poly-L-Lysine dendrimer complexes doxorubicin and delays tumor growth in vitro and in vivo. *ACS Nano*. 2013;7(3):1905–17.
62. Guo S, Wang Y, Miao L, Xu Z, Lin CHM, Huang L. Turning a water and oil insoluble cisplatin derivative into a nanoparticle formulation for cancer therapy. *Biomaterials*. 2014;35(26):1–7.
63. Guo S, Lin CM, Xu Z, Miao L, Wang Y, Huang L. Co-delivery of cisplatin and rapamycin for enhanced anticancer therapy through synergistic effects and microenvironment modulation. *ACS Nano*. 2014;8(5):4996–5009.
64. Speiser DE, Schwarz K, Baumgaertner P, Manolova V, Devedre E, Sterry W, et al. Memory and effector CD8 T-cell responses after nanoparticle vaccination of melanoma patients. *J Immunother*. 2010;33(8):848–58.
65. Xu Z, Wang Y, Zhang L, Huang L. Nanoparticle-delivered transforming growth factor-B siRNA enhances vaccination against advanced melanoma by modifying tumor microenvironment. *ACS Nano*. 2014;8(4):3636–45.
66. Yao H, Ng SS, Huo L-F, Chow BKC, Shen Z, Yang M, et al. Effective melanoma immunotherapy with interleukin-2 delivered by a novel polymeric nanoparticle. *Mol Cancer Ther*. 2011;10(6):1082–92.
67. Kwong B, Gai SA, Elkhader J, Wittrup KD, Darrell J. Localized immunotherapy via liposome-anchored anti-CD137 + IL-2 prevents lethal toxicity and elicits local and systemic anti-tumor immunity. *Cancer Res*. 2013;73(5):1547–58.
68. He H, Grignolc V, Karpac V, Yena C, LaPerlee K, Zhangf X, et al. Use of a nanoporous biodegradable miniature device to regulate cytokine release for cancer treatment Hongyan. *J Control Release*. 2011;151(3):1–20.
69. Tan S, Sasada T, Bershteyn A, Yang K, Ioji T, Zhang Z. Combinational delivery of lipid-enveloped polymeric nanoparticles carrying different peptides for anti-tumor immunotherapy. *Nanomedicine*. 2013;9(5):635–47.
70. Wang Y, Xu Z, Guo S, Zhang L, Sharma A, Robertson GP, et al. Intravenous delivery of siRNA targeting CD47 effectively inhibits melanoma tumor growth and lung metastasis. *Mol Ther*. 2013;21(10):1919–29.
71. Jean Bolognia, Julie V. Schaffer, Joseph L. Jorizzo. *Dermatologia*. 3rd ed. Jeffrey P callen, Lorenzo Cerroni, Warren R. Heymann, George J. Hruza, editors. Elsevier; 2015. 1910 p.
72. Basu S, Harfouche R, Soni S, Chimote G, Mashelkar RA, Sengupta S. Nanoparticle-mediated targeting of MAPK signaling predisposes tumor to chemotherapy. 2009;106(19):7957–61.
73. Beloor J, Choi CS, Nam HY, Park M, Kim SH, Jackson A, et al. Arginine-engrafted

- biodegradable polymer for the systemic delivery of therapeutic siRNA. *Biomaterials*. 2012;33(5):1640–50.
74. Chen Y, Bathula SR, Yang Q, Huang L. Targeted Nanoparticles Deliver siRNA to Melanoma. *J Invest Dermatol*. 2010;130(12):2790–8.
 75. Yin D, Li Y, Lin H, Guo B, Du Y, Li X, et al. Functional graphene oxide as a plasmid-based Stat3 siRNA carrier inhibits mouse malignant melanoma growth in vivo. *Nanotechnology*. 2013;24(10):1–12.
 76. Yang Y, Liu X, Zhang D, Yu W, Lv G, Xie H, et al. Chitosan/VEGF-siRNA nanoparticle for gene silencing. *J Control Release*. 2011;152:e160–1.
 77. Yin D, Li Y, Guo B, Liu Z, Xu Y, Wang X, et al. Plasmid-Based Stat3 siRNA Delivered by Functional Graphene Oxide Suppresses Mouse Malignant Melanoma Cell Growth. *Oncol Res*. 2016;23(5):229–36.
 78. Tran MA, Gowda R, Sharma A, Park EJ, Adair J, Kester M, et al. Targeting V600EB-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. *Cancer Res*. 2008;68(18):7638–49.
 79. Dhomen N, Reis-Filho JS, da Rocha Dias S, Hayward R, Savage K, Delmas V, et al. Oncogenic Braf Induces Melanocyte Senescence and Melanoma in Mice. *Cancer Cell*. 2009;15(4):294–303.
 80. Dhomen N, Da Rocha Dias S, Hayward R, Ogilvie L, Hedley D, Delmas V, et al. Inducible expression of V600EBraf using tyrosinase-driven Cre recombinase results in embryonic lethality. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;112–20.
 81. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, Tsoi J, Robert L, Goedert L, et al. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma. *Sci Transl Med*. 2015;7(279):1–11.
 82. Greger JG, Eastman SD, Zhang V, Bleam MR, Hughes AM, Smitheman KN, et al. Combinations of BRAF, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRAS or MEK mutations. *Mol Cancer Ther*. 2012;11(4):909–20.
 83. Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, et al. Activation of Stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res*. 2006;66(6):3188–96.
 84. Lu W, Xiong C, Zhang G, Huang Q, Zhang R, Zhang JZ, et al. Targeted photothermal ablation of murine melanomas with melanocyte-stimulating hormone analog - conjugated hollow gold nanospheres. *Clin Cancer Res*. 2009;15(3):876–86.
 85. Balivada S, Rachakatla RS, Wang H, Samarakoon TN, Dani RK, Pyle M, et al. A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron (0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study. *BMC Cancer*. 2010;1–9.
 86. Roy A, Chandra S, Mamilapally S, Upadhyay P, Bhaskar S. Anticancer and immunostimulatory activity by conjugate of paclitaxel and non-toxic derivative of Ips for combined chemo-immunotherapy. *Pharm Res*. 2011;29(8):2294–309.
 87. European Medicines Agency. PegIntron. 2012;1–4. Available from:

http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?wbContentId=WC500039431

88. European Medicines Agency. RCM - Caelyx. 2017;1–47. Available from: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170324137504/anx_137504_pt.pdf
89. European Medicines Agency. Avastin. 2017;1–4. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?wbContentId=WC500029309
90. Spitler LE, Boasberg P, O’Day S, Hamid O, Cruickshank S, Mesko S, et al. Phase II study of nab-paclitaxel and bevacizumab as first-line therapy for patients with unresectable stage III and IV melanoma. *Am J Clin Oncol*. 2015;38(1):61–7.
91. Hersh EM, Del M, Brown MP, Kefford R, Loquai C, Testori A, et al. A randomized, controlled phase III trial of nab-Paclitaxel versus dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with metastatic melanoma. *Ann Oncol*. 2015;26(11):2267–73.
92. Smylie MG, Wong R, Mihalcioiu C, Lee C, Pouliot JF. A phase II, open label, monotherapy study of liposomal doxorubicin in patients with metastatic malignant melanoma. *Invest New Drugs*. 2007;25(2):155–9.
93. European Medicines Agency. Caelyx. 2010;1–3. Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?wbContentId=WC500020197
94. Fink W, Zimpfer-Rechner C, Thoenke A, Figl R, Kaatz M, Ugurel S, et al. Clinical phase II study of pegylated liposomal doxorubicin as second-line treatment in disseminated melanoma. *Onkologie*. 2004;27(6):540–4.