



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Inês Torres Carvalhosa

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Associação da Nanotecnologia com a Terapêutica do Melanoma” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Doutora Ana Filipa Fernandes Pimenta e do Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2019

Faculdade de Farmácia
da Universidade de Coimbra

Inês Torres Carvalhosa

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Associação da Nanotecnologia com a Terapêutica do Melanoma” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Doutora Ana Filipa Fernandes Pimenta e do Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2019

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Eu, Inês Torres Carvalhosa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014212289, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Associação da Nanotecnologia com a Terapêutica do Melanoma” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 de Setembro de 2019.

Inês Torres Carvalhosa
(Inês Torres Carvalhosa)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, à minha irmã e aos meus avós, sem os quais esta etapa não estaria prestes a terminar, pelo apoio incondicional, por toda a força transmitida e por nunca deixarem de acreditar em mim e nas minhas capacidades.

Ao Professor Doutor Luís Miguel Santos Loura, por todo o apoio e disponibilidade na elaboração da monografia.

À Dr.^a Ana Filipa Fernandes Pimenta, pela oportunidade de estágio, por me ter recebido muito bem, por todos os ensinamentos transmitidos e por toda a ajuda na elaboração do relatório de estágio.

A toda a equipa da Farmácia S. Bento, nomeadamente à Dr.^a Cátia, à Dr.^a Filipa, à Dr.^a Rita, ao Sr. Paulo, ao Sr. Rui e à D. Amélia, pelos conhecimentos transmitidos, pela receção calorosa, pela disponibilidade para o esclarecimento das minhas dúvidas e pela boa disposição presente diariamente na farmácia.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por me ter proporcionado a melhor formação teórico-prática possível.

À minha família de “praxe”, da qual tenho muito orgulho, pela amizade, por todos os conselhos, pela força e motivação e por estar sempre presente nos bons e nos maus momentos.

Ao meu namorado, por todo o amor, força e motivação.

Aos meus amigos e colegas da faculdade, que me acompanham ao longo de todo este percurso académico, pela amizade e pela ajuda.

A todos que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para que tudo isto fosse possível, o meu muito obrigado!

ÍNDICE

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	5
1. Notas Introdutórias.....	6
2. A Farmácia S. Bento	6
3. Análise SWOT	7
3.1. Análise SWOT Interna.....	9
3.1.1. Pontos Fortes.....	9
3.1.1.1. Localização	9
3.1.1.2. Equipa Técnica.....	9
3.1.1.3. Serviços Prestados ao Utente	10
3.1.1.4. Valormed.....	11
3.1.1.5. Sifarma 2000®	11
3.1.1.6. Diversidade de produtos.....	12
3.1.1.7. Diversidade de tarefas realizadas.....	13
3.1.1.7.1. Realização de Encomendas.....	13
3.1.1.7.2. Receção de Encomendas.....	14
3.1.1.7.3. Arrumação dos Produtos	15
3.1.1.7.4. Organização do Espaço Físico.....	16
3.1.1.7.5. Gestão e Regularização de Devoluções.....	17
3.1.1.7.6. Controlo dos Prazos de Validade.....	18
3.1.1.7.7. Conferência do Receituário e Faturação.....	18
3.1.2. Pontos Fracos	20
3.1.2.1. Preparação de Medicamentos Manipulados	20
3.2. Análise SWOT Externa.....	20
3.2.1. Oportunidades.....	20
3.2.1.1. Participação em Formações	20

3.2.1.2. Diversidade de Utentes	21
3.2.2. Ameaças	22
3.2.2.1. Receita Manual.....	22
3.2.2.2. Conhecimento do utente relativamente aos MG.....	22
3.2.2.3. Alterações no P.V.P. dos MSRM.....	23
3.2.2.4. Medicamentos Esgotados ou Rateados.....	23
3.2.2.5. Aspeto das Embalagens	23
3.2.2.6. Problemas Informáticos	24
4. Casos Práticos.....	24
4.1. Caso Prático I – Infecções Urinárias.....	24
4.2. Caso Prático 2 – Onicomicoses.....	25
5. Conclusão.....	25
6. Referências Bibliográficas	26

Parte II - Monografia

Associação da Nanotecnologia com a Terapêutica do Melanoma

Lista de Abreviaturas	29
Resumo	30
Palavras-chave:	30
Abstract.....	31
Keywords.....	31
1. Notas Introdutórias.....	32
2. Melanoma	33
2.1. Fatores de Risco	33
2.2. Classificação	35
2.3. Diagnóstico e Estadiamento	36
2.4. Alterações moleculares associadas ao desenvolvimento do melanoma.....	37

2.4.1. Alterações na via das MAPK.....	38
2.4.1.1. Mutações no gene BRAF.....	39
2.4.1.2. Mutações no gene NRAS.....	39
2.4.2. Alterações na via da PI3K/AKT	40
3. Terapia Convencional do Melanoma.....	41
3.1. Quimioterapia.....	42
3.2. Radioterapia	43
3.3. Terapia Fotodinâmica.....	43
3.4. Terapia Dirigida.....	44
3.5. Imunoterapia	45
4. Nanotecnologia e a sua associação com a terapia anticancerígena.....	48
4.1. Vetorização dos nanossistemas.....	48
4.2. Características dos Nanossistemas.....	50
4.3. Tipos de Nanossistemas	51
4.3.1. Lipossomas.....	51
4.3.2. Dendrímeros.....	51
4.3.3. Micelas poliméricas.....	52
4.3.4. Nanopartículas.....	52
4.4. Associação da Nanotecnologia com as Terapias Convencionais do Melanoma.....	52
4.4.1. Associação da Nanotecnologia com a Quimioterapia.....	53
4.4.2. Associação da Nanotecnologia com a Terapia Dirigida	54
4.4.3. Associação da Nanotecnologia com a Imunoterapia.....	56
4.4.4. Associação da Nanotecnologia com a Terapia Fotodinâmica.....	57
5. Conclusão.....	57
6. Referências Bibliográficas	58

Parte I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas

CNP – Código Nacional do Produto

DT – Diretora Técnica

FEFO – *First Expire, First Out*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FIFO – *First In, First Out*

IVA – Imposto Sobre o Valor Acrescentado

MG – Medicamento(s) Genérico(s)

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento(s) Não Sujeito(s) a Receita Médica

MSRM – Medicamento(s) Sujeito(s) a Receita Médica

P.I.C. – Preço Inscrito na Cartonagem

P.V.A. – Preço de Venda ao Armazenista

P.V.F. – Preço de Venda à Farmácia

P.V.P. – Preço de Venda ao Público

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Notas Introdutórias

O estágio curricular, inserido na unidade curricular de “Estágio Curricular”, do plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), proporciona ao estudante, futuro farmacêutico, um primeiro contacto com a realidade do mercado de trabalho, bem como a aplicação, em contexto real, dos conhecimentos teórico-práticos adquiridos ao longo do curso. Neste sentido, e de acordo com as modalidades de estágio possíveis que são colocadas à disposição do aluno, optei por realizar o estágio exclusivamente em farmácia comunitária, com o objetivo de adquirir mais experiência nessa área.

A farmácia comunitária, sendo o primeiro local a que o cidadão normalmente se dirige, quando surge um problema de saúde ⁽¹⁾, desempenha um papel fundamental na promoção da saúde da população. Além de ser um estabelecimento onde ocorre a dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde, a farmácia é igualmente um lugar onde o farmacêutico comunitário exerce um papel importante, enquanto agente de saúde pública, na prestação de cuidados farmacêuticos à população ⁽²⁾.

O estágio decorreu na Farmácia S. Bento, em Viana do Castelo, de 7 de Janeiro a 28 de Junho de 2019, sob a orientação da Dr.^a Ana Filipa Fernandes Pimenta, tendo sido realizadas, em média, 7 horas diárias, durante os dias úteis da semana, completando assim as 810 horas de estágio obrigatórias.

O presente relatório encontra-se estruturado sob a forma de uma análise SWOT, na qual são avaliados os Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) do estágio realizado. Por último são descritos alguns casos práticos que surgiram durante o estágio na Farmácia S. Bento.

2. A Farmácia S. Bento

A Farmácia S. Bento situa-se na Avenida D. Afonso III n.º 414 – 420, no concelho e distrito de Viana do Castelo. O horário de funcionamento da farmácia é das 8:30 às 20:00, de segunda a sexta-feira e das 9:00 às 13.00, aos sábados, estando encerrada aos domingos. De 9 em 9 dias, de acordo com a escala de turnos de serviço estabelecida pela Administração Regional de Saúde do Norte, a farmácia encontra-se de serviço permanente. Nesses dias, a farmácia fica aberta até às 23:00, momento a partir do qual a porta é encerrada e o atendimento ao público realizado através de um postigo de atendimento, até às 8:30 do dia seguinte.

O espaço exterior é facilmente reconhecível através da presença de duas cruzes verdes dispostas perpendicularmente à fachada do estabelecimento. A farmácia apresenta duas montras envidraçadas que permitem a exposição de produtos e que são periodicamente atualizadas de acordo com a época sazonal, campanhas e promoções da farmácia. A entrada de utentes é feita através de uma rampa e porta automática, garantindo deste modo a acessibilidade a todo o tipo de pessoas, incluindo cidadãos com deficiências locomotoras ou com carrinhos de bebé.

O interior da farmácia apresenta instalações relativamente modernas, que garantem a acessibilidade, comodidade e privacidade dos utentes e do respetivo pessoal da farmácia, assim como a preparação, conservação e segurança dos medicamentos ⁽³⁾, sendo constituído pelas seguintes divisões: sala de atendimento ao público, local onde ocorre a dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde, com cinco postos de atendimento devidamente equipados; área de receção de encomendas que funciona simultaneamente como área de armazenamento de produtos; armazém; gabinete da direção técnica com zona de recolhimento; laboratório para preparação de medicamentos e armazenamento de produtos com *stock* excedente; gabinete de atendimento personalizado onde são efetuadas medições da pressão arterial, glicémia, colesterol total, entre outros serviços e instalações sanitárias. A farmácia dispõe ainda de mais dois gabinetes onde são realizados os serviços de nutrição e de podologia.

A equipa técnica da Farmácia S. Bento é formada por profissionais competentes, responsáveis, dedicados e com muita boa disposição. Fazem parte desta grande equipa quatro Farmacêuticas, incluindo a Diretora Técnica (DT) e Farmacêuticas Adjuntas, dois Auxiliares Técnicos de Farmácia e uma Auxiliar de Limpeza.

3. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta muito utilizada a nível empresarial, que permite avaliar a posição estratégica das empresas face à concorrência, através da identificação de quatro variáveis: Pontos Fortes (*Strengths*), Pontos Fracos (*Weaknesses*), Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) ⁽⁴⁾.

Esta análise, por sua vez, pode ser dividida em duas partes:

- Análise SWOT Interna: onde se incluem os Pontos Fortes (*Strengths*) e os Pontos Fracos (*Weaknesses*), relacionados com a própria empresa ⁽⁴⁾.
- Análise SWOT Externa: onde se incluem as Oportunidades (*Opportunities*) e as Ameaças (*Threats*), relacionadas com o meio envolvente da empresa ⁽⁴⁾.

Uma vez que se trata de uma ferramenta relativamente simples, a análise SWOT pode ser aplicada em uma grande diversidade de situações, sendo neste caso concreto utilizada para avaliar o meu estágio curricular em farmácia comunitária.

Na tabela-resumo que se segue encontram-se representados os Pontos Fortes (*Strengths*) e os Pontos Fracos (*Weaknesses*) do estágio, inerentes à farmácia e as Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*) do estágio, inerentes ao meio envolvente da farmácia.

	PONTOS FORTES	PONTOS FRACOS
ANÁLISE SWOT INTERNA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Localização ▪ Equipa Técnica ▪ Serviços Prestados ao Utente ▪ Valormed ▪ Sifarma 2000® ▪ Diversidade de produtos ▪ Diversidade de tarefas realizadas 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Preparação de Medicamentos Manipulados
	OPORTUNIDADES	AMEAÇAS
ANÁLISE SWOT EXTERNA	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Participação em Formações ▪ Diversidade de Utentes 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Receita Manual ▪ Conhecimento do utente relativamente aos MG ▪ Alterações no P.V.P. dos MSRM ▪ Medicamentos Esgotados ou Rateados ▪ Aspeto das embalagens ▪ Problemas Informáticos

3.1. Análise SWOT Interna

3.1.1. Pontos Fortes

3.1.1.1. Localização

Um dos motivos que me levou à escolha da Farmácia S. Bento como local de estágio foi a sua localização.

A farmácia situa-se a uma distância relativamente curta do centro histórico de Viana do Castelo, uma das zonas mais movimentadas da cidade, refletindo-se numa maior afluência de utentes à farmácia. Além disso, em frente à Farmácia S. Bento, existe uma estrada bastante movimentada. Constatei ao longo do estágio, que uma parte dos utentes que frequentam a farmácia são cidadãos que se deslocam de veículo, que aproveitam a vantagem da localização da farmácia para adquirir os seus produtos. Para além dos aspetos anteriormente referidos, este é um local que dispõe de estacionamento exclusivo para os utentes da farmácia.

Todos estes fatores permitiram-me contactar diariamente com uma grande diversidade de utentes e de situações adversas no atendimento.

Por outro lado, a sua localização bastante próxima ao meu local de residência e dos meus familiares, possibilitou-me aceder facilmente e rapidamente à farmácia.

3.1.1.2. Equipa Técnica

Um dos pontos fortes foi sem dúvida a equipa técnica que me acompanhou durante o estágio.

No dia em que solicitei a realização do meu estágio curricular na Farmácia S. Bento, fui muito bem recebida pela DT que desde logo se prontificou para me apresentar a farmácia e a equipa.

Nas primeiras semanas de estágio, senti-me desde cedo integrada na equipa de trabalho, o que foi fundamental para que rapidamente me sentisse à vontade de esclarecer as minhas dúvidas com toda a equipa, que sempre se mostrou disponível, em todos os momentos que precisei.

Na Farmácia S. Bento, as funções encontram-se devidamente distribuídas por toda a equipa, permitindo uma melhor organização do trabalho. Por este motivo, cada elemento desempenhou um papel essencial na minha aprendizagem, durante as várias atividades que realizei ao longo do estágio.

Quando passei para a fase do atendimento, inicialmente visualizava a equipa a fazer os mesmos e, posteriormente, comecei a ser eu própria a realizá-los, supervisionada. Nestas situações era apresentada pela equipa aos utentes o que me permitiu criar uma empatia inicial com os mesmos e conhecer alguns dos utentes habituais da Farmácia S. Bento.

Mais tarde, quando me sentia com capacidade de realizar os atendimentos sozinha, a equipa concedia-me autonomia para os fazer, o que foi fundamental para que, a cada dia, me sentisse mais confiante na realização dos mesmos.

Além dos aspetos referidos anteriormente, o bom sentido de humor e a boa disposição, presentes diariamente na farmácia, tornaram o meu estágio muito mais produtivo.

3.1.1.3. Serviços Prestados ao Utente

A Farmácia S. Bento apresenta uma diversidade de serviços à disposição do utente, nomeadamente:

- Medição da pressão arterial
- Determinação de parâmetros bioquímicos como o colesterol total, triglicéridos e glicémia
- Avaliação do peso e altura
- Administração de vacinas e medicamentos injetáveis
- Serviços de nutrição, realizados semanalmente
- Serviços de podologia, realizados mensalmente

Dos serviços anteriormente descritos, a medição da pressão arterial foi aquele que mais contactei durante o estágio. Tive a oportunidade de realizar, com alguma frequência, a medição da pressão arterial. Esta atividade foi fundamental, na medida em que constituiu o meu primeiro contacto com os utentes, antes de passar para fase do atendimento. Além disso, a realização frequente desta atividade, permitiu-me não só melhorar a técnica, como também colocar em prática os conhecimentos adquiridos na faculdade. Antes de realizar a medição propriamente dita, começava por estabelecer um diálogo inicial com o utente, questionando-lhe se era a primeira vez que recorria a este tipo de serviço, ou se já costumava avaliar regularmente os seus valores de pressão arterial. Tentava também perceber se o utente tinha algum tipo de patologia subjacente, e se sim, se se encontrava a fazer tratamento farmacológico. Em caso afirmativo alertava o mesmo para a importância da adesão à terapêutica e da adoção de medidas não farmacológicas como um estilo de vida saudável, através da prática de exercício físico e alimentação equilibrada, para os valores se manterem controlados.

Relativamente à determinação de parâmetros bioquímicos, nomeadamente a glicémia, triglicéridos e colesterol total, esta foi uma atividade que pouco realizei, por não me sentir muito à vontade de a fazer, mas também por não ser muito solicitada na farmácia. Contudo, tive a oportunidade de visualizar e treinar esta atividade, com toda a equipa da farmácia, que sempre se mostrou disponível para tal. Isto foi fundamental, na medida em que me ajudou, de certa forma, a superar os meus medos e a encarar a situação com naturalidade.

Quanto à administração de vacinas e medicamentos injetáveis visualizei a administração subcutânea de uma solução injetável de Lovenox.

Por último, no que respeita aos serviços de nutrição, tive a possibilidade de atender os utentes no final dos mesmos e fazer novas marcações.

3.1.1.4. Valormed

Na Farmácia S. Bento, existem contentores da Valormed, destinados à colocação de medicamentos fora do prazo de validade ou fora de uso e das respetivas embalagens.

Criada em 1999, a Valormed é uma sociedade sem fins lucrativos, responsável pela gestão de resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso, que resultou da colaboração entre a indústria farmacêutica, distribuidores e farmácias, em face da sua consciencialização para a especificidade do medicamento enquanto resíduo ⁽⁵⁾. Quando os contentores estão cheios, estes são selados e entregues, através de distribuidores, para um Centro de Triagem, onde os resíduos são separados e classificados, para posteriormente serem incinerados ou reciclados ⁽⁶⁾.

Durante o estágio tive a oportunidade de participar em todo o processo que culmina na entrega dos contentores da Valormed aos distribuidores.

No atendimento deparei-me com utentes que se dirigiam unicamente à farmácia para deixar os seus medicamentos, fora de uso ou fora de prazo, nos contentores, o que demonstra que a população está cada vez mais sensibilizada para a importância deste tipo de prática na proteção do meio ambiente.

3.1.1.5. Sifarma 2000®

O programa informático utilizado pela Farmácia S. Bento é o Sifarma 2000®, sistema desenvolvido pela Glintt. Durante o estágio tive a oportunidade de utilizar muitas das funcionalidades do Sifarma 2000®, para fazer a gestão e receção de encomendas, a gestão e regularização de devoluções e atendimentos.

No que se refere ao atendimento, esta ferramenta foi-me bastante útil, na medida em que me permitia visualizar a informação científica de vários medicamentos para os quais desconhecia a sua indicação, posologia, efeitos adversos e contraindicações, quando os utentes me solicitavam informações sobre os mesmos.

Além disso, através da ficha do produto, quando não me recordava onde um determinado produto estava localizado, através da identificação da prateleira, rapidamente chegava ao produto em questão, diminuindo o tempo de espera no atendimento.

Por outro lado, quando o utente não se lembrava, relativamente aos medicamentos genéricos, o laboratório que era costume levar, facilmente chegava a essas informações no programa, através do histórico de compras feito pelo utente.

Para além dos aspetos anteriormente referidos, considero a utilização do Sifarma 2000® um ponto forte, por se tratar de uma ferramenta de trabalho bastante intuitiva, e por ser o sistema mais utilizado pela grande maioria das farmácias.

3.1.1.6. Diversidade de produtos

Para além dos medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e dos medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), existem igualmente outros produtos na farmácia, nomeadamente: produtos de cosmética e higiene corporal, de fitoterapia e de veterinária; géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial; dispositivos médicos; artigos de puericultura, entre outros.

No que se refere aos produtos de cosmética e higiene corporal, estes são definidos como “qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais” ⁽⁷⁾. A elevada variedade de produtos de dermofarmácia e cosmética, disponíveis na farmácia, permitiu-me conhecer diferentes marcas e, em cada marca, as várias gamas e produtos existentes.

Relativamente aos géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial, destaco as fórmulas destinadas a lactentes e crianças, nomeadamente as papas e os leites, solicitados com alguma frequência, por parte dos utentes. Em relação aos leites, várias formulações existem à disposição do utente, desde os leites para lactentes, os leites de transição e os leites de

crescimento, assim como formulações especiais antiregurgitação, anti-obstipação e hipoalergénicas.

No que respeita aos produtos de fitoterapia e de veterinária, contactei com vários medicamentos à base de plantas, utilizados em situações diversas como insónias, ansiedade e infeções urinárias, e com várias marcas de produtos destinados ao tratamento de parasitas externos e internos dos animais de companhia, respetivamente.

Por fim, em relação aos dispositivos médicos, os produtos mais procurados pelos utentes foram as fraldas para bebés, as tiras e agulhas para a determinação da glicémia e as meias de compressão e de descanso.

A existência de uma grande diversidade de produtos permitiu-me ter um conhecimento geral relativamente aos mesmos, no que toca às suas funções e indicações.

Por outro lado, esta variedade permite, enquanto utente, ter um leque variado de opções de escolha, e enquanto farmacêutico a possibilidade de aconselhamento dentro das várias marcas disponíveis.

3.1.1.7. Diversidade de tarefas realizadas

Antes de passar para a fase do atendimento, participei na realização de uma grande diversidade de atividades, que foram fundamentais para compreender o funcionamento da farmácia, e que são descritas de seguida.

3.1.1.7.1. Realização de Encomendas

A realização de encomendas é de extrema importância, uma vez que assegura a chegada de medicamentos e outros produtos de saúde à farmácia, para que possam ser posteriormente dispensados. Durante o estágio contactei com os seguintes tipos de encomendas: encomendas diárias, encomendas de esgotados, encomendas manuais e encomendas instantâneas.

As encomendas diárias são aquelas realizadas diariamente ao fornecedor. Quando um determinado produto atinge o *stock* mínimo, o Sifarma 2000® cria automaticamente uma proposta de encomenda diária, com uma lista de todos os produtos da farmácia que atingem o *stock* mínimo, de acordo com o fornecedor preferencial. Esta lista é então verificada pelo operador responsável, que procede às alterações necessárias, tais como retirar produtos, ou transferi-los para outros fornecedores com melhores condições comerciais. Uma vez aprovada, a encomenda é enviada via *modem*, diretamente ao fornecedor. A Farmácia S. Bento tem vários

fornecedores diários preferenciais, na qual se destaca um fornecedor principal. Relativamente às encomendas diárias visualizei como se realiza todo este processo.

As encomendas de esgotados correspondem a encomendas de produtos que se encontram rateados ou esgotados. Durante o estágio tive a oportunidade de criar encomendas de esgotados e de telefonar várias vezes aos fornecedores, a pedir este tipo de produtos.

As encomendas manuais são aquelas pedidas por telefone, diretamente ao fornecedor. Apresentam a vantagem de se confirmar com o fornecedor, a existência de um determinado produto, assim como a sua data de chegada. As encomendas manuais não ficam gravadas no Sifarma 2000®, pelo que é necessário a sua criação, antes de se proceder à respetiva receção. Durante o atendimento realizei várias vezes este tipo de encomendas, quando o produto desejado pelo utente não existia no *stock* da farmácia, ou quando o mesmo não podia ser substituído por um idêntico na farmácia.

Relativamente às encomendas instantâneas tive a oportunidade de contactar com a encomenda via verde, utilizada para medicamentos pertencentes ao Projeto Via Verde do Medicamento, tais como Spiriva, Lovenox e Atrovent⁽⁸⁾.

3.1.1.7.2. Receção de Encomendas

Uma das primeiras atividades que realizei durante o estágio foi a receção de encomendas.

As encomendas realizadas ao fornecedor chegam à farmácia em “banheiras” e/ou caixas de cartão, destinadas ao transporte de produtos, acompanhadas da respetiva fatura e/ou guia de remessa. Na fatura encontramos várias informações, nomeadamente: identificação da farmácia e do fornecedor; número e data da fatura; lista de produtos faturados e custo total para a farmácia. Relativamente a cada produto faturado é indicado o seu código nacional do produto (CNP); designação; quantidade pedida e quantidade enviada; preço de venda ao armazenista (P.V.A.); descontos; imposto sobre o valor acrescentado (IVA) a que o produto está sujeito; preço de venda ao público (P.V.P.), no caso de produtos com preço inscrito na cartonagem (P.I.C.) e preço de venda à farmácia (P.V.F.). No caso de haver produtos em falta, estes vêm discriminados na fatura, com a respetiva justificação, como por exemplo: esgotado, rateado ou não comercializado.

Após verificação do número de banheiras e/ou volumes dá-se então início à receção de encomendas, dando-se sempre prioridade às encomendas contento produtos a frio. De referir que a receção é diferente, consoante o tipo de encomenda:

- Nas encomendas diárias ou encomendas de esgotados, quando estas são reencaminhadas ao fornecedor, ficam automaticamente gravadas no sistema, sendo apenas necessário selecionar a encomenda e proceder à sua receção.
- Nas encomendas manuais é necessário a sua criação prévia antes de se efetuar a receção. Para tal seleciona-se a funcionalidade do Sifarma 2000® “Gestão de Encomendas” e depois a opção “encomenda manual”. De seguida identifica-se o fornecedor e a lista de produtos, e respetivas quantidades, que se pretende encomendar. Uma vez aprovada, a encomenda é reencaminhada “em papel”, para a sua posterior receção.

Para a receção de encomendas recorre-se à ferramenta do Sifarma 2000® “Receção de Encomendas”. Aqui encontramos todas as encomendas efetuadas, identificadas de acordo com o fornecedor e tipo de encomenda. Seleciona-se a encomenda pretendida e introduz-se o código de leitura e o valor total da fatura. De seguida procede-se à leitura ótica dos produtos um a um. Durante esta fase de leitura é importante verificar a integridade das embalagens, atualizar a ficha do produto, atualizar os prazos de validade dos produtos que não apresentam validade ou que apresentam um prazo inferior àquele descrito no Sifarma 2000® e conferir o P.V.P. no caso de produtos com P.I.C. No final desta fase insere-se o P.V.F. e atualiza-se as margens e o P.V.P. no caso dos produtos com preço marcado pela farmácia. No final, se as quantidades e o custo total coincidirem com a fatura, a encomenda está em condições de ser aprovada.

A receção de encomendas foi uma das atividades que mais gostei de realizar e é sem dúvida uma das atividades de maior importância na farmácia. A realização desta atividade foi extremamente fundamental, na medida em que me permitiu conhecer o aspeto das embalagens, os vários laboratórios existentes e as funções e indicações dos produtos, assim como associar os princípios ativos ao nome comercial dos medicamentos, o que se refletiu posteriormente em um atendimento mais eficaz.

3.1.1.7.3. Arrumação dos Produtos

Depois das encomendas serem rececionadas procede-se à arrumação dos produtos. Na Farmácia S. Bento, o armazenamento de produtos é feito em diferentes locais.

Na área de receção de encomendas existe um armário deslizante, destinado à arrumação dos seguintes produtos: xaropes, suspensões orais, gotas e soluções orais, sistemas transdérmicos, pós cutâneos, ampolas, injetáveis, tiras, agulhas e lancetas; formas farmacêuticas de aplicação retal e vaginal, produtos de higiene íntima e higiene corporal, dispositivos de

inalação, químicos e produtos de veterinária sujeitos a receita médica. Neste local encontramos também vários armários onde são armazenados materiais de enfermagem, meias de compressão e de descanso, entre outros.

O armazém contém gavetas deslizantes, identificadas por ordem alfabética, destinadas à arrumação dos seguintes produtos: MSRM sob a forma de comprimidos e cápsulas, medicamentos de uso oftálmico e medicamentos de uso auricular. Esta zona dispõe ainda de dois armários, um destinado à arrumação de pomadas, cremes e géis de uso tópico e outro destinado à arrumação de carteiras. Existe ainda uma prateleira onde se encontram localizados os medicamentos de elevada rotatividade.

No laboratório situa-se um frigorífico, destinado à arrumação de medicamentos que necessitam de condições especiais de armazenamento, nomeadamente as insulinas e as vacinas. Neste local encontra-se igualmente umas gavetas, destinadas à arrumação dos medicamentos psicotrópicos e estupefacientes, de forma a se poder distingui-los dos restantes medicamentos.

Na sala de atendimento ao público, atrás do balcão de atendimento, situa-se a grande maioria dos MNSRM de IVA a 6%, fora do alcance do público.

A arrumação dos produtos deve ser feita de acordo com o método *First Expire, First Out* (FEFO), ou seja, o primeiro produto com o prazo de validade a expirar deverá ser o primeiro a sair da farmácia. Quando os produtos apresentam prazos de validades iguais deve-se seguir o método *First In, First Out* (FIFO), ou seja, o primeiro produto a entrar na farmácia deverá ser o primeiro a sair. Com estes métodos, evita-se que os produtos que apresentam prazo de validade inferior sejam os últimos a sair.

Durante o estágio realizei várias vezes a arrumação dos produtos. Esta atividade permitiu-me saber onde estes se encontram localizados, possibilitando-me no atendimento chegar rapidamente ao produto em questão, diminuindo o tempo dispensado na procura do mesmo, resultando em um atendimento mais rápido e eficaz.

3.1.1.7.4. Organização do Espaço Físico

Ao longo do estágio tive a oportunidade de participar na organização do espaço físico (*layout*) da farmácia, o que me permitiu aplicar os conhecimentos adquiridos em Comunicação e *Marketing* Farmacêutico.

Atrás do balcão de atendimento situam-se expostos, os MNSRM utilizados nas situações patológicas mais comuns como gripes e constipações; produtos de fitoterapia; produtos de emagrecimento; produtos buco-dentários e produtos de uso veterinário não sujeitos a receita médica, devidamente organizados em lineares e fora do acesso ao público.

Nas zonas quentes da farmácia situam-se vários lineares com produtos de dermofarmácia e cosmética, separados de acordo com a sua marca. Dentro de cada marca, estes encontram-se organizados pela respetiva gama.

Nas zonas frias, encontram-se sobretudo os leites e as fraldas para bebé. A sua localização mais afastada, relativamente aos restantes produtos, resulta do facto de estes produtos já apresentarem elevada rotatividade.

No centro da sala de atendimento, próximo ao balcão de atendimento, situa-se uma gôndola, onde normalmente são colocados os mesmos produtos que se encontram expostos na montra. Geralmente são produtos sazonais, ou produtos que se encontram em promoção, e que a farmácia tem interesse em vender. Estes produtos encontram-se estrategicamente colocados neste lugar, uma vez que se encontram ao alcance das mãos do utente, podendo gerar no mesmo uma compra por impulso.

Fui sensibilizada para a importância de uma correta organização e gestão do espaço físico da farmácia, por um lado, para permitir um melhor aproveitamento do espaço, e por outro lado, para aumentar o número de vendas de produtos com interesse em serem vendidos.

3.1.1.7.5. Gestão e Regularização de Devoluções

Durante o estágio tive igualmente a oportunidade de fazer várias devoluções. A devolução de um produto ao respetivo fornecedor justifica-se nas seguintes situações: fora do prazo de validade, ordem de retirada do medicamento do mercado, erro no pedido, embalagem danificada ou incompleta, produto enviado que não foi pedido, entre outros.

Para fazer uma devolução recorre-se à funcionalidade do Sifarma 2000® “Gestão de Devoluções” e cria-se uma nota de devolução. Aqui seleciona-se o fornecedor a que se pretende devolver o produto, as quantidades dos produtos que se pretende devolver, de acordo com o CNP e designação, motivo da devolução e número da fatura de origem do produto. Após a criação da nota de devolução são impressas três cópias: original, duplicado e triplicado, e estas são rubricadas e carimbadas. O original e o duplicado vão acompanhadas com o produto para o fornecedor e o triplicado fica arquivado na farmácia.

O pedido de devolução pode ou não ser aceite pelo fornecedor. No caso de não ser aceite, os produtos voltam para a farmácia e no caso de ser aceite, estes são substituídos por outros iguais, ou então é emitida uma nota de crédito. Depois da decisão por parte do fornecedor procede-se à regularização das devoluções no Sifarma 2000®.

A maioria das devoluções que realizei na farmácia deveram-se a erros no pedido e a situações em que os mesmos produtos podiam ser adquiridos com melhores condições comerciais.

3.1.1.7.6. Controlo dos Prazos de Validade

O controlo dos prazos de validade é de extrema importância para a farmácia, uma vez que evita a existência de produtos fora de prazo. Desta forma é garantida a qualidade, eficácia e segurança dos produtos dispensados.

O controlo pode ser feito durante a receção das encomendas e mensalmente. De mês em mês é impressa, através do Sifarma 2000®, uma listagem de todos os produtos com o prazo de validade a expirar, no período de tempo definido pelo operador, que normalmente são 3 meses. Nessa listagem encontram-se todos os produtos que se encontram a expirar, pelo seu CNP, designação, prateleira em que se encontram, quantidades, prazo de validade e um novo espaço para correção do prazo de validade.

Os produtos que se encontram na listagem são então conferidos um a um. No caso de existirem produtos com prazo de validade incorreto, procede-se à atualização do seu prazo de validade; produtos que se encontram prestes a expirar e que estão sem previsão de serem vendidos são devolvidos ao respetivo fornecedor e produtos a expirar com previsão de saída são devidamente assinalados, de modo a serem os primeiros a sair.

Os produtos a expirar sem previsão da sua saída são então recolhidos e devolvidos ao fornecedor, através de uma nota de devolução. Estes produtos podem ou não ser aceites pelo fornecedor. No caso de serem aceites é emitida uma nota de crédito ou então os produtos são substituídos por outros iguais, mas com prazo de validade mais alargado.

Tive igualmente a possibilidade de participar no controlo dos prazos de validade. Esta atividade é de extrema importância, por um lado para garantir a segurança dos utentes, e por outro lado para evitar prejuízos para a farmácia.

3.1.1.7.7. Conferência do Receituário e Faturação

A conferência do receituário e faturação foi outra das atividades que contactei durante o estágio. De referir que durante o atendimento aviei dois tipos de receitas: a receita manual e a receita eletrónica. A conferência do receituário é feita de acordo com o tipo de receita em causa.

Relativamente às receitas manuais, após a dispensa de medicamentos com este tipo de receita, é impresso, no verso da mesma, um documento para faturação, que apresenta as

seguintes informações: identificação da farmácia e DT; organismo de comparticipação; número, lote e série da receita; data da dispensa da receita; medicamentos dispensados pelo código, designação, quantidade, P.V.P., valor da comparticipação e valor pago pelo utente; valor total da receita; valor total que é pago pelo utente e valor total a pagar pela entidade. Por fim existe um espaço destinado à assinatura do utente, na qual este declara que lhe foram dispensados os medicamentos prescritos na receita e prestados os respetivos conselhos sobre a sua utilização.

Posteriormente verifiquei duplamente as receitas, na qual tive em atenção a presença das seguintes informações, na frente e no verso da receita: nome e número nacional do utente e, sempre que aplicável, o número de beneficiário; entidade financeira responsável; regime especial de comparticipação de medicamentos, se aplicável; identificação da exceção que justifica a utilização da receita manual; vinheta do local de prescrição; vinheta identificativa do prescriptor; especialidade médica, se aplicável, contacto telefónico e endereço de correio eletrónico; se o número de embalagens por receita e por medicamento estavam corretos; se os medicamentos dispensados correspondiam aos medicamentos prescritos; data de prescrição; assinatura do prescriptor; validade da receita; assinatura do utente; assinatura do responsável pelo atendimento; data e carimbo da farmácia.

Depois de uma terceira verificação das receitas pelo operador responsável, estas são agrupadas por organismos de comparticipação, e dentro de cada organismo, separadas por lotes, sendo cada lote composto por 30 receitas, com a exceção do último lote que pode ser incompleto.

Quando os lotes estão completos procede-se à impressão dos verbetes de identificação de lotes. Estes são carimbados e colocados à volta dos lotes correspondentes.

No final de cada mês, os lotes são fechados e são impressos dois documentos: a Relação Resumo de Lotes e a Fatura Mensal, que são encaminhados juntamente com as receitas manuais.

Relativamente às receitas eletrónicas, este é um processo muito mais facilitado, na medida em que tudo é feito automaticamente, após a dispensa de medicamentos com este tipo de receita.

Esta atividade permitiu-me ter um contacto mais alargado com a receita manual, e conhecer os vários organismos de comparticipação existentes. Alertou-me igualmente para a importância que este processo tem, para evitar prejuízos para a farmácia.

3.1.2. Pontos Fracos

3.1.2.1. Preparação de Medicamentos Manipulados

Os medicamentos manipulados são definidos como “qualquer preparado oficial ou fórmula magistral preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico” ⁽⁹⁾.

Embora o laboratório da Farmácia S. Bento reúna todas as condições necessárias para a preparação de medicamentos manipulados, esta é uma atividade que não é realizada na farmácia, sendo este local normalmente destinado à reconstituição de suspensões.

No entanto, sempre que um medicamento manipulado é solicitado por parte de um utente, a farmácia assegura todas as condições, para que o medicamento em causa chegue à farmácia, para que possa deste modo ser dispensado ao utente.

A preparação de medicamentos manipulados foi portanto uma atividade que não teve a possibilidade de realizar.

3.2. Análise SWOT Externa

3.2.1. Oportunidades

3.2.1.1. Participação em Formações

Ao longo do estágio tive a possibilidade de participar em várias formações, que contribuíram para aprofundar os meus conhecimentos sobre determinados produtos, e que foram promovidas pelos seguintes laboratórios:

- Bioderma
 - Angelini
 - Krka
 - Procter & Gamble
 - Aboca
 - Advancis

Relativamente aos produtos de dermofarmácia e cosmética saliento as formações da Bioderma e Angelini. Na formação da Bioderma foram apresentados vários produtos pertencentes às gamas Photoderm, Cicabio, Sébium e Sensibio, o que me permitiu conhecer as diferentes apresentações existentes, quais as suas funções e quais os produtos mais adequados

para cada tipo de pele. Por sua vez na formação promovida pela Angelini foram apresentados vários produtos da marca Barral, pertencentes à gama BabyProtect e DermoProtect.

Na formação da Krka foi abordado o produto Amflee Combo, um medicamento de uso veterinário não sujeito a receita médica, constituído pela associação de dois princípios ativos (fipronil e s-metopreno), utilizado no tratamento de infestações por parasitas externos tais como pulgas e carraças.

A Procter & Gamble apresentou vários produtos pertencentes à marca Kukident, utilizados na fixação de próteses dentárias. Nesta formação aumentei também os meus conhecimentos sobre o produto Vicks VapoRub, nomeadamente o facto de não ser aconselhável a sua utilização em doentes asmáticos, por possuir cânfora, em concentrações elevadas, na sua composição. Foi referido que neste tipo de doentes poderá ser utilizado o produto Vicks BabyRub, por apresentar concentrações reduzidas deste componente.

Na formação da Aboca e da Advancis foram referidos vários produtos para emagrecimento (Lynfase, LibraMed e Adipox) e vários suplementos alimentares da marca Absorvit, respetivamente.

Estas formações foram de extrema importância, devido ao meu desconhecimento inicial relativamente a alguns produtos. Com a ajuda das formações e dos conhecimentos técnicos da equipa, a dificuldade sentida no aconselhamento deste tipo de produtos foi sendo aos poucos ultrapassada, ao longo do estágio.

3.2.1.2. Diversidade de Utentes

A diversidade de utentes que frequentam diariamente a Farmácia S. Bento foi visível durante todo o estágio.

Tive a oportunidade de atender utentes pertencentes a várias faixas etárias, desde jovens, adultos e idosos e cidadãos de nacionalidade estrangeira.

A maior parte dos utentes que atendi são clientes habituais, maioritariamente idosos, que se deslocam quase diariamente à farmácia para adquirir a sua medicação.

O contacto diário com vários utentes permitiu-me estar perante diferentes tipos de atendimentos. Possibilitou-me também enquanto estagiária adaptar o meu discurso de acordo com o utente que tinha na minha frente. De referir que os utentes da Farmácia S. Bento são bastante simpáticos e recetivos a serem atendidos por estagiários, o que foi fundamental para me sentir confiante na realização dos mesmos.

3.2.2. Ameaças

3.2.2.1. Receita Manual

Apesar da grande maioria das receitas que aviei serem eletrónicas, contactei diariamente com algumas receitas manuais. A prescrição de medicamentos através de receita manual apenas se justifica nas seguintes situações: falência informática; inadaptação fundamentada do prescritor, previamente confirmada e validada anualmente pela respetiva ordem profissional; prescrição no domicílio e até 40 receitas por mês. Durante o estágio senti algumas vezes dificuldades em identificar a designação, posologia e dosagem dos medicamentos prescritos, através da receita manual, por não conseguir interpretar a caligrafia do médico, o que me levava a consultar a equipa nestas situações, diminuindo a eficácia do atendimento.

Por outro lado, as receitas manuais devem seguir um conjunto de especificações que devem ser cumpridas, para que a farmácia possa receber a comparticipação dos medicamentos que nela constam. Quando estas normas não são seguidas, as receitas não são consideradas válidas, causando prejuízos de ordem menor ou maior à farmácia. Neste sentido, as receitas manuais constituem uma ameaça por estarem mais sujeitas à existência de erros.

3.2.2.2. Conhecimento do utente relativamente aos MG

Durante o estágio constatei a existência de alguma falta de conhecimento, relativamente ao conceito de medicamento genérico (MG), por parte de alguns utentes.

Apesar de na definição de MG constar que é um “medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados” ⁽¹⁰⁾, alguns utentes desconfiam da segurança e eficácia deste tipo de medicamentos e, perante a opção de escolha entre um MG ou um medicamento de marca, optam por adquirir o medicamento de marca, apesar dos seus custos mais elevados. Reparei que esta insegurança relativamente aos MG é influenciada muitas vezes pela opinião de terceiros ou do próprio médico prescritor que recomenda o medicamento de marca.

Nestas situações, o meu discurso com o utente baseava-se em elucidar o mesmo que os MG são confiáveis, apresentando a mesma eficácia e segurança que os medicamentos de marca, sendo que alguns dos utentes, perante a minha explicação, optavam por adquirir o MG enquanto outros continuavam a preferir adquirir o medicamento de marca.

3.2.2.3. Alterações no P.V.P. dos MSRM

Ao longo do estágio apercebi-me de várias alterações no P.V.P. de alguns MSRM, durante a receção de encomendas e no atendimento. Estas alterações fazem com que muitas vezes exista na farmácia o mesmo medicamento com P.V.P. diferentes.

Fui alertada pela equipa para a importância de estar atenta a este tipo de alterações, durante a receção das encomendas e no atendimento, para evitar prejuízos quer para a farmácia, quer para o utente.

3.2.2.4. Medicamentos Esgotados ou Rateados

A existência de medicamentos esgotados foi uma situação que me acompanhou durante o estágio. Apesar do esforço diário visível, na aquisição deste tipo de medicamentos, através da realização de encomendas de esgotados ou telefonas a diferentes fornecedores, alguns medicamentos não chegavam à farmácia ou apenas chegavam passado alguns meses. Esta situação acabava por ser problemática quando o utente necessitava, com alguma urgência, de um medicamento que se encontrava nesta situação, e o mesmo não podia ser substituído por um idêntico, dentro do mesmo grupo homogêneo, na farmácia. Durante o atendimento quando confrontada com uma situação de medicamento esgotado, telefonava a todos os armazenistas a questionar a disponibilidade do medicamento em questão e em caso negativo ou do mesmo ter uma previsão de chegada longa, averiguava a existência de alternativas possíveis e, só em último caso, informava o utente que não tinha o medicamento em questão. Deste modo a existência de medicamentos esgotados e a ausência de alternativas possíveis é considerada uma ameaça uma vez que pode pôr em risco a saúde do doente.

3.2.2.5. Aspeto das Embalagens

Durante o estágio, verifiquei a existência de alterações no tamanho e no aspeto das embalagens, em alguns medicamentos. Estas alterações podem gerar algum tipo de dúvida ou confusão em alguns utentes, sobretudo na população idosa, sobre o facto do medicamento que está a ser dispensado ser o mesmo medicamento que é habitual levar.

Por outro lado a existência de embalagens semelhantes, com o mesmo princípio ativo, em dosagens diferentes, pode constituir uma ameaça, uma vez que existe o risco de se dispensar o medicamento numa dosagem diferente da que é suposto utilizar. Por este motivo é necessário uma atenção especial neste tipo de medicamentos, verificando, numa primeira fase, se a

dosagem do medicamento é a correta e, numa segunda fase, fazer essa confirmação através do modo de verificação do Sifarma 2000®, antes de finalizar o atendimento.

3.2.2.6. Problemas Informáticos

A existência de problemas informáticos no Sifarma 2000® foi uma situação que ocorreu com alguma frequência. Durante a receção de encomendas verificaram-se momentos em que o programa deixava de funcionar, sendo necessário, nessas ocasiões, proceder à reiniciação do sistema. Esta situação implicava recomeçar tudo de novo, o que acabava por atrasar todo o processo de receção das encomendas, principalmente no caso de encomendas muito grandes e com elevado número de referências. Por outro lado, no atendimento existiram situações em que o sistema sofria atualizações que impossibilitavam abrir as receitas eletrónicas ou inserir o regime de comparticipação no sistema. Estas situações impediam a dispensa de medicamentos com este tipo de receita, o que implicava por vezes o utente ter de se dirigir à farmácia em outro dia.

4. Casos Práticos

4.1. Caso Prático I – Infeções Urinárias

Uma senhora dirige-se à farmácia, queixando-se de uma infeção urinária, solicitando algo que a ajudasse a resolver essa situação. Numa abordagem inicial, comecei por pedir à utente que me fizesse uma descrição dos seus sintomas, ao qual a senhora referiu sentir ardor ao urinar e necessidade de urinar com maior frequência. Tratando-se possivelmente de uma infeção urinária e após perceber que a situação era relativamente recente, aconselhei o produto RoterCysti 500mg, um medicamento tradicional à base de plantas, cuja substância ativa é o extrato seco da folha de *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-ursina), indicando à senhora que deveria tomar dois comprimidos, duas vezes por dia, durante cinco dias ⁽¹⁾. Alertei igualmente a utente para a importância de ingerir bastante água, para promover a diurese e facilitar a eliminação de resíduos do trato urinário. Por último referi à utente que caso não sentisse melhoria dos sintomas, nos primeiros dias após a toma do medicamento, consulta-se o seu médico.

4.2. Caso Prático 2 – Onicomicoses

Uma senhora, praticante de natação, dirige-se à farmácia queixando-se de um “fungo na unha do pé”. Inicialmente solicitei à utente que visualizasse a unha do pé na qual verifiquei que esta apresentava uma coloração amarelada e alterações na sua espessura, tratando-se de sintomas indicativos de uma possível onicomicose. Para o tratamento recomendei a utilização de uma caneta antifúngica Excilor, devido à facilidade de aplicação, sem necessidade de limar a unha. Uma vez que a senhora é praticante de natação, a transmissão do fungo pode ser explicada pela frequência de ambientes quentes e húmidos, favoráveis ao desenvolvimento de fungos, como por exemplo balneários. Por este motivo, aconselhei a utilização de um *spray* antifúngico Mycosana Protect, um produto resistente à água, que cria uma barreira protetora à volta do pé, impedindo a adesão dos fungos à pele, prevenindo deste modo a reinfeção por parte dos fungos. Por último aconselhei a utente a não andar descalça, quando frequentar estes locais, para evitar a contaminação por fungos.

5. Conclusão

A realização do estágio curricular em farmácia comunitária foi, sem dúvida, uma experiência bastante positiva, permitindo-me não só contactar de perto com o dia-a-dia da farmácia comunitária como também aplicar e consolidar muitos dos conhecimentos adquiridos na FFUC.

Durante o estágio tive a oportunidade de desempenhar muitas das funções de um farmacêutico comunitário, começando inicialmente pelas atividades do *back-office* e, posteriormente, pela realização de medições da pressão arterial e glicémia, terminado por último no atendimento ao público.

Foram várias as dificuldades que senti durante o estágio, sobretudo no atendimento ao público, ao nível da comunicação com o utente e no aconselhamento de determinados produtos, contudo sinto que no final, essas dificuldades foram sendo ultrapassadas. Esta evolução gradual deveu-se, em grande parte, ao apoio de toda a equipa da farmácia.

Por último, resta-me agradecer à Farmácia S. Bento por me ter proporcionado as bases necessárias, caso algum dia venha a exercer a minha profissão em farmácia comunitária, e por me ter feito crescer não só a nível profissional, como também a nível pessoal.

6. Referências Bibliográficas

- (1) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. – **Farmácia Comunitária**. [Acedido a 25 de Abril de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/>
- (2) ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. – **A Farmácia Comunitária**. [Acedido a 25 de Abril de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
- (3) Ministério da Saúde. – **Decreto-Lei n.º 307/2007 de 31 de Agosto**. Diário da República n.º 168 – Série I (2007) 6083-6091.
- (4) OLIVEIRA, W. – **Entenda definitivamente o que é análise SWOT**. [Acedido a 25 de Abril de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.heflo.com/pt-br/swot/o-que-e-analise-swot/>
- (5) VALORMED, Sociedade Gestora de Resíduos de Embalagens e Medicamentos, Lda. – **QUEM SOMOS**. [Acedido a 2 de Maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
- (6) VALORMED, Sociedade Gestora de Resíduos de Embalagens e Medicamentos, Lda. – **PROCESSO**. [Acedido a 2 de Maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/8/processo>
- (7) INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. – **Cosméticos**. [Acedido a 7 de Maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos>
- (8) INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. – **Circular Informativa n.º 019/2015**. INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (2015).
- (9) INFARMED, Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. – **Medicamentos manipulados**. [Acedido a 17 de Maio de 2019]. Disponível na Internet:

<http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>

(10) Ministério da Saúde. – **Decreto-lei nº 176/2006 de 30 de Agosto**. Diário da República nº 167 – Série I (2006) 6297 – 6383.

(11) VEMEDIA MANUFACTURING B.V. – **Resumo das características do medicamento RoterCysti 500mg**, 2016. [Acedido a 23 de Julho de 2019]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=614422&tipo_doc=rcm

Parte II – Monografia
Associação da Nanotecnologia com a
Terapêutica do Melanoma

Lista de Abreviaturas

α -MSH – Hormona estimulante de melanócitos alfa
APC – Células apresentadoras de antígenos
CDK – Quinase dependente de ciclina
CDK4 – Quinase dependente de ciclina 4
CDKN2A – Inibidor da quinase dependente de ciclina 2
CTLA-4 – Antígeno associado a linfócitos T citotóxicos 4
FDA – *Food and Drug Administration*
IFN – Interferão
IL-2 – Interleucina 2
MAPK – Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MCI R – Recetor de melanocortina I
NFI – Neurofibromina I
NK – *Natural killer*
PD-1 – Proteína de morte celular programada I
PEG – Propilenoglicol
Peg-INF – Peginterferão
PI3K/AKT – Fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B
RES – Sistema reticuloendotelial
ROS – Espécies reativas de oxigénio
RTK – Recetor de tirosina quinase
siRNA – RNA de interferência
T-VEC – Talimogene laherparepvec
UV – Ultravioleta
VEGFR – Recetor do fator de crescimento endotelial

Resumo

O melanoma, uma neoplasia associada à transformação maligna dos melanócitos, representa a forma mais agressiva de cancro da pele na população humana. Embora corresponda a uma pequena percentagem de todos os tipos de cancro da pele, a sua incidência tem vindo a aumentar gradualmente, sendo responsável pelas elevadas taxas de mortalidade associadas a este tipo de cancro.

O melanoma localizado, em estágio inicial, que não desenvolveu metástases em outras partes do corpo, pode ser removido por meio de tratamento cirúrgico, apresentando uma taxa de sobrevivência muito elevada. Contudo, o melanoma em estágio mais avançado, metastizado, é potencialmente fatal e difícil de tratar, apresentando uma taxa de sobrevivência muito reduzida. Nesta situação, outras abordagens terapêuticas devem ser combinadas com a cirurgia, incluindo a quimioterapia, radioterapia, terapia fotodinâmica, terapia dirigida e imunoterapia. No entanto, estes métodos de tratamento convencionais apresentam várias limitações.

Tornou-se então necessário o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas que permitissem superar as limitações existentes com as terapias convencionais. Neste sentido surge a nanotecnologia, uma área que tem sido amplamente estudada na terapêutica do melanoma. A nanotecnologia, através do desenvolvimento de vários sistemas de transporte e libertação de fármacos, permite concentrar o fármaco no local de ação, aumentando a especificidade de ação, e diminuir os efeitos colaterais associados às terapias convencionais.

A presente monografia começa por fazer uma breve introdução ao tema, abordando, numa fase inicial, alguns aspetos sobre o melanoma, nomeadamente a sua definição, etiologia, tipos de melanoma existentes, como é feito o diagnóstico e alterações moleculares associadas ao seu desenvolvimento. De seguida serão descritas as várias terapêuticas convencionais existentes para o tratamento do melanoma e quais as suas limitações. Por último será feita uma abordagem à nanotecnologia, nomeadamente alguns conceitos relacionados com a vetorização passiva e vetorização ativa de fármacos, os vários tipos de nanossistemas existentes e a sua utilização nas terapias convencionais do melanoma.

Palavras-chave: Melanoma; Terapias Convencionais; Nanotecnologia, Nanossistemas

Abstract

Melanoma, a neoplasm associated with malignant transformation of melanocytes, represents the most aggressive form of skin cancer in the human population. Although it accounts for a small percentage of all types of skin cancer, its incidence has been gradually increasing, being responsible for the high mortality rates associated with this type of cancer.

Located early-stage melanoma, which has not metastasized to other parts of the body, can be removed by surgical treatment, having a very high survival rate. However, metastatic advanced melanoma is potentially fatal and difficult to treat, having a very low survival rate. In this situation, other therapeutic approaches should be combined with surgery, including chemotherapy, radiotherapy, photodynamic therapy, targeted therapy and immunotherapy. However these conventional treatment methods have several limitations.

It has been then necessary to develop new therapeutic strategies that could overcome the limitations of conventional therapies. In this context, nanotechnology, an area that has been widely studied in the therapy of melanoma, has come to the fore. Nanotechnology, through the development of various drug delivery systems, allows the drug to be concentrated at the site of action, increasing the specificity of action and decreasing the side effects associated with conventional therapies.

The present monograph begins by giving a brief introduction to the subject, addressing at an early stage some aspects of melanoma, namely its definition, etiology, types of melanoma, how the diagnosis is made and molecular changes associated with its development. In the following, the various conventional therapies for treating melanoma and their limitations will be described. Finally, an approach to nanotechnology will be taken, namely some concepts related to passive and active vectorization of drugs, the various types of nanosystems and their use in melanoma conventional therapies.

Keywords: Melanoma; Conventional Therapies; Nanotechnology, Nanosystems

I. Notas Introdutórias

O cancro da pele representa a forma mais comum de malignidade na população caucasiana. São identificados diferentes tipos de cancro da pele, designados de acordo com o tipo de célula que lhes dá origem, sendo os mais comuns o carcinoma basocelular e o carcinoma espinocelular (ambos também designados por cancro da pele não melanoma) e o melanoma (também conhecido por melanoma maligno). O melanoma é de todos os tipos de cancro da pele, o mais agressivo, apresentando um elevado potencial de desenvolver metástases ⁽¹⁾.

O melanoma é uma neoplasia que resulta da ocorrência de alterações genéticas nos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina, e que se localiza normalmente ao nível da pele (melanoma cutâneo) ⁽²⁾. O desenvolvimento do melanoma está associado a vários fatores de risco, entre eles, a exposição à radiação ultravioleta, a presença de nevos melanocíticos, o histórico familiar de melanoma, entre outros. Existem quatro subtipos de melanoma cutâneo, com características clínicas e histológicas diferentes, incluindo o melanoma extensivo superficial, o melanoma nodular, o melanoma lentigo maligno e o melanoma lentiginoso acral ⁽³⁾.

O melanoma em estágio inicial, diagnosticado precocemente, pode ser removido através da cirurgia, apresentando um bom prognóstico. Contudo, quando detetado numa fase tardia, o melanoma pode já ter desenvolvido metástases em outras partes do corpo, sendo a cirurgia, por si só, incapaz de curar a lesão. Nesta situação, outras abordagens terapêuticas como a radioterapia, quimioterapia, terapia fotodinâmica, terapia dirigida e imunoterapia devem ser combinadas com a cirurgia ⁽⁴⁾. Apesar das suas vantagens, estas terapias apresentam, no entanto, algumas limitações relacionadas com a baixa especificidade de ação, efeitos colaterais graves, toxicidade e desenvolvimento de resistências aos fármacos ⁽⁵⁾.

A nanotecnologia constitui uma das estratégias utilizadas para superar as limitações terapêuticas associadas às terapias convencionais. Vários nanossistemas têm sido desenvolvidos como sistemas de transporte e libertação de fármacos, permitindo localizar o fármaco no local de ação por vetorização passiva, devido às características anatomofisiológicas do tumor, ou por vetorização ativa, mediante a adição de ligandos capazes de interagir especificamente com as células-alvo. Desta forma é conseguida uma maior especificidade de ação e uma diminuição dos efeitos colaterais das terapias convencionais ⁽⁶⁾.

Esta monografia irá abordar alguns aspetos sobre o melanoma, as terapias convencionais existentes no seu tratamento e as suas limitações, a nanotecnologia, os vários tipos de nanossistemas existentes e a sua utilização nas terapias convencionais do melanoma.

2. Melanoma

O melanoma é uma neoplasia que resulta da transformação maligna dos melanócitos ⁽¹⁾. Os melanócitos são células geradas a partir de precursores indiferenciados e não pigmentados, derivados da crista neural, os melanoblastos, que durante o processo de embriogênese, migram para a sua localização final: camada basal da epiderme, folículos pilosos, superfícies mucosas, meninges, estria vascular da cóclea e coróide, onde se diferenciam para originar melanócitos maduros ^(7,8). Por este motivo, embora a forma mais comum do melanoma se desenvolva ao nível da pele, este também pode surgir em outros locais do corpo como nos olhos, no ouvido interno, no trato gastrointestinal, na mucosa oral e genital e nas leptomeninges ⁽⁹⁾.

A principal função dos melanócitos é a síntese de melanina, um pigmento presente na pele, nos olhos e no cabelo, responsável por proteger o organismo dos danos nocivos provocados pela radiação ultravioleta (UV) e cuja produção ocorre em organelos especializados dos melanócitos, denominados melanossomas ⁽⁸⁾. Na epiderme, a síntese de melanina é estimulada em resposta aos danos celulares induzidos pela radiação UV, nos queratinócitos. Esta situação leva à produção da hormona estimulante de melanócitos alfa (α -MSH) nos queratinócitos, através de um mecanismo dependente do gene p53. Uma vez sintetizada, a α -MSH vai-se ligar ao recetor de melanocortina I (MC1R), presente nos melanócitos, induzindo a produção de melanina ⁽¹⁰⁾. Dois tipos de melanina são produzidos: a eumelanina, um pigmento de coloração acastanhada/preta, que apresenta propriedades fotoprotetoras e a feomelanina, um pigmento de coloração amarelada/alaranjada, que apresenta fracas propriedades fotoprotetoras ⁽⁸⁾. A melanina, uma vez sintetizada é transferida para os queratinócitos vizinhos, protegendo o seu DNA dos danos induzidos pela radiação UV. Deste modo, os melanócitos desempenham um papel fundamental na proteção da pele contra a ação dos raios UV ⁽¹⁰⁾.

2.1. Fatores de Risco

A etiologia do melanoma maligno é multifatorial, envolvendo fatores de risco ambientais e fatores de risco do hospedeiro ⁽⁷⁾.

A radiação UV é o principal fator de risco ambiental responsável pelo desenvolvimento do melanoma maligno cutâneo ⁽⁷⁾. De acordo com o seu comprimento de onda, a radiação UV pode ser subdividida em radiação UVC (100 a 280 nm), radiação UVB (280 a 315 nm) e radiação UVA (315 a 400 nm). Os raios UVC são filtrados pela camada de ozono, não atingindo a superfície da Terra. Da radiação UV que atinge a Terra, cerca de 95% corresponde à radiação UVA e 5% à radiação UVB. Os raios UVB são responsáveis por danificar diretamente o DNA,

através da formação de dímeros de pirimidina e indiretamente, através da indução de danos oxidativos, sendo considerados mais carcinogénicos do que os raios UVA⁽⁸⁾. Por sua vez, a radiação UVA é responsável por induzir maioritariamente danos oxidativos no DNA, através da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). O aumento da concentração intracelular de ROS leva ao *stress* oxidativo e induz a transcrição de fatores envolvidos em processos inflamatórios, provocando danos em várias estruturas celulares, incluindo os lípidos, as proteínas e o DNA. Por outro lado, este aumento de ROS é responsável pela diminuição da expressão de enzimas antioxidantes importantes e pela depleção de genes responsáveis por controlar os níveis intracelulares de ROS, entre eles o p16, contribuindo para o aumento do *stress* oxidativo⁽¹¹⁾. O desenvolvimento do melanoma maligno, por sua vez, está associado ao padrão e tempo de exposição à radiação UV solar. Deste modo, uma exposição solar intensa e intermitente relaciona-se com um maior risco de desenvolvimento de melanoma, comparativamente a um padrão de exposição solar contínuo, frequentemente associado aos tipos de cancro da pele não melanoma. Para além destes, outros fatores como o histórico de queimaduras solares na infância ou na adolescência, indivíduos que apresentam mais do que cinco queimaduras solares graves e a exposição a fontes artificiais de radiação UV, estão igualmente relacionados com um risco acrescido de vir a desenvolver melanoma⁽⁷⁾.

Os fatores de risco do hospedeiro que contribuem para o desenvolvimento do melanoma maligno incluem a presença de nevos melanocíticos, a suscetibilidade genética e o histórico familiar de melanoma⁽⁷⁾. Os nevos melanocíticos, popularmente designados por sinais ou manchas de nascença, são lesões benignas, congénitas ou adquiridas, constituídas por aglomerados concentrados de melanócitos⁽¹²⁾. Embora a grande maioria dos melanomas surja de novo, a partir da transformação dos melanócitos, aproximadamente 25% dos mesmos desenvolve-se a partir de nevos pré-existentes. Indivíduos com um elevado número de nevos melanocíticos, a presença de vários nevos atípicos e a presença de nevos melanocíticos congénitos gigantes são fatores que contribuem para um risco acrescido de vir a desenvolver melanoma⁽⁸⁾. Em relação à suscetibilidade genética é conhecido que os polimorfismos existentes no gene responsável por codificar o MC1R são responsáveis pelas diferentes características fenotípicas presentes nos indivíduos⁽⁷⁾. Deste modo, indivíduos com características como cabelo loiro ou ruivo, olhos azuis e pele clara que queima facilmente apresentam uma maior sensibilidade à radiação UV e um maior risco de desenvolver melanoma, em relação a indivíduos que apresentam cabelo castanho, olhos castanhos e pele que bronzeia facilmente. Tal situação deve-se ao facto de os primeiros indivíduos produzirem pouca ou nenhuma eumelanina, estando menos protegidos dos danos nocivos da radiação UV. Por último, cerca de 10% dos melanomas

estão associados ao histórico familiar de melanoma ⁽⁸⁾. A presença de mutações germinativas no gene inibidor da quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) e no gene quinase dependente de ciclina 4 (CDK4) são as anomalias genéticas mais frequentemente identificadas em contexto familiar, associadas a um maior risco de desenvolver melanoma ⁽⁷⁾. O gene CDK4 é responsável pela proliferação celular, ao promover a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Por sua vez, o gene CDKN2A é responsável por codificar uma proteína, a p16, responsável por inibir a atividade de CDK4, interrompendo a proliferação celular, pelo que a presença de mutações neste gene, conduz a um aumento da proliferação celular e conseqüentemente ao desenvolvimento do melanoma ⁽¹²⁾.

2.2. Classificação

O melanoma maligno pode ser classificado de acordo com o seu conteúdo em melanina e a sua localização. No que diz respeito ao conteúdo em melanina, embora a maioria dos melanomas sejam pigmentados, contendo vários graus e tipos de melanina, alguns apresentam ausência de pigmentação, sendo designados por melanomas amelanóticos. Em relação à sua localização, o melanoma pode ser classificado em três categorias: (1) melanoma ocular, (2) melanoma das mucosas e (3) melanoma cutâneo. O melanoma cutâneo representa a forma mais comum de melanoma e, por sua vez, pode ser subdividido em: (1) melanoma extensivo superficial; (2) melanoma nodular; (3) melanoma lentigo maligno e (4) melanoma lentiginoso acral ⁽¹³⁾ (Figura 1).

O melanoma extensivo superficial é o subtipo mais comum, representando cerca de 60 a 70% de todos os melanomas cutâneos. Pode ocorrer em qualquer idade e surgir em qualquer parte do corpo, embora seja mais comum aparecer em determinadas regiões como no tronco, no caso dos homens e nos membros inferiores, no caso das mulheres, como resultado da exposição intermitente ao sol. Manifesta-se como uma lesão de coloração *marrom* ou preta, com bordas irregulares e variações na cor, podendo surgir de novo ou a partir de nevos pré-existentes. Apresenta inicialmente uma fase de crescimento radial, horizontal e confinada à epiderme, podendo posteriormente evoluir para uma fase de crescimento vertical ^(3, 14).

O melanoma nodular é o segundo subtipo mais comum, representando cerca de 15 a 30% de todos os melanomas cutâneos. Pode surgir em qualquer parte do corpo e desenvolve-se geralmente de novo. Manifesta-se como um nódulo de rápido crescimento, de coloração preta a azulada, ou avermelhada, podendo apresentar ulcerações e hemorragias associadas. É

frequentemente diagnosticado num estágio mais avançado e apresenta um pior prognóstico, uma vez que só apresenta uma fase de crescimento vertical ^(3, 14).

Por sua vez, o melanoma lentigo maligno representa cerca de 10% de todos os melanomas cutâneos. Desenvolve-se a partir de um lentigo maligno (melanoma *in situ*.) localizado predominantemente na face ou em outras regiões cronicamente expostas ao sol e manifesta-se com uma grande mácula pigmentada e com bordas irregulares ^(3, 14).

Por último o melanoma lentiginoso acral é o subtipo menos comum de todos os melanomas cutâneos. Surge em zonas do corpo como a região palmar, plantar e subungueal e apresenta características histopatológicas semelhantes ao melanoma lentigo maligno. Embora a sua incidência seja semelhante, independentemente do grupo étnico, nos indivíduos de pele negra, este subtipo de melanoma é mais comum comparativamente aos restantes ^(3, 14)

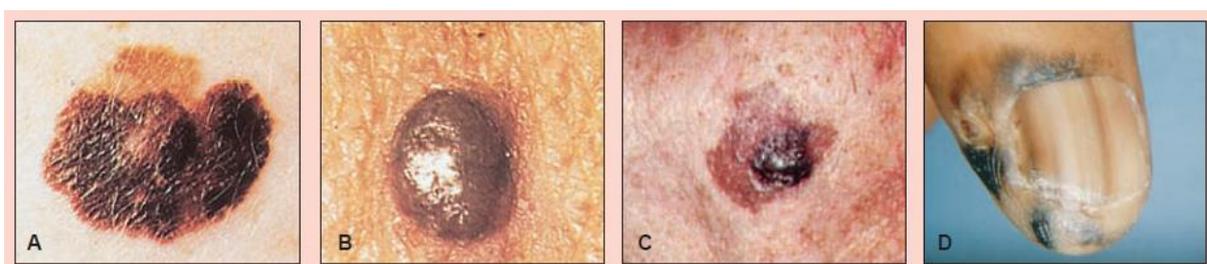


Figura I – Subtipos de melanoma cutâneo. A = melanoma extensivo superficial; B = melanoma nodular; C = melanoma lentigo maligno e D = melanoma lentiginoso acral ⁽¹⁴⁾

2.3. Diagnóstico e Estadiamento

O diagnóstico do melanoma maligno é geralmente feito através da avaliação clínica das lesões cutâneas, recurso à dermatoscopia e biópsia. O diagnóstico do melanoma através da avaliação clínica das lesões baseia-se na observação dos sinais ABCDE (A = Assimetria; B = Bordas Irregulares; C = Cor não homogénea; D = Diâmetro > 6mm e E = Evolução ⁽¹⁵⁾), contudo o diagnóstico a olho nu nem sempre é preciso, pelo que são necessários métodos de deteção mais eficazes ⁽¹²⁾. A dermatoscopia é uma técnica que permite estabelecer um diagnóstico mais preciso do melanoma, fazendo uso de um aparelho designado por dermatoscópio, que permite a ampliação das lesões cutâneas. Esta técnica pode ser adicionalmente equipada com sistemas de digitalização que permitem o armazenamento e comparação de imagens de dermatoscopia ao longo do tempo, sendo assim designada de dermatoscopia digital computadorizada, permitindo, deste modo, diagnósticos mais eficazes ^(12, 15). Contudo, uma das limitações relaciona-se com o facto de esta técnica requerer experiência por

parte do operador ⁽¹⁵⁾. Para um diagnóstico definitivo do melanoma recorre-se à análise histopatológica ou molecular da biópsia ⁽³⁾.

Apesar da importância do diagnóstico na identificação do melanoma, a avaliação do prognóstico, assim como o planeamento do tratamento do doente, requer o estadiamento do melanoma. Este é atualmente baseado no sistema TNM do *American Joint Committee on Cancer*, que inclui a classificação do melanoma nas seguintes categorias: Categoria T, na qual o melanoma é classificado com base na espessura da lesão, em milímetros e na presença ou ausência de ulceração; Categoria N, na qual o melanoma é classificado com base no número de metástases envolvidas em linfonodos regionais e na presença ou ausência de satélites, microssatélites ou metástases em trânsito e Categoria M – na qual o melanoma é classificado com base na presença ou ausência de metástases à distância e a sua localização anatómica e nos níveis de lactato desidrogenase ⁽¹⁶⁾. Esta classificação serve de base para determinar o estágio do melanoma, que varia do estágio 0 ao estágio IV. O melanoma em estágio 0 corresponde a uma lesão que está restrita à epiderme (melanoma *in situ*), sem evidência de metástases em linfonodos regionais ou presença de satélites, microssatélites e metástases em trânsito, enquanto o melanoma em estágio IV, por sua vez, indica que o melanoma desenvolveu metástases à distância, podendo ou não ter desenvolvido metástases em linfonodos regionais ou apresentar satélites, microssatélites ou metástases em trânsito ⁽¹⁷⁾.

2.4. Alterações moleculares associadas ao desenvolvimento do melanoma

O desenvolvimento do melanoma maligno resulta de um conjunto de mutações genéticas e/ou epigenéticas, em genes responsáveis por regular vários processos celulares. Estas alterações provocam a desregulação de várias vias de sinalização intracelular, envolvidas no controlo de mecanismos como a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, levando a um aumento da sinalização celular e consequentemente a uma proliferação descontrolada do melanoma ⁽¹⁸⁾.

As principais mutações envolvidas no desenvolvimento do melanoma ocorrem na via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) e na via da fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3K/AKT), que se encontram esquematicamente representadas na Figura 2 ⁽¹⁹⁾.

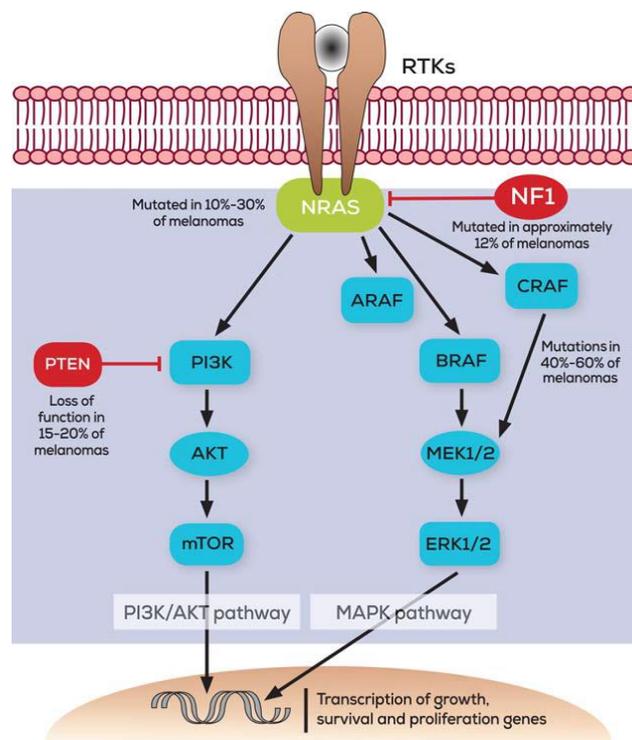


Figura 2 – Vias celulares envolvidas no desenvolvimento do melanoma ⁽¹⁹⁾

2.4.1. Alterações na via das MAPK

A via das MAPK é uma via de sinalização intracelular, responsável pelo controlo de vários processos como a embriogénese, diferenciação, proliferação celular e apoptose. Em condições normais, a ativação desta via celular ocorre em resposta a várias condições fisiológicas, através da ligação extracelular de ligandos, como por exemplo fatores de crescimento, ao recetor de tirosina quinase (RTK). Esta ligação vai induzir a ativação da proteína RAS que por sua vez vai fosforilar a RAF quinase, levando à sua ativação. A RAF quinase, uma vez ativada vai fosforilar e ativar a MEK quinase que, depois de ativada, vai fosforilar a ERK quinase. A ERK quinase, uma vez ativada, é responsável pela promoção do crescimento e diferenciação celular e pelo controlo do mecanismo de *feedback* negativo, de forma a prevenir a ativação persistente da via das MAPK. No entanto, quando existe a ocorrência de mutações a nível celular, o mecanismo de ativação desta via celular ocorre de uma maneira diferente. Nesta situação, as células não requerem a ativação habitual e o mecanismo de *feedback* negativo não existe, levando à ativação permanente da via das MAPK e conseqüentemente à proliferação celular descontrolada. As principais mutações nesta via ocorrem no gene BRAF e no gene NRAS ⁽²⁰⁾.

2.4.1.1. Mutações no gene BRAF

BRAF, também designado por homólogo B1 do oncogene viral de sarcoma murino v-raf, é um gene responsável por codificar a proteína quinase de serina/treonina B-RAF, uma proteína que, juntamente com a A-RAF e a C-RAF, constituem a família das RAF quinases ⁽²¹⁾. A presença de mutações no gene BRAF leva à ativação constitutiva da proteína B-RAF, independentemente da sinalização a montante pela proteína RAS, que vai fosforilar a MEK quinase, que uma vez ativada vai fosforilar a ERK quinase, resultando numa hiperativação da via das MAPK ⁽²²⁾.

Aproximadamente 40 a 60% dos melanomas apresentam mutações no gene BRAF, sendo a mutação mais prevalente a mutação BRAF^{V600E}, que resulta da substituição da valina pelo ácido glutâmico, no codão 600. Com menor frequência ocorrem as mutações BRAF^{V600K} (substituição da valina por lisina), BRAF^{V600R} (substituição da valina por arginina) e BRAF^{V600D} (substituição da valina por ácido aspártico) ⁽¹⁹⁾.

As mutações no gene BRAF estão mais associadas a melanomas que ocorrem na pele exposta de forma intermitente ao sol, comparativamente a melanomas que surgem na pele exposta cronicamente ao sol. Por sua vez, cerca de 80% dos nevos benignos apresentam mutações BRAF^{V600E} e, uma vez que estes geralmente são estáveis após a sua formação, existe uma certa dúvida sobre o envolvimento destas mutações no desenvolvimento do melanoma a partir dos nevos pré-existentes. Estudos adicionais revelaram que estas mutações são pouco frequentes em melanomas *in situ*, em fase de crescimento radial, e muito frequentes em melanomas em fase de crescimento vertical, o que demonstra que as mutações no gene BRAF, por si só, não são suficientes para induzir a formação do melanoma, mas que por sua vez estão envolvidas no crescimento e na progressão tumoral.

Deste modo o desenvolvimento do melanoma envolve a cooperação entre as mutações no gene BRAF e outras mutações ⁽²²⁾.

2.4.1.2. Mutações no gene NRAS

NRAS é um dos três proto-oncogenes da família RAS, juntamente com KRAS e HRAS, sendo responsável pela regulação da proliferação e apoptose celular ⁽²²⁾. As mutações no gene NRAS resultam na ativação constitutiva da proteína NRAS, levando à ativação não só da via das MAPK, como também da via da PI3K/AKT, resultando no aumento do crescimento e proliferação celular. Estas mutações ocorrem geralmente no codão 61 e com menor frequência nos codões 12 e 13, e estão presentes em aproximadamente 10 a 30% dos melanomas ^(19, 22). À semelhança do que acontece com o gene BRAF, as mutações no gene NRAS encontram-se

igualmente presentes nos nevos benignos, pelo que estas mutações não estão envolvidas na iniciação do melanoma. No entanto, embora o gene NRAS e o gene BRAF estejam presentes na mesma via de sinalização, a presença simultânea destas duas mutações raramente é encontrada no mesmo doente. De acordo com uma análise feita a tumores primários e tumores metastizados, os tumores metastizados apresentaram uma incidência mais elevada de mutações em BRAF e em NRAS, em relação aos tumores primários, sugerindo que estas duas mutações na via das MAPK estão envolvidas na progressão do melanoma primário para o melanoma metastático ⁽¹²⁾.

Outra mutação associada ao aumento da atividade do gene RAS ocorre no gene da neurofibromina I (NFI). Este gene sintetiza uma proteína responsável por diminuir a atividade do gene RAS, pelo que a presença de mutações no gene NFI vai resultar num aumento da atividade da proteína RAS e consequentemente à ativação constitutiva da via das MAPK e da via PI3K/AKT ⁽²³⁾. Este tipo de mutação ocorre em aproximadamente 12% dos melanomas ⁽¹⁹⁾.

2.4.2. Alterações na via da PI3K/AKT

A via da PI3K/AKT é também uma via de sinalização intracelular envolvida no desenvolvimento do melanoma maligno. Em condições normais, a ativação desta via celular é iniciada pela ativação do RTK por ligandos extracelulares. Esta ligação vai induzir a ativação da proteína RAS que, por sua vez, vai ativar a via da PI3K/AKT, através da ativação sequencial das PI3K, AKT e mTOR quinases ⁽¹⁹⁾. Tal como acontece com a via das MAPK, a ativação constitutiva da via da PI3K/AKT resulta no aumento da proliferação celular e consequentemente no desenvolvimento do melanoma. A ativação constitutiva desta via celular ocorre não só como resultado da presença de mutações genéticas no gene PI3K e no gene AKT, mas também devido à presença de mutações no gene RAS, elevada expressão de ligandos do RTK, mutações no RTK (ex: KIT) e mutações no gene PTEN, um gene supressor de tumor que codifica uma proteína responsável pela inativação da via da PI3K/AKT, e que se encontra alterado em aproximadamente 15 a 20% dos melanomas ^(12, 19).

3. Terapia Convencional do Melanoma

O melanoma maligno, devido às suas características como elevada heterogeneidade, capacidade de evasão ao sistema imunitário e desenvolvimento de resistências a vários fármacos ⁽²⁴⁾, apresenta atualmente bastantes desafios no que respeita ao seu tratamento, apesar dos progressos significativos verificados nos últimos anos ⁽²⁵⁾.

O melanoma, quando diagnosticado e tratado nos seus estágios iniciais, apresenta uma capacidade de recuperação muito boa. Porém quando detetado numa fase tardia, este pode crescer profundamente na pele, invadir a corrente sanguínea e o sistema linfático e desenvolver metástases em outros locais do corpo, sendo extremamente difícil de tratar, apresentando um mau prognóstico ⁽²⁶⁾. A cirurgia constitui o tratamento de primeira linha para doentes que apresentam melanoma localizado, diagnosticado precocemente, e pode envolver a excisão local da lesão, a linfodectomia e a biópsia do gânglio sentinela. A lesão é extraída, juntamente com algum tecido circundante não afetado, de acordo com determinadas margens de segurança, de forma a assegurar que todo o tecido afetado é removido ^(21, 27). As margens de segurança variam de acordo com a espessura do tumor e incluem margens de 0,5, 1 e 2 cm para melanomas *in situ*, melanomas com espessura até 2 mm e melanomas com espessura superior a 2 mm, respetivamente ⁽²⁾. Por sua vez o melanoma metastático é mais agressivo e difícil de tratar. Nesta situação outras opções de tratamento devem ser combinadas com a cirurgia incluindo a quimioterapia, radioterapia, terapia fotodinâmica, terapia dirigida e imunoterapia ⁽⁴⁾.

Vários fármacos têm sido aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos para o tratamento do melanoma maligno, durante os últimos anos. A dacarbazina foi o primeiro fármaco a ser aprovado, seguido do interferão (IFN) α -2b e da interleucina-2 (IL-2). Posteriormente outros fármacos foram sendo aprovados incluindo o peginterferão (Peg-IFN) α -2b, inibidores seletivos (vemurafenib, dabrafenib e trametinib), anticorpos (ipilimumab, nivolumab e pembrolizumab), terapias dirigidas combinadas (dabrafenib com trametinib e cobimetinib com vemurafenib) e o talimogene laherparepvec (Figura 3) ⁽²⁾. Estes fármacos serão abordados com maior detalhe nas secções que se seguem.

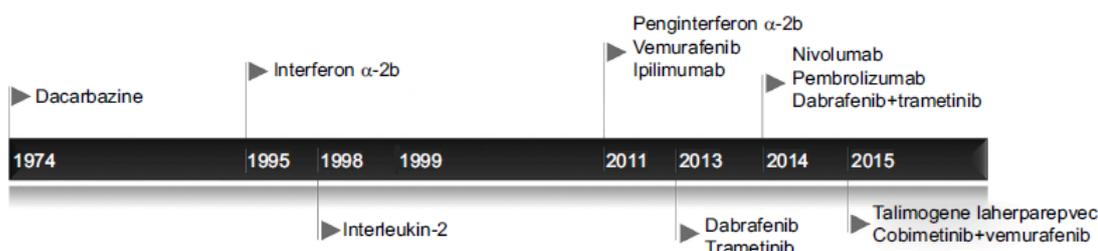


Figura 3 – Fármacos aprovados pela FDA para o tratamento do melanoma ⁽²⁾

3.1. Quimioterapia

A quimioterapia consiste na administração de fármacos que têm como objetivo destruir as células cancerígenas ⁽¹¹⁾. Estes fármacos incluem a dacarbazina, a temozolomida (um análogo da dacarbazina), as nitrosoureas (carmustina, lomustina, fotemustina), os alcaloides da vinca (vincristina, vimblastina, vindesina), os compostos de platina (cisplatina, carboplatina), os taxanos (paclitaxel, docetaxel), entre outros ^(28, 29). De todos os fármacos anteriormente descritos, a dacarbazina é, até ao momento, o único agente quimioterápico aprovado pela FDA para o tratamento do melanoma maligno ⁽³⁰⁾. A dacarbazina é um agente alquilante, derivado do triazeno, cujo mecanismo de ação se baseia na alquilação do DNA, levando à formação de ligações cruzadas dentro e entre as hélices da dupla cadeia de DNA, provocando a desnaturação e consequente perda da função celular, destruindo a célula tumoral ^(31, 32) (Figura 4). A dacarbazina é administrada por via intravenosa ⁽²⁹⁾ e para exercer a sua atividade antitumoral, requer ativação metabólica pelo citocromo P50, de forma a originar o seu metabolito ativo ⁽³¹⁾.

A dacarbazina pode ser administrada isoladamente ou em combinação com outros agentes quimioterápicos. Várias combinações que incluem a dacarbazina como a combinação cisplatina-vimblastina-dacarbazina (conhecido como “Regime CVD”) e a combinação decarbazina-carmustina-cisplatina-tamoxifeno (conhecido como “Regime de Dartmouth”) ⁽²⁶⁾ foram testadas e comparadas com a administração da dacarbazina isoladamente, não demonstrando melhorias na sobrevida global em relação à dacarbazina utilizada isoladamente, estando associadas a um aumento da toxicidade ^(29, 33).

Por sua vez, a temozolomida é um análogo da dacarbazina que é administrado por via oral, e que, contrariamente a esta, não necessita de ativação metabólica pelo citocromo P50 para exercer a sua ação antitumoral, uma vez que esta ocorre espontaneamente em pH fisiológico ^(29, 30). Uma vez que consegue atravessar a barreira hematoencefálica, a temozolomida é utilizada na prevenção e tratamento de metástases cerebrais ⁽³⁰⁾. Vários estudos demonstraram não existir diferenças significativas relativamente à taxa de resposta e sobrevida global entre a dacarbazina e o seu análogo e, por este motivo, a temozolomida não foi aprovada pela FDA ^(29, 33), sendo a escolha entre os dois fármacos baseada consoante a via de administração preferencial, custos, disponibilidade e presença de metástases cerebrais ⁽³⁰⁾.

Outros fármacos como os alcaloides da vinca, taxanos, nitrosoureas e compostos de platina foram investigadas no tratamento do melanoma, contudo não demonstraram benefícios significativos na sobrevida global comparativamente à dacarbazina ⁽²¹⁾.

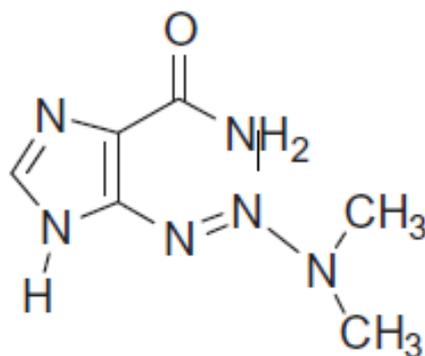


Figura 4 – Estrutura molecular da dacarbazina ⁽³²⁾

3.2. Radioterapia

A radioterapia consiste na utilização de radiação de elevada energia, com o objetivo de destruir as células cancerígenas ⁽¹¹⁾. A radioterapia pode ser externa, quando uma fonte externa de radiação é usada para direcionar feixes de elevada energia para o tumor, ou interna, quando a radiação é direcionada internamente até ao local do tumor, com o auxílio de vários instrumentos ⁽²¹⁾. Este método de tratamento é utilizado na eliminação de lesões melanocíticas presentes na região da nasofaringe, nasossinusal e oral, quando a excisão local através da cirurgia não é a melhor opção ⁽²⁸⁾. A radioterapia pode também ser utilizada no caso da presença de metástases ósseas e cerebrais ⁽³⁾.

3.3. Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é um método de tratamento pouco invasivo, utilizado no tratamento do melanoma maligno, que utiliza três elementos essenciais: uma substância fotossensibilizante, uma fonte de luz de comprimento de onda específico e o oxigénio molecular. Este mecanismo envolve inicialmente a absorção de radiação de comprimento de onda específico por parte da substância fotossensibilizante que passa de um estado de menor energia para um estado excitado (singleto), podendo posteriormente transitar para um estado de maior energia (triplete) ⁽¹³⁾. A substância fotossensibilizante no estado tripleto, por sua vez pode originar a formação de ROS, através de dois mecanismos: o mecanismo do tipo I que envolve a reação da substância fotossensibilizante com diferentes substratos, levando à formação de radicais livres que interagem com o oxigénio molecular, levando à formação do anião superóxido, uma ROS, e o mecanismo do tipo II que envolve a transferência de energia da substância fotossensibilizante no estado tripleto para o oxigénio molecular, levando à formação

do oxigênio singlete, uma ROS extremamente reativa ^(13, 27). As ROS formadas induzem danos oxidativos em várias estruturas celulares como lípidos, proteínas e ácidos nucleicos que por sua vez desencadeiam três mecanismos biológicos: (1) morte celular direta por necrose, apoptose ou autofagia, (2) isquemia tumoral após lesão vascular induzida pela substância fotossensibilizante e (3) ativação do sistema imunológico contra antígenos tumorais ⁽¹³⁾.

3.4. Terapia Dirigida

A terapia dirigida consiste no desenvolvimento de agentes capazes de interagir especificamente com moléculas envolvidas no crescimento e proliferação do tumor. Deste modo, a terapia dirigida oferece um tratamento personalizado, na medida em que cada doente recebe o tratamento baseado no perfil genético do seu tumor ⁽³⁴⁾.

A descoberta do envolvimento da via das MAPK no desenvolvimento do melanoma, nomeadamente a existência de mutações ao nível do gene BRAF, resultou na investigação de vários inibidores seletivos da proteína B-RAF mutante que, posteriormente, resultou na aprovação de dois fármacos pela FDA para o tratamento do melanoma maligno, o vemurafenib e o dabrafenib ⁽²⁾. Estes dois fármacos ligam-se ao local ativo da proteína quinase B-RAF, apresentando uma maior especificidade para inibir as proteínas que apresentam mutações BRAF^{V600}. A inibição da proteína B-RAF pelo vemurafenib e o dabrafenib em doentes que possuem mutações BRAF^{V600} resulta na paragem do ciclo celular, diminuição da proliferação e aumento da apoptose. Estes fármacos, comparativamente à quimioterapia, demonstraram apresentar melhores resultados no que respeita à taxa de resposta e sobrevida global. No entanto, o desenvolvimento de resistências é um efeito que ocorre na maioria dos doentes que utilizam estes inibidores em monoterapia, devido à reativação da via das MAPK por outros mecanismos ⁽¹⁹⁾. Estes mecanismos incluem (1) mutações no gene MEK resultando na ativação constitutiva da ARK quinase; (2) mutações ativas no gene NRAS que conduzem à ativação do gene CRAF que por sua vez resultam num aumento da sinalização pelas MEK e ARK quinases e (3) *splicing* alternativo do gene BRAF, resultando na formação de variantes que não possuem o domínio de ligação da proteína RAS, levando à sinalização constitutiva das MEK e ERK quinases ^(19, 23). Deste modo, uma das estratégias para superar as resistências encontradas com a utilização dos inibidores da BRAF quinase isoladamente, consiste na combinação de inibidores da BRAF e da MEK quinase. Dois fármacos inibidores da MEK quinase foram aprovados pela FDA para o tratamento do melanoma maligno: o trametinib e o cobimetinib. Várias combinações de inibidores da BRAF quinase com inibidores da MEK quinase foram testadas em vários ensaios

clínicos de fase 3 e comparados com a administração isolada de inibidores da BRAF quinase. Os resultados desses ensaios demonstraram que a terapia combinada dabrafenib + trametinib e vemurafenib + cobimetinib apresentaram taxas de resposta mais elevadas e sobrevida livre de progressão e sobrevida global melhoradas, comparativamente à administração isolada de inibidores da BRAF quinase. Isto levou à aprovação pela FDA destas terapias combinadas no tratamento do melanoma maligno ⁽¹⁹⁾.

Outros fármacos como inibidores do recetor CKIT, inibidores do recetor do fator de crescimento endotelial (VEGFR), inibidores da via da PI3K/AKT/mTOR e inibidores da quinase dependente de ciclina (CDK) encontram-se atualmente em ensaios clínicos. Na Figura 5 encontram-se representadas as terapias dirigidas aprovadas pela FDA no tratamento do melanoma maligno, em fundo branco e as sujeitas a ensaios clínicos em fundo cinzento ⁽²⁾

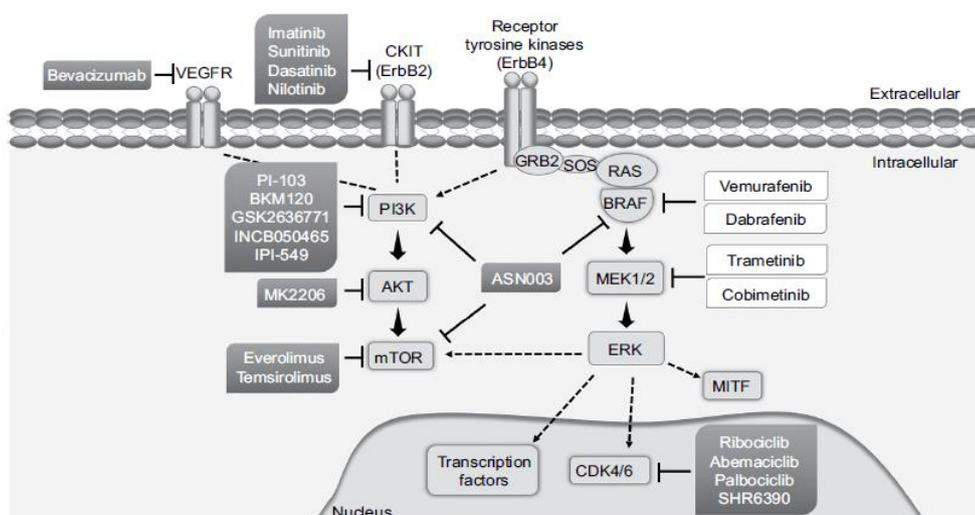


Figura 5 – Terapias dirigidas aprovadas pela FDA e terapias dirigidas sujeitas a ensaios clínicos ⁽²⁾

3.5. Imunoterapia

A descoberta do envolvimento do sistema imunitário, na transformação e regressão do melanoma, resultou na descoberta e posterior aprovação de várias imunoterapias que têm como objetivo potenciar a resposta imune contra o melanoma, permitindo uma melhoria da resposta imune dos doentes com este tipo de patologia e um aumento da depuração das células cancerígenas ^(25, 30). Várias imunoterapias foram aprovadas pela FDA para o tratamento do melanoma maligno e encontram-se representadas na Figura 6 ⁽²⁾.

O IFN α -2b foi o primeiro fármaco em imunoterapia a ser aprovado pela FDA para o tratamento do melanoma maligno. Os IFNs são citocinas responsáveis pela ativação de várias células do sistema imunitário incluindo os linfócitos T citotóxicos, os linfócitos B, as células *natural killer* (NK) e as células dendríticas e pela inibição de células com ação imunossupressora incluindo os linfócitos T reguladores e as células supressoras derivadas de células mieloides. Deste modo o IFN α -2b desempenha um papel fundamental na imunomodulação, induzindo a estimulação de várias células imunológicas, inibindo, deste modo, a proliferação das células tumorais do melanoma. O Peg-IFN α -2b é um fármaco que resulta da combinação do IFN α -2b com uma molécula de propilenoglicol (PEG), resultando em um aumento do tempo de circulação do fármaco na corrente sanguínea, melhorando a sua eficácia terapêutica, sendo aprovado pela FDA para o tratamento do melanoma maligno ⁽²⁾.

A IL-2 é outro fármaco aprovado pela FDA para o tratamento do melanoma maligno, responsável pela estimulação e proliferação de vários subtipos de população dos linfócitos T ⁽³³⁾. Os linfócitos T citotóxicos são células envolvidas na resposta antitumoral, responsáveis pelo reconhecimento de antígenos específicos do tumor, que uma vez ativadas sofrem proliferação e diferenciação, adquirindo capacidade de destruir as células tumorais que apresentem estes antígenos. Vários mecanismos de sinalização estimuladores e inibitórios estão envolvidos no controlo da resposta antitumoral mediada pelos linfócitos T ⁽²⁾.

O antígeno associado a linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4) é um regulador negativo da resposta antitumoral mediada pelos linfócitos T citotóxicos. Na resposta antitumoral, as células apresentadoras de antígenos (APC) são responsáveis pela apresentação de antígenos tumorais aos linfócitos T citotóxicos, através dos complexos major de histocompatibilidade e uma segunda proteína de superfície, a proteína B7, presente nas APC atua como uma molécula co-estimuladora na ativação dos linfócitos T citotóxicos. A proteína de superfície CTLA-4 presente nos linfócitos T citotóxicos compete com a molécula CD28 na ligação com a proteína B7, sendo que a ligação da proteína CTLA-4 com a proteína B7 inibe a proliferação dos linfócitos T citotóxicos e, conseqüentemente, a libertação de citocinas estimuladoras, resultando no aumento da tolerância das células tumorais do melanoma à resposta imune ⁽³³⁾. Deste modo, uma das estratégias consiste na inibição da proteína CTLA-4 de forma a aumentar a resposta imune ao tumor. Neste sentido, surgiu o ipilimumab, um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 aprovado pela FDA para o tratamento do melanoma ⁽²⁾.

Outro regulador negativo da resposta imune mediada pelos linfócitos T citotóxicos é a proteína de morte celular programada I (PD-I). PD-I é uma proteína transmembranar expressa na superfície celular dos linfócitos T CD4 e CD8, das células NK e das células dendríticas e que

apresentam afinidade para os ligantes PDL-1 a PDL-2, presentes em diferentes estruturas celulares. No entanto, os ligantes PDL-1 e PDL-2 encontram-se igualmente expressas nas células tumorais o que favorece a sua interação com os linfócitos T citotóxicos ⁽³⁴⁾. Uma vez que esta ligação leva à supressão da ativação dos linfócitos T citotóxicos, a inibição da PD-1 constitui uma estratégia para aumentar a atividade dos linfócitos T citotóxicos. Dois anticorpos anti-PD-1 foram aprovados pela FDA para o tratamento do melanoma maligno incluindo o nivolumab e o pembrolizumab ⁽²⁾.

Outra estratégia terapêutica relacionada indiretamente com a imunoterapia consiste na utilização de vírus oncolíticos. O talimogene laherparepvec (T-VEC) é um vírus oncolítico, aprovado pela FDA para o tratamento do melanoma maligno, consistindo em um vírus herpes simplex do tipo I geneticamente modificado. Este vírus, após ser injetado, entra nas células tumorais e replica-se, levando à lise celular com consequente libertação de antígenos tumorais capazes de serem reconhecidos pelas APC, levando à resposta antitumoral mediada pelos linfócitos T citotóxicos ⁽²⁾.

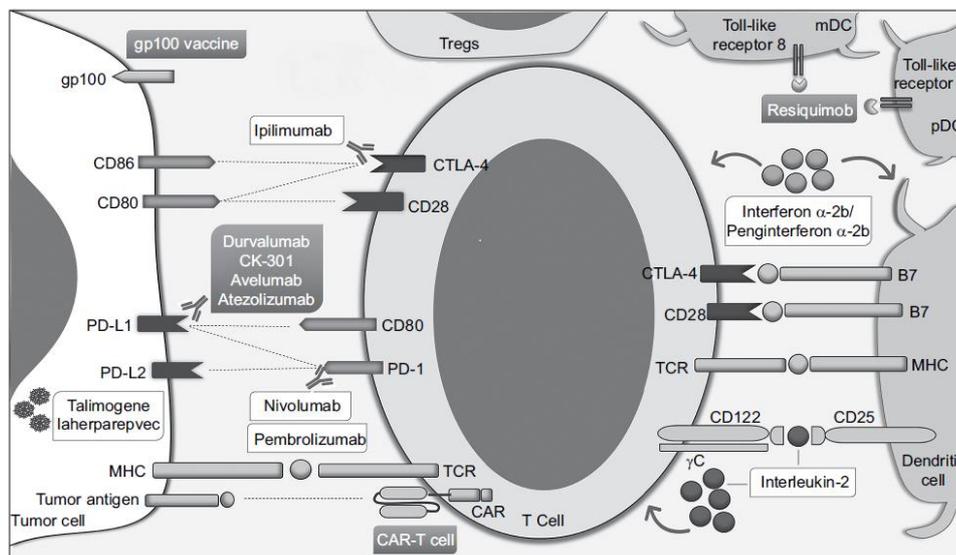


Figura 6 – Imunoterapias aprovadas pela FDA (fundo branco) e sujeitas a ensaios clínicos (fundo cinzento) no tratamento do melanoma maligno ⁽²⁾

4. Nanotecnologia e a sua associação com a terapia anticancerígena

A nanotecnologia consiste no *design*, desenvolvimento, caracterização e aplicação de estruturas, sistemas e dispositivos à escala nanométrica, isto é, numa escala de 1 a 100 nm, embora este limite possa ser estendido até aos 1000 nm. Estas propriedades, associadas à possibilidade de modelação das suas características, despertam o interesse da aplicação da nanotecnologia, ao nível da medicina (assim designada por nanomedicina), em particular, na prevenção, no diagnóstico e no tratamento de doenças, entre elas, as doenças oncológicas⁽³⁵⁾.

Deste modo, e ao nível do tratamento do melanoma maligno, a nanotecnologia pode ser uma estratégia utilizada para superar as limitações terapêuticas frequentemente encontradas nas terapias convencionais. Através do desenvolvimento de vários sistemas de transporte de fármacos à escala nanométrica é possível maximizar a biodistribuição dos fármacos, através da produção de nanossistemas com tamanho e características de superfície ideais; proteger e solubilizar o fármaco a ser administrado, permitindo deste modo aumentar o seu tempo de circulação na corrente sanguínea, reduzir a sua captação pelo sistema imunitário, melhorar a disponibilidade do fármaco no local de ação e reduzir o seu metabolismo; vetorizar seletivamente o fármaco para o tumor, permitindo aumentar a especificidade e eficácia dos fármacos, aumentar a sua concentração no local de ação e diminuir a sua toxicidade e incorporar vários fármacos simultaneamente, permitindo diminuir a dose de cada um dos fármacos administrados isoladamente e deste modo reduzir os efeitos colaterais^(35, 36).

Para tal os nanossistemas devem possuir determinadas características que permitam fornecer diretamente o fármaco às células tumorais, mantendo as células normais intactas e por sua vez devem ser biocompatíveis com o meio interno de forma a evitar o desencadeamento de respostas imunes indesejadas, preservando a sua atividade. De forma a conseguir alcançar estas propriedades, várias estratégias de vetorização e vários fatores como o tamanho dos nanossistemas, carga e características de superfície devem ser considerados no desenvolvimento dos nanossistemas. Estas características serão descritas com maior detalhe nas secções que se seguem⁽³⁶⁾.

4.1. Vetorização dos nanossistemas

A vetorização, no contexto da nanotecnologia refere-se à localização específica dos nanossistemas no local de ação. A vetorização de fármacos através do auxílio de vários sistemas de transporte de fármacos à escala nanométrica permite concentrar elevadas quantidades de fármaco no local de ação, facilitar a captação e internalização dos nanossistemas pelas células

tumorais e evitar a sua distribuição para outros tecidos que não as células tumorais, reduzindo deste modo os seus efeitos colaterais. A vetorização do fármaco para o local do tumor pode ocorrer através de dois mecanismos: vetorização passiva e vetorização ativa ^(37, 38).

A vetorização passiva ocorre devido às propriedades bioquímicas dos nanossistemas em combinação com o efeito *enhanced permeability and retention* (EPR). O efeito EPR ocorre como resultado das características fisiopatológicas encontradas no tumor nomeadamente a elevada densidade vascular e a existência de um epitélio vascular fenestrado (onde as fenestrações entre as células endoteliais adjacentes podem ir até aos 800 nm), que resulta numa diminuição da drenagem linfática, permitindo aos nanossistemas entrar no espaço extravascular dos tumores e permanecer no local de ação, aumentando assim o seu efeito antitumoral, como é possível verificar na Figura 7 ^(1, 38).

A vetorização ativa, por sua vez, refere-se às ligações específicas que se estabelecem entre os nanossistemas e o tumor, através da conjugação de ligandos como peptídeos, anticorpos, polímeros e outras moléculas de pequena dimensão, à superfície dos nanossistemas, capazes de interagir especificamente com recetores ou moléculas altamente expressas nas células tumorais. Este tipo de vetorização permite uma interação melhorada entre os nanossistemas e as células tumorais e um aumento da internalização do fármaco através da endocitose mediada por recetores. Deste modo a seleção de um ligando ideal é fundamental, de forma a permitir que os nanossistemas sejam apenas direcionados para as células tumorais, evitando as células normais, reduzindo deste modo os efeitos colaterais dos fármacos ^(1, 37).

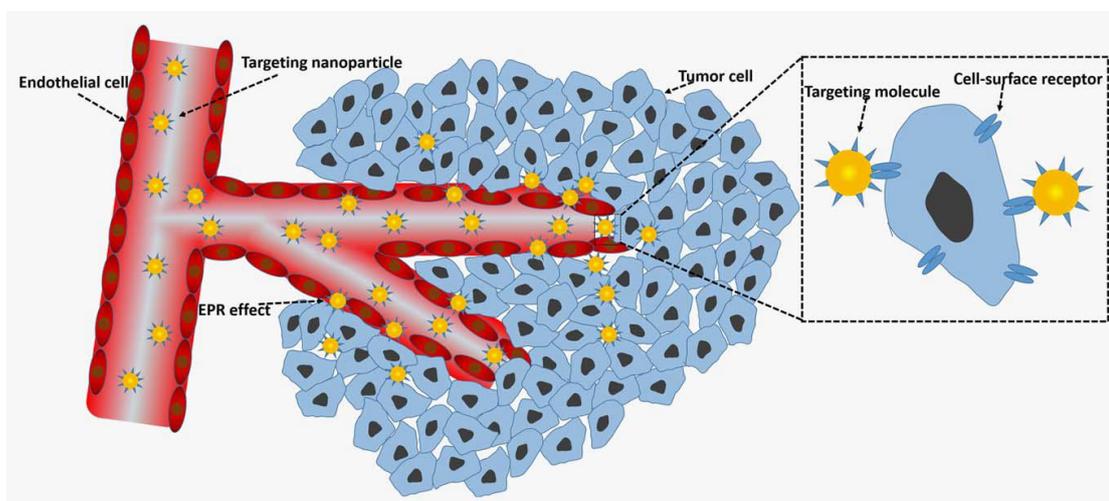


Figura 7 – Ilustração que representa o efeito EPR, com consequente acumulação das nanopartículas no local do tumor ⁽³⁸⁾

4.2. Características dos Nanossistemas

Vários fatores como as características físicas e químicas dos nanossistemas, incluindo o tamanho, a carga, as características da superfície, entre outros, desempenham individualmente um papel importante na biodistribuição *in vivo* e na internalização celular dos nanossistemas ⁽³⁹⁾.

As características de superfície desempenham um papel fundamental na biodistribuição e no tempo de permanência dos nanossistemas no organismo. Quando os nanossistemas atingem a corrente sanguínea, um dos principais obstáculos que estes atravessam é a sua captação pelo sistema reticuloendotelial (RES). O sistema RES é formado por um conjunto de células fagocíticas (ex: macrófagos) que desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra partículas estranhas que circulem na corrente sanguínea. No sangue, ocorre a adsorção de proteínas plasmáticas denominadas opsoninas à superfície dos nanossistemas, tornando-os mais suscetíveis à sua eliminação pelo RES. Deste modo a modificação das características de superfície dos nanossistemas constitui uma estratégia para escapar à opsonização, permitindo prolongar o seu tempo de permanência no sangue. Uma das estratégias para escapar ao RES consiste em revestir os nanossistemas com polímeros hidrofílicos, como por exemplo o PEG ^(39, 40).

Por sua vez, a carga de superfície desempenha igualmente um papel crítico no tempo de semi-vida dos nanossistemas e na internalização celular. Partículas de carga positiva podem reagir com a carga negativa das proteínas plasmáticas (ex: albumina) resultando na formação de uma coroa de proteína, levando à formação de complexos de maiores dimensões capazes de serem reconhecidos pelo sistema imune, resultando na sua eliminação e conseqüentemente diminuição do efeito terapêutico dos nanossistemas. Deste modo, os nanossistemas carregados positivamente são mais facilmente captados pelo RES comparativamente aos nanossistemas que apresentam carga neutra ou carga ligeiramente negativa, mas por sua vez são mais facilmente internalizados relativamente aos nanossistemas com carga neutra ou ligeiramente negativa, devido à ligação eletrostática que se estabelece entre a carga positiva dos nanossistemas e a carga negativa da membrana celular ^(39, 40).

Por fim o tamanho dos nanossistemas é um parâmetro fundamental, influenciando a biodistribuição dos nanossistemas. Antes de atingirem o local do tumor, os nanossistemas precisam de circular na corrente sanguínea, atravessar várias barreiras biológicas e escapar à *clearance* renal e hepática. Os rins são capazes de eliminar rapidamente as moléculas presentes no sangue através das fenestrações capilares presentes. Vários estudos sugerem que os nanossistemas devem possuir um tamanho inferior a 10 nm para prevenir a sua eliminação renal

e por sua vez não devem possuir um tamanho superior a 200 nm para prevenir a sua filtração pelo baço ^(39, 40).

4.3. Tipos de Nanossistemas

Vários tipos de nanossistemas têm sido estudados no tratamento do melanoma maligno incluindo os lipossomas, dendrímeros, micelas poliméricas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas, entre outros ⁽³⁵⁾.

4.3.1. Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas, de tamanho e forma bem definidos, constituídos por uma fase externa formada por uma bicamada fosfolipídica e uma fase interna formada por um compartimento aquoso. Estas características conferem aos lipossomas propriedades anfífilas, permitindo a incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos. O compartimento aquoso é utilizado para a encapsulação de fármacos solúveis em água e a bicamada fosfolipídica para a incorporação de fármacos lipofílicos ou anfífilos. Os lipossomas apresentam a vantagem de poderem ser funcionalizados, através da conjugação de ligandos e/ou polímeros à superfície destes sistemas, permitindo aumentar a eficiência de entrega dos fármacos e prolongar o seu tempo de circulação na corrente sanguínea. Uma das estratégias consiste na adição de polímeros hidrofílicos como o PEG à superfície dos lipossomas, permitindo a estes sistemas escapar do sistema RES (“lipossomas *stealth*”) ^(28, 35). Os lipossomas têm sido utilizados para transportar vários fármacos quimioterápicos, imunocitocinas e RNA de interferência (siRNA) para aumentar a eficácia do tratamento do melanoma, em vários ensaios clínicos ⁽⁴¹⁾.

4.3.2. Dendrímeros

Os dendrímeros são macromoléculas monodispersas, de estrutura tridimensional e altamente ramificados. São constituídos por um núcleo central e uma camada externa contendo vários grupos funcionais que permitem a conjugação de fármacos hidrofílicos ou lipofílicos, ácidos nucleicos e agentes de imagiologia, quer no núcleo central quer na camada externa. Várias modificações químicas adicionais como a conjugação com o PEG ou a adição de ligandos podem ser realizadas para modificar as propriedades bioquímicas destes sistemas, permitindo diminuir a toxicidade e melhorar o direcionamento destes sistemas ^(35, 36, 39).

4.3.3. Micelas poliméricas

As micelas poliméricas são sistemas formados por duas ou mais cadeias poliméricas com diferentes solubilidades, que se organizam espontaneamente para formar uma estrutura micelar. As cadeias hidrofóbicas constituem o núcleo, de forma a minimizar o seu contato com o meio aquoso, sendo utilizados para a incorporação de fármacos hidrofóbicos, enquanto as cadeias hidrofílicas se situam na periferia, em contato com a água. Devido ao seu tamanho reduzido comparativamente aos lipossomas, estes apresentam um tempo de circulação curto. Porém como apresentam um tamanho que varia dos 10 aos 80 nm, estes sistemas são mais facilmente captados pelos tumores, devido ao efeito EPR. Estes sistemas podem ser funcionalizados através da ligação de ligandos, como anticorpos, péptidos, ácidos nucleicos e moléculas de pequena dimensão, permitindo aumentar ainda mais a eficácia e especificidade destes sistemas ⁽³⁵⁾.

4.3.4. Nanopartículas

As nanopartículas são definidas como partículas cujo tamanho varia de 1 a 100nm e incluem as nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas sólidas e os transportadores lipídicos nanoestruturados) e as nanopartículas poliméricas. As nanopartículas lipídicas sólidas e os transportadores lipídicos nanoestruturados são estruturas formadas a partir de lípidos no estado sólido, sendo a sua estrutura interna, o parâmetro que as distingue. Enquanto que nas primeiras a sua estrutura interna é formada apenas por lípidos no estado sólido, nas segundas a estrutura interna resulta de uma mistura de lípidos no estado sólido e no estado líquido, conduzindo a imperfeições na sua estrutura cristalina. Por sua vez, as nanopartículas poliméricas são construídas a partir de polímeros orgânicos ou inorgânicos e podem ser divididas em nanocápsulas e nanoesferas. Nas nanocápsulas o fármaco encontra-se encapsulado numa matriz polimérica bem definida, enquanto nas nanoesferas o fármaco encontra-se disperso na matriz polimérica. A encapsulação dos fármacos é feita através da mistura do fármaco com a solução polimérica. O fármaco pode estar dissolvido, disperso ou adsorvido à matriz polimérica ⁽²⁸⁾.

4.4. Associação da Nanotecnologia com as Terapias Convencionais do Melanoma

A nanotecnologia tem sido utilizada na maioria das terapias convencionais do melanoma. Foi demonstrado, em vários estudos clínicos em diferentes fases de desenvolvimento que o transporte de fármacos, através de nanossistemas na quimioterapia, imunoterapia e terapia fotodinâmica permitiu aumentar consideradamente a eficácia do tratamento do melanoma ⁽⁴¹⁾.

4.4.1. Associação da Nanotecnologia com a Quimioterapia

Como já referido anteriormente, a dacarbazina é o único agente quimioterápico aprovado pela FDA para o tratamento do melanoma maligno. Apesar de apresentar uma taxa de resposta relativamente baixa (na ordem dos 15%), não demonstrar benefícios significativos ao nível da sobrevida global e por sua vez estar associada a elevadas toxicidades, a quimioterapia continua a ser uma das terapias convencionais mais utilizadas no tratamento de vários tipos de cancro, incluindo o melanoma. Além disso, a ausência de mutações no gene BRAF em quase metade dos doentes, o facto de nem todos os doentes beneficiariam da utilização de outros tipos de tratamento e a inacessibilidade de terapias dirigidas e imunoterapias em alguns países, demonstra que a quimioterapia continua a ser essencial neste tipo de doentes ^(37, 41).

Por sua vez, outros agentes terapêuticos para além da dacarbazina, incluindo o docetaxel, paclitaxel e doxorrubicina têm sido avaliados no tratamento do melanoma maligno. Apesar de todos eles demonstrarem uma inibição significativa do crescimento do melanoma *in vitro*, a sua aplicação ao nível do melanoma é dificultada, uma vez que nem todos os doentes apresentam a mesma sensibilidade a todos os agentes quimioterápicos e, por sua vez, estes fármacos apresentam uma baixa solubilidade e estabilidade e são responsáveis por provocar toxicidade severa nas células normais. Por este motivo, o desenvolvimento de nanossistemas é essencial para ultrapassar as dificuldades relacionadas com a baixa eficiência na entrega dos fármacos no local de tumor e com os efeitos tóxicos provocados por estes tipos de terapias ⁽³⁷⁾.

Neste sentido várias nanopartículas podem ser utilizadas para veicular vários agentes quimioterápicos ao local do tumor, permitindo aumentar a eficácia do tratamento e reduzir os efeitos colaterais ⁽⁴¹⁾. A título de exemplo, Zhang e colaboradores testaram a eficácia de nanopartículas de ouro encapsuladas com doxorrubicina, em murganhos portadores de melanoma B16 e em murganhos com excertos tumorais SK-MEL-28 humanos. A doxorrubicina é um fármaco amplamente utilizado na quimioterapia, em vários tipos de cancro, cujo mecanismo de ação baseia na inibição da síntese de RNA através da ligação à RNA polimerase II e à topoisomerase II. Este estudo demonstrou que a injeção intratumoral das nanopartículas de ouro encapsuladas com doxorrubicina é mais eficaz na supressão do crescimento tumoral, em murganhos portadores de células de melanoma B16 e excertos tumorais SK-MEL-28 humanos, comparativamente à administração de doxorrubicina isoladamente (Figura 8). ⁽⁴²⁾ Por sua vez, uma das maiores limitações associadas à utilização da doxorrubicina é o desenvolvimento de resistências que ocorre em vários tipos de cancro e a cardiotoxicidade induzida por este fármaco. Neste sentido, Tawagi e colaboradores compararam a toxicidade de nanopartículas de ouro encapsuladas com doxorrubicina em células de melanoma B16 e em

cardiomiócitos em murganhos, em relação à administração isolada de doxorubicina. Este estudo revelou que os cardiomiócitos apresentaram uma maior sensibilidade à doxorubicina administrada isoladamente e que por sua vez são dramaticamente menos sensíveis às nanopartículas de ouro encapsuladas com doxorubicina. Estes sistemas permitem, portanto, superar a resistência das células cancerígenas à doxorubicina e reduzir a toxicidade deste fármaco em outros órgãos, em particular no coração ⁽⁴³⁾.

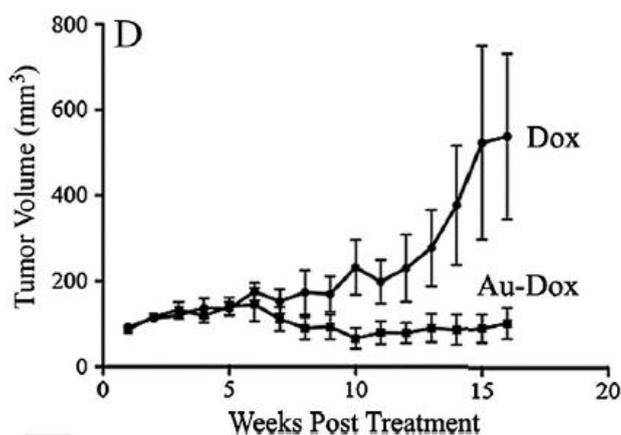


Figura 8 – Crescimento tumoral após a administração intratumoral das diferentes formulações. Dox = doxorubicina; Au-Dox = nanopartículas de ouro encapsuladas com doxorubicina ⁽⁴²⁾

4.4.2. Associação da Nanotecnologia com a Terapia Dirigida

Como já referido na secção 2.4., várias vias de sinalização intracelular desempenham um papel fundamental na carcinogénese e no prognóstico de muitos tipos de cancro, incluindo o melanoma. Entre as principais vias celulares envolvidas no desenvolvimento do melanoma encontra-se a via das MAPK e a via da PI3K/AKT ^(18,19). A identificação das principais mutações genéticas nestas vias celulares resultou no desenvolvimento e posterior aprovação de várias terapias dirigidas, incluindo o vemurafenib, o dabrafenib, o trametinib e o cobimetinib. Apesar de estas terapias apresentarem uma taxa de resposta inicial elevada e um impacto visível na sobrevivência global, o desenvolvimento de resistências é uma situação que ocorre como resultado da utilização destas terapias ⁽³⁷⁾. Por este motivo, outro tipo de estratégias terapêuticas são necessárias.

Uma das estratégias de tratamento que tem atraído cada vez mais atenção é a utilização do RNA de interferência. O RNA de interferência é uma tecnologia que envolve o silenciamento

de genes específicos, mediado pelo RNA de dupla cadeia. O RNA de dupla cadeia gera um pequeno complexo de RNA de interferência (siRNA), responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional ⁽³⁸⁾. Deste modo, uma das possíveis estratégias terapêuticas consiste na utilização de siRNA para silenciar vários genes envolvidos no desenvolvimento do melanoma maligno ⁽¹⁸⁾. Contudo, uma das limitações da utilização desta técnica relaciona-se com a baixa estabilidade do siRNA e a sua vulnerabilidade à destruição pelas nucleases ⁽³⁸⁾. Deste modo a nanotecnologia pode ser utilizada para proteger e transportar o siRNA para silenciar vários genes de várias vias celulares envolvidas no desenvolvimento do melanoma, como por exemplo a via das MAPK. A título de exemplo, Tran e colaboradores desenvolveram lipossomas para fornecer o siRNA, direcionado especificamente para as moléculas B-RAF^{V600E} e AKT3, em lesões melanocíticas presentes na pele, para retardar o desenvolvimento do melanoma. Este estudo demonstrou que a administração tópica dos lipossomas encapsulados com siRNA dirigido para as moléculas B-RAF^{V600E} e AKT3, em combinação com a utilização de ultrassons de baixa frequência permitiu diminuir o desenvolvimento de lesões melanocíticas cutâneas precoces ou prevenir a disseminação de metástases cutâneas. Por sua vez a utilização de lipossomas encapsulados com siRNA, direcionado para ambas as moléculas B-RAF^{V600E} e AKT3, permite uma maior redução do crescimento tumoral, comparativamente à administração de lipossomas encapsulados com siRNA direcionado para a molécula B-RAF^{V600E} ou de lipossomas encapsulados com siRNA direcionado para a molécula AKT3, como é possível verificar no gráfico que se segue ⁽⁴⁴⁾ (Figura 9).

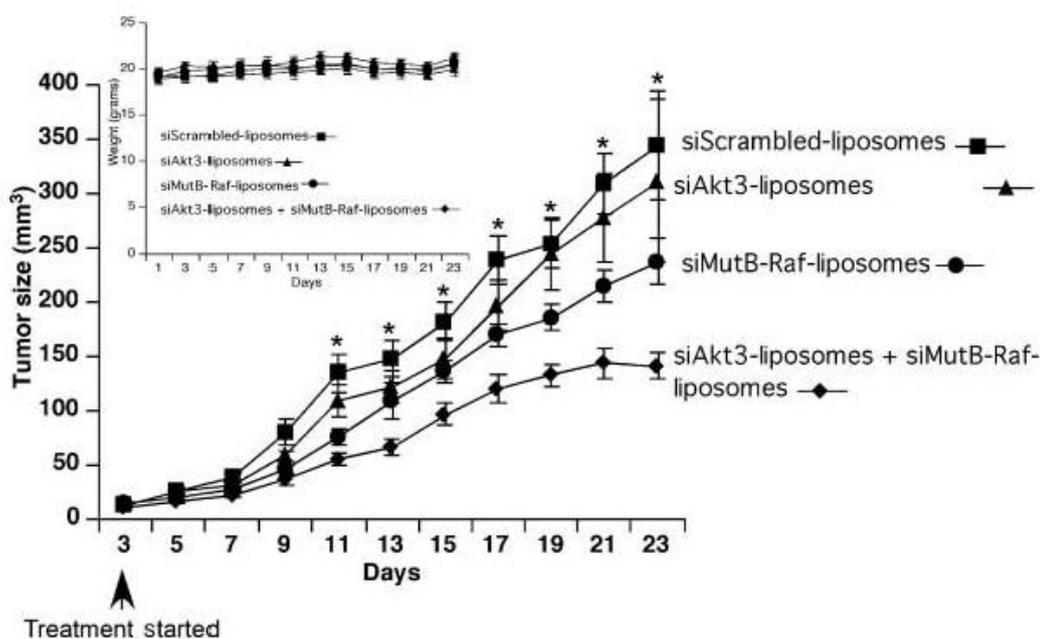


Figura 9 – Crescimento tumoral após a administração tópica das diferentes formulações ⁽⁴⁴⁾

4.4.3. Associação da Nanotecnologia com a Imunoterapia

A imunoterapia, com já referido anteriormente, permite melhorar a resposta imune dos doentes ao melanoma e aumentar a depuração das células cancerígenas danificadas por tratamentos anteriores, como a quimioterapia e a terapia dirigida. Sem um sistema imune capaz de remover as células cancerígenas danificadas, a eficácia dos tratamentos pode não ser alcançada, uma vez que estas células podem se autorregenerar e por sua vez adquirir maior malignidade ⁽⁴¹⁾.

Várias imunocitocinas aprovadas para o tratamento do melanoma, como por exemplo a IL-2, apesar de demonstrarem atividade antitumoral inicial, têm a sua ação limitada pelos efeitos colaterais graves que provocam nos tecidos normais. Neste sentido, várias nanopartículas pode ser utilizadas para transportar estes fármacos ao local do tumor, com maior especificidade, permitindo reduzir os efeitos colaterais que provocam nos tecidos normais ^(37, 41). A título de exemplo, Yao e colaboradores desenvolveram uma nanopartícula polimérica contendo IL-2 e testaram-na em murganhos com excertos de melanoma B16-F11. Estas nanopartículas foram formuladas a partir de uma polietilenimina de baixo peso molecular, ligada por uma β -ciclodextrina e conjugada com o folato e misturadas com o plasmídeo contendo o gene que codifica para a IL-2. Foi demonstrado que esta nanopartícula permitiu inibir o crescimento do tumor e prolongar a sobrevivência dos murganhos com melanoma ^(37, 45).

Mais tarde, com o grande sucesso alcançado em vários ensaios clínicos, vários inibidores de mediadores negativos da resposta imune, como o ipilimumab (anticorpo anti-CTLA-4) e o nivolumab e o pembrolizumab (anticorpos anti-PD-1), marcaram um grande avanço na terapia do melanoma. Apesar destes fármacos demonstrarem uma atividade antitumoral significativa, vários efeitos adversos graves foram relatados em quase metade dos doentes a fazer este tipo de tratamento. A procura de novas estratégias imunoterapêuticas, cada vez mais eficientes, mas com menos efeitos adversos está, cada vez mais, a ganhar grande importância. Uma das estratégias consiste, por exemplo, no direcionamento específico dos tratamentos para várias células do sistema imunitário como as células dendríticas e os linfócitos T ou vários órgãos linfoides como os linfonodos ⁽³⁷⁾. Uma vez que as células dendríticas, uma classe de APC, são responsáveis pela apresentação de antígenos aos linfócitos T, levando à sua ativação, estas células são importantes na regulação da resposta imune em vários tipos de cancro, incluindo o melanoma. Neste sentido com o desenvolvimento da nanotecnologia, uma grande variedade de nanopartículas podem ser utilizadas para transportar vários biomateriais para as células dendríticas. As nanopartículas podem transportar vários antígenos tumorais ou péptidos às células dendríticas, protegendo-os da degradação pelas proteases, permitindo aumentar a

eficiência da fagocitose destes antígenos pelas células dendríticas. Por sua vez, estas nanopartículas podem ser modificadas com ligandos específicos das células dendríticas, que lhes permitam ser reconhecidos pelas células dendríticas, melhorando a sua especificidade ⁽³⁷⁾.

4.4.4. Associação da Nanotecnologia com a Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica, devido à ausência de efeitos colaterais a longo prazo e por ser um método de tratamento pouco invasivo, representa um dos métodos de tratamento mais promissores para o cancro da pele, incluindo o melanoma ⁽³⁷⁾. As utilizações da nanotecnologia neste campo baseiam-se na melhoria da compatibilidade das substâncias fotossensibilizantes na água (uma vez que a maioria destas substâncias são hidrofóbicas), proteger a substância fotossensibilizante da sua degradação, prolongar a libertação do fármaco, melhorar a biodisponibilidade, melhorar a seletividade tumoral (através da conjugação de ligandos capazes de direcionar estas substâncias ao local do tumor), permitir uma maior penetração das substâncias em tumores mais profundos, aumentar a eficiência e reduzir os efeitos colaterais ⁽¹³⁾.

5. Conclusão

O melanoma maligno apresenta atualmente muitos desafios no que se refere ao seu tratamento, apesar dos progressos significativos verificados nos últimos anos ⁽²⁵⁾. A compreensão da patogénese do melanoma foi fundamental para o desenvolvimento de novas terapias. A caracterização das principais vias de sinalização intracelular envolvidas na oncogénese do melanoma permitiram a identificação de novos alvos para tratamentos clinicamente eficazes, como a imunoterapia e a terapia dirigida. Contudo, apesar de representarem um avanço no tratamento do melanoma, estas abordagens enfrentam vários desafios ⁽²⁾.

A utilização da nanotecnologia no tratamento do melanoma permite ultrapassar muitas das limitações terapêuticas das terapias convencionais. Vários ensaios pré-clínicos com as nanopartículas demonstraram um aumento na eficácia do tratamento do melanoma e uma redução dos efeitos colaterais. Atendendo ao sucesso verificado em tais ensaios pré-clínicos, o uso da nanotecnologia poderá ser o futuro para o tratamento do melanoma ^(38, 41).

6. Referências Bibliográficas

- (1) NAVES, L. B., DHAND, C., VENUGOPAL, J. R., RAJAMANI, L., RAMAKRISHNA, S., ALMEIDA, L. – **Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer**. *Progress in Biomaterials*, 6 (2017) 13 – 26.
- (2) DOMINGUES, B., LOPES, J., SOARES, P., POPULO, H. – **Melanoma treatment in review**. *ImmunoTargets and Therapy*, 7 (2018) 35–49.
- (3) GARBE, C., PERIS, K., HAUSCHILD, A., SAIAG, P., MIDDLETON, M., BASTHOLT, L., GROB, J., MALVEHY, J., NEWTON-BISHOP, J., STRATIGOS, A. J., PEHAMBERGER, H., EGGERMONT, A. M. – **Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016**. *European Journal of Cancer*, 63 (2016) 201 – 217.
- (4) EL-KENAWY, A. E.-M., CONSTANTIN, C., HASSAN, S. M. A., MOSTAFA, A. M., NEVES, A. F., DE ARAÚJO, T. G., NEAGU, M. – **Nanomedicine in Melanoma: Current Trends and Future Perspectives**. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, (2017) 143 – 159.
- (5) DAS, S., KHUDA-BUKHSH, A. R. – **PLGA-loaded nanomedicines in melanoma treatment: Future prospect for efficient drug delivery**. *Indian Journal of Medical Research*, 144 (2016), 181 – 193.
- (6) WADAJKAR, A. S., BHAVSAR, Z., KO, C. Y., KOPPOLU, B., CUI, W., TANG, L., NGUYEN, K. T. – **Multifunctional particles for melanoma-targeted drug delivery**. *Acta Biomaterialia*, 8 (2012), 2996 – 3004.
- (7) LEONARDI, G. C., FALZONE, L., SALEMI, R., ZANGHÌ, A., SPANDIDOS, D. A., MCCUBREY, J. A., CANDIDO, S., LIBRA, M. – **Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review)**. *International Journal of Oncology*, 5 (2018) 1071 – 1080.
- (8) BERTOLOTTO, C. – **Melanoma: From Melanocyte to Genetic Alterations and Clinical Options**. *Scientifica*, (2013) 1 – 22.
- (9) MCCOURT, C., DOLAN, O., GORMLEY, G. – **Malignant melanoma: A pictorial review**. *Ulster Medical Journal*, 83 (2014) 103 – 110.

- (10) SHAIN, A. H., BASTIAN, B. C. – From melanocytes to melanomas. *Nature Reviews Cancer*, 16 (2016) 345 – 358.
- (11) DE CARVALHO LIMA, E. N., PIQUEIRA, J. R. C., MARIA, D. A. – Advances in Carbon Nanotubes for Malignant Melanoma: A Chance for Treatment. *Molecular Diagnosis and Therapy*, 22 (2018) 703 – 715.
- (12) LIU, Y., SHEIKH, M.S. – Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *HHS Public Access*, 6 (2015) 228-
- (13) MONGE-FUENTES, V., MUEHLMANN, L. A., DE AZEVEDO, R. B. – Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma. *Nano Reviews*, 5 (2014) 24381.
- (14) CANAVAN. T., CANTRELL, W – Recognising melanoma: Diagnosis and treatment options. *The Nurse Practitioner*, 41 (2016) 24-29.
- (15) FERRIS, L. K., & HARRIS, R. J. – New Diagnostic Aids for Melanoma. *Dermatologic Clinics*, 30 (2012) 535 – 545.
- (16) GERSHENWALD, J. E., SCOLYER, R. A. – Melanoma Staging: American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th Edition and Beyond. *Annals of Surgical Oncology*, 25 (2018) 2105 – 2110.
- (17) GERSHENWALD, J. E. et. all. - Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *A Cancer Journal for Clinicians*, (2017)
- (18) INAMDAR, G. S., MADHUNAPANTULA, S. R. V., ROBERTSON, G. P. – Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail. *Biochemical Pharmacology*, 80 (2010) 624–637.
- (19) LIM, S. Y., MENZIES, A. M., RIZOS, H. – Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Cancer*, 123 (2017) 2118 – 2129.
- (20) AMARAL, T., SINNBERG, T., MEIER, F., KREPLER, C., LEVESQUE, M., NIESSNER, H., GARBE, C. – The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I – Activation

and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European Journal of Cancer*, 73 (2017) 85 – 92.

(21) LIU, Q., DAS, M., LIU, Y., HUANG, L. – Targeted drug delivery to melanoma. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 127 (2017) 208–221

(22) DAVIS, E. J., JOHNSON, D. B., SOSMAN, J. A., CHANDRA, S. – Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer*, 124 (2018) 3490 – 3499.

(23) REDDY, B. Y., MILLER, D. M., TSAO, H. – Somatic driver mutations in melanoma. *Cancer* (2017).

(24) BADEA, I. – New strategies in melanoma therapy: Can nanoparticles overcome chemoresistance? *Nanomedicine*, 12 (2017) 1623 – 1626.

(25) TYRELL, R., ANTIA, C., STANLEY, S., DEUTSCH, G. B. – Surgical resection of metastatic melanoma in the era of immunotherapy and targeted therapy. *Melanoma Management*, 4 (2017), 61 – 68.

(26) BEI, D., MENG, J., & YOUAN, B. B. C. – Engineering nanomedicines for improved melanoma therapy: Progress and promises. *Nanomedicine*, 5 (2010) 1385 – 1399.

(27) HONORS, C. N., KRUGER, C. A., & ABRAHAMSE, H. – Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: A review. *Technology in Cancer Research and Treatment*, 17 (2018) 1 – 15.

(28) RIGON, R. B., OYAFUSO, M. H., FUJIMURA, A. T., GONÇALEZ, M. L., DO PRADO, A. H., GREMIÃO, M. P. D., CHORILLI, M. – Nanotechnology-based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: A review. *BioMed Research International*, (2015) 16 – 20.

(29) MAIRA, F., CATANIA, A., CANDIDO, S., RUSSO, A. E., MCCUBREY, J., LIBRA, M., MALAPONTE, G., FENGA, C. – Molecular Targeted Therapy in Melanoma: A Way to Reverse Resistance to Conventional Drugs. *Current Drug Delivery*, 9 (2011) 17 – 29.

(30) MISHRA, H., MISHRA, P. K., EKIELSKI, A., JAGGI, M., IQBAL, Z., TALEGAONKAR, S. – Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 144 (2018) 2283 – 2302.

- (31) FOLETTO, M. C., HAAS, S. E. – **Cutaneous melanoma: New advances in treatment.** *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89 (2014) 301 – 310.
- (32) MURRAY, A. – **Decarbazine.** *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 41 (2014) 1132 – 1134.
- (33) ALGAZI, A. P., SOON, P. W., DAUD, A. – **Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects.** *Cancer Management and Research*, 2 (2010) 197 – 211.
- (34) MATTIA, G., PUGLISI, R., ASCIONE, B., MALORNI, W., CARÈ, A., MATARRESE, P. – **Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies review- Article.** *Cell Death and Disease*, 9 (2018).
- (35) DIANZANI, C. et. al. – **Drug delivery nanoparticles in skin cancers.** *BioMed Research International*, (2014).
- (36) BRYN, A. K., GOWDA, R., LORLAUX, D. B., ROBERTSON, G. P., MOSCA, P. J. – **Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy.** *Biotechnology Advances*, 34 (2016) 565 – 577.
- (37) LI, J. et. al. – **Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma.** *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11 (2015) 769 – 794.
- (38) Tang, J. Q. et. al. – **Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment.** *International Journal of Cancer*, 141 (2017), 646 – 653.
- (39) ASLAN, B., OZPOLAT, B., SOOD, A. K., LOPEZ-BERESTEIN, G. – **Nanotechnology in cancer therapy.** *Journal of Drug Targeting*, 21 (2013) 904 – 913.
- (40) PAUTU, V., LEONETTI, D., LEPELTIER, E., CLERE, N., PASSIRANI, C. – **Nanomedicine as a potent strategy in melanoma tumor microenvironment.** *Pharmacological Research*, 126 (2017) 31 – 53.
- (41) CHEN, J., SHAO, R., ZHANG, X. D., CHEN, C. – **Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics.** *International Journal of Nanomedicine*, 8 (2013) 2677 – 2688.

- (42) ZHANG, X., TEODORO, J. G., NADEAU, J. L. – Intratumoral gold-doxorubicin is effective in treating melanoma in mice. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 11 (2015) 1365 – 1375.
- (43) TAWAGI, E., MASSMANN, C., CHIBLI, H., NADEAU, J. L. – Differential toxicity of gold-doxorubicin in cancer cells vs. cardiomyocytes as measured by real-time growth assays and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). *Analyst*, 140 (2015) 5732 – 5741.
- (44) TRAN, M. A. et. al. – Targeting V600E-B-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. *Cancer Research*, 68 (2008) 7638 – 7649.
- (45) YAO, H. et. al. – Effective melanoma immunotherapy with interleukin-2 delivered by a novel polymeric nanoparticle. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10 (2011) 1082 – 1092.