



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Sara Rhaissa Rezende dos Reis

**Desenvolvimento triano de entrega de fármacos: nanopartículas
biencapsuladas com dacarbazina e ftalocianina de zinco radiomarcadas
com tecnécio-99 metaestável como nanoteranósticos para o melanoma
metastático**

Rio de Janeiro

2020

Sara Rhaisa Rezende dos Reis

Desenvolvimento de sistema troiano de entrega de fármacos: nanopartículas biencapsuladas com dacarbazina e ftalocianina de zinco radiomarcadas com tecnécio^{99m} como nanoteranósticos para o melanoma metastático

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R375 Reis, Sara Rhaissa Rezende dos.
Desenvolvimento de sistema troiano de entrega de fármacos: nanopartículas biencapsuladas com dacarbazina e ftalocianina de zinco radiomarcadas com técnico-99-metaestável como nanoteranósticos para o melanoma metastático/ Sara Rhaissa Rezende dos Reis. – 2020.
115f.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos Oliveira

Mestrado (Dissertação) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Radiofármacos - Teses. 2. Melanoma - Teses. 3. Nanopartículas - Teses. 4. Dacarbazina. 5. Fotoquimioterapia. I. Oliveira, Ralph Santos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 615.849.1

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 – 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Sara Rhaisa Rezende dos Reis

**Desenvolvimento de sistema troiano de entrega de fármacos: nanopartículas
biencapsuladas com dacarbazina e ftalocianina de zinco radiomarcadas com tecnécio^{99m}
como nanoteranósticos para o melanoma metastático**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-
Graduação em Biociências, da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 17 de junho de 2020.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Edward Helal-Neto

Instituto de Engenharia Nuclear

Rio de Janeiro

2020

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o incentivo, investimento, empenho e preocupação com as etapas de minha formação profissional e pessoal, além do carinho e apoio em todos os momentos da minha vida.

Aos meus padrinhos, por sempre me incentivarem a ir adiante na vida acadêmica, me orientando em todos os passos e me auxiliando com qualquer que fosse o necessário.

Aos meus colegas do laboratório, pela boa convivência e pelos momentos de alegria, que foram muitos e únicos, deixando essa jornada mais leve e, principalmente, pela colaboração em todas as partes em que mais precisei.

Aos meus professores e aos meus amigos, que sempre me acompanharam durante toda a caminhada e tornaram essa fase memorável.

Ao PPGGB, e a todos os professores e alunos que com ele colaboram, que de alguma forma me apoiaram e auxiliaram no decorrer do curso de pós-graduação.

À Marta, pela amizade desde o início de minha iniciação, sempre me incentivando na área da Radiofarmácia me orientando no que fosse necessário, estando sempre disponível.

Ao meu orientador, Ralph, que se tornou um grande amigo e que não mediu esforços para que eu crescesse ao longo da minha jornada, representando seu papel de orientador com maestria, não apenas de forma profissional, mas pessoal, o que resultou, de sua parte, em inúmeros conselhos, os quais levarei comigo.

À CAPES-CNPQ, pelo suporte financeiro da bolsa de mestrado durante a realização do curso de pós-graduação.

À FAPERJ, pela verba para a compra de equipamentos e insumos para a realização do projeto de pesquisa.

Por fim, agradeço imensamente a todos que me apoiaram neste trabalho, acreditaram na minha capacidade e me incentivaram a seguir em frente.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina

RESUMO

REIS, Sara Rhaissa Rezende dos. *Desenvolvimento de sistema troiano de entrega de fármacos: nanopartículas biencapsuladas com dacarbazina e ftalocianina de zinco radiomarcadas com técnico-99-metaestável como nanoteragnósticos para o melanoma metastático*. 2020. 115f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O melanoma é um câncer de pele invasivo e muito agressivo devido à sua resistência a vários medicamentos, que resulta em baixa sobrevida do paciente, sendo responsável por 80% das mortes por cânceres de pele a cada ano. Sua patogênese ainda não está totalmente elucidada, o que também justifica a alta taxa de mortalidade, adicionado à falta de alternativas eficazes de tratamento e limitações no seu diagnóstico. É necessário testar novas abordagens de tratamento para melhorar a eficácia terapêutica e reduzir os efeitos colaterais dos tratamentos convencionais. Na terapia atual, a Dacarbazina (DTIC) é o único antineoplásico aprovado pela FDA para o melanoma, entretanto sua taxa responsiva é baixa, tornando o prognóstico ruim. De modo a contornar este cenário crítico, o diagnóstico precoce e adequado do melanoma metastático é a chave principal para a sobrevida em potencial, sendo assim, a utilização de radionuclídeos como marcadores moleculares vem se destacando dentro da medicina. E, por meio do uso de nanoestruturas biocompatíveis, viabiliza-se a produção de nanofármacos capazes de agir com um elevado desempenho, em especial quanto à sua penetrabilidade e direcionamento específico, alcançando também resultados terapêuticos robustos criando uma estrutura teragnóstica. O que permitiu melhorar alternativas terapêuticas como uso de agentes fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica, através da mudança estrutural e a funcionalização de nanomaterias, capaz de realizar associações estáveis com diversos fármacos ou moléculas, o que resulta numa otimização do processo teragnóstico. No presente trabalho, foi desenvolvido um sistema de liberação de drogas de nanopartículas (NP) que transporta tanto quimioterápicos (Dacarbazina) quanto agentes fotossensibilizadores (ftalocianina de zinco) usando células de melanoma MV3 como modelo. Estudos de viabilidade celular *in vitro* demonstram que a eficácia terapêutica é dependente da dose. Os resultados *in vivo* demonstram que a carga do medicamento afeta a biodistribuição das formulações de NP. O baixo acúmulo de NPs no estômago, coração, cérebro e rins sugere que os efeitos colaterais comuns da dacarbazina podem ser reduzidos. Este trabalho relata uma formulação robusta de nanopartículas com o objetivo de alavancar os efeitos sinérgicos de quimioterapia e terapias fotodinâmicas para potencialmente suprimir a probabilidade de resistência a medicamentos e reduzir os efeitos colaterais associados à dacarbazina.

Palavras-chave: Melanoma. Radiofármacos. Nanopartículas Poliméricas. Teragnóstico. Nanotecnologia. Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

REIS, Sara Rhaisa Rezende dos. *Development of a trojan drug delivery system: biencapsulated nanoparticles with dacarbazine and zinc phthalocyanine radiolabelled with technetium-99m as nanotheragnostics for metastatic melanoma*. 2020. 115f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Melanoma is an invasive and very aggressive skin cancer due to its resistance to various drugs, which results in low patient survival, being responsible for 80% of deaths from skin cancers each year. Its pathogenesis is not yet fully elucidated, which also justifies the high mortality rate, added to the lack of effective treatment alternatives and limitations in its diagnosis. It is necessary to test new treatment approaches to improve therapeutic efficacy and reduce the side effects of conventional treatments. In current therapy, Dacarbazine (DTIC) is the only FDA-approved antineoplastic agent for melanoma, however its responsive rate is low, making the prognosis poor. In order to circumvent this critical scenario, the early and adequate diagnosis of metastatic melanoma is the main key to potential survival, therefore, the use of radionuclides as molecular markers has been highlighted within medicine. And, through the use of biocompatible nanostructures, it is possible to produce nanopharmaceuticals capable of acting with a high performance, especially regarding their penetrability and specific targeting, also achieving robust therapeutic results creating a theragnostic structure. What allowed to improve therapeutic alternatives such as the use of photosensitizing agents in photodynamic therapy, through structural change and the functionalization of nanomaterials, capable of making stable associations with various drugs or molecules, which results in an optimization of the theragnosis process. In the present work, a nanoparticle drug delivery system (NP) was developed that transports both chemotherapeutic drugs (Dacarbazine) and photosensitizing agents (zinc phthalocyanine) using MV3 melanoma cells as a model. In vitro cell viability studies demonstrate that therapeutic efficacy is dose dependent. The in vivo results demonstrate that the drug load affects the biodistribution of NP formulations. The low accumulation of NPs in the stomach, heart, brain and kidneys suggests that the common side effects of dacarbazine can be reduced. This paper reports on a robust formulation of nanoparticles with the aim of leveraging the synergistic effects of chemotherapy and photodynamic therapies to potentially suppress the likelihood of drug resistance and reduce the side effects associated with dacarbazine.

Keywords: Melanoma. Radiopharmaceuticals. Polymeric nanoparticles. Theragnosis. Nanotechnology. Photodynamic Therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estimativa de casos prevalentes em cinco anos, para todos os tumores, em ambos os sexos com idade superior a vinte anos.....	19
Figura 2 –	Estimativa de casos prevalentes em cinco anos, para todos os tumores, em ambos os sexos com idade superior a 20a, na América do Sul.....	20
Figura 3 –	As dez características do câncer, conhecidas como “hallmarks” essenciais para o desenvolvimento do tumor.....	21
Figura 4 –	Estimativa de câncer de pele melanoma para 2018-2019.....	23
Figura 5 –	Eventos envolvidos no melanoma induzidos pelos fatores ambientais e genéticos quando associados à exposição de radiações ultravioletas.....	24
Figura 6 –	Esquematização da pele.....	27
Figura 7 –	As cinco camadas constituintes da epiderme.....	28
Figura 8 –	Disposição dos melanócitos na epiderme e sua interação com outros componentes celulares.....	29
Figura 9 –	Esquema representativo das etapas envolvidas no processo da Melanogênese.....	30
Figura 10 –	Efeitos positivos ou negativos que a exposição solar pode promover, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS).....	31
Figura 11 –	Esquematização genética participante no desenvolvimento de melanoma através da via de sinalização MAPK e PI3K.....	34
Figura 12 –	Alterações morfológicas associadas à progressão do melanoma metastático, que estão relacionadas às mutações espontâneas no DNA e suas modulações epigenéticas.....	36
Figura 13 –	Esquema representativo da Terapia Fotodinâmica utilizando fotossensibilizadores encapsulados em nanopartículas para uso alvo-específico na destruição de tumores.....	42
Figura 14 –	Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica no combate à células tumorais, através de transferência de energia de um fotossensibilizador para o oxigênio molecular.....	43
Figura 15 –	Diagrama de funcionalização da superfície de nanopartículas a fim de torna-las específicas para receptores celulares, facilitando sua absorção	

	intracelular.....	48
Figura 16 –	Esquema das principais vias de endocitose de nanopartículas em células eucarióticas, por meio da internalização de partículas.....	50
Figura 17 –	Ilustração esquemática do mecanismo de retenção e permeabilidade na região tumoral pelo direcionamento passivo de nanocarreadores.....	51
Figura 18 –	Tipos de nanopartículas poliméricas.....	52
Figura 19 –	Protocolo de dupla emulsificação para produção de nanopartículas poliméricas (NPs) e encapsulação com o fármaco dacarbazina e o fotossensibilizador ftalocianina de zinco.....	56
Figura 20 –	Irradiação com laser infravermelho para modelo <i>in vitro</i> de terapia fotodinâmica, em células MV3 (melanoma), tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e vazia, e grupo controles positivo e negativo..	59
Figura 21 –	Protocolo de radiomarcção direta das nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e Vazia e marcadas com o radionuclídeo ^{99m} Tc para estudo do controle de qualidade e análises <i>in vitro e in vivo</i>	61
Figura 22 –	Desenho experimental para estudo de biodistribuição em modelo <i>in vivo</i> das nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e Vazia.....	62
Figura 23 –	Distribuição da nanopartícula polimérica encapsulada com dacarbazina e o agente fotossensibilizador (PLA/PVA/DTIC/ZnPc), analisados por DLS, caracterizando seu tamanho por intensidade de distribuição.....	64
Figura 24 –	Imagem obtida por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas PLA/PVA/DTIC/ZnPc (c); PLA/PVA/DTIC (b) e PLA/PVA (a) caracterizando seu tamanho e superfície. As imagens de (d-f) apresentam os mapas topográficos em 3D, respectivamente.....	66
Figura 25 –	Imagem obtida por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas de PLA/PVA.	66
Figura 26 –	Mapas de adesão obtido por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas de PLA/PVA/DTIC/ZnPc (c); PLA/PVA/DTIC (b) e PLA/PVA (a).....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Sobrevivência de células MV3 após tratamento por 24h, com diferentes concentrações de Np PLA/PVA/DTIC/ZnPc; PLA/PVA/DTIC e PL/PVA.....	69
Gráfico 2 –	Sobrevivência de células MV3 após tratamento por 72h, com diferentes concentrações de Np PLA/PVA/DTIC/ZnPc; PLA/PVA/DTIC e PL/PVA.....	70
Gráfico 3 –	Perfil de biodistribuição expresso em dose por órgão, das nanopartículas poliméricas nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc (NP I) e radiomarcadas com ^{99m} Tc, que são administradas por via retro-orbital em camundongos.....	71
Gráfico 4 –	Perfil de biodistribuição expresso em dose por órgão, das nanopartículas poliméricas nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC (NP II) e radiomarcadas com ^{99m} Tc, que são administradas por via retro-orbital em camundongos.....	72
Gráfico 5 –	Perfil de biodistribuição expresso em dose por órgão, das nanopartículas poliméricas nanopartículas poliméricas encapsuladas com vazia (NP III) e radiomarcadas com ^{99m} Tc, que são administradas por via retro-orbital em camundongos.....	72

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 –	Tipos de terapia, e suas drogas específicas aprovadas pela FDA, com seus mecanismos de ação correspondentes, comumente usado no tratamento do melanoma.....	39
Quadro 2 –	Radiofármacos utilizados na medicina nuclear para o diagnóstico de tumores, com suas respectivas aplicações clínicas e mecanismo de ação.....	46
Quadro 3 –	Radionuclídeos utilizados na medicina nuclear para a terapia de tumores, com suas respectivas energia e modo de decaimento	47
Tabela 1 –	Análise do Índice de Polidispersividade das nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e Vazia, por meio de DLS, caracterizando o índice de polidispersão das nanopartículas.....	65
Tabela 2 –	Porcentagem de nanopartículas poliméricas dopadas com ^{99m}Tc , após cromatografias em tempo ascendente, comparando com pertcnetato livre ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$) para avaliação da pureza radioquímica.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^{18}F -FDG	Fluorodesoxiglicose-Fluor-18
^{67}Cu	Cobre-67
^{89}Sr	Estrôncio-89
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio-99-metaestável
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DMSA	Ácido Dimercaptossuccínico-Tecnécio-99-metaestável
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA	Ácido Dietilenotriamino-pentacetato-Tecnécio-99-metaestável
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético-Tecnécio-99-metaestável
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Enxofre	Enxofre-Tecnécio-99-metaestável
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Fitato	Ácido Fítico-Tecnécio-99-metaestável
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAA	Macroagregado de Albumina-Tecnécio-99-metaestável
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP	Metilendifosfonato-Tecnécio-99-metaestável
^{123}I	Iodo-123
^{125}I	Iodo-125
^{131}I	Iodo-131
^{177}Lu	Lutécio-177
^{211}At	Astatina-211
^{212}Bi	Bismuto-212
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ABCDE	Algoritmo que caracteriza alterações estruturais ou fisiológicas
ATP	Adenosina trifosfato
BRAF	<i>Proto-Oncogene RAF Viral Oncogene B Homolog</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4</i>
DDS	<i>Drug delivery system</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DOPA	<i>Dihydroxyphenylalanine</i>
DTIC	Dacarbazina

EUA	Estados Unidos da América
EPR	Efeito de Retenção e Permeabilidade
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizadores
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INK4	<i>Inhibitors of CDK4</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MC1R	<i>The melanocortin 1 receptor</i>
MEC	Matriz Extracelular
MES	Melanoma Extensivo Superficial
miRNA	Micro RNA
MLA	Melanoma Lentiginoso Acral
MLM	Melanoma Lentigo Maligno
MPS	<i>mononuclear fagocitic system</i>
MM	Melanoma Metastático
MN	Melanoma Nodular
MSH	<i>melanocyte-stimulating hormones</i>
NPs	Nanopartículas poliméricas
NRAS	<i>Neuroblastoma cells-Rat Sarcoma</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OS	<i>Oxidative Stress</i>
PD-1	<i>Programmed Cell Death Receptor</i>
PDT	<i>Photodynamic therapy</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pK	Perfil farmacocinético
PPGB	Programa de Pós-Graduação em Biociências
pRb	<i>Retinoblastoma protein</i>
PVA	Acetato de Polivinila
RGP	<i>Radial Growth Phase</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
RUV	Raios ultravioletas
TP53	<i>Tumor Protein 53</i>

UERJ Universidade do Estado do Rio de Janeiro

UV Ultravioleta

VGP *Vertical growth Phase*

ZnPc *Zinc Phtalocyanine*

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	O CANCER	19
1.1	Epidemiologia e etiologia do melanoma e suas características	22
1.1.1	<u>Composicao da epiderme</u>	26
1.1.2	<u>Fisiopatologia do melanoma</u>	30
1.1.3	<u>Heterogeneidade do melanoma</u>	33
1.2	O Melanoma Metastático (MM)	35
1.3	Terapêutica associada à terapia-alvo	35
1.3.1	<u>Dacarbazina (DTIC) como quimioterápico-padrão no tratamento de MM</u>	39
1.3.2	<u>Terapêuticas adjuvantes: Associação com Terapia Fotodinâmica</u>	40
1.3.2.1	<u>Ftalocianina de Zinco como Agente Fotossensibilizante</u>	44
1.3.3	<u>Teragnósticos como nova linha de pesquisa</u>	44
1.4	Radiofármacos	44
1.5	Nanotecnologia no sistema de liberação controlada	48
1.5.1	<u>Sistemas nanoestruturados e seus mecanismos de ação</u>	49
1.5.1.1	<u>Nanopartículas Poliméricas (NPs)</u>	51
2	OBJETIVOS	54
2.1	Objetivo Geral	54
2.2	Objetivos Específicos	54
3	MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1	Material	55
3.2	Equipamentos	55
3.3	Desenvolvimento das NPs	55
3.4	Caracterizacao físico-química das NPs	57
3.4.1	<u>Determinação do diâmetro médio por espectroscopia de correlação de fótons</u>	57
3.4.2	<u>Análise morfológica e dimensional por Microscopia de Força Atômica (AFM)</u> ..	57
3.5	Avaliação da citotoxicidade das NPs	58
3.5.1	<u>Linhagem celular do melanoma</u>	58
3.5.2	<u>Ensaio de Viabilidade Celular</u>	58

3.5.3	<u>Irradiação com Laser Infravermelho para avaliação da Terapia Fotodinâmica.....</u>	59
3.6	Radiomarcção das NPs com Tecnecio^{99m}metaestável (^{99m}Tc)	60
3.6.1	<u>Controle de qualidade do processo de marcação das NPs com ^{99m}Tc</u>	61
3.6.2	<u>Desenho Experimental <i>In Vivo</i></u>	61
3.6.2.1	Estudo de Biodistribuição	62
3.7	Análises estatísticas	63
4	RESULTADOS	64
4.1	Análise das características dimensionais e morfológicas das NPs.....	64
4.1.1	<u>Diâmetro Médio (<i>Size</i>) e Índice de Polidispersividade (PDI).....</u>	64
4.1.2	<u>Microscopia de Força Atômica (AFM).....</u>	65
4.2	Controle de Qualidade da radiomarcção das NPs com ^{99m}Tc.....	67
4.3	Análise da Eficiência de Encapsulação.....	68
4.4	Avaliação da viabilidade celular nas NPs em modelo <i>in vitro</i> de melanoma..	69
4.5	Estudo <i>in vivo</i> do perfil de biodistribuição das NPs em animais controle.....	70
5	DISCUSSÃO	74
	CONCLUSÕES	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	114
	ANEXO B – Artigo	115

INTRODUÇÃO

O câncer é a principal causa de morte, e única barreira no aumento de expectativa de vida, representando cerca de 12% do total de óbitos por doenças no mundo (SIEGEL et al., 2015; BRAY et al., 2018; GOLOB-URBANC et al., 2019), e, dentre as neoplasias malignas registradas, o melanoma é responsável por mais de 130 mil casos por ano (FERLAY et al., 2015; BRAY et al., 2018; PENTA et al., 2018). Solé (2019) ressalta que sua incidência mais que duplicou desde a década de 70. O câncer de pele do tipo melanoma e melanoma metastático são responsáveis por 3% dos óbitos por câncer. No Brasil, estima-se o surgimento de mais de seis mil casos para o biênio 2018-2019 (INCA, 2018). Ocorrem em 2017, somente nos Estados Unidos da América (EUA), um número de óbitos que excede os 10 mil casos (SIEGEL, 2019; YABROFF et al., 2019). Estima-se que esse número pode ser subestimado, devido ao diagnóstico limitado e ao óbito ocorrer em decorrência de processo metastático secundário, levando a uma classificação errônea (CHAPMAN et al., 2011; FLAHERTY et al., 2012; LUO et al., 2012; ISLAMI et al., 2018; TERHEYDEN et al., 2019).

O melanoma é considerado uma das neoplasias mais agressivas (DOMINGUES et al., 2018; AASEN et al., 2019; ROSSI et al., 2019; TSENG et al., 2019), com alto teor proliferativo e comprometimento dos níveis dérmicos (MENDES, 2014; MARQUES et al., 2019; TERHEYDEN et al., 2019) e apresentar alto grau de disseminação, levando a metástases distantes, em particular a cerebral (ISLAMI et al., 2018; SCHADENDORF et al., 2018; SHU et al., 2018; ZENDEDEL et al., 2019).

De origem neuroectodérmica, o melanoma tem sua malignidade proveniente das alterações neoplásicas dos melanócitos (ARDA et al., 2014; JOLY-TONETTI et al., 2016; HAZARIKA et al., 2017; ROSA et al., 2017; SIMON et al., 2017; BELYSHEVA et al., 2019; JOSHI et al., 2019;), entretanto, sua patogênese ainda não é completamente elucidada (ERNST et al., 2016; MILLET et al., 2017; CHEN et al., 2018; KISZNER et al., 2019). É importante salientar que em 95% dos casos, a falta de tratamento ou o tratamento refratário, são responsáveis por uma sobrevida de apenas 5 anos (WEIDE et al., 2017; TSENG et al., 2019; YE et al., 2019).

O desenvolvimento de novos métodos terapêuticos, associados ao diagnóstico precoce, se torna prioritário e desafiador (DE SOUZA ALBERNAZ et al., 2017; ROSA et al., 2017; CHANG et al., 2018; HENRIQUES et al., 2018; KILLOCK, 2018; PORTILHO et al., 2018; SASSE et al., 2018). Nesse cenário, o arsenal terapêutico é bastante restrito e muitas das vezes

com baixa eficácia. Atualmente, uma das poucas alternativas, é o antineoplásico alquilante dacarbazina (DTIC) (BEBEROK et al., 2017; ROSA et al., 2017; WEHLER et al., 2017; SANTOS-OLIVEIRA, 2018; CORRÊA et al., 2019), que embora apresente 20% de taxa responsiva (AL-BADR et al., 2016; BRUSCO et al., 2019), continua a ser o tratamento padrão (BEBEROK et al., 2017; WEHLER et al., 2017; ZIMMER et al., 2017; GROB et al., 2018; EGGERMONT et al., 2019; PAVLICK et al., 2019), já que nenhum outro procedimento, seja ressecção, quimioterapia adjuvante ou imunoterapia demonstrou ter uma eficácia significativamente superior ao DTIC, corroborando o baixo arsenal terapêutico disponível (BEDIKIAN et al., 2006; MOUAWAD et al., 2010; MISHRA et al., 2018; PENG et al., 2018).

Dentro deste contexto e de modo a contornar as dificuldades terapêuticas, o campo da nanotecnologia vem atraindo o interesse da comunidade científica mundial (LIU et al., 2015; HAFEEZ et al., 2017; NAVES et al., 2017; LIU et al., 2018; MELLAI et al., 2018;). Recentemente, os radiofármacos, que se destacam por serem medicamentos com a presença de um ou mais radionuclídeos, passaram a ser estudados como plataformas nanotecnológicas nucleares (nanorradiofármacos), capazes de diagnosticar e tratar simultaneamente diversos tipos de enfermidades. Assim, dentre os radionuclídeos que compõem os nanorradiofármacos, destaca-se o ^{99m}Tc metaestável (^{99m}Tc), devido as suas propriedades físico-químicas e nucleares, permitindo que esses atuem em maior grau de desempenho (FARZANEFAR et al., 2018; BANERJEE et al., 2019; HELAL-NETO et al., 2019; SANTOS-OLIVEIRA, 2019; DARWISH et al., 2020; KIM et al., 2020; M. SOLIMAN et al., 2020).

Nos últimos anos, a associação de terapia ao diagnóstico (teranósticos) vem se tornando o alvo mundial da pesquisa (IDÉE et al., 2013; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2018; STABIN et al., 2018; D'ANGELO et al., 2019). O uso de nanossistemas troianos (nome referenciado ao Cavalo de Tróia), pelo qual, o sistema biológico alvo é enganado e acaba por capturar um composto nocivo ao seu desenvolvimento, vem se tornando um método de inúmeras pesquisas (JACKSON et al., 2002; DAVIDS; KLEEMANN, 2011). Por fim, o uso da photodynamic therapy (PDT, em português, terapia fotodinâmica) apresenta grande potencial em terapias dermatológicas, com especial ênfase em melanoma (AGOSTINIS et al., 2011; RICCI-JUNIOR et al., 2018; LI et al., 2020;).

Compreende-se, dentro desta terapia, o uso de agentes fotossensibilizadores (FS), como Zinc Phtalocyanine (ZnPc, em português, ftalocianina de zinco), excitados por um comprimento de onda específico, localizado no tecido tumoral, que produz reactive oxygen

species (ROS, em português, espécies reativas de oxigênio), e leva a um dano oxidativo celular, em sua grande maioria ao ácido desoxirribonucleico (DNA) (WITTGEN et al., 2007; HUANG et al., 2012; LI et al., 2018), o que resulta na indução da morte celular neoplásica, a regressão da massa tumoral, com baixo dano às células saudáveis (MARTÍN-GORGOJO et al., 2018).

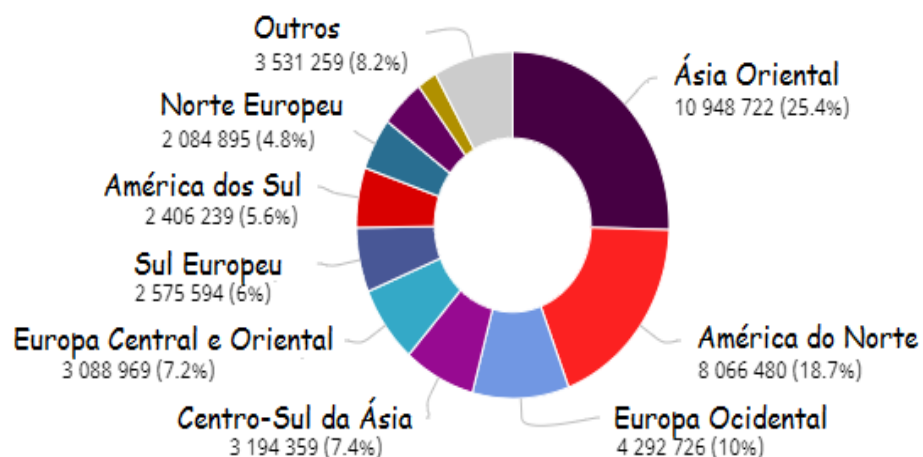
Assim, foi desenvolvido um sistema de liberação de drogas com nanopartículas que transporta tanto o quimioterápico (Dacarbazina) quanto o agente fotossensibilizador (ftalocianina de zinco) usando células de melanoma MV3 como modelo. Para melhorar as opções terapêuticas contra o melanoma metastático, uma nanopartícula polimérica biodegradável (NP) foi desenvolvida para fornecer dacarbazina e ftalocianina de zinco como uma alternativa terapêutica ao tratamento do melanoma metastático por terapia fotodinâmica.

1 O CANCER

A terminologia “câncer” representa um conjunto de doenças, com diversos fatores epidemiológicos (FIDLER, 1989; SKUSE A., 2015), que se originam de distintos tipos celulares, caracterizados pela sua proliferação irrestrita (MCGEE et al., 2019) e sua alta capacidade de invasão tecidual (SKUSE A., 2015). Até o século XX, estudos de Hanahan e Weinberg (2000) propuseram que o câncer envolvia mudanças genéticas dinâmicas, não sendo apenas “massas insulares de proliferação tumoral” e, após uma década de observações, os autores notaram uma evolução neoplásica celular com alta complexidade tecidual e uma série de interações heterotípicas entre si (HANAHAN; WEINBERG, 2011), abrangendo estudos de cooperações do “microambiente tumoral”, papel crucial para a tumorigênese (GRUOSSO et al., 2019; HELAL-NETO et al., 2019; MCGEE et al., 2019).

Nas últimas décadas, o câncer adquiriu uma dimensão maior, enquadrando-se em um problema de saúde pública mundial (BRAY et al., 2018; SIEGEL et al., 2019). Diante desse cenário, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima, para o ano de 2040, 30 milhões de casos incidentes e um total de 17 milhões de mortes por câncer, sendo a América do Sul o sétimo continente com maior número de casos prevalentes (Figura 1) e, dentro desta o Brasil ocupa a primeira posição (Figura 2) (BRAY et al., 2018).

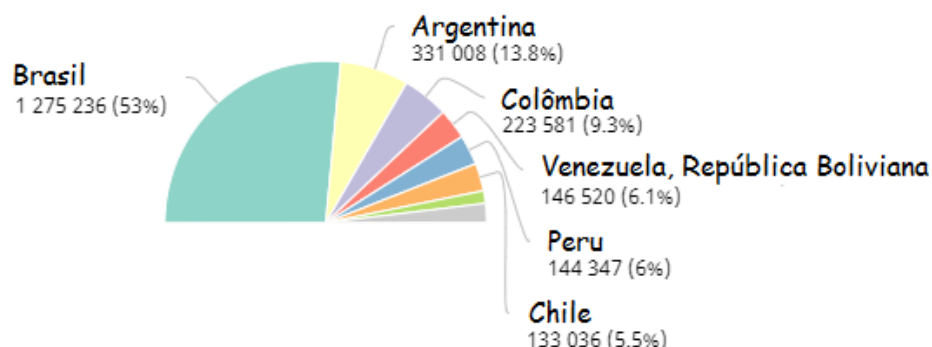
Figura 1 - Estimativa de casos prevalentes em cinco anos, para todos os tumores, em ambos os sexos com idade superior a vinte anos



Fonte: Adaptado de (WHO, 2018).

Nota: Estatística global que apresenta o ranking de casos prevalentes de cinco anos, em 2018, para ambos os sexos com idade superior a 20 anos de idade. A ilustração mostra que a América do Sul se torna o sétimo continente com maior número de casos, em uma proporção de 100 mil, o que corresponde a 5,6%, ficando atrás da América do Norte e Ásia.

Figura 2 - Estimativa de casos prevalentes em cinco anos, para todos os tumores, em ambos os sexos com idade superior a vinte anos, na América do Sul



Fonte: Adaptado de (WHO, 2018).

Nota: Estatística, que apresenta o ranking de casos prevalentes de cinco anos, em 2018, para ambos os sexos com idade superior a 20 anos de idade, somente na América do Sul. A ilustração mostra que o Brasil se torna o primeiro país com maior número de ocorrências, totalizando mais 1 milhão de casos, correspondendo a 53%.

As altas taxa de incidência, e mortalidade, são decorrentes do crescimento e envelhecimento da população, além da disseminação de fatores de riscos, que podem ser: extrínsecos, como o uso de tabaco (SEMINERIO et al., 2019), alcoolismo (WEBER et al., 2017), obesidade (KIM et al., 2019), hábitos alimentares e estilo de vida (THEODORATOU et al., 2017) e, principalmente, exposição à radiações (ISLAMI et al., 2018); assim como intrínsecos, relacionados o histórico familiar (KITANO et al., 2019) e a anormalidades genômicas (PAVONE et al., 2018).

O acúmulo de mutações genéticas, muitas das vezes específicas, ativa genes controladores ou promotores do crescimento celular (oncogenes), o que inativa supressores tumorais e realiza diversos rearranjos cromossomais, bem como alterações epigenéticas (FOGEL et al., 2017; SOTGIA et al., 2019; YU et al., 2019), iniciando a tumorigênese (MARTINEZ et al., 2019)

Como as mutações sucessivas nos oncogenes resultam em proliferação sustentada (DOMBLIDES et al., 2019) e resistência à morte celular (YUAN et al., 2017), isso torna sua malignidade muito mais invasiva, o que também se relaciona a um conjunto de alterações, as “hallmarks” (Figura 3), características essenciais para o desenvolvimento tumoral (COSTA et al., 2018; SOTGIA et al., 2019).

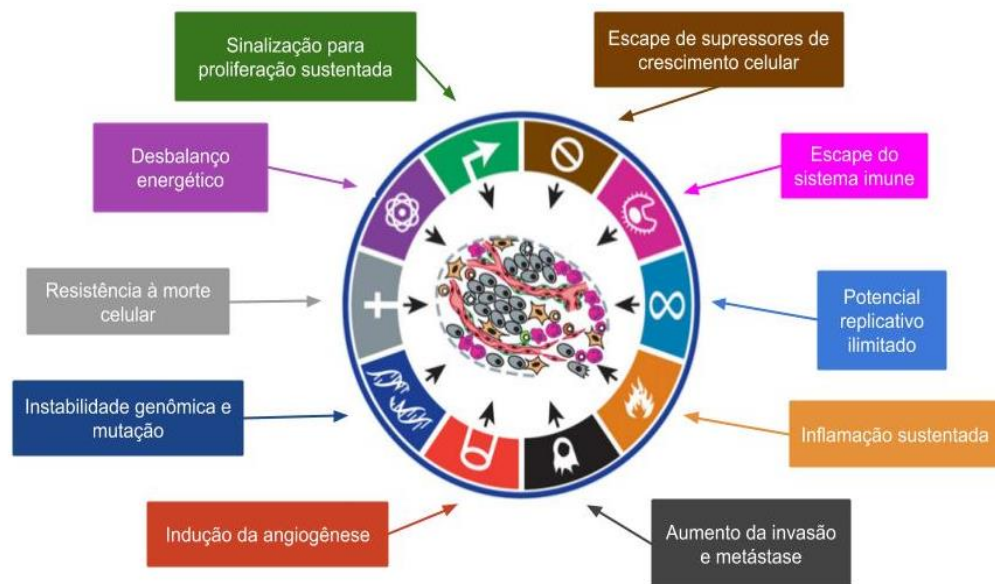
O desenvolvimento envolve três processos:

- (a) iniciação, que consiste em alterações no genótipo celular, ocasionadas pelas modificações epigenéticas, ocorrendo de forma irreversível (LIU et al., 2018);

(b) promoção, que amplifica as células com genótipo alterado, por meio de agentes promotores em contato contínuo, como os exossomos, que contribuem para tal proliferação (YÁÑEZ-MÓ et al., 2015);

(c) progressão, que expande as células mutadas com alterações bioquímicas e morfológicas, que se multiplicam descontrolada e irreversivelmente, pela alteração do perfil de miRNA's (MARTÍN et al., 2011; CHEN et al., 2018; AKSENEKO et al., 2019).

Figura 3 - As dez características do câncer, conhecidas como “*hallmarks*” essenciais para o desenvolvimento do tumor



Fonte: Adaptado de (HANAHAN et al., 2011).

Nota: A ilustração mostra a proposta de Hanahan e Weinberg (2011) para as dez características do câncer, conhecidas como “*hallmarks*”, que foram originalmente publicadas pelos mesmos autores em 2000. Estas características englobam habilidades como escape de supressores do crescimento celular e do sistema imune, um potencial replicativo ilimitado, uma inflamação sustentada, um aumento da invasão e metástase, além da indução da angiogênese, uma instabilidade genômica, resistência à morte celular, desbalanço energético e sinalização sustentada, que desencadeiam a progressão e proliferação tumoral.

Nos últimos anos o interesse em estudos sobre miRNA's circulantes na progressão tumoral cresceu (RIEFOLO et al., 2019; SOLÉ et al., 2019), definidos como pequenos RNA's não codificadores, são responsáveis pela regulação da expressão gênica pós-transcricional nos processos de diferenciação e migração celular (JIANG et al., 2014; FRIJHOFF et al., 2015; USHIO et al., 2019), participando e facilitando comportamentos celulares (CHAMORRO et al., 2016; ZHU et al., 2017; WANG et al., 2018). Entretanto, caso ocorra a desregulamentação

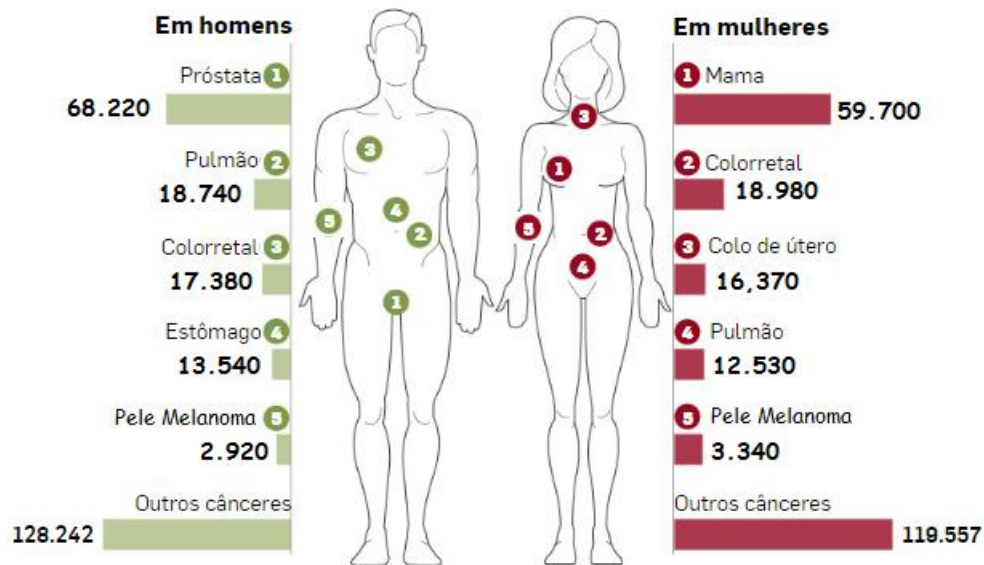
de miRNA's, ocorre a superexpressão de “oncomiRs”, oncogenes que remodelam o ambiente e aceleram a ocorrência e o desenvolvimento de metástases no tumor. (BRACKEN et al., 2016; WANG et al., 2018; ZHAO et al., 2018)

Dessa forma, a progressão do câncer e, junto a ela, a capacidade de secretar quimiocinas e fatores de crescimento, desencadeia uma cascata sinalizadora (CIRRI et al., 2011; AKSENENKO et al., 2019), que constroi um microambiente favorável, afetando a formação tumoral, sua disseminação e resistência celular (BRONTE et al., 2016; UMANSKY et al., 2016; HUBER et al., 2018), principalmente em tumores do tipo melanoma (DIETRICH et al., 2018; GALASSO et al., 2018; LI et al., 2018; SHI et al., 2018; ZHU et al., 2018; RIEFOLO et al., 2019)

1.1 Epidemiologia e etiologia do melanoma e suas características

Nos últimos 30 anos, a incidência de melanoma vem acentuando-se consideravelmente no mundo (WEIDE et al., 2017; CICHOREK et al., 2019). Apenas em 2018, surgiram mais de 287 mil casos e 61 mil óbitos foram registrados. Tais casos foram mais recorrentes nas populações com baixa pigmentação na pele (VAN DER LEEST et al., 2015; BEHRENS et al., 2018; BRAY et al., 2018), dentre as quais se atestam altos registros na Austrália (AITKEN et al., 2018) e EUA (NOONE et al., 2017). No Brasil, para o biênio 2018-2019, estima-se mais de 6 mil novos casos, com maior prevalência para mulheres (Figura 4) e, apesar da baixa incidência, ainda é responsável por uma grande taxa de mortalidade (GUY et al., 2015; BRAY et al., 2018; GRUBER et al., 2018).

Figura 4 - Estimativa de câncer de pele melanoma para 2018-2019



Fonte: Adaptado de CIPERJ, 2018 e INCA, 2018.

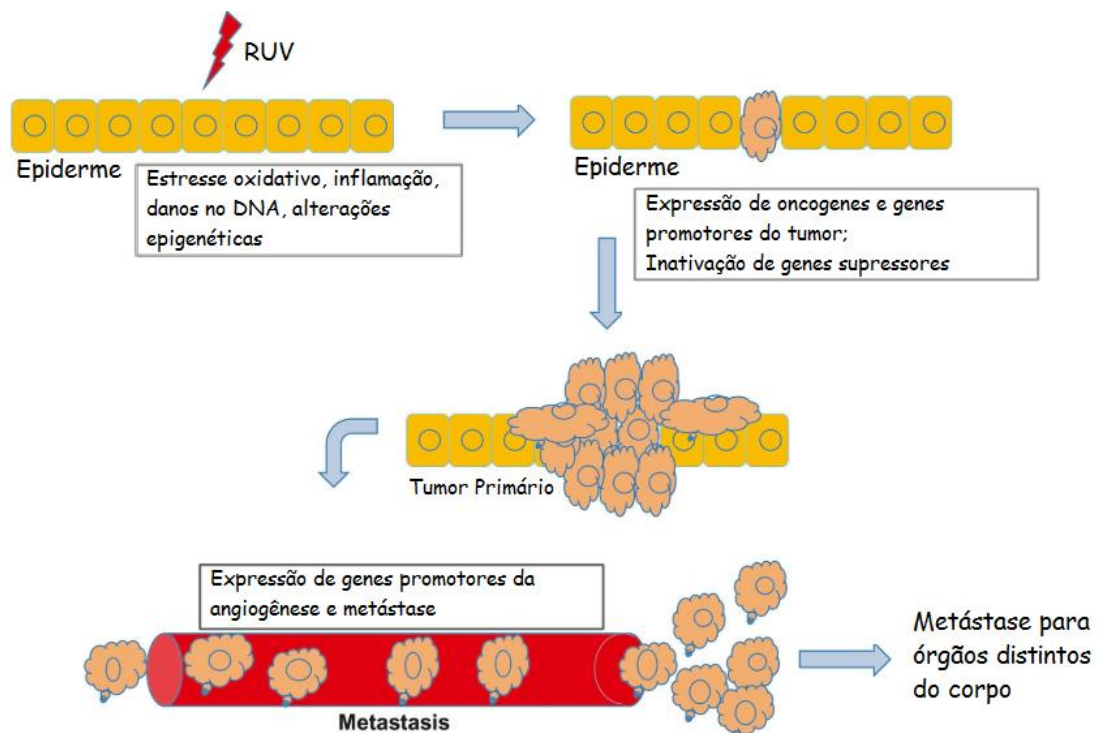
Nota: A ilustração mostra a estimativa feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) de novos casos para o biênio de 2018 e 2019, em ambos os sexos, de câncer de pele melanoma. Apesar da taxa de incidência ser menor do que os cânceres mais prevalentes, a malignidade do melanoma se torna importante, com quase 3 mil novos casos para homens e, 3 mil e 300 novos casos para mulheres.

Diversas condições estão relacionados ao seu desenvolvimento, o que inclui o fototipo da derme e coloração capilar, além de parâmetros como idade, gênero, histórico familiar, nervos displásicos e localização geográfica (BARBARIC et al., 2016; STRÖMBERG et al., 2016; WHITEMAN et al., 2016; HERNANDO et al., 2016; KARIMKHANI et al., 2017; LIU-SMITH et al., 2017; FU et al., 2017; CORICOVAC et al., 2018; SACCHETTO et al., 2018;). Contudo, cabe ressaltar que a exposição à radiações ultravioletas (RUV) (RAWSON et al., 2017; BEHRENS et al., 2018; PRADO et al., 2019; SCHIERBECK et al., 2019), assim como o estilo de vida ao ar livre (YUAN et al., 2017; AITKEN et al., 2018;) são relevantes fatores que desencadeiam o surgimento de outros fatores contribuintes para a carcinogênese, como a inflamação crônica, (MONTES DE OCA et al., 2017; BEHRENS et al., 2018; KITANO et al., 2019;), e a formação em excesso de radicais livres (BARBOSA et al., 2010)

Além disso, a exposição à RUV induz alterações epigenéticas (Figura 5), aquelas em que há modificações na expressão e função gênica, mediada por miRNA's (FU et al., 2017; PRASAD et al., 2017), em genes como Proto-Oncogene RAF Viral Oncogene B Homolog (BRAF, em português, homólogo viral do oncogene B do proto-oncogene RAF) (BRUNO et al., 2017; VALLI et al., 2019), genes do Neuroblastoma cells-Rat Sarcoma (NRAS, em português, homólogo oncogênico do neuroblastoma RAS) (WILMS et al., 2017), Tumor Protein 53 (TP53, em português, Proteína Tumoral 53) (HAYWARD et al., 2017; RIEFOLO

et al., 2019), Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A, em português, inibidor de quinase dependente de ciclina 2A) (ERLICH et al., 2018), bem como genes supressores do tumor (SHAIN et al., 2016; MILLET et al., 2017; ZHAO et al., 2018), o que desempenham um papel fundamental para o desenvolvimento e proliferação tumoral do melanoma (HADDAD et al., 2017; PENTA et al., 2018).

Figura 5 - Eventos envolvidos no melanoma induzidos pelos fatores ambientais e genéticos quando associados à exposição de radiações ultravioletas



Legenda: Radiação ultravioleta (RUV).

Fonte: Adaptado de (PENTA et al., 2018).

Nota: A ilustração mostra os eventos envolvidos no melanoma induzido pela exposição à radiação ultravioleta (RUV), seguida da metástase. Esta exposição resulta em estresse oxidativo (OS), inflamação e danos ao DNA nas células da epiderme e, sendo de forma contínua e prolongada, esta exposição induz ainda mais a expressão de oncogenes tumorais e a supressão de genes supressores, através de mecanismos genéticos e epigenéticos, transformando, desse modo, células normais em tumorais. No estágio posterior, as células tumorais apresentam a capacidade de metastatizar em órgãos distintos do corpo, expressando genes indutores de metástase.

A sintomatologia relacionada ao melanoma se dá apenas após o aparecimento de lesões pigmentadas irregulares, acompanhadas de coceira ou descamação (CORDORO et al., 2013; GLAZER et al., 2017; WARD et al., 2017; AFANASIEV et al., 2019) e presença de queratoses solares, que se torna importante biomarcador para alta exposição solar (BERWICK et al., 2016; BETANCOURT et al., 2019). Estudos indicam que o melanoma pode ocasionar lesões em diferentes locais, surgindo diversos subtipos baseados em suas características

histológicas (CAINI et al., 2009; WHITEMAN et al., 2011; WARD et al., 2017; NARTEY et al., 2018), como nos exemplos:

- (a) Melanoma Extensivo Superficial (MES): subtipo mais frequente, compreendendo 2/3 de todos os melanoma, em que a exposição aguda na infância e exposição intermitente na vida adulta são considerado os fatores etiológicos (VICENTE, 2016), o que resulta em elevada incidência de mutações nos genes *BRAF* e *CDKN2*, importante supressores tumorais (MINCU et al., 2019; SPATHIS et al., 2019). Caracteriza-se por ser uma neoplasia que apresenta grandes melanócitos se estendendo por entre os queratinócitos e, devido a sua presença nas diferentes camadas da epiderme, a variação da coloração surge como principal sinal clínico (ABULAFIA et al., 1969; ABUDU et al., 2019);
- (b) Melanoma Lentigo Maligno (MLM): compreende de 4% a 15% dos melanomas (FINET et al., 2013; FLORES et al., 2018), surgindo clinicamente como uma mácula irregular e de pigmentação heterogênea em tons variáveis, devido a proliferação de melanócitos atípicos (DONIGAN et al., 2018; DUARTE et al., 2018), confluentes ao longo da junção dermo-epiderme, que decorrem da exposição crônica ao sol (CHARIFA et al., 2019; PLATSIDAKI et al., 2019);
- (c) Melanoma Nodular (MN): segundo subtipo mais incidente dentre os melanomas, apresentando o componente dérmico repleto de ninhos celular tumorais com padrão expansivo de crescimento, com nucléolos proeminentes e elevado índice mitótico (GUTIÉRREZ-CASTAÑEDA et al., 2019);
- (d) Melanoma Lentiginoso Acral (MLA): caracterizado pela proliferação de melanócitos atípicos ao longo da epiderme basal com o citoplasma preenchido com grânulos de melanina e, embora acometam sítios que, muitas vezes, não recebem alta incidência de RUV, esta constitui um fator de risco para MLA (SUNDARARAJAN et al., 2019)
- (e) Outros tipos: melanoma das mucosas, estimulada por inflamação crônica (LAMBERTINI et al., 2018; MALINOSKI et al., 2019; YOSHIKAWA et al., 2019); melanoma ocular, onde a região da úvea é a mais comum de ocorrer alteração de melanócitos (FIORENTZIS et al., 2018; BROUWER et al., 2019; CASSOU-MOUNAT et al., 2019; HAO et al., 2019; MA et al., 2019) e desmoplásicos.

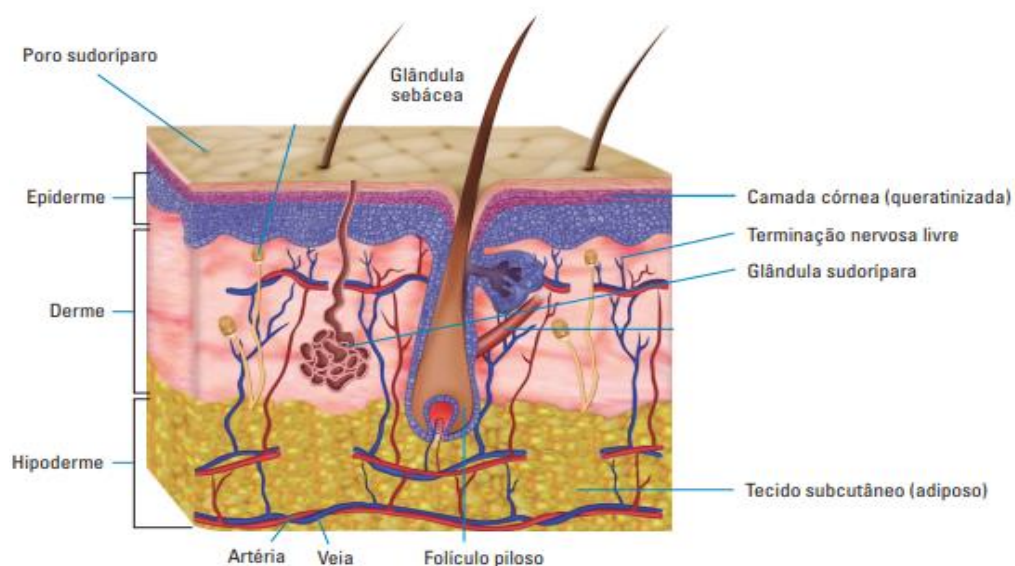
O diagnóstico clínico é feito seguindo-se os cinco critérios do algoritmo ABCDE, introduzido nos anos 80 (LEE et al., 2018), onde promove a detecção da assimetria, irregularidade de borda, variabilidade de cores, diâmetro (>6 mm) e evolução das lesões do melanoma, de forma a identificá-las objetivamente (LEE et al., 2018; NARTEY et al., 2018; ZIMMERLÉ et al., 2018).

1.1.1 Composição da epiderme

No século XIX, a pele, um dos maiores órgãos do corpo humano representando 15% do peso corpóreo (BROWN et al., 2019), foi descrita como uma barreira física entre o organismo e o meio externo, desempenhando uma importante função fotoprotetora (DĄBROWSKA et al., 2018; AGARWAL et al., 2019). A depender de sua viabilidade, os controles hemodinâmicos e hidro-eletrolíticos, assim como metabolismo energético e sistema sensorial, estão inseridos na sua funcionalidade (SAHLE et al., 2015; OSSEIRAN et al., 2018), demonstrando que é um sistema sofisticado (CHANG et al., 2017).

As alterações que acometem uma região da pele envolvem o recrutamento de uma série de componentes celulares, sendo necessário compreender a estrutura epitelial, até então formada por três camadas (ARDA et al., 2014; SAMPAIO E RIVITTI, 2018): a epiderme, constituída por epitélio de revestimento queratinizado no qual se reconhecem distintas camadas celulares (PEDROSA et al., 2017; OSSEIRAN et al., 2018); a derme, tecido conjuntivo que dá suporte à camada anterior no qual abriga vasos, nervos e receptores sensoriais (GÜÇLÜ KARADAĞ et al., 2017; VELA-ROMERA et al., 2019); e a hipoderme, camada mais interna constituída de tecido conjuntivo frouxo e adiposo (HWANG et al., 2016; HBIBI et al., 2018) (Figura 6).

Figura 6 - Esquemática da pele



Fonte: Adaptado de (CESTARI, 2017).

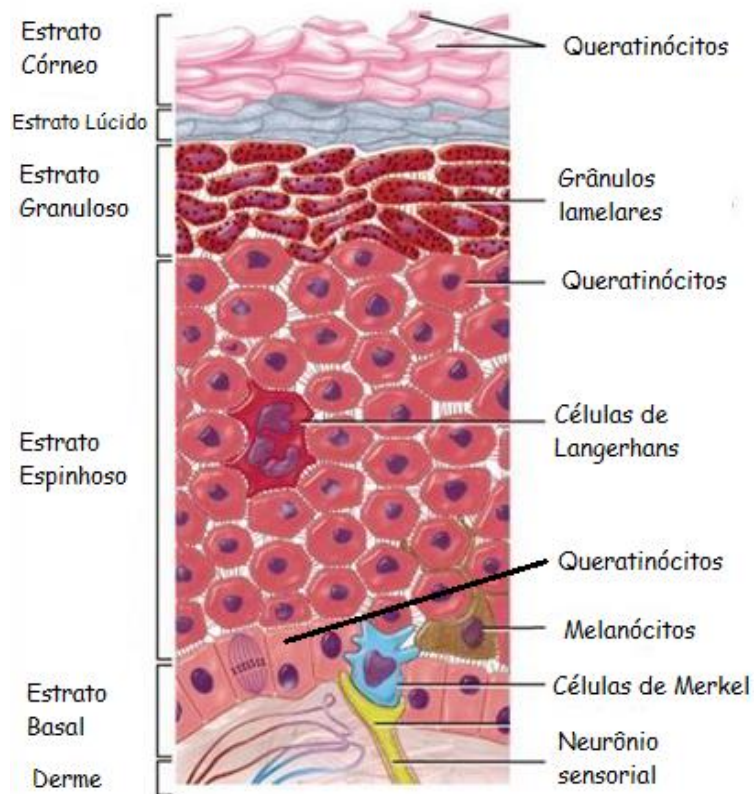
Nota: Na ilustração temos que anatomicamente a pele está estratificada em três camadas distintas, mas que, no funcionamento, estão intimamente relacionadas. A camada mais superficial, a epiderme, abrange diversas camadas celulares, mas não apresentam terminações nervosas, porém nutrientes e oxigênio chegam a ela por difusão. Essa camada apresenta uma camada queratinizada, de revestimento, e as glândulas sebáceas em conjunto com o poro sudoríparo. A derme, camada intermediária, é rica em terminações nervosas e vasos sanguíneos, além de apresentar as glândulas sudoríparas. A última camada é a hipoderme, constituída de adipócitos e vasos sanguíneos.

As camadas celulares presentes na epiderme se distinguem devido aos seus parâmetros morfológicos e seu grau de maturação e, principalmente à sua localização (AGARWAL et al., 2019; FREEMAN et al., 2019; VERDEL et al., 2019), onde a camada córnea (stratum corneum) é a mais superficial e espessa, sendo constituída de queratina e corneócitos (células revestidas de proteínas e lipídios), que irão prevenir a perda de água transepidérmica e dar proteção às substâncias externas nocivas (BOUSLIMANI et al., 2015; PETROVIC et al., 2018; FERNANDEZ et al., 2019; KHIAO IN et al., 2019; SOLÉ et al., 2019). O revestimento lipídico é proveniente da camada granulosa (stratum granulosum), localizada entre a córnea e a espinhosa, essas por sua vez, contêm grânulos de querato-hialina, abrangendo glicoproteínas e fosfolipídeos que irão se modificar e se depositar na matriz, o que acaba por gerar proteção aos demais estratos (RINNERTHALER et al., 2018; LI et al., 2019; SANZ RESSEL et al., 2019).

Logo abaixo da camada granulosa, encontra-se a camada espinhosa (stratum spinosum), composta pelas células de Malpighi, que são queratinócitos diferenciados que produzem além da queratina, as citocinas que participam de processos inflamatórios na epiderme (ARGYRIS et al., 2019), estando conectados por desmossomos que permitem a

união das células à camada basal (stratum basale), sendo a mais profunda e próxima da derme (GALASSO et al., 2018; LYKOVA et al., 2019). Nesta camada, há apenas uma placa de aderência de queratinócitos, denominadas de hemidesmosomos, estruturas de adesão que contém glicoproteínas (KHIAO IN et al., 2019; MANSO et al., 2019; PORA et al., 2019), como demonstrado na figura 7.

Figura 7 - As cinco camadas constituintes da epiderme



Fonte: Adaptado de (YOUSEF et al., 2019).

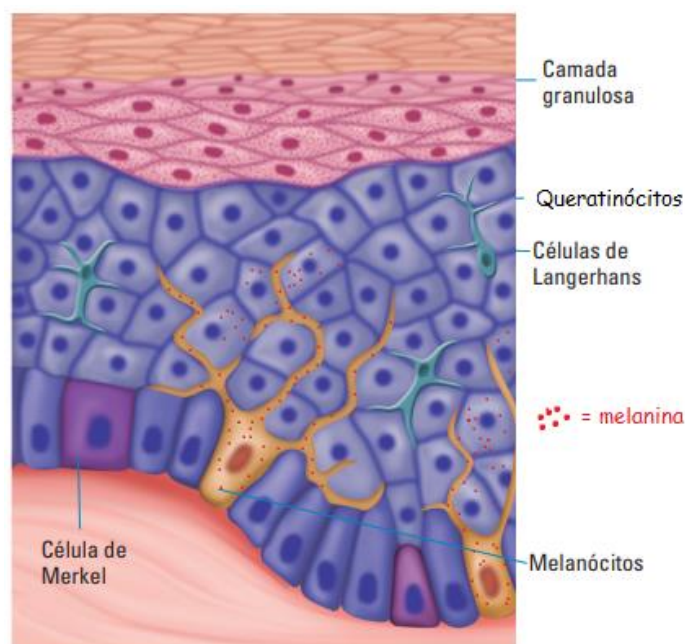
Nota: A ilustração mostra as camadas que constituem a epiderme. A camada basal, ou germinativa, apresenta a capacidade de diferenciação celular, originando assim as outras camadas superiores. Nela apresenta as células de Merkel que irão proliferar os queratinócitos; há também os melanócitos, células portadoras de melanina. Esta camada possui apenas uma única linha celular, conhecida como hemidesmosomos, que fornece adesão à derme. Posteriormente, há a camada espinhosa, ou de Malpighi, células que são queratinócitos e que produzem citocinas e queratina, conectados à camada anterior pelos desmossomos. Há também as células de Langerhans, provenientes da camada basal e responsáveis pela comunicação celular linfóide. A camada granulosa apresenta grânulos de querato-hialina, conferindo proteção às camadas inferiores, sendo compostos de fosfolipídeos e glicoproteínas. Essa composição abrange as células da camada córnea, que apresenta queratinócitos diferenciados da camada basal, que vão dar proteção à agentes nocivos. Além disso a formação dessa camada de queratinócitos e corneócitos previnem a perda de água transdérmica, função presente na camada lúcida, pela presença de eleidina.

A pele é ainda constituída de uma camada basal, a qual é essencialmente germinativa, originando as demais camadas por meio de progressiva diferenciação celular, por sua alta atividade mitótica (LAJTHA, 1979; FUCHS, 2008; SOTIROPOULOU et al., 2012; WONG

et al., 2012; MISTRY et al., 2012; PETROVIC et al., 2018; FERNANDEZ et al., 2019; KHIAO IN et al., 2019). Há ainda outras células presentes na pele como: as células de Langerhans, que reconhecem e processam sinais antigênicos e os comunicam às células linfóides (BOCK et al., 2018; YOUSEF et al., 2019); as células de Merkel, que são células neuroendócrinas as quais atuam na proliferação de queratinócitos e possuem papel na regulação de doenças cutâneas (RUSH et al., 2018; LAIKOVA et al., 2019); e os melanócitos, que contêm pigmentos de melanina (ARDA et al., 2014; MERKEL et al., 2017; BIRLEA, 2017; BECKER et al., 2019; CHEN et al., 2019; VALKO-ROKYTOVSKÁ et al., 2019)

Os melanócitos, derivados da crista neural, em conjunto com os queratinócitos, esses sendo funcionalmente relacionados ao primeiro, constituem as unidades epidermomelânicas da pele (Figura 8) (ZUR MÜHLEN et al., 1998; BERETTI et al., 2019; KOZAR et al., 2019; ZHANG et al., 2019; ZÖLLER et al., 2019;). No citoplasma dos melanócitos há organelas especializadas, denominadas melanossomas, que proporcionam a interação melanócito-queratinócito e a síntese da melanina por meio de uma cascata de reações, cujo ponto de partida é o triptofano, mediada pela enzima tirosinase (Figura 9) que então catalisa a melanogênese (TARAFDER et al., 2014; DI VIRGILIO et al., 2017; KAWAKAMI et al., 2017; DI VIRGILIO et al., 2018; MORAN et al., 2018; KOIKE et al., 2019; VALKO-ROKYTOVSKÁ et al., 2019).

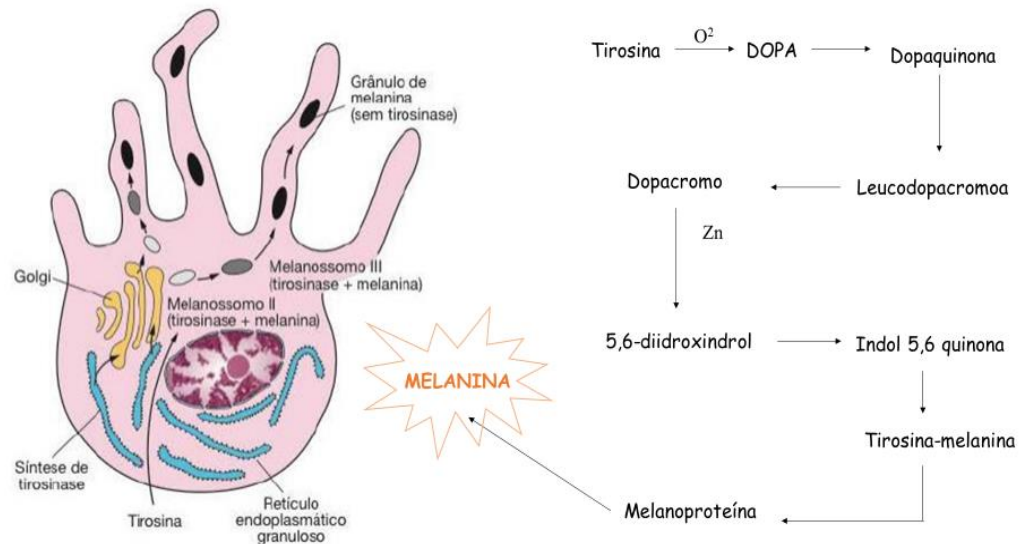
Figura 8 - Disposição dos melanócitos na epiderme e sua interação com outros componentes celulares



Fonte: Adaptado de (CESTARI, 2017).

Nota: A ilustração mostra a interação dos melanócitos com os queratinócitos formando assim unidades epidermomelânicas da pele. Após a produção da melanina no interior do melanócito, nos melanossomos, organelas especializada nesta interação, a melanina é transportada através deles e posteriormente transferida para os queratinócitos, constituindo assim a pigmentação celular.

Figura 9 - Esquema representativo das etapas envolvidas no processo da Melanogênese



Legenda: Oxigênio (O₂) Zinco (Zn) 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA).

Fonte: Adaptado de (ESTEVEZ et al., 2017)

Nota: A ilustração mostra que a tirosinase é sintetizada no retículo endoplasmático granuloso e adentra ao complexo de Golgi, onde é acumulada em vesículas. Essas vesículas, uma vez livres no citoplasma e cheias de tirosinase, são os melanossomos I. É nelas que se inicia a síntese de melanina, graças à ação da tirosinase sobre a tirosina. As vesículas com tirosinase e melanina são os melanossomos II e III, onde a enzima tirosinase hidroxila a L-tirosina ou L-hidroxifenilalanina (DOPA). Em sequência há sucessivas reações de oxidação e redução, até que as proteínas relacionadas a tirosinase (TRP1 e TRP2) desaparecem, constituindo-se os grânulos de melanina. Esses grânulos são transferidos para os queratinócitos por meio dos prolongamentos dos melanócitos.

Como resultado, obtém-se a melanina, a qual confere fotoproteção e oxiproteção ao DNA por absorver e dispersar os RUV e ROS, respectivamente (KIERSZENBAUM et al., 2012; CZYZ, 2018; MORAN et al., 2018; MÂNICA et al., 2019) através da produção do melanocyte-stimulating hormones (MSH, em português hormônio estimulante de melanócito) que se liga ao melanocortin 1 receptor (MC1R, em português Receptor de Melanocortina 1) e assim libera o pigmento protetor (LEONARDI et al., 2018; MÂNICA et al., 2019).

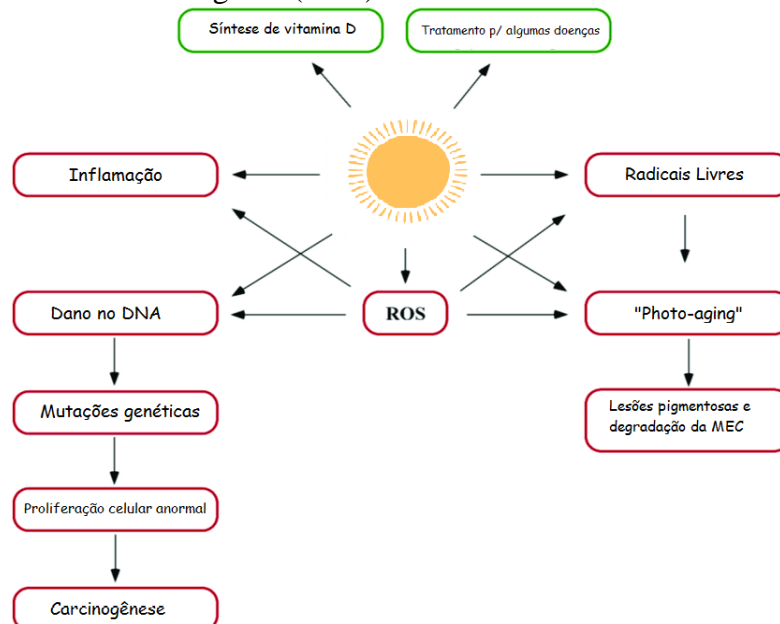
1.1.2 Fisiopatologia do Melanoma

Apesar da fisiopatologia não estar completamente elucidada, a literatura indica que a exposição às radiações (NATARAJAN et al., 2014; FALZONE et al., 2016; RÜNGER, 2016; JANJETOVIC et al., 2017; ROSA et al., 2017; PORTILHO et al., 2018; OBRADOR et al.,

2019), atuam contra a pele representando um estímulo nocivo capaz de ativar ROS, promovendo danos celulares nos melanócitos epidérmicos residentes na camada basal (DENAT et al., 2014; CHANG et al., 2018; EGGEN et al., 2018; MILAC et al., 2018; LI et al., 2019;), o qual é um tecido relativamente hipóxico (OBRADOR et al., 2019).

É característico das células cancerosas apresentarem níveis desproporcionais de ROS em comparação às células normais, pela indução de OS (LIOU et al., 2010; LIU et al., 2015; MINCIULLO et al., 2015; BEBEROK et al., 2017; MARTINO et al., 2018; OBRADOR et al., 2019), o que contribui para uma microrregião mutagênica nas células da epiderme (Figura 10), resultando em alterações na função mitocondrial e na sinalização celular, o que modifica a transdução apoptótica (SHYUR et al., 2010; BEBEROK et al., 2017;), ou seja, torna o gene instável e acarreta danos no DNA, potente efeito pró-tumorigênico (MOLONEY et al., 2018; CANNAVÒ et al., 2019; SCHNEIDER et al., 2019). Além disso, a própria síntese de melanina a torna um agente fotossensibilizador que produz altos níveis de ROS intracelular. Tal processo contribui para o aumento do fotoenvelhecimento, pois ativa respostas inflamatórias na matriz (CAVINATO et al., 2017); e aumenta a suscetibilidade ao melanoma (ZAIDI et al., 2008; OBRADOR et al., 2019).

Figura 10 - Efeitos positivos ou negativos que a exposição solar pode promover, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS)



Fonte: Adaptado de Pérez-Sanchez, 2018.

Legenda: Espécies reativas de oxigênio (ROS) Ácido desoxirribonucleico (DNA) Matriz extracelular (MEC).

Nota: A ilustração mostra as ações das radiações ultravioletas (UV) solares, que promovem a síntese de precursores da vitamina D, importante para absorção de cálcio e tonificar ossos e músculos; e no tratamento de algumas doenças autoimunes. Entretanto, a exposição excessiva aos raios solares pode causar eventos negativos, como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que desencadeiam

outros processos relacionados a: inflamação tecidual, que eleva o nível de substâncias pró-inflamatórias, aumentando o dano oxidativo; e danos ao DNA, ocasionando mutações genéticas e assim a proliferação celular anormal até o surgimento do câncer. A geração de ROS compactua para que um desequilíbrio de radicais livres, que promove ações de “photoaging”, fotoenvelhecimento da pele decorrente da exposição aos raios UV que resulta no surgimento de lesões pigmentosas e degradação da matriz extracelular (MEC), que quebram o colágeno. Com isso há potencialização do fotoenvelhecimento, decorrente da ação de radicais livres.

Adicionalmente, esse estímulo além de provocar necrose celular podem ocasionar reações complexas na vasculatura da derme, fenômeno conhecido como inflamação (WITTGEN et al., 2007; YANG et al., 2013; MARGOLIN, 2014; BARDI et al., 2019; CANNAVÒ et al., 2019; SABAT et al., 2019), promovida pela angiogênese, tendo seu grau de atividade se relacionando diretamente com a evolução do melanoma (BALLESTER et al., 2016; BROWN CHANDLER et al., 2019; NEAGU et al., 2019). Esta hipervascularização é característico da estrutura vascular tumoral o que resulta em perda de função dos vasos, importante para o desenvolvimento do melanoma e sua agressividade (BODA et al., 2018; ROSSI et al., 2019).

Estudos indicam que no microambiente tumoral a sinalização de adenosina trifosfato (ATP) aumenta as células tumorais e a interação celular imunológica, causando uma imunossupressão, contribuindo assim para a composição celular e bioquímica de diferentes maneiras (LIU et al., 2015; DI VIRGILIO et al., 2017; BERTONI et al., 2018; DI VIRGILIO et al., 2018; MÂNICA et al., 2019), podendo deixar o ambiente hipóxico (RÜNGER, 2016; FISCHER et al., 2018; LU et al., 2018; CICHOREK et al., 2019; OBRADOR et al., 2019;).

O microambiente hipóxico, se caracteriza por uma reduzida pressão de O₂, o que é comum em condições patofisiológicas como: o enfarte do miocárdio; o acidente vascular cerebral ou a insuficiência respiratória. Situação similar pode ocorrer em tumores malignos (IMAHASHI et al., 2000; KUNZ et al., 2003; PAPANDREOU et al., 2005; LEE et al., 2007). Desta forma a hipoxia constitui uma característica condicionante nos tumores, tendo um grande impacto (MACINTYRE, 2014; FRIDMAN et al., 2020; ZHANG et al., 2020), auxiliando a sua progressão, além de provocar a parada do ciclo celular; o remodelamento dos tecidos; e promoção do processo tumoral (FAJERSZTAJN et al., 2017; NANDURI et al., 2017; VIZCARDI-GALINDO et al., 2020).

1.1.3 Heterogeneidade do melanoma

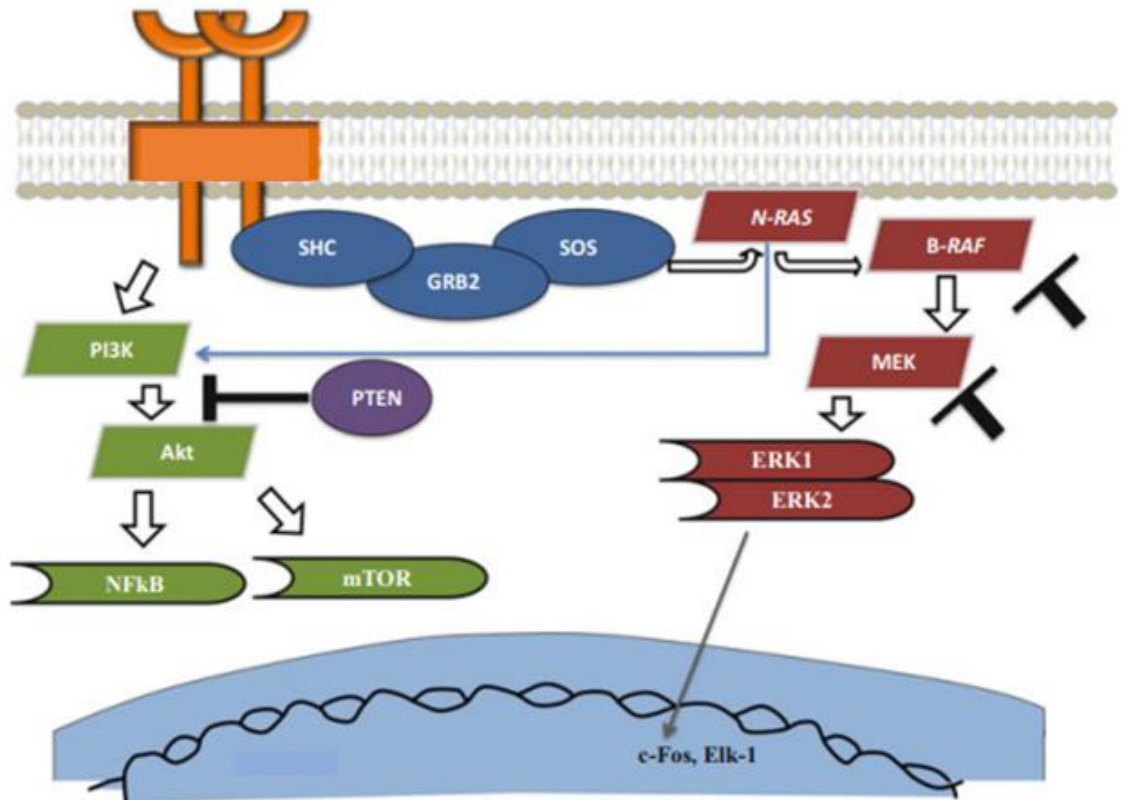
O desenvolvimento do melanoma ocorre a partir de alterações que modificam a expressão de genes específicos (READ et al., 2016; SOURA et al., 2016; OBADOFIN et al., 2019; PAVLICK et al., 2019), resultando em eventos que promovem a desestabilização de vias de sinalização celular e perda no controle do ciclo celular (FEUERER et al., 2019; HERNANDEZ-SEGURA et al., 2018; OBRADOR et al., 2019).

É descrito na literatura, e observado na figura 11, que as frequentes exposições à luz UV desencadeiam 50% das alterações genéticas em BRAF no melanoma (WANG et al., 2007; BESARATINIA et al., 2014; SHAIN et al., 2016; SENER et al., 2017; CORICOVAC et al., 2018; ERLICH et al., 2018), uma serina-treonina quinase, que quando ativada pela proteína RAS, participa da proliferação celular desencadeando a via de sinalização Mitogen Activated Protein Kinase1 (MAPK, em português, Proteínas Ativadas por Mitógeno) (BAROLLO et al., 2014; RICHTIG et al., 2017; TRUBINI et al., 2018), proteína quinase, que controla processos celulares importantes, tais como: progressão e diferenciação do ciclo celular. Logo, mutações nestes genes comprometem-os, promovendo a oncogênese do melanoma (ROH et al., 2015; NAVES et al., 2017; CORICOVAC et al., 2018; LEONARDI et al., 2018; LIU et al., 2018;).

Outra sinalização alterada via MAPK são as mutações nos genes NRAS, representando cerca de 30% das alterações no melanoma (HALABAN et al., 2005; GANDOLFI et al., 2016; GRZYWA et al., 2017). São proteínas estimulantes da transdução de sinal e, as alterações da longa exposição solar promovem sua hiperativação e consequente aumento da sinalização da via MAPK, progredindo assim o melanoma (WILMOTT et al., 2012; SENER et al., 2017; MARTÍN-GORGOJO et al., 2018).

¹ Subfamília de proteínas-quinase específicas de serina/treonina que respondem a estímulos extracelulares (mitógenos) e regulam várias atividades celulares, como expressão gênica, diferenciação, sobrevivência celular e apoptose (morte celular). Regulada por fosfatases, tem comunicação com outras vias, tal como a proteína quinase B e as vias AKT/m-TOR.

Figura 11 - Esquematização genética participante no desenvolvimento de melanoma através da via de sinalização MAPK e PI3K



Legenda: Homólogo Oncogênico Do Neuroblastoma RAS (NRAS); Homólogo Viral Do Oncogene B Do Proto-Oncogene RAF (BRAF); Inibidor De Quinase Dependente De Ciclina 2A (CDKN2A); Homólogo de Fosfatase e Tensina (PTEN); Proteína Tumoral (TP53); Fosfatidilinositol-3-cinases (PI3K); Linfoma de células B (BCL2); Proteína Retinoblastoma (RB); Ciclina D1 (CyclinD1); Proteína Cinase 4 dependente de Ciclina (CDK4); Proteína Cinase 6 dependente de Ciclina (CDK6).

Fonte: Adaptado de (BALLESTER et al., 2016; INAMDAR et al., 2010)

Nota: MAPK é uma família de serina/treonina-quinases envolvidas em no crescimento celular, na diferenciação e apoptose. A atividade das enzimas é regulada por uma cascata de fosforilação iniciada pela ativação de uma membrana receptora. A ativação do receptor é o resultado de uma conformação estrutural da proteína após a ligação. Esta alteração conformacional induzida pelo ligante promove a interação do receptor de membrana com uma proteína adaptadora intracelular (Shc, GRB2). A proteína adaptadora, por sua vez, interage com um fator de troca de nucleotídeos de guanina (SOS), que comunica o sinal a uma pequena proteína de ligação a GTP (RAS). Posteriormente, o RAS ativa o RAF (MAPKinase), a primeira quinase intracelular na cascata. As quinases RAF são uma família de serina/treonina quinases, incluindo BRAF. Uma vez ativado, o RAF fosforila a quinase à MEK, que por sua vez ativa a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), que pode fosforilar diretamente várias transcrições, regulando a expressão de genes envolvidos no crescimento e proliferação celular. Alterações em diferentes pontos desse caminho podem levar ao crescimento e proliferação descontrolados de células e contribuir para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, incluindo melanoma.

As alterações epigenéticas no DNA podem estar associadas ao desenvolvimento do melanoma, como fatores atuais na progressão (SARKAR et al., 2015; CHALMERS et al., 2017; SALVAING et al., 2017; FUJIWARA et al., 2018), o que pode incluir o perfil de expressão de miRNAs (RIEFOLO et al., 2019), além das modificações nas histonas e remodelamento da cromatina (ASKARIAN-AMIRI et al., 2018).

1.2 O melanoma Metastático (MM)

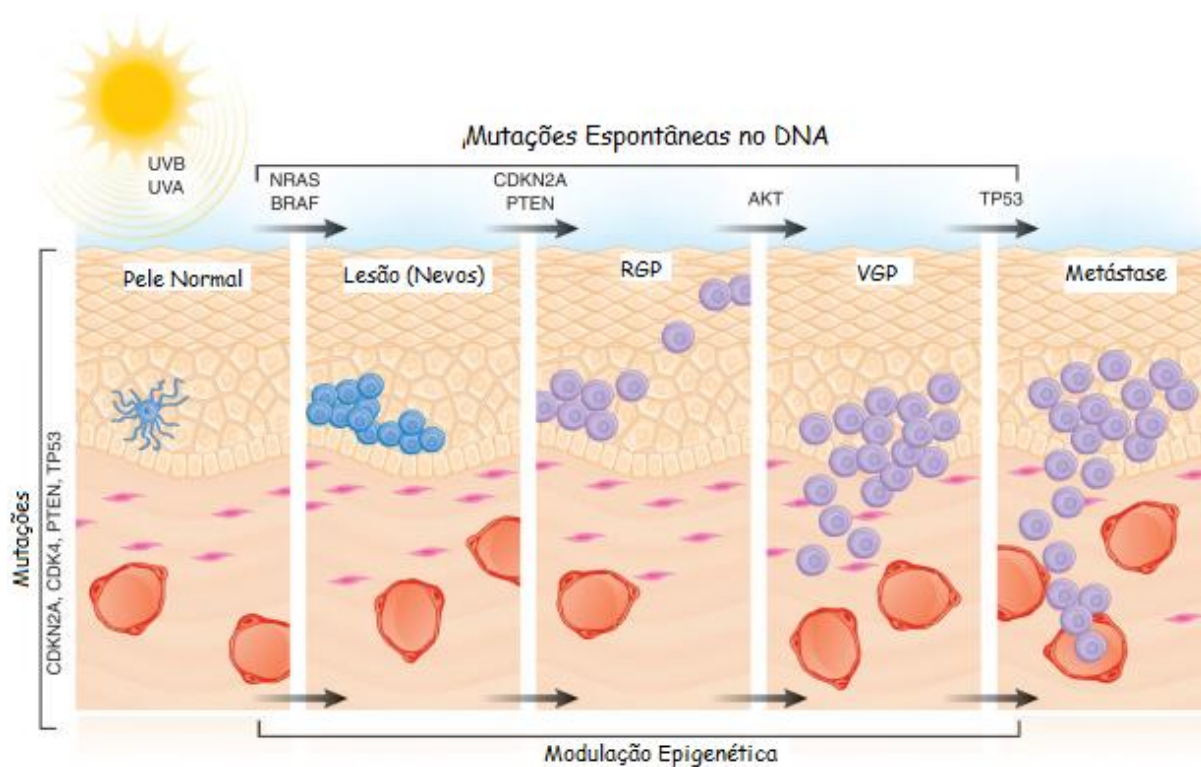
Quando as células apresentam a capacidade de invadir e evadir de barreiras físicas, como a matriz extracelular (GAJOS-MICHNIEWICZ et al., 2019; HAO et al., 2019), e extravasar para o sistema vascular e assim se infiltrar em órgãos secundários para sua proliferação, ocorre a metástase (SUGARBAKER, 1979; ADLER et al., 2017; HAYWARD et al., 2017; JANSSEN et al., 2017). Essa capacidade ocorre devido às alterações nas proteínas caderinas² que perdem sua função de promover a adesão intercelular, facilitando assim o desprendimento das células (FIDLER, 1989; VILLANUEVA et al., 2008).

O melanoma é uma das neoplasias mais letais devido à sua alta metastatização para múltiplos órgãos humanos, como o fígado, o cérebro e o pulmão (VILLANUEVA et al., 2008; VARAMO et al., 2017; LEONARD et al., 2017; BAI et al., 2018; THYAGARAJAN et al., 2018;). Esse processo multifatorial ocorre devido a instabilidade cromossômica (RUNDLE, 2017), ativação do oncogene, perda de genes supressores de tumor e redução da vigilância imunológica (JANSSEN et al., 2017; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2017), sensibilidade excessiva à RUV (LEONARD et al., 2017; THYAGARAJAN et al., 2018), assim como alterações de expressões de perfil de proteínas (CHEN et al., 2019), perfil genético e o papel dos miRNAs (HAYWARD et al., 2017; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2017; VARAMO et al., 2017; SMIT et al., 2019), já descritos anteriormente.

Seu desenvolvimento segue múltiplas etapas com características clínicas e histológicas distintas (Figura 12): (1) os nevos adquiridos se formam como resultado do aumento da proliferação dos melanócitos (GAJOS-MICHNIEWICZ et al., 2019); (2) crescimento com diferenciação anormal (HAYWARD et al.; 2017); (3) desenvolvimento da Radial Growth Phase (RGP, em português, fase de crescimento radial) dentro da epiderme; (4) os melanomas RGP adquirem potencial invasivo através de alterações genéticas, caracterizadas por ser a Vertical growth Phase (VGP, em português, Fase de crescimento vertical) (BEVONA et al., 2003; THYAGARAJAN et al., 2018; VILLANUEVA et al., 2008), tornando assim as opções de tratamento mais limitadas e (5) formação da lesão metastática, representando um estágio complexo da tumorigênese (HAYWARD et al., 2017; KANEHISA et al., 2017).

² Glicoproteínas transmembrana dependentes de Ca²⁺ extracelular que permitem a adesão entre células vizinhas (VAN ROY, 2014)

Figura 12 - Alterações morfológicas associadas à progressão do melanoma metastático e relacionadas às mutações espontâneas no DNA e suas modulações epigenéticas



Legenda: Raios Ultravioletas Tipo B (UVB); Raios Ultravioletas Tipo A (UVA); Fase De Crescimento Radial (RGP); Fase De Crescimento Vertical (VGP); Homólogo Oncogênico Do Neuroblastoma RAS (NRAS); Homólogo Viral Do Oncogene B Do Proto-Oncogene RAF (BRAF); Inibidor De Quinase Dependente De Ciclina 2A (CDKN2A); Homólogo de Fosfatase e Tensina (PTEN); Proteína Kinase B (AKT); Proteína Tumoral (TP53).

Fonte: Adaptado de (LARRIBÈRE; UTIKAL, 2019; MILLER et al., 2017)

Nota: A ilustração mostra alterações moleculares propostas associadas ao início e progressão do melanoma que podem ocorrer em diferentes estágios. A proliferação desenfreada de melanócitos normais, em resposta à radiação UV, resulta na formação de nevos benignos ou displásicos. O melanoma da fase de crescimento radial (RGP) apresenta capacidade de crescimento intraepidérmico, seguido de invasão da derme na fase de crescimento vertical (VGP), culminando assim na metástase. Nota-se que apenas cerca de metade dos melanomas são conhecidos por surgir de nevos, e a progressão pode ocorrer sem passar por todos os estágios descritos. Vários genes de suscetibilidade ao melanoma foram identificados, como as mutações hereditárias de *CDKN2A* e as mutações germinativas de *PTEN* e *TP53*. As mutações espontâneas do DNA foram observadas em vários genes e postulam estar envolvidos em diferentes estágios de progressão do melanoma, de acordo com evidências de diversos estudos. Zaidi, Day e Merlino (2008) propuseram que os eventos epigenéticos desempenham um papel importante na interação gene-ambiente associada à iniciação e progressão do melanoma.

O melanoma metastático (MM), segundo a Organização Mundial da Saúde, afetou mais de 200 mil pessoas, e foi responsável por 55 mil óbitos (LO et al., 2014; WHO, 2014; KEMP et al., 2017; WANG et al., 2017; CROSBY et al., 2018). Apresenta um prognóstico de 10 a 20% com uma sobrevida média global de apenas 9 meses (PANDIANI et al., 2017).

Por esta razão que resultados modestos são obtidos apenas com alguns agentes terapêuticos convencionais, aprovados pela FDA para o MM (NAVES et al., 2017), como a Dacarbazina (DTIC) e o Interferon-2 (HIL-2), ambos apresentando até 20% de taxa de

resposta (ROSA et al., 2017; PORTILHO et al., 2018), limitando sua terapêutica, o que torna necessárias novas alternativas (LO et al., 2014; CERQUEIRA-COUTINHO et al., 2017; GLAZER et al., 2017; PORTILHO et al., 2018; RICCI-JUNIOR et al., 2018).

1.3 Terapêutica associada a uma terapia-alvo

No tratamento de MM, a excisão cirúrgica vem como primeira opção terapêutica em lesões primárias (PAVRI et al., 2016; CRAWFORD et al., 2018;), proporcionando alívio na fase inicial (GELLER et al., 2017; PATEL et al., 2017; YUAN et al., 2017; YUAN et al., 2019) e melhor estadiamento da doença (GROB et al., 2018; ASCIERTO et al., 2019); entretanto, as possibilidades de cura são limitadas (NORAIN et al., 2016; GATZKA, 2018; HUBER et al., 2018;), uma vez que o melanoma apresenta grande capacidade de recidivas e metástase para outros órgãos (EGGERMONT et al., 2011; COENS et al., 2017; MA et al., 2019).

Essa abordagem muda com a introdução de novas estratégias, desde terapia adjuvante e imunoterapia (SHI et al., 2012; KOYAMA et al., 2016; HAFEEZ et al., 2017; QUINN et al., 2017; MINCU et al., 2019) até o desenvolvimento de agentes quimioterápicos (WEBER et al., 2017; EGGERMONT et al., 2018;), que se tornaram uma terapia alvo na oncologia contra as células tumorais, de forma que apresente um potencial direcionamento de atividade citotóxica apenas nas células alteradas (BRYSS et al., 2016; NAVES et al., 2017), como o caso da DTIC, o primeiro antineoplásico aprovado pela FDA em 1975 (DAVEY et al., 2016; CORRÊA et al., 2019).

Apesar da DTIC ser o quimioterápico-padrão, este não apresenta taxa de sobrevida ampla (BLAY et al., 2019; MISHRA et al., 2019; PIOTROWSKA et al., 2019; YANG et al., 2019). Contudo, desde 2011 o número de terapias direcionadas e alternativas terapêuticas vêm sendo buscadas globalmente (Quadro 1):

(a) terapias direcionadas:

- os inibidores BRAF, agentes como Vemurafenib, Dabrafenib e Encorafenib inibem mutações nesta proteína, bem presentes no MM decorrentes da exposição à RUV. Capazes de inibir a sinalização de MAPK, importante nos processos de progressão e diferenciação celular (SOLIT et al., 2011; HAUSCHILD et al., 2012; SCATENA et al., 2019);

- os inibidores MEK (ou MAPK), o Trametinib, Cobimetinib e Binimetinib que são agentes responsáveis por inibir ação das quinases, ou seja, impedem a catalisação dos resíduos de tirosina e treonina que, quando fosforiladas, ativam a proteína quinase MAPK (GILMARTIN et al., 2011; FLAHERTY et al., 2012; LONG et al., 2014; AASEN et al., 2019;)

(b) terapias imunológicas:

- o inibidor *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4* (CTLA-4, em português, Proteína associada aos linfócitos T citotóxicos 4), Ipilimumab, atua nas células T elevando sua concentração, o que anexa e bloqueia a atividade da proteína CTLA-4, responsável pelo controle da atividade dos linfócitos, importante para o sistema imunológico (BUCHBINDER et al., 2016; EGGERMONT et al., 2016; ASCIERTO et al., 2019);

- os inibidores *Programmed Cell Death Receptor 1* (PD-1, em português, Receptor 1 de morte celular programada), Pembrolizumab e Nivolumab, bloqueiam este receptor impedindo a inibição da atividade de células imunológicas e, conseqüentemente, a progressão do MM (KAUNITZ et al., 2017; EGGERMONT et al., 2018; ASCIERTO et al., 2019; EGGERMONT et al., 2019).

Quadro 1 - Lista dos tipos de terapia, e suas drogas específicas aprovadas pela FDA, com seus mecanismos de ação correspondentes, comumente usado no tratamento do melanoma

<i>Tipo de Terapia</i>	<i>Medicamento</i>	<i>Aprovação FDA</i>	<i>Mecanismo de Ação</i>
<i>Imunoterapia</i>	Interferon alfa-2b		Ativação JAK/STAT
	Interleucina-2	1998	Ativação de células imune
	Nivolumabe	2014	Anticorpo Monoclonal Anti-PD-1
	Pembrolizumabe	2015	
	Talimogene		Terapia oncolítica viral
Ipilimumabe	2011	Anticorpo monoclonal Anti-CTLA-4	
<i>Terapia-alvo</i>	Cobimetinibe		Inibidores da MEK
	Binimetinibe		
	Encorafenibe		
	Dabrafenibe	2013	Inibidores BRAF
Trametinibe	2013		
Vemurafenibe	2011		
<i>Quimioterapia</i>	Dacarbazina	1975	Alquilação do DNA
	Temozolomide		

Legenda: Proteína associada aos linfócitos T citotóxicos 4 (CTLA-4); Receptor 1 de morte celular programada (PD-1); homólogo viral do oncogene B do proto-oncogene RAF (BRAF).

Fonte: Adaptado de (ASCIERTO et al., 2013; IVES et al., 2017; GROB et al., 2018).

Nota: O quadro mostra as terapias atuais aprovadas pelo FDA e seus respectivos mecanismos de ação no melanoma.

1.3.1 Dacarbazina como quimioterápico-padrão no tratamento de MM

Entre as alternativas terapêuticas aprovadas pelo FDA, a dacarbazina é um dos membros da classe de drogas antineoplásicas conhecidas como agentes alquilantes não clássicos (LUI et al., 2007; XIN et al., 2016; BITEGHE et al., 2017; CORRÊA et al., 2019),

inicialmente desenvolvido como um pró-fármaco que requer ativação metabólica pelo sistema hepático do citocromo P4503 (WITHROW et al., 2012; KIM et al., 2016).

A atividade da DITC ocorre pela ligação aos grupos sulfidril das proteínas, formando íons metilcarbônicos que atacam grupos nucleofílicos, inibindo a síntese do DNA e RNA. Sua atividade antitumoral se dá por essa metilação de ácidos nucleicos e danos diretos ao DNA, resultando na morte do ciclo celular (FLORES, 2012; BOTTON, 2015; DING et al., 2016; WILSON et al., 2016; CROSBY et al., 2018).

Além disso, o uso de DTIC no tratamento do melanoma é restrito devido às suas diversas desvantagens: (i) administração por via intravenosa, o que gera um processo de aplicação doloroso (PASCHKE et al., 1993); (ii) sua taxa de absorção é incompleta, lenta e irregular devido à sua fraca solubilidade em água (STÉPHANOU et al., 2019); e (iii) apresenta instabilidade e sensibilidade à luz (KUNZE et al., 1980; YUNG et al., 1981). Ademais, o uso de DTIC pode produzir algumas reações adversas, como: hipotensão; redução do apetite; náusea; síndrome gripal; redução do número dos glóbulos vermelhos, brancos e plaquetas. Outra característica é a toxicidade gastrointestinal, comum do fármaco e que por muitas vezes limita sua esquema de doses (TEIMOURI et al., 2013; MA et al., 2014; BOTTON, 2015; CROSBY et al., 2018). Além disso, a taxa responsiva varia de 10 a 20% somente (KOPROWSKA et al., 2011; NIEWEG et al., 2015; ATKINSON, 2015; FORCE et al., 2017; WEHLER et al., 2017), e nenhum dos agentes utilizados no tratamento do MM demonstrou um aumento na sobrevida global, o que traz a necessidade de novos agentes para ambos: diagnóstico e terapia (XIN et al., 2016; GLAZER et al., 2017; RICCI-JUNIOR et al., 2018).

1.3.2 Terapêuticas adjuvantes: Associação com Terapia Fotodinâmica

Considerando a ineficácia e habitual toxicidade dos antineoplásicos disponíveis, métodos alternativos de tratamento de tumores vem sendo utilizados. Dentre eles, destaca-se a terapia fotodinâmica.

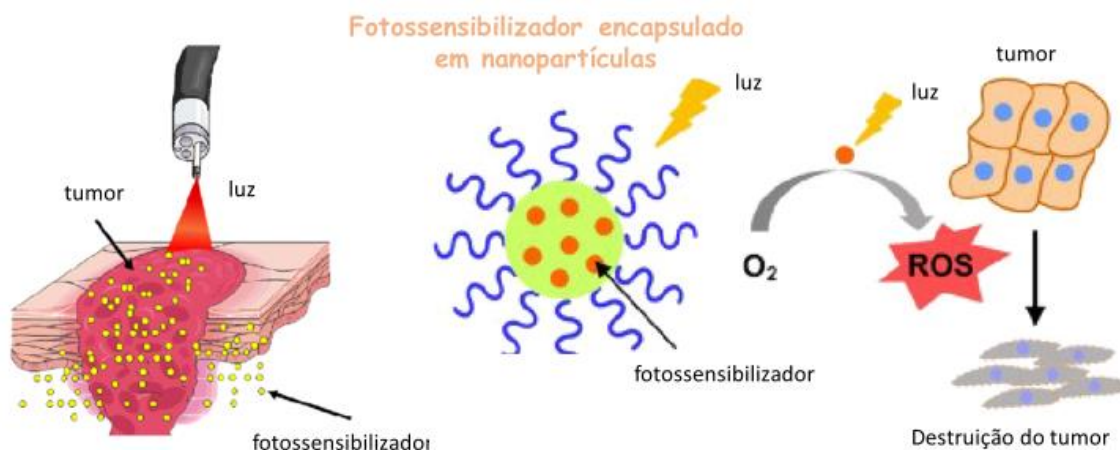
³ São oxidases de função mista, envolvidas na biotransformação de endobióticos, bem como de inúmeros xenobióticos de relevância terapêutica e ambiental. O conteúdo de CYP450 e, portanto, a função são regulados por suas sínteses coordenadas de hemoproteínas e rotatividade proteolítica (KWON et al., 2020).

A PDT, é classificada como uma terapia relativamente nova para o tratamento de doenças neoplásicas (SHARMAN et al., 1999; SIBATA et al., 2000; RUNDLE, 2017), sendo promissora desde a década de 1980, o que pode ser atribuído ao seu conceito básico: um método terapêutico em que as células e os tecidos neoplásicos são eliminados por uma associação de luz e agente fotossensibilizante, na presença de oxigênio molecular tecidual (SCHUITMAKER et al., 1996; CHATTERJEE et al., 2008; JIA et al., 2012; LI et al., 2018; PEREIRA et al., 2019)

A PDT apresenta algumas vantagens quando comparada com as terapias convencionais utilizadas para o tratamento do câncer: (i) apresenta especificidade pelo tumor, permitindo o tratamento localizado, o que não ocorre na quimioterapia (HE et al., 2019); (ii) apresenta regeneração do tecido normal após o tratamento, diferentemente da cirurgia (DENG et al., 2019); (iii) permite repetição da terapia, sem efeito tóxico cumulativo, o que ocorre na radioterapia (PHILIPP-DORMSTON, 2018); (iv) apresenta relação custo-benefício favorável (BALDEA et al., 2017); (v) consiste em uma terapia ambulatorial, diferentemente da radioterapia e da quimioterapia, que podem durar semanas ou meses, e da cirurgia, que pode requerer hospitalização prolongada (CHATTERJEE et al., 2008; HU et al., 2017; MILLER et al., 2017; KWIATKOWSKI et al., 2018).

Esta terapia é constituída por dois componentes atóxicos que, ao serem associados, induzem efeitos oxigênio-dependente no tecido; ou seja, na presença de oxigênio molecular, a combinação da luz visível com um fotossensibilizante produz agentes citotóxicos letais que podem inativar as células tumorais (SHARMAN et al., 1999; DOLMANS et al., 2003; CHILAKAMARTHI et al., 2017; DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA et al., 2017; PLOTINO et al., 2019). Após a administração do fotossensibilizante, um intervalo de tempo é definido para que ocorra acúmulo no tecido tumoral e, assim, irradiar a região com luz visível em um comprimento de onda específico de absorção do fotossensibilizante (HESSEL et al., 2011; VERDEL et al., 2019; DARWISH et al., 2020), o qual é ativado e transfere energia intramolecular da luz para o oxigênio que destrói as células tumorais, como esquematizado na figura 13, por meio de ROS.

Figura 13 - Esquema representativo da Terapia Fotodinâmica utilizando fotossensibilizadores encapsulados em nanopartículas para uso alvo-específico na destruição de tumores



Legenda: oxigênio (O_2); espécies reativas de oxigênio (ROS).

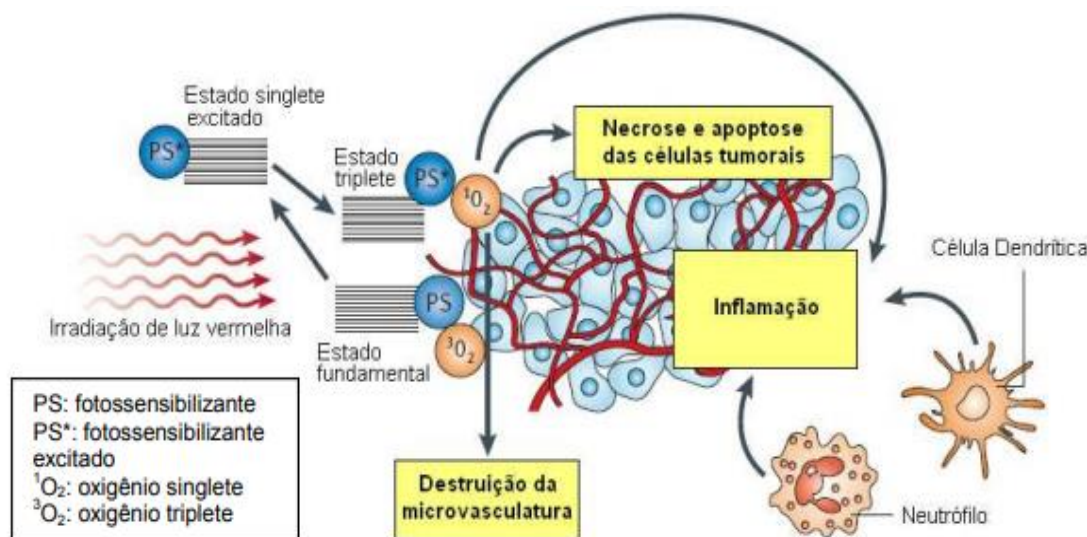
Fonte: Adaptado de (HONG et al., 2016).

Nota: A ilustração retrata o princípio da terapia fotodinâmica, que se caracteriza pela estimulação de uma substância sensível à luz, sendo um fotossensibilizador, como por exemplo a ftalocianina de zinco, que é administrada na corrente sanguínea por via intravenosa e/ou injetada localmente nas células tumorais. O sensibilizador se liga a uma célula tumoral no corpo com especificidade muito alta e após a estimulação com luz (laser), essas células cancerígenas direcionadas são destruídas pela formação de radicais ativos de oxigênio.

Um dos mecanismos fotoquímicos predominantes durante a PDT é uma reação de tipo II: em que um agente fotossensibilizante no estado triplete excitado (T_1) transfere energia diretamente para o oxigênio molecular ($3O_2$), formando o oxigênio singleto ($1O_2$) (BORNHÜTTER et al., 2018; LOOFT et al., 2018; PODERYS et al., 2020), este elemento é extremamente reativo e interage com substratos biológicos, o que induz dano oxidativo e morte celular por necrose pela geração de radicais livres (DOLMANS et al., 2003; TRIESSCHEJIN et al., 2006; CASTANO et al., 2006; AGOSTINIS et al., 2011). Estes resultados podem ser modulados por fatores como concentração do fármaco, sua localização, exposição à luz e disponibilidade de oxigênio.

Esse comportamento difere de agentes citotóxicos convencionais, que causam apenas a morte celular apoptótica. Somado a isso, a PDT, ocasiona o colapso da microvasculatura o que faz com que haja a privação local de oxigênio e nutrientes, resultando em hipóxia severa e persistente. Por fim, a PDT ativa a resposta imune antitumoral de células inflamatórias, como observado na figura 14.

Figura 14 - Mecanismo de ação da terapia fotodinâmica no combate à células tumorais, através de transferência de energia de um fotossensibilizador para o oxigênio molecular



Legenda: oxigênio (O_2); espécies reativas de oxigênio (ROS).

Fonte: Adaptado de (SHARMAN et al., 1999; CASTANO et al., 2006; AGOSTINIS et al., 2011; KWIATKOWSKI et al., 2018; CARDOSO, 2019)

Nota: A ilustração retrata o princípio da terapia fotodinâmica, que se caracteriza pela estimulação de uma substância sensível à luz, sendo um fotossensibilizador, como por exemplo a ftalocianina de zinco, que quando irradiada muda de um estado singlete excitado para um estado triplete, formando um oxigênio singlete pela transferência de energia. Este O_2 reage com sistemas biológicos causando: necrose celular tumoral; rompimento de microvasculaturas e inflamação, no qual se recruta células imunes.

Essas reações ocorrem no local imediato de absorção de luz e, portanto, apenas as células expostas sofrem o efeito citotóxico (AGOSTINIS et al., 2011; DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA et al., 2017; DENG et al., 2019), conferindo maior seletividade ao tecido neoplásico, produzido tanto pelo direcionamento preferencial do fotossensibilizante para o tecido tumoral como pela habilidade de se programar tais meios, como pelo uso de nanopartículas (HUANG et al., 2012; RICCI-JUNIOR et al., 2018; HELAL-NETO et al., 2019)

1.3.2.1 Ftalocianina de Zinco como agente fotossensibilizante

Fotossensibilizantes são compostos que absorvem energia da luz em comprimentos de onda específicos e a utilizam para induzir reações em outras moléculas, dentre alguns tipos, estão as ftalocianinas (VALLI et al., 2020), que apresentam propriedades como: seletividade tumoral; eficiência citotóxica pela fotogeração de oxigênio singlete (MONTE et al., 2020) e coeficiente de absorção na faixa de 650 a 850nm em energias de até 100J/cm², com ótima

penetração da luz no tecido, resultando em elevada resposta fototerápica. (LEDERER et al., 2016; DING et al., 2019; HUANG et al., 2019)

As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são extremamente dependentes do íon metálico central (MILAN et al., 2020; PEKBELGIN et al., 2020), como os complexos de zinco, Zn(II) e, alumínio, Al(III). A ftalocianina de zinco é a mais utilizada, e fácil de ser obtida, apresentando as propriedades que representam a janela ótima para a transmitância de luz pelos tecidos, tornando-a um fotossensibilizante promissor com potente atividade fotoquímica e fotodinâmica para aplicação na PDT do câncer (MATLOU et al., 2018; YU et al., 2018; DENG et al., 2019)

No entanto, a ZnPc é hidrofóbica, altamente insolúvel em água e em solventes fisiologicamente compatíveis (GARLAND et al., 2009; FEUSER et al., 2016; RICCI-JUNIOR et al., 2018; YU et al., 2018; THAKUR et al., 2019), o que torna difícil o desenvolvimento de formulações para a administração endovenosa e, por isso, o principal desafio da PDT está relacionado com a liberação desses fotossensibilizantes lipofílicos nas células tumorais (WANG et al., 2018; CARVALHO et al., 2019). Portanto, é necessária a incorporação em um sistema de liberação mais sofisticado, como as nanopartículas poliméricas, sistema nanoestruturado, que permite alta eficiência de encapsulação e a possibilidade de controlar a liberação do fármaco (HUANG et al., 2018; MA et al., 2018; NAIDOO et al., 2019; THAKUR et al., 2019; WEI et al., 2019)

Dessa forma, a eficácia do tratamento da PDT pode ser aperfeiçoado pela associação de um fotossensibilizante a um sistema de liberação adequados, se tornando uma alternativa viável para uma possível aplicação clínica.

1.3.3 Teranósticos como nova linha de pesquisa

Para uma terapia otimizada do câncer, é imperativo o desenvolvimento de uma nanoplataforma teranóstica que integre o elemento diagnóstico e o agente terapêutico, utilizando sistemas biológicos para obtenção desta finalidade. A individualização do tratamento e criação de perfis genéticos específicos, se torna o principal objetivo deste procedimento, otimizando tanto a eficácia quanto a segurança da terapêutica usada (TAN et al., 2017; WANG et al., 2019). Em virtude da imagem em tempo real, os agentes teragnósticos podem identificar a localização do tumor, detectar o acúmulo de agentes e monitorar a eficiência terapêutica, tendo a ablação de tumores com maior especificidade e sensibilidade

(JOKERST et al., 2011; DRUDE et al., 2017), portanto, o uso da nanotecnologia se torna indispensável, pois proporciona a aplicação integrada de nanofármacos e nanorradiofármacos, novos modelos clínicos de terapêutica e diagnose do câncer (HURST et al., 2016; NAGESETTI et al., 2016; PINTO et al., 2018)

1.4 Radiofármacos

Segundo a ANVISA, radiofármacos são definidos como “preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos”, possuindo uma biodistribuição com afinidade pelo órgão, ou tecido que se pretende avaliar por imagem, ou um estudo terapêutico (ANVISA, 2009; SAHA, 2010; GNANASEGARAN et al., 2014; COSTA et al., 2019). Essas características são possíveis pelo fato de que apresentam dois componentes em sua estrutura básica: um carreador que apresenta afinidade pelo alvo e um radionuclídeo emissor da radiação (DRUDE et al., 2017; MOEK et al., 2017). Em muitos casos, o radioisótopo pode emitir mais de um tipo de radiação (alfa, beta ou gama), podendo-o dotar de atividade teranóstica (terapia+diagnóstico) (IDÉE et al., 2013; WRIGHT et al., 2015; POLYAK et al., 2018; SANTOS-OLIVEIRA, 2019).

Em uso diagnóstico, os radionuclídeos mais utilizados são os emissores gama ou pósitronicos (β^-), que atravessam com facilidade o tecido e podem ser detectados através de equipamentos como Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT, em português, tomografia computadorizada de emissão de fóton único) e Pósitron Emission Tomography (PET, em português, tomografia de emissão de pósitrons), respectivamente (REYNOLDS et al., 2017; POLYAK et al., 2018; O'NEILL et al., 2019), pela qual é possível avaliar a fisiologia e a bioquímica do órgão, sendo atualmente disponível para fins terapêuticos e de imagem, destacados no Quadro 2 e Quadro 3.

Quadro 2 - Radiofármacos utilizados na medicina nuclear para o diagnóstico de tumores, com suas respectivas aplicações clínicas e mecanismo de ação

USO DE KITS RADIOFARMACÊUTICOS NA MEDICINA NUCLEAR		
<i>Radiofármaco</i>	<i>Aplicação clínica</i>	Mecanismo de Ação
^{99m} Tc-DTPA ^{99m} Tc-DMSA ^{99m} Tc-EDTA	Rins	Difusão passiva
^{99m} Tc-MDP	Ossos	Troca iônica
^{99m} Tc-MAA	Pulmonar	Bloqueio capilar, partículas de macroagregados de albumina retidas nos capilares pulmonares
^{99m} Tc-enxofre	Células retículoendoteliais	Fagocitose
^{99m} Tc-Fitato	Fígado	Fagocitose
¹²³ Iodo	Captação de tireóide	Transporte ativo
¹⁸ F-FDG	Tecidos muito metabólicos	Metabolismo

Legenda: Tecnécio-99-metaestável (^{99m}Tc); Flúor-18 (¹⁸F); Dietilenotriamino-pentacetato (DTPA); Ácido dimercaptossuccínico (DMSA); Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA); Metilendifosfonato (MDP); Macroagregado de Albumina (MAA); Fluorodesoxiglicose (FDG).

Fonte: Adaptado de (SAHA, 2010; PORTILHO et al., 2018; SANTOS-OLIVEIRA, 2019)

Nota: O quadro ilustra os principais radiofármacos utilizados na medicina nuclear para uso em diagnósticos de alguns tecidos e tumores.

Quadro 3 - Radionuclídeos utilizados na medicina nuclear para a terapia de tumores, com suas respectivas energia e modo de decaimento

USO DE RADIONUCLÍDEOS NA MEDICINA NUCLEAR			
<i>Radionuclídeo</i>	<i>Meioa Vida</i>	<i>Decaimento</i>	<i>Emissão de Energia</i>
¹³¹ I	8 dias	β^-	0,81 MeV
⁶⁷ Cu	2,6 dias	β^-	0,57 MeV
¹⁷⁷ Lu	6,7 dias	β^-	0,5 MeV
⁸⁹ Sr	50,5 dias	β^-	1,46 MeV
²¹² Bi	1 hora	α	6 MeV
²¹¹ At	0,30 dias	α	6 MeV
¹²⁵ I	60,3 dias	Captura Eletrônica	0,4 KeV

Legenda: Iodo (¹³¹I); Cobre (⁶⁷Cu); Lutécio (¹⁷⁷Lu); Estrôncio (⁸⁹Sr); Bismuto (²¹²Bi); Astatina (²¹¹At); Iodo (¹²⁵I)
 Fonte: Adaptado de (SAHA, 2010; PORTILHO et al., 2018; SANTOS-OLIVEIRA, 2019)

Nota: O quadro ilustra os principais radionuclídeos utilizados na medicina nuclear para uso em terapia de alguns tumores, indicando sua meia vida, modo de decaimento e respectivas energias de emissão.

1.5 Nanotecnologia no sistema de liberação controlada

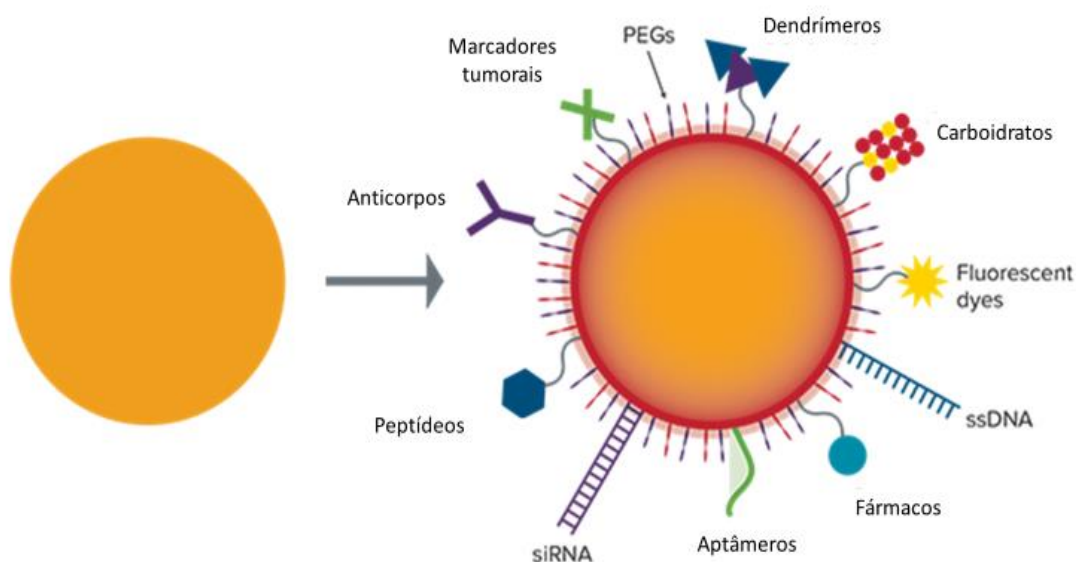
A capacidade da nanotecnologia nas últimas décadas para moldar a matéria na escala de nanômetros foi de fundamental relevância para a área da saúde, avançando de modo a resolver diversos problemas como: solubilidade, direcionamento e toxicidade (SCHAFFAZICK et al., 2003; FORMARIZ, 2004; BHIRDE et al., 2011; HESSEL et al., 2011; PERERA et al., 2015).

Um sistema amplamente utilizado é o de nanopartículas, projetadas para suprir carências nos tratamentos tradicionais que tornam-se cada vez mais limitados (DARAE et al., 2016; PORTILHO et al., 2018). Diversas formulações podem ser encontradas dentro deste sistema nanoestruturado, destacando-se as nanopartículas poliméricas, (COOPER et al., 2014; DARAE et al., 2016; ANDREOU et al., 2017; JAHANGIRIAN et al., 2017), que surgem como alternativa viável à esses desafios. Um novo paradigma dentro da medicina, principalmente no que tange à medicina nuclear, são os radiofármacos em escala nanométrica, definidos como nanoradiofármacos. Tais estruturas apresentam propriedades particulares que permitem vantagens no carregamento de fármacos, ou radiofármacos, tornando o biodirecionamento maior, o que otimiza, consequentemente: (i) o resultado terapêutico; (ii)

modificação tecidual do fármaco; (iii) proteção do sistema gastrointestinal (TGI); (iv) estabilidade do fármaco e, principalmente (v) a capacidade de ultrapassar barreiras biológicas (CARVALHO et al., 2020; HUANG et al., 2020; NAGARAJU et al., 2020; RIZWANULLAH et al., 2020), propriedades estas que ocorrem devido à influência do tamanho das nanoestruturas, variando, em geral, entre 100-500nm (KHODABANDEHLOO et al., 2016)

Não obstante, outras características, como forma, carga superficial, grupos funcionais e hidrofiliicidade, são propriedade físico-químicas que influenciam a internalização celular das nanopartículas, somado à circunstância no meio de exposição das células (LI et al., 2016; DREIFUSS et al., 2018; ZHOU et al., 2018; BANERJEE et al., 2019). Para melhorar o reconhecimento, e serem capazes de realizar ação em um alvo específico, são funcionalizadas, ou seja, sua superfície recebe um revestimento com moléculas biológicas de interesse (anticorpos, receptores celulares e outros) ou fármacos alvo-específicos (LI et al., 2016; ZHANG et al., 2016; PORTILHO et al., 2018; REIFARTH et al., 2018), como observado na figura 15.

Figura 15 - Diagrama de funcionalização da superfície de nanopartículas a fim de torna-las específicas para receptores celulares, facilitando sua absorção intracelular



Legenda: Polietilenoglicol (PEG); *stranded* DNA (ssDNA); *small interfering* RNA (siRNA).

Fonte: Adaptado de (DA et al., 2009; GOTO, 2016; BANERJEE et al., 2016; LIU et al., 2018)

Nota: A imagem representa à esquerda uma nanopartícula comum e à direita uma nanopartícula com sua superfície funcionalizada com diversos ligantes, sendo assim capaz de permitir a ligação de uma variedade de moléculas alvo, incluindo drogas, anticorpos, ácidos nucleicos aos receptores de células tumorais. Relação direta com suas propriedades físico químicas, onde os fatores que mais contribuem são tamanho, hidrofiliicidade, carga superficial e sua modificação estrutural da superfície.

1.5.1 Sistemas nanoestruturados e seus mecanismos de ação

A principal rota de internalização das nanopartículas se dá por vias endocíticas e não endocíticas (BRKIĆ AHMED et al., 2017; DREIFUSS et al., 2018; ZHOU et al., 2018).

O transporte passivo ou via não endocítica, ocorre por diferença de gradiente, e, geralmente se aplica à moléculas pequenas (<30nm), hidrofóbicas e sem carga superficial, que atravessam passivamente a membrana através dos poros. Em casos de nanopartículas com diâmetro maiores (>30nm), o transporte ativo ocorre com auxílio de proteínas transportadoras, colaborando com a inserção na membrana (KETTLER et al., 2014; BELLI et al., 2017; PINTO et al., 2018; PORTILHO et al., 2018; REIFARTH et al., 2018; ZHOU et al., 2019).

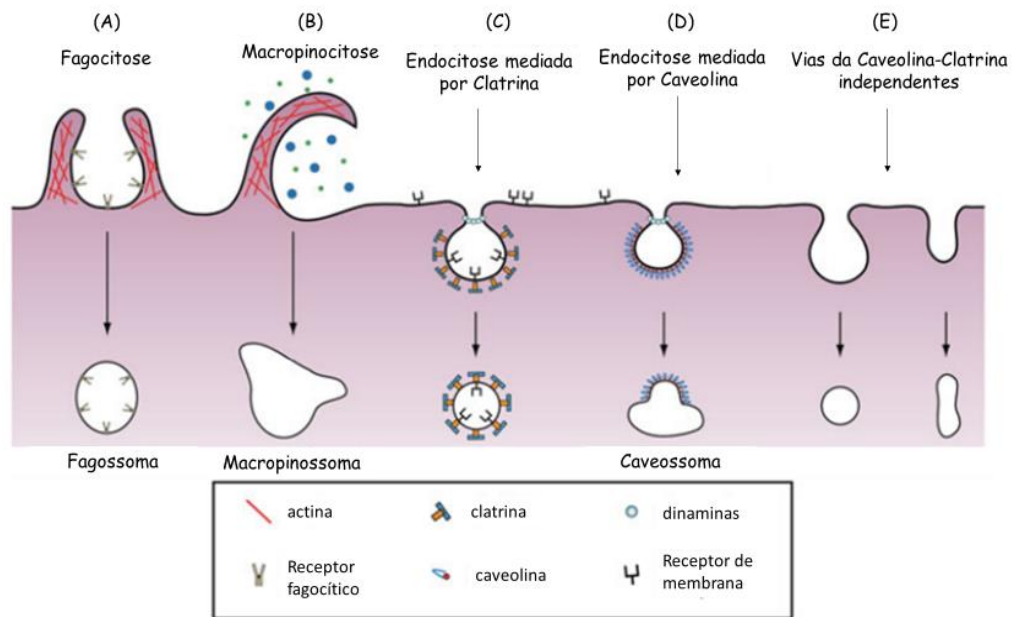
A via endocítica é dependente do tamanho da partícula e de suas modificações estruturais na superfície, conforme demonstrado na figura 16, ocorre normalmente por fagocitose, pinocitose ou macropinocitose (COOPER et al., 2014; PORTILHO et al., 2018; REIFARTH et al., 2018).

Outra via importante na internalização de NPs, é a via dependente de caveolina⁴ e clatrina. No caso da caveolina, o processo envolve a presença de uma proteína, caveolina-1, que assume a forma de gancho no lado citosólico da membrana plasmática, permitindo que a NP penetre no interior celular, (NWOSU et al., 2016; KUO et al., 2018; BANERJEE et al., 2019). No caso do processo envolvendo a clatrina⁵, essa é recrutada e forma uma ligação receptor-ligante, levando a criação de uma vesícula a partir da polimerização da clatrina-1, que é liberada no citoplasma pela constrição pela dinamina, facilitando a endocitose (FERREIRA et al., 2018; METTLEN et al., 2018; WEI et al., 2018).

⁴ Proteína de membrana oncogênica associada à endocitose, organização da MEC, distribuição do colesterol, migração celular e sinalização, que está envolvido em alterações metabólicas, uma estratégia crítica adotada pelas células cancerígenas para sobrevivência.

⁵ Proteína de membrana responsável pela captação de receptores e transportadores transmembranares, pela remodelação da composição da membrana plasmática em resposta a mudanças ambientais e pela regulação da sinalização da superfície celular.

Figura 16 - Esquema das principais vias de endocitose de nanopartículas em células eucarióticas, por meio da internalização de partículas

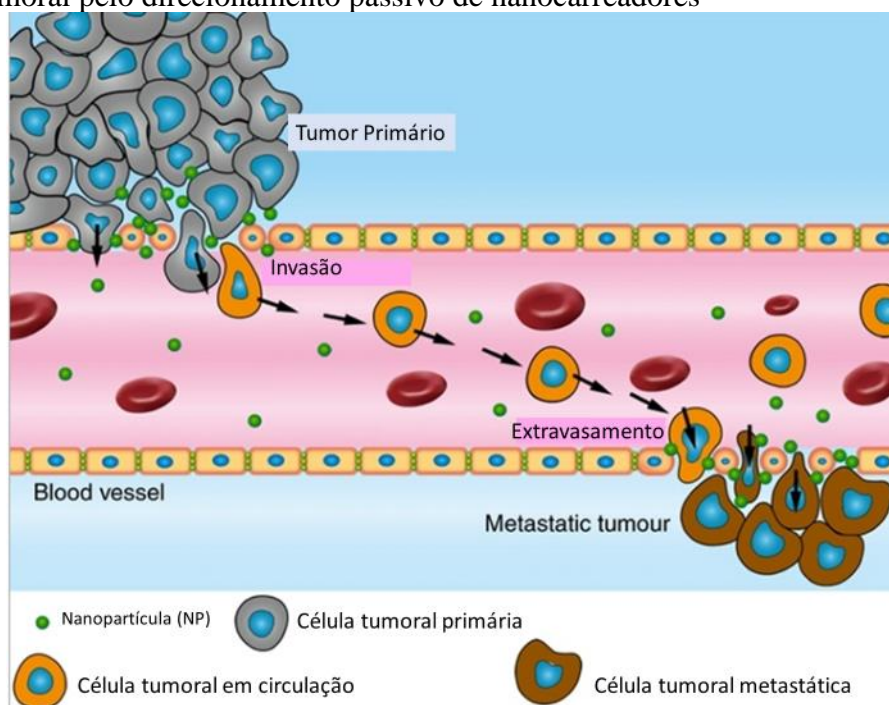


Fonte: Adaptado de (BANERJEE et al., 2016)

Nota: A imagem representa a via de internalização de sistemas nanoestruturados. A etapa inicial representa vias endocíticas que tem como consequência a formação de vesículas intracelulares. Em (A) ocorre a fagocitose, mediada por fagócitos que internalizam materiais exógenos, geralmente com diâmetro >750nm, para formar um fagossoma que será processado no interior da célula. Pinocitose, em (B), mediada por actina que projeta uma membrana capaz de englobar o fluido extracelular com as partículas. A endocitose mediada por clatrina (C) apresenta a formação de uma vesícula, a partir da formação de uma proteína citosólica, a qual é capaz de interagir com outras moléculas por meio de receptores de membrana. A endocitose mediada por caveolina (D) induz a curvatura da membrana e, com a dinamina, constringe-a liberando o endossoma no citoplasma, assim como em (C). Vias alternativas, não clássicas, independentes das proteínas citosólicas (E) que realiza atividade endocitária e transdução de sinais celulares.

Em geral, nanossistemas administrados por via sistêmica são acumulados na zona do tumor através do efeito de permeação e retenção (EPR) devido à peculiar arquitetura dos vasos sanguíneos desses tecidos, que se apresentam com endotélio defeituoso e fenestrado, permitindo a entrada de estruturas maiores, o que é esquematizado na figura 17. À este efeito é atribuído às propriedades do microambiente tumoral, a baixa taxa de eliminação e a pobre drenagem linfática. A eficácia desse processo é relacionada ao tamanho de partícula, carga de superfície ou hidrofobicidade (NICHOLS et al., 2014; BAETKE et al., 2015; KANG et al., 2019; WU et al., 2019).

Figura 17 - Ilustração esquemática do mecanismo de retenção e permeabilidade na região tumoral pelo direcionamento passivo de nanocarreadores



Fonte: Adaptado de (GOLOB-URBANC et al., 2019; WANG et al., 2019; RAPOSO et al., 2020)

Nota: A imagem representa o efeito de permeabilidade e retenção endotelial, que permite o extravasamento de macromoléculas e, assim, retem-se de forma prolongada no tecido patológico. Este efeito ocorre ao rápido processo de angiogênese no ambiente tumoral, em que vasos sanguíneos são produzidos de maneira defeituosa, formando fenestrações entre as células do epitélio, o que permite uma maior permeação das partículas no tecido tumoral, principalmente de tamanho entre 20 a 200nm. Ademais, nesta região a deficiência dos vasos linfáticos proporciona uma maior acúmulo destes carreadores e permite uma permanência maior no sítio alvo.

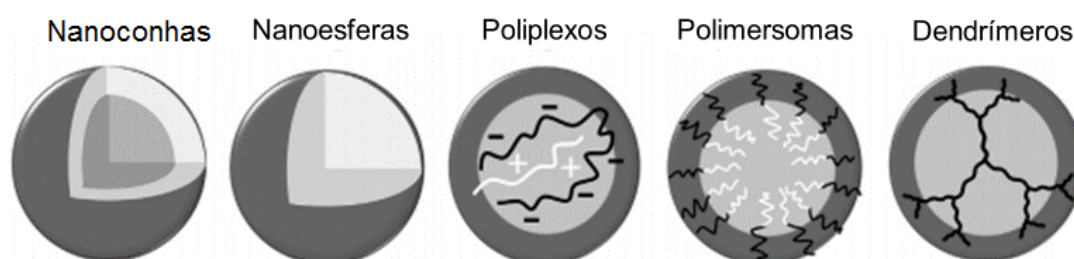
1.5.1.1 Nanopartículas Poliméricas

As nanopartículas poliméricas oferecem as mesmas vantagens de todas as outras formulações, incluindo proteção de agentes terapêuticos contra a degradação, por fatores como pH e luz, e a limitação da citotoxicidade, o que causa menor irritação dos tecidos quando em contato com a formulação farmacêutica (LANGER et al., 1976; JARAI et al., 2020). Exclusivamente, as NPs poliméricas podem oferecer uma vantagem adicional, a personalização mais fácil, decorrentes das propriedades inerentes às moléculas de nível monomérico (LIECHTY et al., 2010; HUANG et al., 2012; BELLI et al., 2017; SANTOS-OLIVEIRA, 2019; CHUNG, 2020). Dependendo das propriedades específicas do polímero e das condições sintéticas, uma grande variedade de estruturas de NP poliméricas pode ser formada (figura 18):

- (a) Nanoconchas: constituídas por um invólucro polimérico ao redor de um núcleo líquido hidrofóbico ou hidrofílico, no qual o princípio ativo pode

- estar no núcleo, embebido na membrana polimérica ou na superfície da estrutura dependendo do momento em que se adiciona o fármaco;
- (b) Nanoesferas: consiste em um polímero com uma matriz distribuída por meio de encapsulamento ou ligação covalente, e o fármaco é adsorvido na superfície da nanoesfera, sendo geralmente esféricas e não esféricas;
 - (c) Políplexos: complexos de polieletrólitos formados por atrações eletrostáticas, amplamente utilizado em aplicações de entrega de genes conjugando diferentes oligonucleotídeos carregados negativamente;
 - (d) Dendrímeros: constitui uma rede de polímeros, em que a encapsulação se dá em sua superfície ou na rede estruturada;
 - (e) Polimerossomas: são estruturas vesiculares de copolímeros de blocos anfífilos, tendo vantagens sob lipossomas, com alta versatilidade química e estabilidade.

Figura 18 - Tipos de nanopartículas poliméricas



Fonte: Adaptado de (JARAI et al., 2020).

Nota: A imagem representa os tipos de nanopartículas, que pode ser: nanocápsulas, ou *nanoshell*; partículas de polímero sólidas, ou nanoesferas; complexos induzidos por carga entre polímeros catiônicos e iônicos, ou políplexos; estruturas imiscíveis do tipo lipossomo, ou polimerossomas; estruturas repetidas altamente ordenadas, ou dendrímeros.

Essas várias estruturas facilitam a funcionalização das NPs assim como suas propriedades que podem ser controladas com precisão, ajustando as propriedades físico-químicas. (LEE et al., 2017; ABOUITAH et al., 2020; JARAI et al., 2020; MARQUES et al., 2020).

Abordando um sistema triano de DDS, a funcionalização de NPs envolve o revestimento com estruturas bioquímicas semelhantes a receptores membranares, para a produção de entidades biológicas bifuncionais, a fim de contornar barreiras da membrana celular (PARDRIDGE, 2017; GUMIENNA-KONTECKA et al., 2019). O que se torna uma estratégia, semelhante ao Cavalo de Tróia, para uma terapêutica mais eficiente, capaz de

atingir o mais próximo possível do microambiente de tecidos patológicos, com perfis farmacodinâmicos e farmacocinéticos ideais (WU et al., 2016). Este sistema apresenta duas vantagens: (i) citotoxicidade específica, o que retém a capacidade de retorno do tumor e (ii) lise celular através de drogas alvo-específicas (OUYANG et al., 2020). O sistema troiano, hoje, vem se tornando bem-sucedido na administração de medicamentos, distribuindo a carga farmacológica de forma a liberar de modo seletivo, e reduzir a atividade no tecido normal (WU et al., 2016; BRAVO-OSUNA et al., 2019; NGO et al., 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas biencapsuladas com dacarbazina e ftalocianina de zinco, radiomarcadas com tecnécio-99-metaestável, para formar uma plataforma nanoteragnóstica para o melanoma metastático, avaliando o perfil de biodistribuição em modelo *in vivo* e citotoxicidade em modelo *in vitro*.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Produzir nanopartículas poliméricas (NPs);
- b) Encapsular Dacarbazina (DTIC) e Ftalocianina de zinco (ZnPc) nas NPs;
- c) Caracterizar as nanopartículas de PLA/PVA/DTIC/ZnPc e NPs vazias;
- d) Avaliar a citotoxicidade *in vitro* das nanopartículas de PLA/PVA/DTIC/ZnPc e NPs vazias em modelo de células de melanoma;
- e) Incorporar o radionuclídeo Tecnécio-99-metaestável nas NPs de PLA/PVA/DTIC/ZnPc e NPs vazias;
- f) Avaliar a estabilidade e eficiência da radiomarcagem das NPs de PLA/PVA/DTIC/ZnPc/Tc-99m e NPs vazias radiomarcadas;
- g) Avaliar o perfil de biodistribuição das NPs de PLA/PVA/DTIC/ZnPc/Tc-99m em modelo animal controle.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Para realização deste trabalho foram utilizados os seguintes itens: Poli(ácido láctico) (PLA) adquirido da Sigma Aldrich®, utilizado na forma de pó, com peso molecular de 60.000/mol; Poli(álcool vinílico) (PVA) adquirido da Sigma Aldrich®, utilizado na forma de pó, como grau de hidrólise de aproximadamente 85%; DTIC 200mg (Fauldacar®) fabricado pela Libss, na forma de pó liofilizado injetável; Zinc Phthalocyanine (Ftalocianina de Zinco) adquirido da Sigma Aldrich®, utilizado na forma de pó; DMSO (Dimetilsulfóxido) adquirido da Sigma Aldrich®; Diclorometano adquirido da VETEC®, grau de pureza P.A.; Sal de tetrazólio XTT (2,3-bis(2-metiloxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2Htetrazólio-5-carboxanilida) adquirido da Sigma Aldrich®; Linhagem celulares fornecidas pelo Departamento de Biofísica Molecular da Universidade de Lodz, Polônia), obtidas a partir da American Type Culture Collection (Rockville, MD, EUA); SnCl² (Cloreto Estanoso) adquirido da Sigma Aldrich®; ^{99m}Tc (Tecnécio 99 metaestável) IPEN/CNEN, fornecido pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ); Acetona adquirido da Merck, grau de pureza P.A.; Papel de Whatman n° 1; Camundongos Balb/c adquiridos do Biotério da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO);

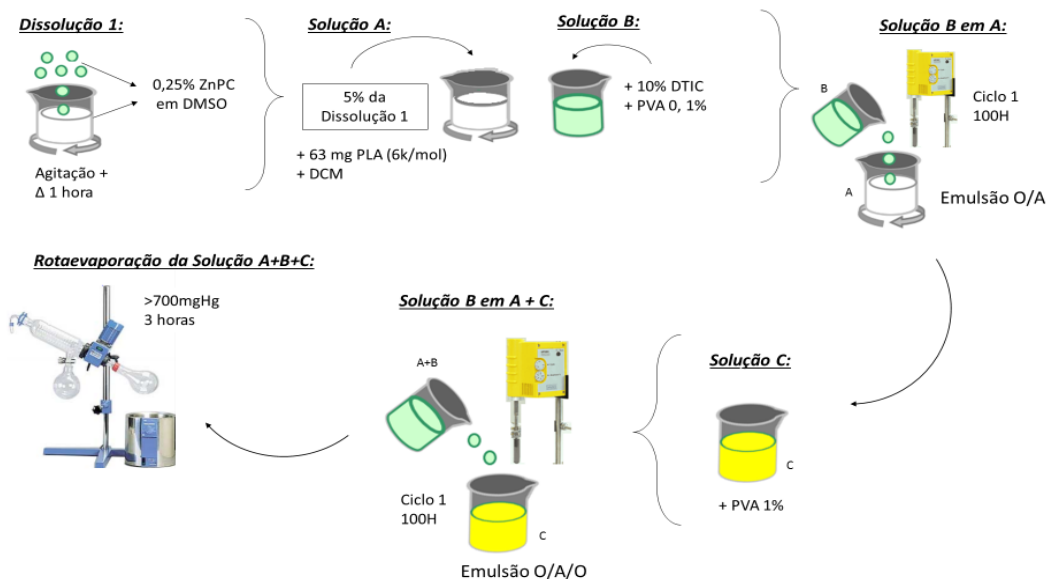
3.2 Equipamentos

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: Balança Ay220, Shimadzu; Ultrassonicador (Ultrasonic processor) GEX600, Sigma, St Louis, MO; Rotaevaporador a vácuo Fisatann MFP - 3D-BIOTM; Ultracentrífuga Beckman, TL-100 ultracentrifuge UMG; Calibrador de dose CRC® 25R, Capintec; Contador gama Perkin Elmer modelo Wizard® 2470; Photon Lase I, DMC, São Carlos, Brasil; Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido).

3.3 Desenvolvimento das Nanopartículas (NPs)

Para a obtenção das nanopartículas PLA/PVA/DTIC/ZnPc, foi utilizado o método de dupla emulsificação seguida de evaporação do solvente, descritos na figura 19. Inicialmente foi preparado a solução de ZnPc a 0,25%, solubilizando 2,5mg em 10mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) sob aquecimento de 1 hora. Posteriormente, à 5% desta solução foi adicionado 63mg de PLA (com uma massa molar de 60.000 g/mol), já previamente solubilizados em 6mL de diclorometano (DCM), elaborando uma solução A. Para o procedimento descrito, esta solução A foi convertida em uma solução B, contendo 10% de dacarbazina, ao qual corresponde a massa polimérica, solubilizados em PVA a 0,1%. A mistura foi processada usando ultrasonic por 5 minutos em banho de gelo, com potência de 100H e ciclo 1, para produzir uma emulsão de água em óleo (O/A). Esta emulsão foi emulsificada novamente com solução de PVA 1% por ultrassonicador (100H/ciclo 1) para produzir uma emulsão A/O/A.

Figura 19 - Protocolo de dupla emulsificação para produção de nanopartículas poliméricas (NPs) e encapsulação com o fármaco dacarbazina e o fotossensibilizador ftalocianina de zinco



Legenda: Ftalocianina de Zinco (ZnPc); Dimetilsulfóxido (DMSO); Ácido Poliláctico (PLA); Diclorometano (DCM); Dacarbazina (DTIC); Álcool Polivinílico (PVA); emulsão óleo em água (O/A); Aquecimento (Δ).

Fonte: Adaptado de (BERNARDES et al., 2017; RICCI-JUNIOR et al., 2018).

Nota: A ilustração mostra a metodologia da produção de nanopartículas PLA/PVA/DTIC/ZnPc (I), onde inicialmente é realizada a dissolução da ZnPc em 10mL de DMSO, para em seguida ser utilizada 250 microlitros na formulação da Solução A, que contém PLA e DCM. Na solução B, solubiliza-se a dacarbazina em 1 mL de PVA 0,1%. Em seguida, esta solução B é vertida na solução A no ultrassonicador por 5 minutos, estando em banho de gelo. Posteriormente, esta solução final é vertida por gotejamento

durante 5 minutos, em uma solução C contendo 9 mL de PVA 1%, no ultrasonicador. A emulsão O/A/O permanece no ultrasonic por 4 minutos, antes de ir ao rotaevaporador, numa pressão >700mgHg durante aproximadamente 3 horas, até que todo o DCM tenha evaporado. Para as nanopartículas de PLA/PVA (II) e PLA/PVA/DTIC (II) foram utilizadas os mesmos processos, excluindo o uso da ZnPc e DTIC quando necessário.

Além disso, nanopartículas vazias (PLA/PVA) e nanopartículas encapsuladas apenas com dacarbazina (PLA/PVA/DTIC) também foram preparadas aplicando a mesma metodologia. Em seguida o diclorometano foi evaporado sob pressão reduzida durante 3h a 25°C.

3.4 Caracterização físico-química das NPs

3.4.1 Determinação do diâmetro médio por espectroscopia de correlação de fótons

A partir do Dynamic Light Scattering (DLS, em português, espalhamento dinâmico de luz), utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido), é possível determinar a distribuição do tamanho das nanopartículas, tamanho médio e índice de polidispersidade (PDI), através do método de dispersão de partículas em fase líquida associado com um processo de medida óptica pela difração de laser. Para cada análise, utilizou-se a diluição das amostras em água ultrapura na proporção de 1:20, as medições foram realizadas em triplo a 25°C e o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi de 173°, usando uma cubeta de quartzo de 12 mm². A média \pm desvio padrão (DP) foi avaliada.

3.4.2 Análise topográfica por Microscopia de Força Atômica (AFM)

Os experimentos de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizados com um Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara) usando o software Nanoscope Analysis 1.50 (Bruker) no modo de derivação (contato intermitente) para aquisição de imagens topográficas e de fase, a fim de determinar o diâmetro, altura e composição das fases das partículas. As experiências foram realizadas com uma constante de 0,24 N/m e um raio de 2 nm. As soluções de

partículas foram diluídas para uma concentração de aproximadamente 10⁹ a 10¹⁰ partículas por 1cm³. As soluções foram deixadas em uma câmara de vácuo protegida contra contaminação. O experimento foi realizado com uma resolução de varredura de 256×256 linhas e uma frequência de 0,5 Hz.

3.5 Avaliação da citotoxicidade das NPs

3.5.1 Linhagem celular do melanoma

Células de melanoma humano (MV3) foram utilizadas neste estudo a fim de avaliar o perfil citotóxico das nanopartículas produzidas para o melanoma. As células foram cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), enriquecido com 10% de SFB (soro bovino fetal), 3,7g/L de bicarbonato de sódio, 5,2 g/L de HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinoetilsulfônico), 0,5 U/ml de penicilina e 0,5 mg/ml de estreptomicina a 37°C/5% de CO₂.

3.5.2 Ensaio de Viabilidade Celular

A fim de avaliar se as NPs (I), (II) e (III), poderiam interferir na sobrevivência celular, foi realizado o teste de MTT [3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo], determinando após atingir a confluência, um breve tratamento com 0,1/0,01% de tripsina/ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA), onde foram submetidas à centrifugação, ressuspensas em DMEM e cultivadas (10⁴ células/poço) em placas planas de 96 poços para tratamento com NPs nas seguintes concentrações: (i) 100µg e (ii) 20µg.

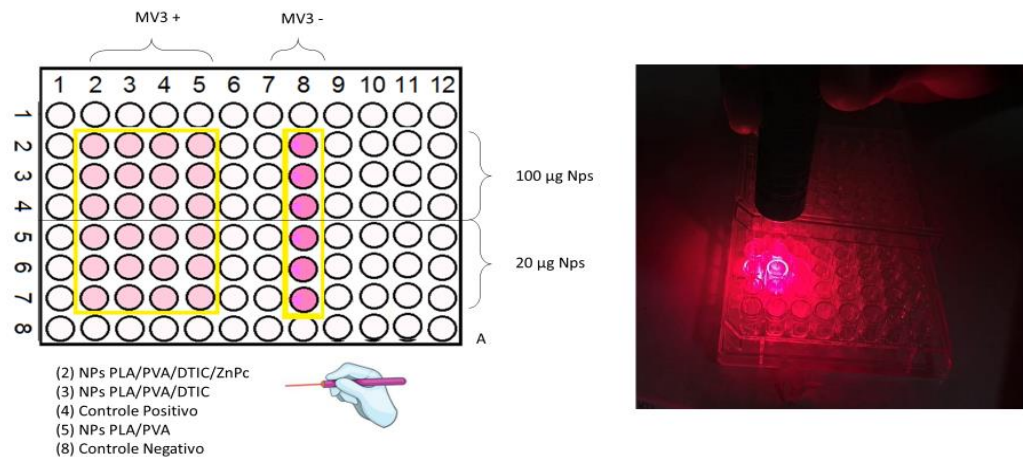
Posterior ao período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com uma solução de MTT a 1 mg/ml durante 2 horas. Em seguida, a solução de MTT foi removido e 200µL de isopropanol absoluto foi adicionado para lisar as células e solubilizar os cristais de MTT em todas as condições. Finalmente, a absorção em cada poço foi lida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas (BIO-RAD, Hercules, CA), onde para

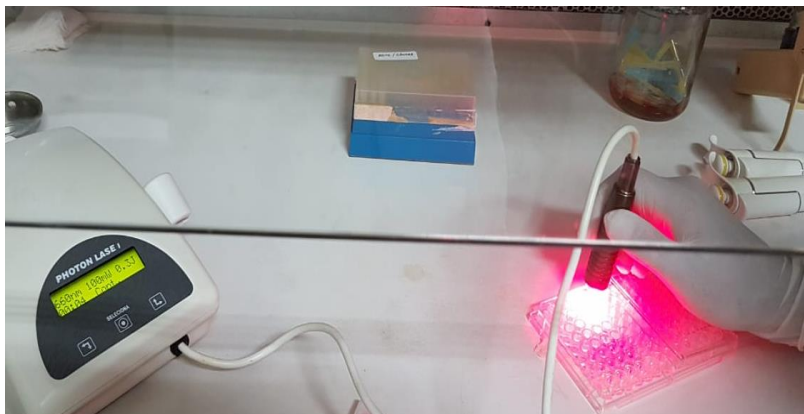
os cálculos, uma curva padrão foi construída usando concentrações crescentes de células MV3 aderidas (10^3 - 5×10^4 células/poço) para realizar o ensaio como descrito por (HELAL-NETO et al., 2019a). Os resultados são apresentados como porcentagem de controle.

3.5.3 Irradiação com Laser Infravermelho para avaliação da Terapia Fotodinâmica

Os poços contendo a linhagem de células MV3, em concentrações de 20 μg e 100 μg , tratadas com: PLA/PVA/DTIC/ZnPc (2); PLA/PVA/DTIC (3) e PLA/PVA (5), foram irradiados com laser infravermelho no comprimento de onda de 660nm, e irradiância de 28J/cm², por 2,5 minutos usando o Photon Lase I (potência=100mW, meio ativo InGaAlP, fabricante: DMC, São Carlos, Brasil), conforme figura 20, e incubados por 24 (grupo 1) e 72 horas (grupo 2), a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. No grupo controle positivo (4) foi realizado o mesmo procedimento de irradiação e, o grupo controle negativo (8) não houve uso do laser infravermelho, a fim de avaliar a resposta citotóxica das nanopartículas.

Figura 20 - Irradiação com laser infravermelho para modelo *in vitro* de terapia fotodinâmica, em células MV3 (melanoma), tratadas com diferentes concentrações de nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e Vazia, e grupo controles positivo e negativo





Legenda: (MV3); (U373); Ácido Poliláctico (PLA); Dacarbazina (DTIC); Álcool Polivinílico (PVA); Ftalocianina de Zinco (ZnPc); Nanopartículas Poliméricas (NPs).

Nota: A ilustração mostra a metodologia do processo de irradiação, utilizando o Photon Lase I. Após o plaqueamento com as células, a placa A foi dividida em dois grupos, Grupo MV3 e Grupo U373, que contem 4 subgrupos: (2) e (8) pertencem às NPs de PLA/PVA/DTIC/ZnPc; (3) e (9) às Nps de PLA/PVA/DTIC; (4) e (10) ao grupo controle positivo e, (5) e (11) às NPs vazia de PLA/PVA. Cada poço, contendo concentrações crescente da linhagem celular, foi irradiado com $28\text{J}/\text{cm}^2$ durante 2:30 min, em uma potência de 100mW. Na placa B, há os grupos controle negativo, onde não foram realizados processos de irradiação com laser infravermelho. Ambas as placas foram à estufa por 37°C e tempo de 24 horas. O mesmo procedimento foi realizado para o tempo de 72 horas.

Fonte:A autora, 2020.

3.6 Radiomarcção das NPs com Tecnecio-99-metaestável ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)

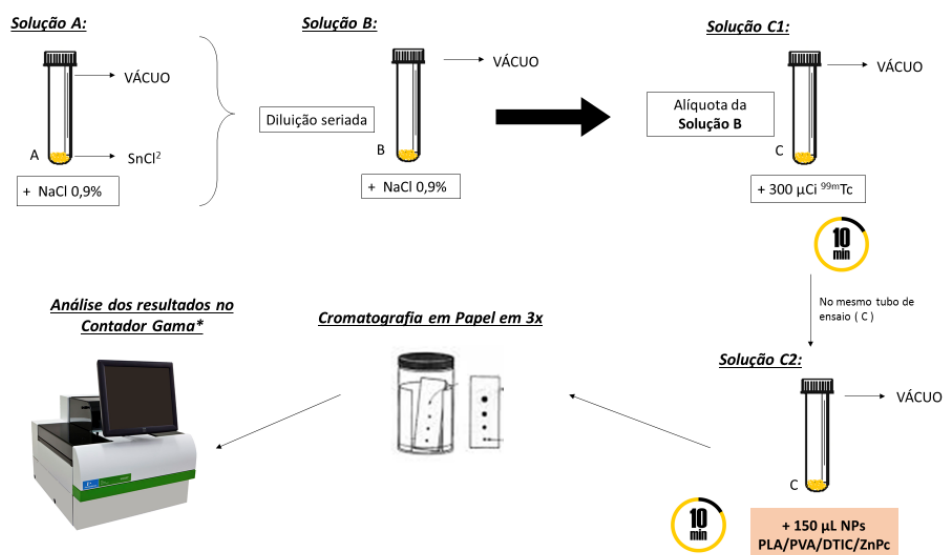
O método utilizado foi o processo de marcação direta, conforme descrito na figura 21, nos três tipo de formulações elaboradas: (I) nanopartículas de PLA/PVA/DTIC/ZnPC; (II) nanopartículas de PLA/PVA/DTIC e (III) nanopartículas de PLA/PVA. Inicialmente uma solução de $100\ \mu\text{Ci}$ de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (aproximadamente $300\ \mu\text{L}$) foi incubada com solução de cloreto estanoso (SnCl_2) ($30\ \mu\text{L}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) por 20 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, $150\ \mu\text{L}$ de cada formulação foram incubados com a solução reduzida de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por mais 10 minutos.

3.6.1 Controle de qualidade do processo de marcação das NPs com $^{99\text{m}}\text{Tc}$

A fim de caracterizar a estabilidade das NPs (I), (II) e (III), a cromatografia em papel foi realizada em triplicata com papel Whatman n° 1 em 5 momentos diferentes (0,1,2,4 e 6h). Antes de cada realização da cromatografia em papel, as NPs marcadas foram deixadas em uma solução de NaCl (0,9%) pelo tempo expresso acima, utilizando-se $2\ \mu\text{L}$ da NP marcada e acetona (Sigma-Aldrich) como fase móvel. Após o processo da cromatografia em papel, as tiras foram coletadas e cortadas ao meio, a fim de se obter análises da porcentagem de

radioatividade da marcação no topo e origem das fitas, por meio do contador gama (Perkin Elmer Wizard® 2470, Shelton, CT City, State).

Figura 21 - Protocolo de radiomarcção direta das NP encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e Vazia e marcadas com o radionuclídeo ^{99m}Tc para estudo do controle de qualidade e análises *in vitro* e *in vivo*



Legenda: Miligrama (mg); Mililitro (mL); Microlitro (μL); Cloreto Estanoso (SnCl_2); Cloreto de Sódio 0,9% (NaCl 0,9%); Tecnécio-99-metaestável (^{99m}Tc); * Contador gama Perkin Elmer modelo Wizard® 2470.

Fonte: (DOS REIS, 2017; PINTO et al., 2018; PORTILHO et al., 2018).

Nota: A ilustração mostra a metodologia do processo de radiomarcção direta com ^{99m}Tc , onde inicialmente em um tubo de ensaio A, sob vácuo, solubiliza-se 3 mg de SnCl_2 em 10 mL de NaCl 0,9%. Em seguida, por uma diluição seriada, em um tubo B alíquota-se 1 mL da solução A, resultando em uma solução B. Posteriormente, 1,5% desta é adicionada a um tubo C, com 150 μL de ^{99m}Tc , deixando em repouso por 10 minutos. Ao mesmo tubo, adiciona-se 150 μL da NP PLA/PVA/DTIC/ZnPc, aguardando mais dez minutos em repouso, resultando em uma solução C. Para a radiomarcção das NPs PLA/PVA/DTIC e PLA/PVA, utiliza-se o mesmo procedimento a partir da Solução B, o que resulta em mais duas formulações, solução D e E, correspondendo respectivamente às NPs anteriormente mencionadas.

3.6.2 Desenho Experimental *In Vivo*

Camundongos fêmeas Balb/c foram tratadas de acordo com os protocolos aprovados pelo Conselho Institucional de Revisão e Uso de Animais do Instituto de Energia e Pesquisa Nuclear sob o número 181/2017 (CEUA IPEN 181/17), vide Anexo A. Todas as experiências com os camundongos foram realizadas de acordo com os regulamentos e diretrizes. Os camundongos receberam água e comida *ad libitum* e foram utilizados após atingirem a maturidade às oito semanas de idade. Um total de nove camundongos foram utilizados neste estudo como grupo controle para análise biológica das NPs, onde em cada grupo foram avaliados 3 animais.

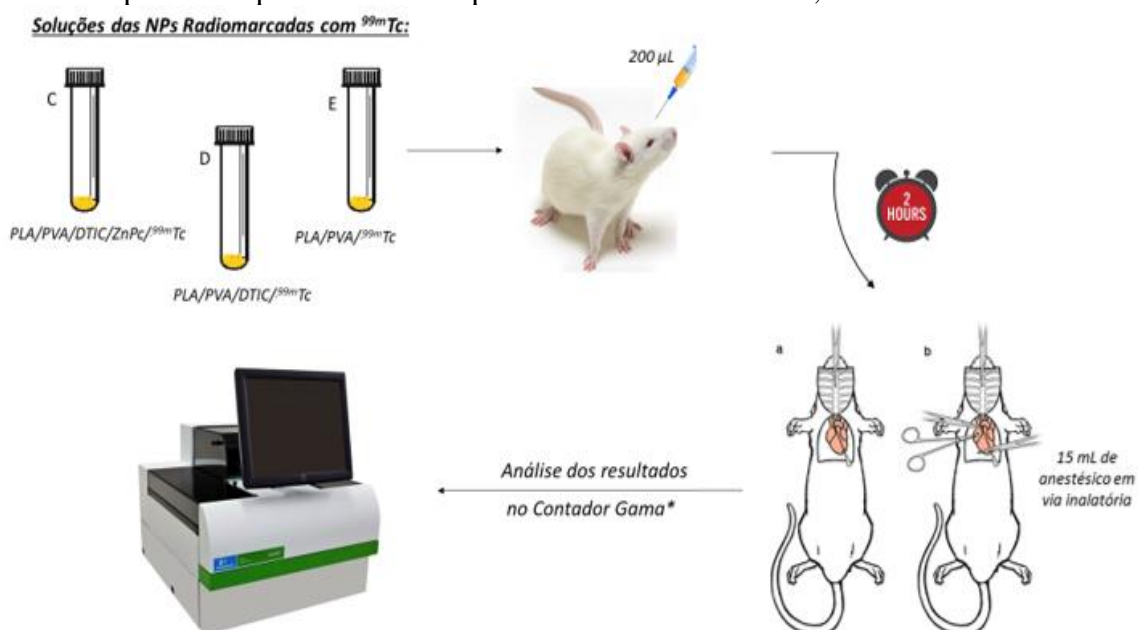
3.6.2.1 Estudo de Biodistribuição

A avaliação da biodistribuição (Figura 22) foi feita com grupos controle, usando camundongos saudáveis:

- com NPs PLA/PVA/DTIC/ZnPC/ ^{99m}Tc (n=3);
- com NPs PLA/PVA/DTIC/ ^{99m}Tc (n = 3);
- com NPs PLA/PVA/ ^{99m}Tc (n = 3).

Os camundongos foram anestesiados com solução de Isoflurano em volume de 15 mL e administrados por via inalatória, para o preparo da administração dos 3 compostos (3,7 MBq em volume de 0,2 mL), sendo esta por via retro-orbital. Todos os grupos foram sacrificados por asfixia usando uma câmara de gás dióxido de carbono após duas horas (120 min) de administração de compostos. Os órgãos (cérebro, pulmões, rins, estômago, intestino delgado e grosso, bexiga, coração, pool sanguíneo e baço) foram extraídos, pesados e a atividade de cada órgão foram determinadas pelo contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470), com um cristal de NaI(Tl) em condições eletrônicas ótimas para a leitura do radioisótopo ^{99m}Tc . Os resultados foram expressos em dose por órgão (%ID/órgão) e dose por grama de tecido (%ID/g).

Figura 22 - Desenho experimental para estudo de biodistribuição em modelo *in vivo* das nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e Vazia



Legenda: Mililitro (mL); Microlitro (μ L); Tecnécio-99-metaestável (^{99m}Tc); *Contador gama Perkin Elmer modelo Wizard® 2470; *¹ órgãos retirados: sangue, coração, cérebro, estômago, pâncreas, intestinos delgado e grosso, bexiga, rins, pulmões, fígado, baço.

Fonte: A autora, 2020.

Nota: A ilustração mostra a metodologia do estudo de biodistribuição. As soluções preparadas são administradas por via retro-orbital, em modelo animal de fêmeas Balb/c, tendo n= 3 por grupo de NP radiomarcada. Após 2 horas de biodistribuição os animais são eutanasiados e seus órgãos*¹ foram retirados para análise no contador gama.

3.7 Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como a média \pm DP de pelo menos três experiências independentes. A análise estatística ANOVA foram realizadas no software Graph Pad Prism 6.0, e os resultados $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

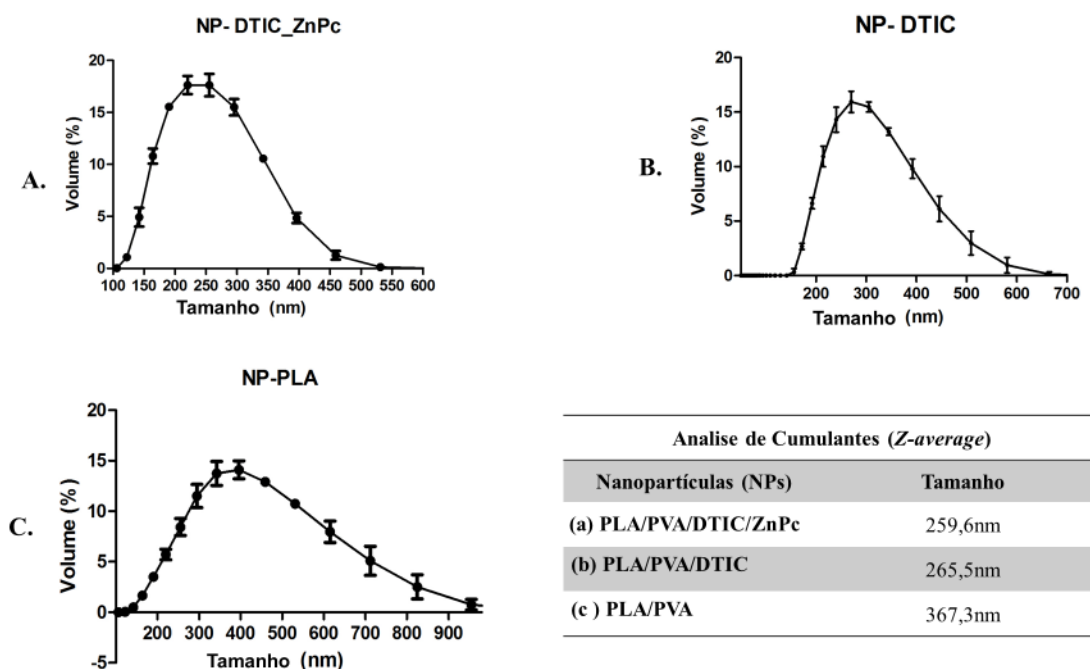
4 RESULTADOS

4.1 Análise das características dimensionais e morfológicas das NPs

4.1.1 Diâmetro Médio (Size) e Polidispersão (PDI)

De acordo com os dados analisados pelo DLS, a figura 23 mostra o tamanho e distribuição dimensional das NPs de PLA/PVA/DTIC/ZnPc, PLA/PVA/DTIC e PLA/PVA. Pelo perfil de distribuição apresentado, há apenas um pico de tamanho variando entre 250 a 360nm, corroborando os achados da polidispersividade apresentados na tabela 1, sendo possível inferir que as NPs apresentaram um comportamento monodisperso.

Figura 23 - Distribuição da nanopartícula polimérica encapsulada com dacarbazina e o agente fotossensibilizador (PLA/PVA/DTIC/ZnPc), analisados por DLS, caracterizando seu tamanho por intensidade de distribuição



Legenda: nanometro (nm); porcentagem (%); Ácido Poliláctico (PLA); Dacarbazina (DTIC); Álcool Polivinílico (PVA); Ftalocianina de Zinco (ZnPc).

Fonte: A autora, 2020.

Nota: A análise de cumulantes indicam que as nanopartículas: (A) dacarbazina+ftalocianina de zinco (PLA/PVA/DTIC/ZnPc); (B) dacarbazina livre (PLA/PVA/DTIC) e (C) nanopartícula vazia (PLA/PVA)

apresentaram, respectivamente, tamanho médio de 259,6nm; 265,5nm e 367,3nm, com apenas um pico de referência na sua distribuição de tamanho.

Em relação ao Índice de Polidispersividade (PDI), este analisa a variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade, variando de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra, como foi descrito nos resultados da tabela abaixo. As NPs de PLA/PVA/DTIC/ZnPc; PLA/PVA/DTIC e PLA/PVA apresentaram PDI semelhantes, sem diferenças significativas, sendo respectivamente de: 0.09, 0.1 e 0.2; sugerindo que a incorporação com fármacos aos polímeros se manteve de forma estável e homogênea.

Tabela 1 - Análise do Índice de Polidispersividade das nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc, DTIC livre e Vazia, por meio de DLS, caracterizando o índice de polidispersão das nanopartículas

<i>Análises de Polidispersividade das Nanopartículas</i>		
	<i>Nanopartículas (NPs)</i>	<i>Índice de Polidispersividade (PDI)</i>
<i>I</i>	PLA/PVA/DTIC/ZnPc	0.090
<i>II</i>	PLA/PVA/DTIC	0.136
<i>III</i>	PLA/PVA	0.266

Legenda: Ácido Polilático (PLA); Dacarbazina (DTIC); Álcool Polivinílico (PVA); Ftalocianina de Zinco (ZnPc); nanopartículas (NPs); Índice de Polidispersão (PDI).

Fonte: A autora, 2020.

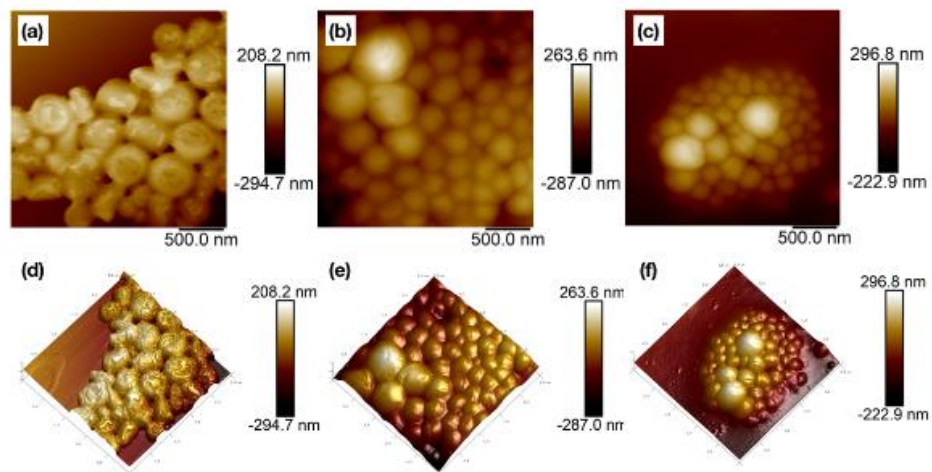
Nota: As análises de polidispersão indicam que as nanopartículas: (I) de dacarbazina+ftalocianina de zinco (PLA/PVA/DTIC/ZnPc); (II) de dacarbazina livre (PLA/PVA/DTIC) e (III) de nanopartícula vazia (PLA/PVA) apresentaram PDI entre >0,08 até 0,7, confirmando que estas possuem valores intermediários, sendo monodispersas em sua distribuição, corroborando os achados no DLS. Valores <0,08 apresentam amostras padrão, onde são extremamente monodispersas.

4.1.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Figura 24 mostra os resultados dos mapas topográficos em nanopartículas vazias (Figura 24-a), carregadas com dacarbazina (Figura 24-b) e carregadas com dacarbazina-zinco-ftalocianina (Figura 24-c), e seus respectivos mapas tridimensionais de altura (Figuras 24d-f) . A barra de escala de imagens revela que a altura das nanopartículas aumenta com a adição de dacarbazina e dacarbazina-zinco ftalocianina. A altura máxima para a imagem de partículas vazias é de 208 nm, enquanto para as partículas carregadas

com dacarbazina e dabarbazina-zinco-fitalocianina é de 263,6 e 296,8 nm, respectivamente, o que evidencia o fato de que o medicamento foi incorporado na nanopartícula vazia.

Figura 24 - Imagem obtida por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas PLA/PVA/DTIC/ZnPc (c); PLA/PVA/DTIC (b) e PLA/PVA (a) caracterizando seu tamanho e superfície. As imagens de (d-f) apresentam os mapas topográficos em 3D, respectivamente

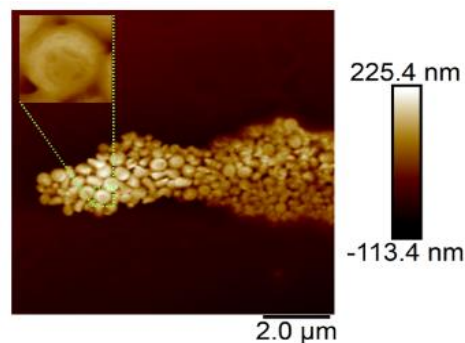


Fonte: A autora, 2020.

Nota: Os resultados do AFM indicam que em

Outra evidência de eficiência também pode ser vista na morfologia das partículas. Pode-se notar que as nanopartículas vazias, como melhor mostrado na Figura 25, apresentam uma depressão na região central, diferente das partículas carregadas, uma característica atribuída, provavelmente, devido à ausência de conteúdo interno nessas nanopartículas.

Figura 25 - Imagem obtida por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas de PLA/PVA

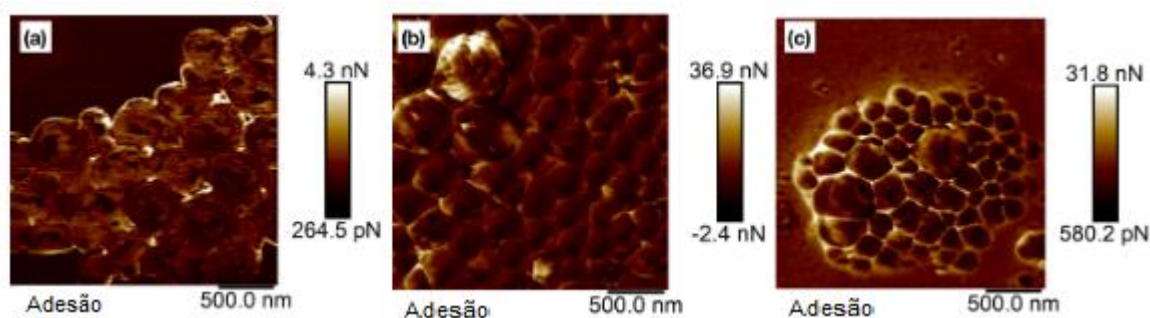


Fonte: A autora, 2020.

Nota: Os resultados do AFM destacam uma depressão no centro da partícula devido, provavelmente, à ausência de conteúdo interno.

Além das imagens topográficas, foram obtidos mapas de aderência para cada amostra, como mostra a Figura 26. Observa-se que a adesão das nanopartículas aumenta cerca de oito vezes após a incorporação. Esse fato é importante porque essa adesão aprimorada fornece, provavelmente, melhor fixação das nanopartículas no tecido tumoral.

Figura 26 - Mapas de adesão obtido por Microscopia de Força Atômica das nanopartículas de PLA/PVA/DTIC/ZnPc (c); PLA/PVA/DTIC (b) e PLA/PVA (a)



Fonte: A autora, 2020.

Nota: Os resultados do AFM destacam o valor máximo de adesão para cada amostra: 4,3 nN (a), 36,9 nN (b) e 31,8 nN (c).

4.2 Controle de Qualidade da radiomarcção das NPs com ^{99m}Tc

Os dados sobre a estabilidade das NPs ligadas ao radioonuclídeo são confirmados através do controle de qualidade por cromatografia em papel, indicando que não ocorreram dissociação significativa de ^{99m}Tc das NPs (a), (b), (c) por um período de até 6 horas, como mostrado na Tabela 2. Foi observado que na parte “origem” da fita cromatográfica, ficaram as NPs (I), (II) e (III) marcadas com ^{99m}Tc , e na parte “topo”, apenas o tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), obtendo rendimento total de cada marcação de: 99,9%; 99,2%; 99,19%, respectivamente, corroborando os achados na literatura.

Tabela 2 - Porcentagem de nanopartículas poliméricas dopadas com ^{99m}Tc , após cromatografias em tempo ascendente, comparando com pertcnetato livre ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$) para avaliação da pureza radioquímica

ESTABILIDADE DA RADIOMARCAÇÃO COM ^{99m}Tc (%)			
TEMPO (HORAS)	PLA/PVA/DTIC/ZnPc/^{99m}Tc	PLA/PVA/DTIC/^{99m}Tc	PLA/PVA/^{99m}Tc
0	99.99±0.01	99.71±0.3	99.91±0.05
2	99.98±0.01	99.39±0.6	99.60±0.35
4	99.96±0.02	98.82±0.6	99.08±0.56
6	99.81±0.01	99.04±0.2	99.14±1.0
24	99.84±0.13	98.98±0.5	98.39±0.25

Fonte: A autora, 2020.

Legenda: hora (h); Tecnécio-99-metaestável (^{99m}Tc).

Nota: A tabela mostra a eficácia de ligação (%) do ^{99m}Tc às nanopartículas, em função do tempo ascendente: 0 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas e 24 horas. Entretanto as NPs (b) e (c) não obtiveram procedimentos experimentais no tempo de 24 horas, não tendo análises a comparar. De acordo com os achados, observa-se uma estabilidade contínua de até 6 horas em todos os casos de NPs, porém no tempo de 4 horas apresenta-se uma particularidade de encapsulação com o radionuclídeo, o que pode ser justificado por uma pequena dissociação com o ^{99m}Tc , devido a fatores como qualidade dos reagentes, tempo de armazenamento dos mesmos ou até quantidade do agente redutor utilizado, que poderia ter interferido na redução do estado de oxidação do ^{99m}Tc , resultando em menor ligação com o fármaco.

4.3 Análise da Eficiência de Encapsulação (EE%)

Nesta metodologia, de modo a quantificar o quanto de dacarbazina foi absorvido/encapsulado no processo de desenvolvimento das nanopartículas poliméricas, calculou-se por uma análise visível UV indireta usando um espectrofotômetro (modelo Shimadzu UV-2550) fármaco, através da equação abaixo:

$$EE\% = \text{total de ativo utilizado} / \text{quantidade total de ativo no sobrenadante} \times 100$$

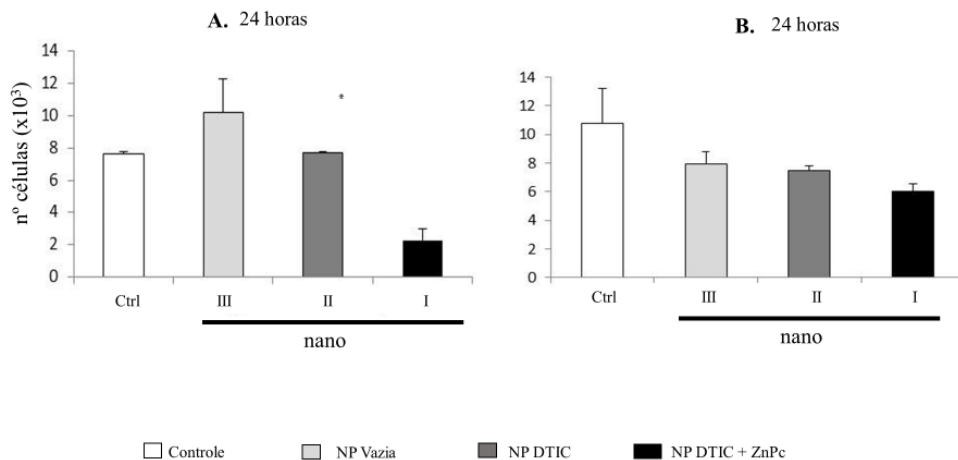
O resultado EE% encontrado para a nanopartícula de PLA/PVA/DTIC foi, de 14,82%. Considerando que a análise de EE% é realizada por cálculo de quantidade de fármaco utilizado e a quantidade de fármaco encontrado no sobrenadante final (equação 1), estas análises confirmam que o fármaco estava presos na superfície da nanopartícula

polimérica, o suficiente para agir como carreador, corroborando os achados no controle de qualidade, onde a NP permanece estável.

4.4 Avaliação da viabilidade celular nas NPs em modelo *in vitro* de melanoma

O teste de viabilidade celular caracterizado pelo ensaio de MTT demonstrou que tanto em 24 quanto 72 horas a nanopartícula polimérica encapsulada com dacarbazina e ftalocianna de zinco (I), reduz, de forma significativa, o número de células de melanoma em uma concentração de 100 μg , utilizando o laser infravermelho numa constante de 2,5 minutos e potência de 28J, como observado em (A) e (C) nos gráficos 1 e 2. Este panorama difere da concentração de 20 μg , como se vê em (B) e (D), sugerindo que numa concentração $>5x$, a nanopartícula biencapsulada apresenta toxicidade às células do melanoma. Em adição, os resultados inferem que apenas a associação com o fotossensibilizador demonstra ter a capacidade de inviabilizar essa linhagem celular, como é observado quando se compara tal resultado a nanopartícula com dacarbazina (II). Este resultado é desejado, uma vez que a quantidade de dacarbazina utilizada para dopar a nanopartícula polimérica foi de 10% da quantidade total necessária para desenvolver um efeito terapêutico, confirmando o aspecto de segurança do sistema de administração de medicamentos, como observado também nas nanopartículas vazias (III), que não apresentaram citotoxicidade celular.

Gráfico 1 - Sobrevivência de células MV3 após tratamento por 24h, com diferentes concentrações de Np PLA/PVA/DTIC/ZnPc; PLA/PVA/DTIC e PL/PVA



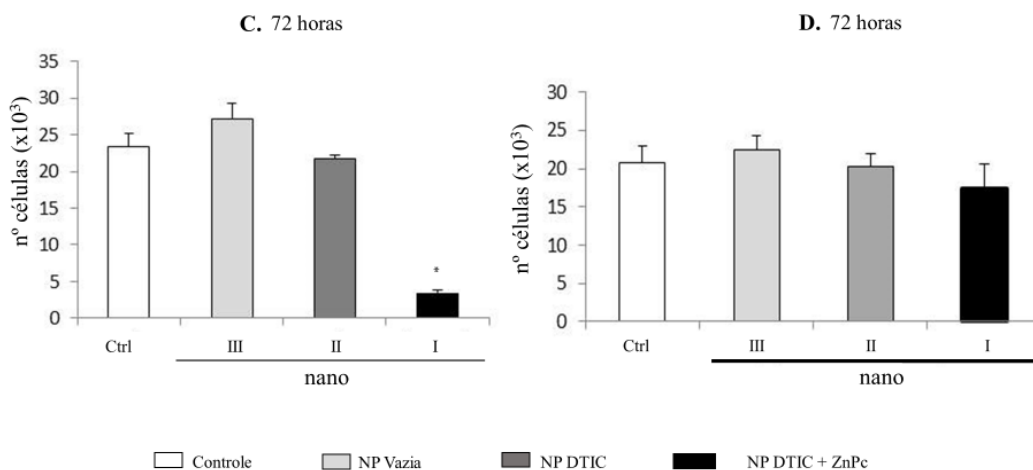
Fonte: A autora, 2020.

Legenda: Grupo controle (Ctrl); PLA/PA/DTIC/ZnPc (I), PLA/PVA/DTIC (II); PLA/PVA (III); nanopartícula (NP)

Nota: Os resultados do ensaio de MTT avaliam os grupos de incubação de 24 horas (A e B), onde (A) são concentrações de 100 μg de tratamento com NPs e, (B) de 20 μg . Os resultados sugerem que a NP (I)

apresenta capacidade citotóxica para linhagens celulares de melanoma, obtendo redução significativa no número de células, quando administrado em concentração de 100 µg, como observado em (A). Este panorama difere quando utilizado concentrações menores (B) de NP (I). A demais, sugere-se que sua associação com o fotossensibilizador é importante para tal aspecto tóxico, justificado pelo uso do laser infravermelho na terapia fotodinâmica, corroborando os dados em NP (II). Adicionalmente, as NP (III) não apresentam citotoxicidade, o que sugere uma administração segura destas nanopartículas. $p < 0,05$.

Gráfico 2 - Sobrevivência de células MV3 após tratamento por 72h, com diferentes concentrações de Np PLA/PVA/DTIC/ZnPc; PLA/PVA/DTIC e PL/PVA



Fonte: A autora, 2020.

Legenda: Grupo controle (Ctrl); PLA/PA/DTIC/ZnPc (I), PLA/PVA/DTIC (II); PLA/PVA (III); nanopartícula (NP)

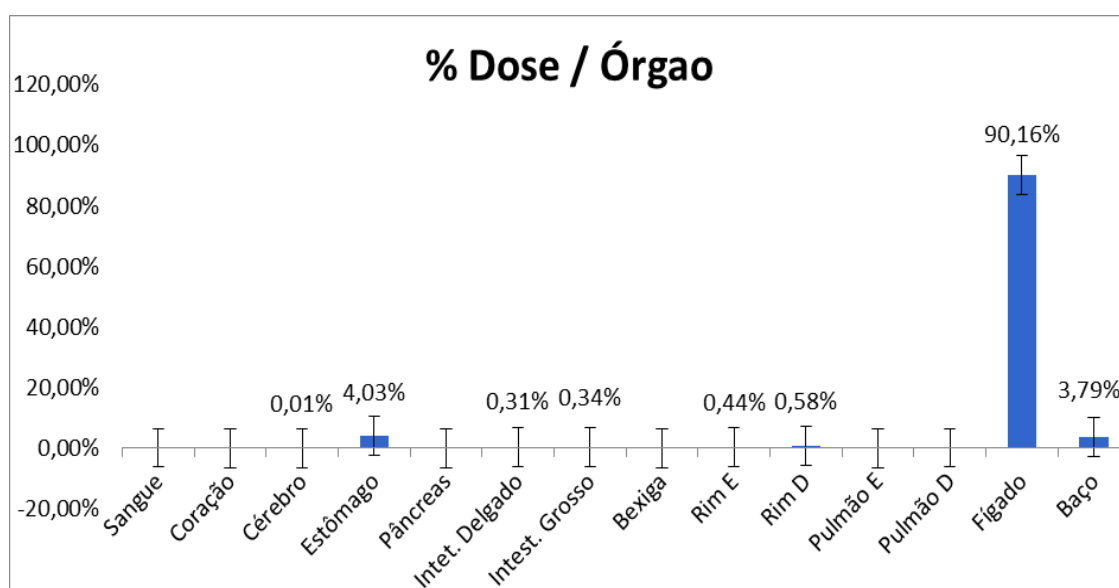
Nota: Os resultados do ensaio de MTT avaliam os grupos de incubação de 72 horas (C e D), onde (C) são concentrações de 100 µg de tratamento com NPs e, (D) de 20 µg. Os resultados sugerem que a NP (I) apresenta capacidade citotóxica para linhagens celulares de melanoma, obtendo redução significativa no número de células, quando administrado em concentração de 100 µg, como observado em (C). Este panorama difere quando utilizado concentrações menores (D) de NP (I). A demais, sugere-se que sua associação com o fotossensibilizador é importante para tal aspecto tóxico, justificado pelo uso do laser infravermelho na terapia fotodinâmica, corroborando os dados em NP (II). Adicionalmente, as NP (III) não apresentam citotoxicidade, o que sugere uma administração segura destas nanopartículas. $p < 0,05$.

4.5 Estudo *in vivo* do perfil de biodistribuição das NPs em animais controle

Para avaliar o comportamento biológico das nanopartículas, foi realizado a biodistribuição em camundongos saudáveis, ou seja, grupo controle e, estas apresentaram perfis heterogêneos. Em todos os casos, a captação no cérebro não foi relevante. Nas nanopartículas (I) e (II), os resultados indicam alta captação no fígado, em torno de 90% e 75%, sendo significativo para nanopartículas encapsuladas, além disso observou-se uma captação estomacal de 4% e 9%, como observado nos gráficos 3 e 24 sendo importante notar que a presença de polímero não interfere nesse resultado, uma vez que a captação não é significativa no intestino e no estômago. O perfil da nanopartícula vazia (III) apresentou diferenças em relação à excreção renal, obtendo uma captação de 30 a 35%, além de uma

absorção de 2 a 3% no trato gastro intestinal (TGI), como identificado no gráfico 5. Em adição, todas as formulações apresentaram captação hepatoesplênica, caracterizando um perfil comum entre elas de apresentarem essa via de excreção como alternativa, principalmente em nanopartículas funcionalizadas.

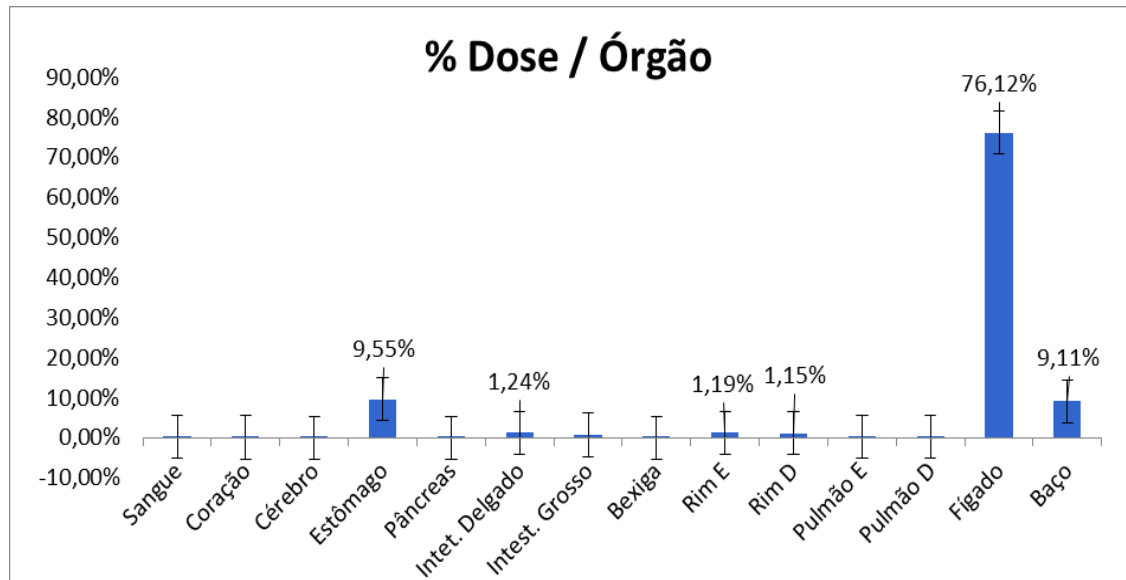
Gráfico 3 - Perfil de biodistribuição expresso em dose por órgão, das nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC+ZnPc (NP I) e radiomarcadas com ^{99m}Tc , que são administradas por via retro-orbital em camundongos Balb-c



Fonte: A autora, 2020.

Nota: Os resultados indicam que NP (I) apresentou alta captação pelo fígado e baço, em torno de 90%, e uma captação de 4% pelo estômago, justificado pela presença do fotossensibilizador que é reconhecido pelo sistema fagocítico, apresentou também os resultados em relação ao tamanho da NP, cujo reconhecimento é mais fácil. Finalmente, apresentou excreção renal, apesar de captções inferiores a 1%. Captções no cérebro foram irrelevantes.

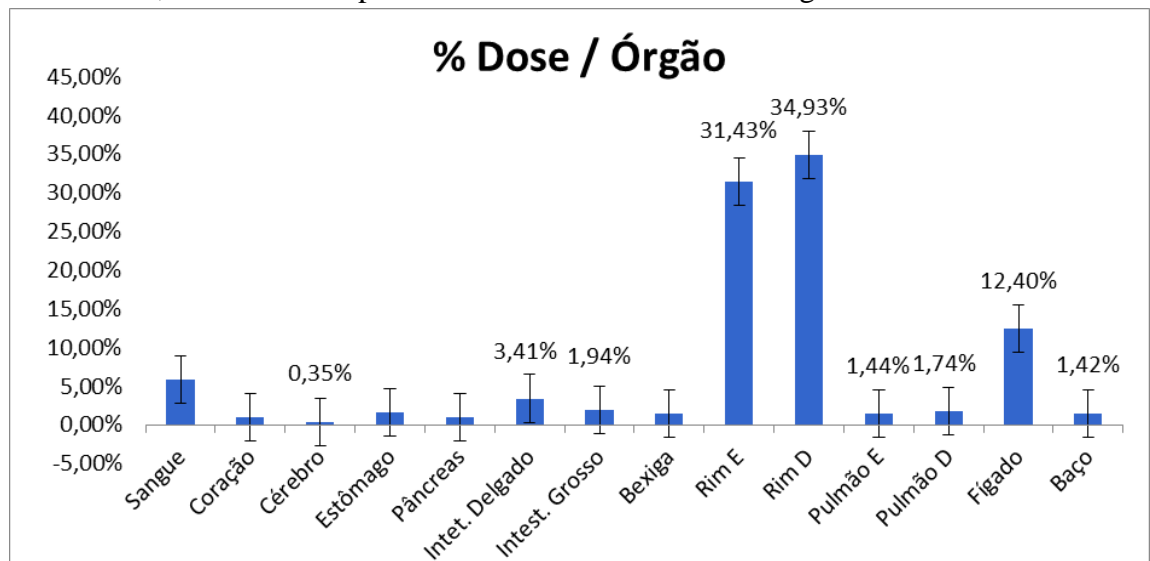
Gráfico 4 - Perfil de biodistribuição expresso em dose por órgão, das nanopartículas poliméricas nanopartículas poliméricas encapsuladas com DTIC (NP II) e radiomarcadas com ^{99m}Tc , administradas por via retro-orbital em camundongos Balb-c



Fonte: A autora, 2020.

Nota: Os resultados indicam que NP (II) apresentou alta captação pelo fígado, em torno de 76%, e uma captação de 9% pelo estômago, justificado pela presença da funcionalização que é reconhecido pelo sistema fagocítico, além dos resultados em relação ao tamanho da NP, o que torna mais fácil esse reconhecimento. Apresentou excreção renal, apesar de captções inferiores a 1%. Captções no cérebro foram irrelevantes.

Gráfico 5 - Perfil de biodistribuição expresso em dose por órgão, das nanopartículas poliméricas nanopartículas poliméricas vazias (NP III) e radiomarcadas com ^{99m}Tc , administradas por via retro-orbital em camundongos Balb-c



Fonte: A autora, 2020.

Nota: Os resultados indicam que NP (III) apresentaram alta captação pelo fígado e baço, em torno de 15%, e uma captação de 4% pelo intestino, sugerindo uma absorção pelo trato gastro intestinal. Apresentou excreção renal significativa em torno de 35%, indicando a presença de *clearance* renal, ou seja, uma depuração plasmática padrão. Os 5% de captação no pool sanguíneo indica

que o nannorradiofármaco foi amplamente distribuído pelo organismo, além de ter sido captado pelas proteínas plasmáticas, perfil comum à nanopartículas poliméricas. Captações no cérebro foram irrelevantes.

5 DISCUSSÕES

O uso de nanossistemas em uma aplicação tópica vem aumentando e, as principais vantagens incluem a alta concentração de fármacos no local da ação e diminuição da absorção sistêmica com efeitos colaterais reduzidos (NAFISI et al., 2015). Existem quatro vias pelas quais um nanossistema pode penetrar na pele: rotas transepidérmicas; incluindo vias intercelulares e transcelulares e através de folículos capilares e glândulas sudoríparas. Em todos os casos, o tamanho, a polaridade e a modificação superficial são questões importantes a serem observadas para estabelecer um fenômeno de transporte epidérmico (NAFISI et al., 2018). No entanto, a falta de uma literatura completa sobre a permeação cutânea aplicada a nanossistemas ainda é um desafio. Por exemplo, Kholi e Alpar (2004) relataram que partículas de látex de 50 a 500 nm carregadas negativamente podem permear a pele. De maneira contrária, Larese Filon (2011) relatou que uma permeação cutânea de nanopartículas de ouro tem sido observada com tamanho de 15 nm. Porém, quando se usa as mesmas partículas em tamanhos variando de 10 a 200 nm, a permeação diminui, o que indica uma relação com as propriedades físico químicas, como polaridade e o revestimento superficial (ABD-EL-AZIM et al., 2018; HELAL-NETO et al., 2018; SANTOS-OLIVEIRA et al., 2018).

Independentemente da literatura os resultados das características físico-químicas da NP de PLA/PVA/DTIC/ZnPc (259,6 nm) demonstra uma eficiência em promover uma aplicação dérmica e transdérmica, devido a: (i) dacarbazina ser uma amina do ácido monocarboxílico, o que promove a acidificação do nanossistema desenvolvido e o aumento da permeação; (ii) a inserção do agente ZnPc no núcleo fornece uma carga adicional para interação com membranas celulares de carga negativa (SOBCZYNSKI et al., 2017). Como demonstrado por Piemi (1999), a nanoemulsão com carga negativa apresentou maior penetração na pele quando comparada à positiva. Finalmente, em relação ao tamanho, tanto Pflucker (2001) como Gontier (2008), demonstraram que o dióxido de titânio variando de 20 a 200 nm é capaz de penetrar na pele, permanecendo na camada mais externa.

No presente estudo, considerando que a NP foi desenvolvida para aplicação com PDT, quanto mais superficial, maior será a eficiência na indução do laser para induzir ROS, o que garante a eficácia do tratamento proposto, devido ao tamanho de 256,9nm. Ademais, a microscopia topográfica realizada por AFM indica análises referentes à superfície da

nanopartícula (PEREIRA et al., 2014), corroborando os resultados anteriores, confirmando um comportamento monodisperso.

Em concordância com Gaumet (2008) e Miller (2017), as análises de DLS e PDI encontradas neste estudo estão relacionadas principalmente com a via de administração a ser utilizada, onde NPs com tamanhos menores (até 100nm) são eliminadas por excreção renal (VALSAMI-JONES et al., 2015) ou podem atravessar a BHE, importante desafio no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados. Em contrapartida, NPs com um tamanho >200nm não conseguem adentrar membranas estreitas de tecidos saudáveis, mas podem penetrar em fenestrações de endotélios com processos inflamatórios, superando as barreiras existentes com sucesso (KIM et al., 2019; PINTO et al., 2018; YOO et al., 2011), sendo mais suscetíveis a fagocitose mononuclear. Entretanto, permanecem por mais tempo na circulação, intensificando a eficácia de liberação de um ativo, baseando-se na propriedade de ação do efeito EPR, o que leva em consideração sua biodegradabilidade e citotoxicidade (VIEIRA et al., 2016; BERNARDES et al., 2017; PORTILHO et al., 2018).

O processo de radiomarcagem direta mostrou-se uma metodologia eficiente para introduzir as nanopartículas no tecido. Como demonstrado por Lamb e Holland (2018), o principal mecanismo envolvido na incorporação de um radionuclídeo na superfície de uma nanopartícula é o mecanismo de adsorção química, ou seja, a ligação entre a superfície das nanopartículas e o radionuclídeo é forte o suficiente para resistir às variações biológicas (GONTIER et al., 2009). Na maioria dos casos, a presença de -OH, -COOH e -COH na superfície das nanopartículas do surfactante e dos polímeros é responsável pela conjugação com o radionuclídeo (SANTOS-OLIVEIRA, 2019). No caso do radionuclídeo ^{99m}Tc , a configuração assumida é uma geometria octaédrica com as espécies de ^{99m}Tc em estado de oxidação +4 (COSTA et al., 2019). Como observado em todo o nanossistema radiomarcado, foi introduzido um rendimento de 99%. Além disso, o controle de qualidade corroborou a estabilidade do complexo NP- ^{99m}Tc por um período de 24 horas.

De acordo com autores, a qualidade dos radiofármacos de ^{99m}Tc está relacionada ao uso do agente redutor cloreto estânico ($\text{Sn}2\text{Cl}$), que gera os estados de oxidação reduzidos do ^{99m}Tc , no qual ocorre a ligação com os fármacos (RODRIGO et al., 2009; SANTOS-OLIVEIRA, 2010; PRADO et al., 2015; RADIN et al., 2019; SANTOS-OLIVEIRA, 2019). Para análises seguras, o uso da cromatografia abrange um controle desta pureza, e foi observado que os dados de rendimento total encontrados estão de acordo com a farmacopeia, que aponta que a incorporação dos fármacos ao radionuclídeo deve ser pelo menos de 90%,

produzindo assim resultados mais confiáveis e imagens com poucos artefatos, impactando no diagnóstico mais preciso.

Em relação à deposição tecidual, é possível observar uma alta captação de fígado e baço nos dois nanossistemas: PLA/PVA/DITC/ZnPh e PLA/PVA/DITC. Entretanto, a nanopartícula vazia (PLA/PVA) mostrou uma alta captação renal seguida de captação hepática. Como demonstrado por muitos autores, a maioria das nanopartículas são capturadas pelo sistema fagocítico mononuclear, composto principalmente pelo fígado e baço (HAUTE et al., 2017; FENG et al., 2018; ZHOU et al., 2018). Por exemplo, Zhang (2016) afirmou que 30-99% das nanopartículas administradas no corpo serão absorvidas pelo fígado. Embora algumas alternativas estejam disponíveis para reduzir a captação hepática, o direcionamento parece ser afetado. Por exemplo, Dos Santos (2017) usaram albumina humana para superar a captação hepática de nanopartículas de sílica mesoporosa, embora os resultados mostrem uma superação eficiente, uma perda no direcionamento limitou a técnica. Bazile (1995) também usaram copolímeros em bloco etoxipoli(etilenoglicol)/poli(d,ácido lático) (Me.PEG-PLA) para evitar a captação do fígado com base na densidade do PEG para evitar esse problema.

Por outro lado, as NP de PLA/PVA mostraram um rápido acúmulo em ambos os rins. Embora o acúmulo de rins possa sugerir excreção renal, esses dados só podem ser confirmados com a presença de nanopartículas na bexiga (SOO CHOI et al., 2007), o que difere dos resultados encontrados neste estudo, sugerindo que nanopartículas vazias foram absorvidas pelas barreiras glomerulares renais e mantidas até a degradação total (WANG et al., 2018). A degradação do PLA ocorre quando entra em contato com os meios biológicos. Nesta fase, as cadeias poliméricas do PLA são hidrolisadas em ácido lático ou dióxido de carbono e água e depois excretadas na urina (DA SILVA et al., 2018). Essa captação nos rins pode ser causada devido ao tamanho da nanopartícula (367,5 nm), uma vez que a fisiologia do néfron permite apenas que pequenas moléculas sejam filtradas livremente. É importante notar que, embora muitas estratégias possam ser usadas (NIE, 2010), a captação hepática continua sendo um problema no uso de sistemas nanotecnológicos. Além disso, uma preocupação permanente deve ser a liberação do medicamento.

A análise da terapia fotodinâmica *in vitro* mostrou que é esperado um comportamento dose-resposta usando o nanossistema PLA/PVA/DITC/ZnPc, não sendo observado na concentração de 20 mg, que apresenta um efeito não significativo. Em contrapartida, utilizando uma dose de 100 mg, foi observado um efeito potente. A mesma correlação é observada ao analisar o tempo de contato com as células, enquanto o nanossistema permanecer em contato com as células, terá o efeito potencializado nas mesmas condições.

Isso é explicado pelo fato de que a terapia fotodinâmica (PDT) depende da captação da fotossensibilização (OLEINICK et al., 1998) e, conseqüentemente de uma grande variedade de fatores: (i) pH e polaridade; (ii) tamanho e direcionamento (uso de ligantes específicos para direcionamento intracelular), que conduzem a captação de nanopartículas pelas células. Assim, nanossistemas com tamanhos entre 250nm a 3000nm entram nas células por pinocitose ou micropinocitose (FOROOZANDEH et al., 2018). No entanto, o tamanho também atua como um fator limitante para a internalização e, nesse sentido, nanopartículas grandes têm uma menor taxa de absorção (GEISER et al., 2005). Outro fator importante da elevada ação fototóxica observada deve-se, provavelmente, à sua internalização em maior quantidade, que teria sido favorecida pelo tamanho pequeno e pela monodispersão das nanopartículas. Estas, quando não internalizadas apresentaram segurança no sistema de administração, não sendo tóxicas às células. Assim, um contato celular promoverá uma melhor internalização e, finalmente, um melhor efeito terapêutico. Por esse motivo, as células que foram mantidas em contato por 72h apresentaram melhores resultados do que aquelas que permaneceram em contato por 24h.

O uso da dacarbazina é explicado por suas propriedades de compostos de triazeno, capaz de atuar na metilação da O6-guanina apresentada no DNA mediado pelo íon metildiazônio. Esta propriedade de metilação é responsável pelo efeito citotóxico e mutagênico (MARCHESI et al., 2007). Além disso, sugere-se que a dacarbazina tenha um direcionamento intracelular, aumentando a especificidade do nanossistema. É importante notar que a quantidade utilizada de dacarbazina não produziu nenhum efeito. Isso foi desejado na construção dos nanossistemas PLA/PVA DITC/ZnPc, pois somente foi utilizado para aumentar o direcionamento nas células tumorais, evitando as interações com células saudáveis, utilizando os benefícios da interação intracelular e evitando os efeitos colaterais da administração de dacarbazina. Finalmente, verificou-se que o nanossistema vazio não apresentou efeito, excluindo qualquer participação do polímero no efeito terapêutico do PLA/PVA/DITC/ZnPc.

CONCLUSÕES

Neste estudo, desenvolvemos, caracterizamos, analisamos *in vitro* e testamos *in vivo* nanopartículas poliméricas dopadas com DTIC e ZnPc radiomarcadas com ^{99m}Tc em uso da terapia fotodinâmica como nanoteragnóstico para melanoma. Como controle, foram desenvolvidas e analisadas nanopartículas poliméricas vazias e dopadas apenas com DTIC. Os resultados sugeriram que este protocolo produz sistemas nanoestruturados com dimensões e morfologias adequadas com a literatura, que são capazes de apresentar uma distribuição monodispersa e homogênea. A deposição tecidual indica que as NPs apresentaram um perfil de biodistribuição com degradação renal e reconhecimento pelo sistema fagocítico mononuclear, devido à incorporação com DTIC. Em adição, os resultados *in vitro* corroboram que a NP PLA/PVA/DTIC/ZnPc quando submetidas a terapia com laser infravermelho e associado ao agente FS, apresentam uma resposta dose-dependente significativa em relação à citotoxicidade celular, reduzindo a quantidade de células MV3. Este fator é decorrente da: concentração (i), tamanho (ii) e associação com fotossensibilizador (iii), indicando que o nanossistema troiano desenvolvido, através do fármaco DTIC e o agente FS, pode ser usado como possível alternativa para a terapia fotodinâmica, podendo ser benéfico para imagens biomédicas e aplicação clínica, por exemplo.

REFERÊNCIAS

- AASEN, S. N. et al. Effective Treatment of Metastatic Melanoma by Combining MAPK and PI3K Signaling Pathway Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 17, p. 4235, 29 ago. 2019.
- ABD-EL-AZIM, H. et al. Entrapment efficiency of pyridoxine hydrochloride in unilamellar liposomes: experimental versus model-generated data. **Journal of Liposome Research**, v. 28, n. 2, p. 112–116, 3 abr. 2018.
- ABOUITAH, K. et al. Effective Targeting of Colon Cancer Cells with Piperine Natural Anticancer Prodrug Using Functionalized Clusters of Hydroxyapatite Nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 1, p. 70, 16 jan. 2020.
- ABUDU, B.; CALAME, A.; COHEN, P. R. Pigmented Actinic Keratosis: Case Report and Review of an Uncommon Actinic Keratosis Variant that can Mimic Melanoma. **Cureus**, v. 11, n. 5, p. e4721, 22 maio 2019.
- ABULAFIA, J.; MOSTO, S. J.; GRISPAN BOZZA, N. O. [Superficial extensive melanoma]. **Archivos argentinos de dermatologia**, v. 19, n. 3, p. 219–24, dez. 1969.
- ADLER, N. R. et al. Metastatic pathways in patients with cutaneous melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 30, n. 1, p. 13–27, jan. 2017.
- AFANASIEV, O. K. et al. Characteristics of melanoma in white and nonwhite children, adolescents, and young adults: Analysis of a pediatric melanoma institutional registry, 1995-2018. **Pediatric Dermatology**, p. pde.13836, 16 abr. 2019.
- AGARWAL, S.; KRISHNAMURTHY, K. **Histology, Skin**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2019.
- AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, jul. 2011.
- AITKEN, J. F. et al. Generational shift in melanoma incidence and mortality in Queensland, Australia, 1995-2014. **International Journal of Cancer**, v. 142, n. 8, p. 1528–1535, 15 abr. 2018.
- AKSENENKO, M. et al. Differences in microRNA expression between melanoma and healthy adjacent skin. **BMC Dermatology**, v. 19, n. 1, p. 1, 5 dez. 2019.
- AL-BADR, A. A.; ALODHAIB, M. M. Dacarbazine. In: **Profiles of drug substances, excipients, and related methodology**. [s.l.: s.n.]. v. 41p. 323–377.
- ANDREOU, C. et al. Molecular Imaging in Nanotechnology and Theranostics. **Molecular Imaging and Biology**, v. 19, n. 3, p. 363–372, 1 jun. 2017.
- ARDA, O.; GÖKSÜGÜR, N.; TÜZÜN, Y. Basic histological structure and functions of facial skin. **Clinics in Dermatology**, v. 32, n. 1, p. 3–13, jan. 2014a.
- ARGYRIS, P. P. et al. Solitary oral epidermolytic acanthoma: Case report of a rarely

diagnosed entity. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, mar. 2019.

ASCIERTO, P. A. et al. MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 3, p. 249–256, mar. 2013.

ASCIERTO, P. A. et al. New paradigm for stage III melanoma: from surgery to adjuvant treatment. **Journal of translational medicine**, v. 17, n. 1, p. 266, 14 ago. 2019.

ASKARIAN-AMIRI, M. E. et al. Epigenetics in Melanoma. In: **Melanoma**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 115–132.

ATKINSON, V. Medical management of malignant melanoma. **Australian Prescriber**, v. 38, n. 3, p. 74–78, 27 jun. 2015.

BAETKE, S. C.; LAMMERS, T.; KIESSLING, F. **Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer** *British Journal of Radiology* British Institute of Radiology, , 1 out. 2015.

BAI, X.; YANG, M.; XU, Y. MicroRNA-373 promotes cell migration via targeting salt-inducible kinase 1 expression in melanoma. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 16, n. 6, p. 4759–4764, dez. 2018.

BALDEA, I. et al. Photodynamic Therapy in Melanoma - Where do we Stand? **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 40, p. 5540–5563, 26 dez. 2017.

BALLESTER, L. Y.; AUNG, P. P.; LEE, C.-C. R. The MAPK Pathway in Melanoma. In: **Genetics of Melanoma**. New York, NY: Springer New York, 2016. p. 151–163.

BANERJEE, A. et al. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 238, p. 176–185, 28 set. 2016.

BANERJEE, K. et al. **Methods of Using Nanomaterials to Plant Systems and Their Delivery to Plants (Mode of Entry , Uptake , [s.l.] Elsevier Inc., 2019.**

BARBARIC, J. et al. Disparities in melanoma incidence and mortality in South-Eastern Europe: Increasing incidence and divergent mortality patterns. Is progress around the corner? **European Journal of Cancer**, v. 55, p. 47–55, mar. 2016.

BARBOSA, K. B. F. et al. **Revista de Nutrição Oxidative stress: concept, implications and modulating factors** *Rev. Nutr.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v23n4/v23n4a13>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

BARDI, G. T. et al. Detection of Inflammation-Related Melanoma Small Extracellular Vesicle (sEV) mRNA Content Using Primary Melanocyte sEVs as a Reference. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 5, 12 mar. 2019.

BAROLLO, S. et al. Prevalence, Tumorigenic Role, and Biochemical Implications of Rare *BRAF* Alterations. **Thyroid**, v. 24, n. 5, p. 809–819, maio 2014.

BAZILE, D. et al. Stealth Me. PEG-PLA Nanoparticles Avoid Uptake by the Mononuclear

- Phagocytes System. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 84, n. 4, p. 493–498, abr. 1995.
- BEBEROK, A. et al. Lomefloxacin Induces Oxidative Stress and Apoptosis in COLO829 Melanoma Cells. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 10, 20 out. 2017.
- BECKER, K. et al. Cutaneous Pigmented Neurofibroma in a Pig – Morphology and Immunohistochemical Profile. **Journal of Comparative Pathology**, v. 168, p. 25–29, abr. 2019.
- BEDIKIAN, A. Y. et al. Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: The oblimersen melanoma study group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 29, p. 4738–4745, 10 out. 2006.
- BEHRENS, G. et al. Physical activity, cardiorespiratory fitness and risk of cutaneous malignant melanoma: Systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0206087, 2018.
- BELLI, V. et al. Dynamics of nanoparticle diffusion and uptake in three-dimensional cell cultures. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 7–15, 1 jan. 2017.
- BELYSHEVA, T. S. et al. Melanoma arising in a Giant congenital melanocytic nevus: two case reports. **Diagnostic Pathology**, v. 14, n. 1, p. 21, 19 dez. 2019.
- BERETTI, F. et al. Melanoma types by in vivo reflectance confocal microscopy correlated with protein and molecular genetic alterations: A pilot study. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 3, p. 254–260, 1 mar. 2019.
- BERNARDES, E. S. et al. Microradiopharmaceutical for Metastatic Melanoma. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 12, p. 2922–2930, 2017.
- BERTONI, A. P. S. et al. Extracellular ATP is Differentially Metabolized on Papillary Thyroid Carcinoma Cells Surface in Comparison to Normal Cells. **Cancer Microenvironment**, v. 11, n. 1, p. 61–70, 17 jun. 2018.
- BERWICK, M. et al. Melanoma Epidemiology and Prevention. In: [s.l: s.n.]. p. 17–49.
- BESARATINIA, A.; TOMMASI, S. Epigenetics of human melanoma: promises and challenges. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 356–367, 2014.
- BETANCOURT, L. H. et al. Improved survival prognostication of node-positive malignant melanoma patients utilizing shotgun proteomics guided by histopathological characterization and genomic data. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 5154, 26 mar. 2019.
- BEVONA, C. et al. Cutaneous Melanomas Associated With Nevi. **Archives of Dermatology**, v. 139, n. 12, p. 1620, 1 dez. 2003.
- BHIRDE, A. et al. Nanoparticles for cell labeling. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 142–153, jan. 2011.
- BIRLEA, S. A. S100B: Correlation with Active Vitiligo Depigmentation. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 7, p. 1408–1410, jul. 2017.

BITEGHE, F. N.; DAVIDS, L. M. A combination of photodynamic therapy and chemotherapy displays a differential cytotoxic effect on human metastatic melanoma cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 166, p. 18–27, 2017.

BLAY, J.-Y. et al. Eribulin versus dacarbazine in patients with leiomyosarcoma: subgroup analysis from a phase 3, open-label, randomised study. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 11, p. 1026–1032, 8 maio 2019.

BOCK, S. et al. Characterization of reconstructed human skin containing Langerhans cells to monitor molecular events in skin sensitization. **Toxicology in Vitro**, v. 46, p. 77–85, fev. 2018.

BODA, D. et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). **International journal of oncology**, v. 52, n. 3, p. 637–655, mar. 2018.

BORNHÜTTER, T. et al. Singlet oxygen luminescence kinetics under PDI relevant conditions of pathogenic dermatophytes and molds. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 606–613, 1 jan. 2018.

BOTTON, P. C. R. **MEDICAMENTOS UTILIZADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PELE TIPO MELANOMA: UMA REVISÃO DE LITERATURA**. [s.l.: s.n.].

BOUSLIMANI, A. et al. Molecular cartography of the human skin surface in 3D. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 17, p. E2120-9, 28 abr. 2015.

BRACKEN, C. P.; SCOTT, H. S.; GOODALL, G. J. A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 12, p. 719–732, 31 dez. 2016.

BRAVO-OSUNA, I. et al. Trojan Microparticles Potential for Ophthalmic Drug Delivery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, 5 set. 2019.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

BRKIĆ AHMED, L. et al. Impact of surface functionalization on the uptake mechanism and toxicity effects of silver nanoparticles in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 349–361, 1 set. 2017.

BRONTE, V. et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 12150, 6 dez. 2016.

BROUWER, N. J. et al. Two Late Recurrences of Conjunctival Melanoma. **Ocular Oncology and Pathology**, v. 5, n. 4, p. 262–266, jun. 2019.

BROWN CHANDLER, K. B. et al. Glycosylation in the Tumor Microenvironment: Implications for Tumor Angiogenesis and Metastasis. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 544, 5 jun. 2019.

BROWN, T. M.; KRISHNAMURTHY, K. **Histology, Hair and Follicle**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2019.

BRUNO, W. et al. Heterogeneity and frequency of BRAF mutations in primary melanoma: Comparison between molecular methods and immunohistochemistry. **Oncotarget**, v. 8, n. 5, p. 8069–8082, 31 jan. 2017.

BRUSCO, I. et al. Dacarbazine alone or associated with melanoma-bearing cancer pain model induces painful hypersensitivity by TRPA1 activation in mice. **International Journal of Cancer**, p. ijc.32648, 28 ago. 2019.

BRYNS, A. K. et al. Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 565–577, set. 2016.

BUCHBINDER, E. I.; DESAI, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition. **American journal of clinical oncology**, v. 39, n. 1, p. 98–106, fev. 2016.

CAINI, S. et al. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma according to anatomical site and clinico-pathological variant. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 17, p. 3054–3063, nov. 2009.

CANNAVÒ, S. P. et al. The role of oxidative stress in the biology of melanoma: A systematic review. **Pathology - Research and Practice**, v. 215, n. 1, p. 21–28, 1 jan. 2019.

CARDOSO, A. C. F. **Consequências da exposição de células de melanoma ao shear stress para o remodelamento da microvasculatura intratumoral**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 21 mar. 2019.

CARVALHO, J. A. et al. Functionalized photosensitive gelatin nanoparticles for drug delivery application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 30, n. 7, p. 508–525, 3 maio 2019.

CARVALHO, M. R.; REIS, R. L.; OLIVEIRA, J. M. Dendrimer nanoparticles for colorectal cancer applications. **Journal of materials chemistry. B**, 23 jan. 2020.

CASSOU-MOUNAT, T. et al. Gallbladder Metastasis From Conjunctival Melanoma. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 44, n. 2, p. e107–e109, fev. 2019.

CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. **Photodynamic therapy and anti-tumour immunity** *Nature Reviews Cancer*, jul. 2006.

CAVINATO, M.; JANSEN-DÜRR, P. Molecular mechanisms of UVB-induced senescence of dermal fibroblasts and its relevance for photoaging of the human skin. **Experimental Gerontology**, v. 94, p. 78–82, ago. 2017.

CERQUEIRA-COUTINHO, C. et al. Comparison of biodistribution profile of monoclonal antibodies nanoparticles and aptamers in rats with breast cancer. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 598–601, 3 abr. 2017.

CESTARI, S. DA C. P. **Dermatologia Pediátrica: Epiderme**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://editoradoseditores.com.br/loja-virtual/wp->

content/uploads/2018/09/capitulo_02_dermatologia-1.pdf>. Acesso em: 4 jul. 2019.

CHALMERS, Z. R. et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. **Genome Medicine**, v. 9, n. 1, p. 34, 19 dez. 2017.

CHAMORRO, A. C.; ALBUQUERQUE, E. P. A.; ROSA, V. A. DELLA. **Revista de pesquisa em saúde**. [s.l: s.n.]. v. 16

CHANG, C.-H. et al. CK1 α ablation in keratinocytes induces p53-dependent, sunburn-protective skin hyperpigmentation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 38, p. E8035–E8044, 2017.

CHANG, F. et al. ROCK inhibitor enhances the growth and migration of BRAF-mutant skin melanoma cells. **Cancer science**, v. 109, n. 11, p. 3428–3437, nov. 2018.

CHAPMAN, P. B. et al. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 26, p. 2507–2516, 30 jun. 2011.

CHARIFA, A.; CHEN, C. S. J. **Cancer, Melanoma, Lentigo Maligna**. [s.l: s.n.].

CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. **Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm** *Advanced Drug Delivery Reviews*, 14 dez. 2008.

CHEN, L. et al. MicroRNA-331 inhibits proliferation and invasion of melanoma cells by targeting astrocyte-elevated gene-1. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, 2018.

CHEN, S. et al. Transplantation of adipose-derived mesenchymal stem cells attenuates pulmonary fibrosis of silicosis via anti-inflammatory and anti-apoptosis effects in rats. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2018.

CHEN, W. et al. Adsorption of molybdenum by melanin. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 24, n. 1, p. 36, 17 dez. 2019.

CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. **Photodynamic Therapy: Past, Present and Future** *Chemical Record* John Wiley and Sons Inc., , 1 ago. 2017.

CHUNG, E. J. **Nanoparticles for Biomedical Applications: Fundamental Concepts, Biological ... - Google Livros**. Disponível em: <<https://books.google.com.br>>. Acesso em: 17 jan. 2020.

CICHOREK, M. et al. Novel therapeutic compound acridine–retrotuftsina action on biological forms of melanoma and neuroblastoma. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 145, n. 1, p. 165–179, 26 jan. 2019.

CIRRI, P.; CHIARUGI, P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. **American journal of cancer research**, v. 1, n. 4, p. 482–97, 2011.

COENS, C. et al. Health-related quality of life with adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): secondary outcomes of a multinational, randomised, double-blind, phase 3 trial. **The Lancet Oncology**, v. 18, n. 3, p.

393–403, mar. 2017.

COOPER, D. L.; CONDER, C. M.; HARIRFOROOSH, S. **Nanoparticles in drug delivery: Mechanism of action, formulation and clinical application towards reduction in drug-associated nephrotoxicity** *Expert Opinion on Drug Delivery* Informa Healthcare, , 1 out. 2014.

CORDORO, K. M. et al. Pediatric melanoma: Results of a large cohort study and proposal for modified ABCD detection criteria for children. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 6, p. 913–925, jun. 2013.

CORICOVAC, D. et al. Cutaneous Melanoma-A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, 24 maio 2018a.

CORRÊA, F. DE M. et al. Terapia-alvo versus dacarbazina no tratamento de primeira linha do melanoma avançado não cirúrgico e metastático: análise de impacto orçamentário na perspectiva do Sistema Único de Saúde, 2018-2020. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 28, n. 2, p. e2018325, 27 jun. 2019.

COSTA, A.; SARMENTO, B.; SEABRA, V. Mannose-functionalized solid lipid nanoparticles are effective in targeting alveolar macrophages. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 103–113, mar. 2018.

COSTA, B.; ILEM-ÖZDEMİR, D.; SANTOS-OLIVEIRA, R. **Technetium-99m metastable radiochemistry for pharmaceutical applications: old chemistry for new products** *Journal of Coordination Chemistry* Taylor and Francis Ltd., , 3 jun. 2019.

CRAWFORD, A. B. et al. Wait Times for Melanoma Surgery: Is There an Association with Overall Survival? **Annals of Surgical Oncology**, v. 25, n. 1, p. 265–270, 3 jan. 2018.

CROSBY, T. et al. Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. CD001215, 7 fev. 2018.

CZYZ, M. HGF/c-MET Signaling in Melanocytes and Melanoma. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, 3 dez. 2018.

D'ANGELO, M. et al. Theranostic Nanomedicine for Malignant Gliomas. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 14 nov. 2019.

DA, M.; SOARES, V.; DE JANEIRO, R. **Desenvolvimento e Avaliação de Nanopartículas de Poli-ε-caprolactona contendo Zinco(II)ftalocianina para Uso na Terapia Fotodinâmica do Câncer**. [s.l: s.n.].

DA SILVA, D. et al. Biocompatibility, biodegradation and excretion of polylactic acid (PLA) in medical implants and theranostic systems. **Chemical Engineering Journal**, v. 340, p. 9–14, 15 maio 2018.

DA BROWSKA, A. K. et al. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. **Skin Research and Technology**, v. 24, n. 2, p. 165–174, maio 2018.

DARAEI, H. et al. **Application of gold nanoparticles in biomedical and drug**

delivery *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* Taylor and Francis Ltd., , 1 jan. 2016.

DARWISH, W. M. A.; BAYOUMI, N. A. Gold nanorod-loaded (PLGA-PEG) nanocapsules as near-infrared controlled release model of anticancer therapeutics. *Lasers in Medical Science*, 21 jan. 2020.

DAVEY, R. J.; WESTHUIZEN, A. VAN DER; BOWDEN, N. A. Metastatic melanoma treatment: Combining old and new therapies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 98, p. 242–253, 1 fev. 2016.

DAVIDS, L. M.; KLEEMANN, B. Combating melanoma: The use of photodynamic therapy as a novel, adjuvant therapeutic tool. *Cancer Treatment Reviews*, v. 37, n. 6, p. 465–475, 2011.

DE OLIVEIRA DE SIQUEIRA, L. B. et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. *Nanotechnology*, v. 28, n. 6, 10 fev. 2017.

DE SOUZA ALBERNAZ, M. et al. New chalcone compound as a promising antileishmanial drug for an old neglected disease: Biological evaluation using radiolabelled biodistribution. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 13, p. 139–142, 2017.

DENAT, L. et al. Melanocytes as instigators and victims of oxidative stress. *The Journal of investigative dermatology*, v. 134, n. 6, p. 1512–1518, jun. 2014.

DENG, L. et al. A near-infrared laser and H₂O₂ activated bio-nanoreactor for enhanced photodynamic therapy of hypoxic tumors. *Biomaterials science*, 6 dez. 2019.

DI VIRGILIO, F. et al. Extracellular ATP and P₂ purinergic signalling in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Cancer*, v. 18, n. 10, p. 601–618, 13 out. 2018.

DI VIRGILIO, F.; ADINOLFI, E. Extracellular purines, purinergic receptors and tumor growth. *Oncogene*, v. 36, n. 3, p. 293–303, 20 jan. 2017.

DIETRICH, P. et al. Micro RNA -622 is a novel mediator of tumorigenicity in melanoma by targeting Kirsten rat sarcoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 31, n. 5, p. 614–629, 25 set. 2018.

DING, B. et al. DR5 mAb-conjugated, DTIC-loaded immuno-nanoparticles effectively and specifically kill malignant melanoma cells in vivo. *Oncotarget*, v. 7, n. 35, p. 57160–57170, 2016.

DING, L. et al. Ultrasensitive and visible light-responsive photoelectrochemical aptasensor for edifenphos based on Zinc phthalocyanine sensitized MoS₂ nanosheets. *Biosensors and Bioelectronics*, 15 fev. 2019.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. **Photodynamic therapy for cancer** *Nature Reviews Cancer*, maio 2003.

DOMBLIDES, C. et al. Control of the Antitumor Immune Response by Cancer Metabolism. *Cells*, v. 8, n. 2, p. 104, 31 jan. 2019.

DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and therapy**, v. 7, p. 35–49, 2018.

DONIGAN, J. M. et al. Rate of Recurrence of Lentigo Maligna Treated With Off-Label Neoadjuvant Topical Imiquimod, 5%, Cream Prior to Conservatively Staged Excision. **JAMA dermatology**, v. 154, n. 8, p. 885–889, 2018.

DOS SANTOS, S. N. et al. Avoiding the mononuclear phagocyte system using human albumin for mesoporous silica nanoparticle system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 251, p. 181–189, 2017a.

DREIFUSS, T. et al. Uptake mechanism of metabolic-Targeted gold nanoparticles. **Nanomedicine**, v. 13, n. 13, p. 1535–1549, 2018.

DRUDE, N.; TIENKEN, L.; MOTTAGHY, F. M. **Theranostic and nanotheranostic probes in nuclear medicine** Methods Academic Press Inc., , 1 nov. 2017.

DUARTE, A. F. et al. Lentigo Maligna - Not Always a Face and Neck Disease of the Elderly. **Dermatology (Basel, Switzerland)**, v. 234, n. 1–2, p. 37–42, 2018.

EGGEN, C. A. M. et al. Incidence and relative survival of melanoma in children and adolescents in the Netherlands, 1989-2013. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 6, p. 956–961, jun. 2018.

EGGERMONT, A. M. M. et al. Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 19, p. 1845–1855, 10 nov. 2016.

EGGERMONT, A. M. M. et al. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 19, p. 1789–1801, 10 maio 2018.

EGGERMONT, A. M. M. et al. Prognostic and predictive value of AJCC-8 staging in the phase III EORTC1325/KEYNOTE-054 trial of pembrolizumab vs placebo in resected high-risk stage III melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 116, p. 148–157, jul. 2019.

EGGERMONT, A. M. M.; ROBERT, C. New drugs in melanoma: It's a whole new world. **European Journal of Cancer**, 2011.

ERLICH, T. H.; FISHER, D. E. Pathways in melanoma development. **Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, v. 153, n. 1, p. 68–76, fev. 2018.

ERNST, D. S. et al. Burden of illness for metastatic melanoma in Canada, 2011–2013. **Current Oncology**, v. 23, n. 6, p. e563–e570, 2016.

ESTEVEZ, M.; SANTOS, V. **NOVAS TERAPIAS PARA O CÂNCER DE PELE DO TIPO MELANOMA**. [s.l.: s.n.].

FAJERSZTAJN, L.; VERAS, M. M. **Hypoxia: From Placental Development to Fetal Programming** Birth Defects Research John Wiley and Sons Inc., , 16 out. 2017.

FALZONE, L. et al. Occupational exposure to carcinogens: Benzene, pesticides and fibers. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 5, p. 4467–4474, nov. 2016.

FARZANEFAR, S. et al. The Value of Technetium-99m Labeled Alpha-Melanocyte-Stimulating Hormone (^{99m}Tc - α -MSH) in Diagnosis of Primary and Metastatic Lesions of Malignant Melanoma. **Asia Oceania journal of nuclear medicine & biology**, v. 6, n. 2, p. 155–160, 2018.

FENG, Q. et al. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 1 mar. 2015.

FERNANDEZ, E.; MARULL-TUFEU, S. 3D imaging of human epidermis micromorphology by combining fluorescent dye, optical clearing and confocal microscopy. **Skin Research and Technology**, p. srt.12710, 10 maio 2019.

FERREIRA, A. P. A.; BOUCROT, E. **Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis** *Trends in Cell Biology* Elsevier Ltd, , 1 mar. 2018.

FEUERER, L. et al. Role of MIA (melanoma inhibitory activity) in melanocyte senescence. **Pigment Cell & Melanoma Research**, p. pcmr.12801, 6 jun. 2019.

FEUSER, P. E. et al. Synthesis of ZnPc loaded poly(methyl methacrylate) nanoparticles via miniemulsion polymerization for photodynamic therapy in leukemic cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 60, p. 458–466, 1 mar. 2016.

FIDLER, I. J. Origin and biology of cancer metastasis. **Cytometry**, v. 10, n. 6, p. 673–680, 1 nov. 1989.

FINET, A. et al. Nodular progression of lentigo malignant melanoma during a treatment with tocilizumab: cause or coincidence? **Clinical rheumatology**, v. 32, n. 2, p. 277–80, fev. 2013.

FIORENTZIS, M. et al. Conjunctival melanoma and electrochemotherapy: preliminary results using 2D and 3D cell culture models *in vitro*. **Acta Ophthalmologica**, p. aos.13993, 10 dez. 2018.

FISCHER, G. M. et al. Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications. **Pigment cell & melanoma research**, v. 31, n. 1, p. 11–30, 2018.

FLAHERTY, K. T. et al. Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 2, p. 107–114, 12 jul. 2012.

FLORES, F. F. **Avaliação da atividade antitumoral do comosto DM-1 e da terapia de captura de nêutrons por boro em associação ao quimioterápico dacarbazina no tratamento do melanoma.** [s.l: s.n.].

FLORES, S.; LUBY, N. J.; BOWEN, G. M. **Comparison of melanocyte density counts in topical imiquimod-treated skin surrounding lentigo maligna vs control biopsy**

specimens **JAMA Dermatology** American Medical Association, , 1 abr. 2018.

FOGEL, A. L.; SARIN, K. Y.; TENG, J. M. C. **Genetic diseases associated with an increased risk of skin cancer development in childhood** **Current Opinion in Pediatrics** Lippincott Williams and Wilkins, , 1 ago. 2017.

FORCE, J.; SALAMA, A. K. S. **First-line treatment of metastatic melanoma: Role of nivolumab** **ImmunoTargets and Therapy** Dove Medical Press Ltd., , 2017.

FORMARIZ, T. P. **BIOTECNOLOGIA DE SISTEMAS COLOIDAIS APLICÁVEL NA OTIMIZAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DE FÁRMACOS USADOS NO TRATAMENTO DO CÂNCER**. Disponível em:

<<http://www.revistas.cff.org.br/?journal=infarma&page=article&op=view&path%5B%5D=330>>. Acesso em: 27 jan. 2020.

FOROOZANDEH, P.; AZIZ, A. A. **Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles** **Nanoscale Research Letters** Springer New York LLC, , 2018.

FREEMAN, T. J. et al. Inhibition of Pannexin 1 Reduces the Tumorigenic Properties of Human Melanoma Cells. **Cancers**, v. 11, n. 1, 16 jan. 2019.

FRIDMAN, I. A. et al. Morphological Characteristic of Melanoma B16 Progression in C57BL/6 Mice with High and Low Resistance to Hypoxia. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 168, n. 3, p. 390–394, 15 jan. 2020.

FRIJHOFF, J. et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 14, p. 1144–1170, 10 nov. 2015.

FU, S. et al. DNA methylation/hydroxymethylation in melanoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 44, p. 78163, 2017.

FUCHS, E. **Skin stem cells: Rising to the surface** **Journal of Cell Biology**, 28 jan. 2008.

FUJIWARA, S. et al. Gene Expression and Methylation Analysis in Melanomas and Melanocytes From the Same Patient: Loss of NPM2 Expression Is a Potential Immunohistochemical Marker for Melanoma. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 675, 2018.

GAJOS-MICHNIEWICZ, A.; CZYZ, M. Role of miRNAs in Melanoma Metastasis. **Cancers**, v. 11, n. 3, 2019.

GALASSO, M. et al. Loss of miR-204 expression is a key event in melanoma. **Molecular Cancer**, v. 17, n. 1, p. 71, 9 dez. 2018.

GANDOLFI, G. et al. The extent of whole-genome copy number alterations predicts aggressive features in primary melanomas. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 29, n. 2, p. 163–175, mar. 2016.

GARLAND, M. J. et al. **Designing photosensitizers for photodynamic therapy: Strategies, challenges and promising developments** **Future Medicinal Chemistry**, jul. 2009.

GATZKA, M. Targeted Tumor Therapy Remixed—An Update on the Use of Small-Molecule Drugs in Combination Therapies. **Cancers**, v. 10, n. 6, p. 155, 24 maio 2018.

- GAUMET, M. et al. **Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, maio 2008.
- GEISER, M. et al. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 11, p. 1555–1560, nov. 2005.
- GELLER, S. et al. Dermoscopic assessment of vascular structures in solitary small pink lesions-differentiating between good and evil. **Dermatology practical & conceptual**, v. 7, n. 3, p. 47–50, jul. 2017.
- GILMARTIN, A. G. et al. GSK1120212 (JTP-74057) Is an Inhibitor of MEK Activity and Activation with Favorable Pharmacokinetic Properties for Sustained In Vivo Pathway Inhibition. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 5, p. 989–1000, 1 mar. 2011.
- GLAZER, A. M. et al. Clinical Diagnosis of Skin Cancer. **Dermatologic Clinics**, v. 35, n. 4, p. 409–416, out. 2017a.
- GNANASEGARAN, G.; BALLINGER, J. R. **Molecular imaging agents for SPECT (and SPECT/CT)** *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* Springer Verlag, , 2014.
- GOLOB-URBANC, A. et al. Design of split superantigen fusion proteins for cancer immunotherapy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 16, p. 6294–6305, 2019.
- GONTIER, E. et al. Is there penetration of titania nanoparticles in sunscreens through skin? A comparative electron and ion microscopy study. **Nanotoxicology**, v. 2, n. 4, p. 218–231, 2008.
- GOTO, P. L. **Nanopartículas lipídicas sólidas e vesículas cataniônicas contendo ftalocianina de cloro alumínio aplicadas nos processos fotodinâmicos**. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-23052016-103136/publico/Tese_Corrigida_Simplificada.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2020.
- GROB, J. J. et al. Eighth American Joint Committee on Cancer (AJCC) melanoma classification: Let us reconsider stage III. **European Journal of Cancer**, v. 91, p. 168–170, mar. 2018.
- GRUBER, P.; ZITO, P. M. **Cancer, Skin (Integument)**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2018.
- GRUOSSO, T. et al. Spatially distinct tumor immune microenvironments stratify triple-negative breast cancers. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 4, p. 1785–1800, 2019.
- GRZYWA, T. M.; PASKAL, W.; WŁODARSKI, P. K. Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. **Translational oncology**, v. 10, n. 6, p. 956–975, dez. 2017.
- GÜÇLÜ KARADAĞ, T. et al. The effect of skin expansion on acellular dermis in an experimental model. **Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery**, v. 51, n. 3, p. 187–192, 4 maio 2017.
- GUMIENNA-KONTECKA, E.; CARVER, P. L. Building a Trojan Horse: Siderophore-Drug

Conjugates for the Treatment of Infectious Diseases. **Metal ions in life sciences**, v. 19, 14 jan. 2019.

GUTIÉRREZ-CASTAÑEDA, L. D.; NOVA, J. A.; TOVAR-PARRA, J. D. Frequency of mutations in BRAF, NRAS, and KIT in different populations and histological subtypes of melanoma. **Melanoma Research**, p. 1, 3 jul. 2019.

GUY, G. P. et al. Vital signs: melanoma incidence and mortality trends and projections - United States, 1982-2030. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 64, n. 21, p. 591–6, 5 jun. 2015.

HADDAD, N.; JOST, D.; VAILLANT, C. Perspectives: using polymer modeling to understand the formation and function of nuclear compartments. **Chromosome Research**, v. 25, n. 1, p. 35–50, 14 mar. 2017.

HAFEEZ, A.; KAZMI, I. Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 16517, 2017a.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. **Hallmarks of cancer: The next generation** *Cell*, 4 mar. 2011.

HAO, Y. et al. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 11, p. 2767, 5 jun. 2019.

HAUSCHILD, A. et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 380, n. 9839, p. 358–365, 28 jul. 2012.

HAUTE, D. VAN; BERLIN, J. M. **Challenges in realizing selectivity for nanoparticle biodistribution and clearance: Lessons from gold nanoparticles** *Therapeutic Delivery* Future Medicine Ltd., , 1 ago. 2017.

HAYWARD, N. K. et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. **Nature**, v. 545, n. 7653, p. 175–180, 3 maio 2017.

HAZARIKA, M. et al. U.S. FDA approval summary: Nivolumab for treatment of unresectable or metastatic melanoma following progression on ipilimumab. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 14, p. 3484–3488, 15 jul. 2017.

HBIBI, M. et al. [Macrophage activation syndrome revealing subcutaneous T-cell lymphoma in a 16-year old adolescent]. **The Pan African medical journal**, v. 31, p. 74, 2018.

HE, H.; NIEMINEN, A. L.; XU, P. A bioactivatable self-quenched nanogel for targeted photodynamic therapy. **Biomaterials Science**, v. 7, n. 12, p. 5143–5149, 1 dez. 2019.

HELAL-NETO et al. Molecular and Cellular Risk Assessment of Healthy Human Cells and Cancer Human Cells Exposed to Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 230, 28 dez. 2019.

HELAL-NETO, E. et al. Indirect calculation of monoclonal antibodies in nanoparticles using the radiolabeling process with technetium 99 metastable as primary factor: Alternative methodology for the entrapment efficiency. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical**

Analysis, v. 153, p. 90–94, maio 2018a.

HELAL-NETO, E. et al. Development and biological evaluation of a new nanotheranostic for tuberculosis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 9, n. 1, p. 97–105, 15 fev. 2019b.

HENRIQUES, V. et al. The Emerging Therapeutic Landscape of Advanced Melanoma. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 5, p. 549–558, 2 maio 2018.

HERNANDEZ-SEGURA, A.; NEHME, J.; DEMARIA, M. Hallmarks of Cellular Senescence. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 6, p. 436–453, jun. 2018.

HERNANDO, B. et al. Sex-specific genetic effects associated with pigmentation, sensitivity to sunlight, and melanoma in a population of Spanish origin. **Biology of sex differences**, v. 7, p. 17, 2016.

HESSEL, C. M. et al. Copper selenide nanocrystals for photothermal therapy. **Nano Letters**, v. 11, n. 6, p. 2560–2566, 8 jun. 2011.

HONG, E. J.; CHOI, D. G.; SHIM, M. S. **Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials** *Acta Pharmaceutica Sinica B* Chinese Academy of Medical Sciences, , 1 jul. 2016.

HU, X. M.; HE, L.; ZHAO, Y. Dynamic model of vascular-targeted photodynamic therapy. **Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering**, v. 20, n. 10, p. 1056–1065, 27 jul. 2017.

HUANG et al. Roles of Reconstituted High-Density Lipoprotein Nanoparticles in Cardiovascular Disease: A New Paradigm for Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, p. 739, 23 jan. 2020.

HUANG, L. et al. A tumor-targeted Ganetespib-zinc phthalocyanine conjugate for synergistic chemo-photodynamic therapy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 294–303, 10 maio 2018.

HUANG, Y. et al. A light-triggered self-reinforced nanoagent for targeted chemo-photodynamic therapy of breast cancer bone metastases via ER stress and mitochondria mediated apoptotic pathways. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, 25 dez. 2019.

HUANG, Y. Y. et al. **Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy?** *Nanotechnology Reviews* Walter de Gruyter GmbH, , 1 abr. 2012.

HUBER, V. et al. Tumor-derived microRNAs induce myeloid suppressor cells and predict immunotherapy resistance in melanoma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 128, n. 12, p. 5505–5516, 3 dez. 2018.

HUCLIER-MARKAI, S. et al. Alpha-Emitters for Immuno-Therapy: A Review of Recent Developments from Chemistry to Clinics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 23, p. 2642–2654, 20 mar. 2013.

HURST, M. N.; DELONG, R. K. Two-Dimensional Fluorescence Difference Spectroscopy to

Characterize Nanoparticles and their Interactions. **Scientific Reports**, v. 6, 14 set. 2016.

HWANG, K.; KIM, H.; KIM, D. J. Thickness of skin and subcutaneous tissue of the free flap donor sites: A histologic study. **Microsurgery**, v. 36, n. 1, p. 54–58, jan. 2016.

IDÉE, J.-M. et al. Theranostics and contrast-agents for medical imaging: a pharmaceutical company viewpoint. **Quantitative imaging in medicine and surgery**, v. 3, n. 6, p. 292–297, 2013.

IMAHASHI, K. et al. Kinetics of a putative hypoxic tracer, ^{99m}Tc -HL91, in normoxic, hypoxic, ischemic, and stunned myocardium. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 41, n. 6, p. 1102–7, jun. 2000.

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**, set. 2010.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2018-incidencia-de-cancer-no-brasil>>. Acesso em: 3 jan. 2020.

ISLAMI, F. et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 31–54, jan. 2018.

IVES, N. J. et al. Adjuvant interferon- α for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. **European Journal of Cancer**, v. 82, p. 171–183, set. 2017.

J., C. et al. Applications of nanotechnology for melanoma treatment, diagnosis, and theranostics. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2677–2688, 2013.

JACKSON, B. et al. Trojan particles: Large porous carriers of nanoparticles for drug delivery. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 19, p. 12001–12005, 2002.

JAHANGIRIAN, H. et al. **A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: Green nanomedicine** **International Journal of Nanomedicine** Dove Medical Press Ltd., , 12 abr. 2017.

JANJETOVIC, Z. et al. Melatonin and its metabolites protect human melanocytes against UVB-induced damage: Involvement of NRF2-mediated pathways. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1274, 2017.

JANSSEN, L. M. E. et al. The immune system in cancer metastasis: friend or foe? **Journal for Immunotherapy of Cancer**, v. 5, n. 1, p. 79, 2017.

JARAI, B. M. et al. Polymeric Nanoparticles. In: **Nanoparticles for Biomedical Applications**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 303–324.

JIA, X.; JIA, L. Nanoparticles Improve Biological Functions of Phthalocyanine Photosensitizers Used for Photodynamic Therapy. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 8, p.

1119–1122, 2012.

JIANG, G. et al. Dacarbazine combined targeted therapy versus dacarbazine alone in patients with malignant melanoma: A meta-analysis. **PLoS ONE**, 2014.

JOKERST, J. V.; GAMBHIR, S. S. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 1050–1060, 18 out. 2011.

JOLY-TONETTI, N. et al. Melanin fate in the human epidermis: a reassessment of how best to detect and analyse histologically. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 7, p. 501–504, 1 jul. 2016.

JOSHI, S. S. et al. CD34 defines melanocyte stem cell subpopulations with distinct regenerative properties. **PLoS Genetics**, v. 15, n. 4, 2019.

KANEHISA, M. et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. D1, p. D353–D361, 4 jan. 2017.

KANG, H. et al. Size-Dependent EPR Effect of Polymeric Nanoparticles on Tumor Targeting. **Advanced Healthcare Materials**, 1 jan. 2019.

KARIMKHANI, C. et al. The global burden of melanoma: results from the Global Burden of Disease Study 2015. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 1, p. 134–140, jul. 2017.

KAUNITZ, G. J. et al. Melanoma subtypes demonstrate distinct PD-L1 expression profiles. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 97, n. 9, p. 1063–1071, 2017.

KAWAKAMI, A.; FISHER, D. E. The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 6, p. 649–656, 6 jun. 2017.

KEMP, M.; SPANDAU, D.; TRAVERS, J. Impact of Age and Insulin-Like Growth Factor-1 on DNA Damage Responses in UV-Irradiated Human Skin. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 356, 26 fev. 2017.

KETTLER, K. et al. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 3, p. 481–492, mar. 2014.

KHIAO IN, M. et al. Histological and functional comparisons of four anatomical regions of porcine skin with human abdominal skin. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 48, n. 3, p. 207–217, 16 maio 2019.

KHODABANDEHLOO, H.; ZAHEDNASAB, H.; HAFEZ, A. A. Nanocarriers usage for drug delivery in cancer therapy. **International Journal of Cancer Management**, v. 9, n. 2, 1 abr. 2016.

KIERSZENBAUM, A. L.; TRES, L. L. **Histology and cell biology : an introduction to pathology**. [s.l.] Elsevier Saunders, 2012.

KILLOCK, D. Immunotherapy: Desmoplasia is no barrier to PD-1 blockade in melanoma.

Nature Reviews Clinical Oncology, v. 15, n. 4, p. 200–201, 31 jan. 2018.

KIM, J. E. et al. Clinicopathologic Features and Prognostic Factors of Primary Cutaneous Melanoma: a Multicenter Study in Korea. **Journal of Korean Medical Science**, v. 34, n. 16, 11 abr. 2019.

KIM, K.-W. et al. Alkylating Anticancer Drugs. In: **Cancer Drug Discovery**. [s.l.] Springer Netherlands, 2016a. p. 71–94.

KIM, K. W. et al. **Cancer drug discovery: Science and history**. [s.l.] Springer Netherlands, 2016b.

KISZNER, G. et al. Exploring Differential Connexin Expression across Melanocytic Tumor Progression Involving the Tumor Microenvironment. **Cancers**, v. 11, n. 2, p. 165, 1 fev. 2019.

KITANO, M. et al. Advances in Early Detection of Pancreatic Cancer. **Diagnostics**, v. 9, n. 1, p. 18, 5 fev. 2019.

KOHLI, A. K.; ALPAR, H. O. Potential use of nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery: Effect of particle size and charge. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 275, n. 1–2, p. 13–17, 4 maio 2004.

KOIKE, S. et al. Toll-like receptor 2 utilizes RAB11A for melanosome transfer from melanocytes to keratinocytes. **Journal of Dermatological Science**, abr. 2019.

KOPROWSKA, K.; CZYZ, M. [Dacarbazine, a chemotherapeutic against metastatic melanoma and a reference drug for new treatment modalities]. **Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)**, 2011.

KOYAMA, S. et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. **Nature communications**, v. 7, p. 10501, 17 fev. 2016.

KOZAR, I. et al. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 2, p. 313–322, abr. 2019.

KUNZ, M.; IBRAHIM, S. M. **Molecular responses to hypoxia in tumor cells** **Molecular Cancer**, 17 abr. 2003.

KUNZE, J.; ROEBER, H.; KOLLAKOWSKI, M. [Phototoxic dermatitis caused by DTIC-treatment]. **Zeitschrift für Hautkrankheiten**, v. 55, n. 2, p. 100–1, 15 jan. 1980.

KUO, A. et al. Caveolin-1 regulates lipid droplet metabolism in endothelial cells via autocrine prostacyclin-stimulated, cAMP-mediated lipolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 3, p. 973–983, 2018.

KWIATKOWSKI, S. et al. **Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations** **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 1 out. 2018.

KWON, D.; KIM, S. M.; CORREIA, M. A. **Cytochrome P450 endoplasmic reticulum-**

associated degradation (ERAD): therapeutic and pathophysiological implications *Acta Pharmaceutica Sinica B* Chinese Academy of Medical Sciences, , 1 jan. 2020.

LAIKOVA, K. V. et al. Advances in the Understanding of Skin Cancer: Ultraviolet Radiation, Mutations, and Antisense Oligonucleotides as Anticancer Drugs. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1516, 17 abr. 2019.

LAJTHA, L. G. Stem cell concepts. **Nouvelle Revue Francaise d'Hematologie**, v. 21, n. 1, p. 59–65, 1979.

LAMB, J.; HOLLAND, J. P. Advanced methods for radiolabeling multimodality nanomedicines for SPECT/MRI and PET/MRI. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 3, p. 382–389, 1 mar. 2018.

LAMBERTINI, M. et al. Oral melanoma and other pigmentations: when to biopsy? **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 2, p. 209–214, 1 fev. 2018.

LANGER, R.; FOLKMAN, J. Polymers for the sustained release of proteins and other macromolecules. **Nature**, v. 263, n. 5580, p. 797–800, 1976.

LARESE FILON, F. et al. Human skin penetration of gold nanoparticles through intact and damaged skin. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 493–501, dez. 2011.

LARRIBÈRE, L.; UTIKAL, J. Stem Cell-Derived Models of Neural Crest Are Essential to Understand Melanoma Progression and Therapy Resistance. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 12, p. 111, 2019.

LEDERER, M. et al. Photoinduced Electron Transfer in a Zinc Phthalocyanine–Fullerene Conjugate Connected by a Long Flexible Spacer. **ChemPlusChem**, v. 81, n. 9, p. 941–946, 1 set. 2016.

LEE, J. H. et al. Early Detection of Subungual Melanoma In Situ: Proposal of ABCD Strategy in Clinical Practice Based on Case Series. **Annals of dermatology**, v. 30, n. 1, p. 36–40, fev. 2018.

LEE, K. A.; ROTH, R. A.; LAPRES, J. J. **Hypoxia, drug therapy and toxicity** *Pharmacology and Therapeutics*, fev. 2007.

LEE, W. H. et al. **The achievement of ligand-functionalized organic/polymeric nanoparticles for treating multidrug resistant cancer** *Expert Opinion on Drug Delivery* Taylor and Francis Ltd, , 3 ago. 2017.

LEONARD, M. K. et al. The HGF/SF Mouse Model of UV-Induced Melanoma as an In Vivo Sensor for Metastasis-Regulating Gene. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 8, 28 jul. 2017.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). **International journal of oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071–1080, abr. 2018.

LI, J.; LI, Q.; GENG, S. All-trans retinoic acid alters the expression of the tight junction proteins Claudin-1 and -4 and epidermal barrier function-associated genes in the epidermis.

International journal of molecular medicine, v. 43, n. 4, p. 1789–1805, abr. 2019.

LI, J.; RAO, J.; PU, K. **Recent progress on semiconducting polymer nanoparticles for molecular imaging and cancer phototherapy***Biomaterials* Elsevier Ltd, , 1 fev. 2018.

LI, Y. et al. Photothermally triggered cytosolic drug delivery of glucose functionalized polydopamine nanoparticles in response to tumor microenvironment for the GLUT1-targeting chemo-phototherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 317, p. 232–245, jan. 2020.

LIECHTY, W. B. et al. Polymers for Drug Delivery Systems. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 1, n. 1, p. 149–173, 15 jun. 2010.

LIU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, v. 44, n. 5, p. 479–496, 7 jan. 2010.

LIU-SMITH, F. et al. Sex differences in the association of cutaneous melanoma incidence rates and geographic ultraviolet light exposure. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 3, p. 499–505.e3, mar. 2017.

LIU, C. et al. A targeted therapy for melanoma by graphene oxide composite with microRNA carrier. **Drug design, development and therapy**, v. 12, p. 3095–3106, 2018.

LIU, J.; WANG, Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

LIU, Q. et al. Targeted drug delivery to melanoma. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, p. 208–221, 1 mar. 2018.

LIU, Y. et al. Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research. **Quantitative Imaging in Medicine and Surgery**, v. 5, n. 5, p. 708–729, 2015.

LO, J. A.; FISHER, D. E. The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science**, v. 346, n. 6212, p. 945–949, 21 nov. 2014.

LONG, G. V. et al. Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. **Nature Communications**, v. 5, n. 1, p. 5694, 2 dez. 2014.

LOOFT, A. et al. In vivo singlet molecular oxygen measurements: Sensitive to changes in oxygen saturation during PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 325–330, 1 set. 2018.

LU, X. et al. Molecular classification and subtype-specific characterization of skin cutaneous melanoma by aggregating multiple genomic platform data. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 9, p. 1635–1647, 11 set. 2018.

LUI, P. et al. **Treatments for metastatic melanoma: Synthesis of evidence from randomized trials***Cancer Treatment Reviews*, dez. 2007.

LUO, Y. et al. Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 10, p.

2440–2450, 2012.

LYKOVA, S. G. et al. Ultrastructure of epidermocytes in true pemphigus acantholysis. **Arkhiv patologii**, v. 81, n. 1, p. 3, 2019.

MA, C.; ARMSTRONG, A. W. **Severe adverse events from the treatment of advanced melanoma: A systematic review of severe side effects associated with ipilimumab, vemurafenib, interferon alfa-2b, dacarbazine and interleukin-2** *Journal of Dermatological Treatment*, out. 2014.

MA, J. et al. Zinc phthalocyanine-soybean phospholipid complex based drug carrier for switchable photoacoustic/fluorescence image, multiphase photothermal/photodynamic treatment and synergetic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 284, p. 1–14, 28 ago. 2018.

MA, Z. et al. Folate-mediated and pH-responsive chidamide-bound micelles encapsulating photosensitizers for tumor-targeting photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 14, p. 5527–5540, jul. 2019.

MACINTYRE, N. R. Tissue hypoxia: Implications for the respiratory clinician. **Respiratory Care**, v. 59, n. 10, p. 1590–1596, 1 out. 2014.

MALINOSKI, H. et al. Oral Melanomas: A Case Series of a Deadly Neoplasm. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, mar. 2019.

MÂNICA, A. et al. The signaling effects of ATP on melanoma-like skin cancer. **Cellular Signalling**, v. 59, p. 122–130, jul. 2019.

MANSO, J. A. et al. Integrin $\alpha 6\beta 4$ Recognition of a Linear Motif of Bullous Pemphigoid Antigen BP230 Controls Its Recruitment to Hemidesmosomes. **Structure**, 4 abr. 2019.

MARCHESI, F. et al. **Triazene compounds: Mechanism of action and related DNA repair systems** *Pharmacological Research*, out. 2007.

MARGOLIN, K. Introduction to the Role of the Immune System in Melanoma. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 3, p. 537–558, 1 jun. 2014.

MARQUES, A. C. et al. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies. **Journal of Controlled Release**, jan. 2020.

MARQUES, P. C. et al. Desmoplastic melanoma: a rare variant with challenging diagnosis. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 82–85, 2019.

MARTÍN-GORGOJO, A.; NAGORE, E. Melanoma Arising in a Melanocytic Nevus. **Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)**, v. 109, n. 2, p. 123–132, 1 mar. 2018.

MARTÍN M; CIVETTA J. Carcinogenesis. *Salud pública de México [revista en Internet]* 2011 [acceso 8 de febrero de 2018]; 53(5): [415-414]. v. 53, n. 5, p. 405–414, 2011.

MARTINEZ, M. et al. Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome: PTCH1 Mutation Profile and Expression of Genes Involved in the Hedgehog Pathway in Argentinian Patients. **Cells**, v. 8, n. 2, p. 144, 11 fev. 2019.

- MARTINO, T. et al. The orally active pterocarpanquinone LQB-118 exhibits cytotoxicity in prostate cancer cell and tumor models through cellular redox stress. **The Prostate**, v. 78, n. 2, p. 140–151, 1 fev. 2018.
- MATLOU, G. G. et al. Photodynamic therapy activity of zinc phthalocyanine linked to folic acid and magnetic nanoparticles. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 186, p. 216–224, 1 set. 2018.
- MCGEE, H. M. et al. Targeting the Tumor Microenvironment in Radiation Oncology: Proceedings from the 2018 ASTRO-AACR Research Workshop. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, p. clincanres.3781.2018, 5 fev. 2019.
- MELLAI, M. et al. Solid Lipid Nanoparticles Carrying Temozolomide for Melanoma Treatment. Preliminary In Vitro and In Vivo Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 255, 2018.
- MENDES, G. L. Q. Melanoma no Brasil : Tendência Temporal de Mortalidade com Modelagem idade-período-coorte ., p. 1–134, 2014.
- MERKEL, E. A.; GERAMI, P. Malignant melanoma of sun-protected sites: a review of clinical, histological, and molecular features. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 6, p. 630–635, 16 jun. 2017.
- METTLEN, M. et al. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 87, n. 1, p. 871–896, 20 jun. 2018.
- MILAC, A. L.; NEGROIU, G. The Multiple Roles of Tyrosinase-Related Protein-2/L-Dopachrome Tautomerase in Melanoma: Biomarker, Therapeutic Target, and Molecular Driver in Tumor Progression. In: **Human Skin Cancers - Pathways, Mechanisms, Targets and Treatments**. [s.l.] InTech, 2018.
- MILAN, R. et al. Zinc phthalocyanines as light harvesters for SnO₂-based solar cells: a case study. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1176, 24 dez. 2020.
- MILLER, A. J.; MIHM, M. C. Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 1, p. 51–65, 6 jul. 2006.
- MILLER, M. R. et al. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. **ACS Nano**, v. 11, n. 5, p. 4542–4552, 23 maio 2017.
- MILLET, A. et al. Metastatic Melanoma: Insights Into the Evolution of the Treatments and Future Challenges. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, n. 1, p. 98–148, 1 jan. 2017a.
- MINCIULLO, P. L. et al. Oxidative Stress in Benign Prostatic Hyperplasia: A Systematic Review. **Urologia Internationalis**, v. 94, n. 3, p. 249–254, 2015.
- MINCU, R. I. et al. Cardiovascular Adverse Events Associated With BRAF and MEK Inhibitors. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 8, p. e198890, 9 ago. 2019.
- MISHRA, H. et al. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, n. 12, p. 2283–2302, 9 dez. 2018.

- MISHRA, H. et al. Co-Delivery of Eugenol and Dacarbazine by Hyaluronic Acid-Coated Liposomes for Targeted Inhibition of Survivin in Treatment of Resistant Metastatic Melanoma. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 4, p. 163, 3 abr. 2019.
- MISTRY, D. S.; CHEN, Y.; SEN, G. L. Progenitor function in self-renewing human epidermis is maintained by the exosome. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 1, p. 127–135, 6 jul. 2012.
- MOEK, K. L. et al. **Theranostics using antibodies antibody-related therapeutics** **Journal of Nuclear Medicine** Society of Nuclear Medicine Inc., , 1 set. 2017.
- MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, 1 ago. 2018.
- MONTE, A. F. G.; AZEVEDO, G.; REIS, A. F. Spatial energy transfer with observation of bimolecular singlet oxygen emission using quantum dots as donors and zinc-phthalocyanine as acceptors. **Luminescence**, 2020.
- MONTES DE OCA, M. K. et al. Phytochemicals for the Prevention of Photocarcinogenesis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 4, p. 956–974, 1 jul. 2017.
- MORAN, B. et al. Epigenetics of malignant melanoma. **Seminars in Cancer Biology**, v. 51, p. 80–88, ago. 2018.
- MORGENSTERN, A. et al. An Overview of Targeted Alpha Therapy with 225 Actinium and 213 Bismuth . **Current Radiopharmaceuticals**, v. 11, n. 3, p. 200–208, 11 set. 2018.
- MOUAWAD, R. et al. Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 74, n. 1, p. 27–39, 2010.
- NAFISI, S.; MAIBACH, H. I. Skin penetration of nanoparticles. In: **Emerging Nanotechnologies in Immunology**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 47–88.
- NAFISI, S.; SCHÄFER-KORTING, M.; MAIBACH, H. I. **Perspectives on percutaneous penetration: Silica nanoparticles** **Nanotoxicology** Taylor and Francis Ltd, , 1 ago. 2015.
- NAGARAJU, G. P. et al. **Nanoparticles guided drug delivery and imaging in gastric cancer** **Seminars in Cancer Biology** Academic Press, , 2020.
- NAGESETTI, A.; MCGORON, A. J. Multifunctional organically modified silica nanoparticles for chemotherapy, adjuvant hyperthermia and near infrared imaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 147, p. 492–500, 1 nov. 2016.
- NAIDOO, C.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Targeted photodynamic therapy treatment of *in vitro* A375 metastatic melanoma cells. **Oncotarget**, v. 10, n. 58, 20 set. 2019.
- NANDURI, J.; SEMENZA, G. L.; PRABHAKAR, N. R. **Epigenetic changes by DNA methylation in chronic and intermittent hypoxia** **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology** American Physiological Society, , 1 dez. 2017.
- NARTEY, Y.; SNEYD, M. J. The presenting features of melanoma in New Zealand: implications for earlier detection. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, v. 42, n. 6, p. 567–571, 1 dez. 2018.

- NATARAJAN, V. T. et al. Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 7, p. 542–551, 17 jul. 2014.
- NAVES, L. B. et al. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. **Progress in biomaterials**, v. 6, n. 1–2, p. 13–26, maio 2017.
- NEAGU, M. et al. Inflammation: A key process in skin tumorigenesis. **Oncology letters**, v. 17, n. 5, p. 4068–4084, maio 2019.
- NGO, N. et al. *Bifidobacterium spp*: the promising Trojan Horse in the era of precision oncology. **Future Oncology**, v. 15, n. 33, p. 3861–3876, nov. 2019.
- NICHOLS, J. W.; BAE, Y. H. **EPR: Evidence and fallacy** *Journal of Controlled Release* Elsevier B.V., , 28 set. 2014.
- NIE, S. Editorial: Understanding and overcoming major barriers in cancer nanomedicine. **Nanomedicine**, v. 5, n. 4, p. 523–528, jun. 2010.
- NIEWEG, O. E.; GALLEGOS-HERNÁNDEZ, J. F. La cirugía en melanoma cutáneo maligno y las nuevas drogas. **Cirugia y Cirujanos (English Edition)**, v. 83, n. 2, p. 175–180, 2015.
- NOONE, A. M. et al. **Cancer incidence and survival trends by subtype using data from the surveillance epidemiology and end results program, 1992-2013** *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* American Association for Cancer Research Inc., , 1 abr. 2017.
- NORAIN, A.; DADACHOVA, E. Targeted Radionuclide Therapy of Melanoma. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 46, n. 3, p. 250–259, maio 2016.
- NWOSU, Z. C. et al. **Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: A cancer perspective** *Molecular Cancer* BioMed Central Ltd., , 16 nov. 2016.
- O'NEILL, H. et al. **Can the efficacy of [18 f]fdg-pet/ct in clinical oncology be enhanced by screening biomolecular profiles?** *Pharmaceuticals* MDPI AG, , 2019.
- OBADOFIN, O. et al. Immunohistochemical Analysis of BRAF (V600E) Mutation and P16 Expression in Malignant Melanoma in Lagos, Nigeria: A 10-Year Retrospective Study. **Journal of skin cancer**, v. 2019, p. 1628247, 2019.
- OBRADOR, E. et al. Oxidative stress and antioxidants in the pathophysiology of malignant melanoma. **Biol. Chem**, v. 400, n. 5, p. 589–612, 2019.
- OLEINICK, N. L.; EVANS, H. H. The Photobiology of Photodynamic Therapy: Cellular Targets and Mechanisms. **Radiation Research**, v. 150, n. 5, p. S146, nov. 1998.
- OSSEIRAN, S. et al. Characterizing stratum corneum structure, barrier function, and chemical content of human skin with coherent Raman scattering imaging. **Biomedical Optics Express**, v. 9, n. 12, p. 6425, 1 dez. 2018.
- OUYANG, X. et al. A Trojan horse biomimetic delivery strategy using mesenchymal stem cells for PDT/PTT therapy against lung melanoma metastasis. **Biomaterials Science**, 2020.

- PANDIANI, C. et al. Focus on cutaneous and uveal melanoma specificities. **Genes & development**, v. 31, n. 8, p. 724–743, 2017.
- PAPANDREOU, I. et al. Anoxia is necessary for tumor cell toxicity caused by a low-oxygen environment. **Cancer Research**, v. 65, n. 8, p. 3171–3178, 15 abr. 2005.
- PARDRIDGE, W. M. Delivery of Biologics Across the Blood–Brain Barrier with Molecular Trojan Horse Technology. **BioDrugs**, v. 31, n. 6, p. 503–519, 24 dez. 2017.
- PASCHKE, R. et al. Mechanisms of hepatotoxicity caused by dacarbazine in rats. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 119, n. 8, p. 475–81, 1993.
- PATEL, R. et al. Comparison of electronic brachytherapy and Mohs micrographic surgery for the treatment of early-stage non-melanoma skin cancer: a matched pair cohort study. **Journal of contemporary brachytherapy**, v. 9, n. 4, p. 338–344, ago. 2017.
- PAVLICK, A. C. et al. Frontline Therapy for *BRAF* -Mutated Metastatic Melanoma: How Do You Choose, and Is There One Correct Answer? **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 39, n. 39, p. 564–571, maio 2019.
- PAVONE, D. et al. Epidemiology and Risk Factors of Uterine Fibroids. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 46, p. 3–11, jan. 2018.
- PAVRI, S. N. et al. Malignant Melanoma. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 138, n. 2, p. 330e-340e, ago. 2016.
- PEDROSA, T. DO N. et al. A new reconstructed human epidermis for in vitro skin irritation testing. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 31–37, 1 ago. 2017.
- PEKBELGIN KARAOĞLU, H.; KALKAN BURAT, A. α - and β -Substituted Metal-Free Phthalocyanines: Synthesis, Photophysical and Electrochemical Properties. **Molecules**, v. 25, n. 2, p. 363, 16 jan. 2020.
- PENG, K.-T. et al. Mechanism of Lakoochin A Inducing Apoptosis of A375.S2 Melanoma Cells through Mitochondrial ROS and MAPKs Pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, 6 set. 2018.
- PENTA, D.; SOMASHEKAR, B. S.; MEERAN, S. M. Epigenetics of skin cancer: Interventions by selected bioactive phytochemicals. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 34, n. 1, p. 42–49, 1 jan. 2018.
- PEREIRA, D. DOS S. T. et al. The Use of Lectin Gel in the Treatment of Thermal Burns in Rats Immunocompromised. **International Journal of Advanced Engineering Research and Science**, v. 6, n. 2, p. 53–64, 2019.
- PEREIRA, G. G. et al. Microparticles of Aloe vera/vitamin E/chitosan: Microscopic, a nuclear imaging and an in vivo test analysis for burn treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 2, p. 292–300, 2014.
- PERERA, T. S. H. et al. **Rare earth doped apatite nanomaterials for biological application** *Journal of Nanomaterials* Hindawi Limited, , 2015.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. et al. Nutraceuticals for Skin Care: A Comprehensive Review of Human Clinical Studies. **Nutrients**, v. 10, n. 4, p. 403, 24 mar. 2018.

PETROVIC, A. et al. Immunohistochemical distribution of Ki67 in epidermis of thick glabrous skin of human digits. **Archives of Dermatological Research**, v. 310, n. 1, p. 85–93, 8 jan. 2018.

PFLÜCKER, F. et al. The human stratum corneum layer: An effective barrier against dermal uptake of different forms of topically applied micronised titanium dioxide. **Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology**, v. 14, n. SUPPL. 1, p. 92–97, 2001.

PHILIPP-DORMSTON, W. G. **Photodynamic therapy for aesthetic-cosmetic indications** *Giornale Italiano di Dermatologia e Venereologia* Edizioni Minerva Medica, , 1 dez. 2018.

PIEMI, M. P. et al. Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 58, n. 2, p. 177–87, 29 mar. 1999.

PINTO, S. R. et al. Cytotoxicity, genotoxicity, transplacental transfer and tissue disposition in pregnant rats mediated by nanoparticles: the case of magnetic core mesoporous silica nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 46, n. sup2, p. 527–538, 5 nov. 2018.

PIOTROWSKA, A. et al. Vitamin D and its low calcemic analogs modulate the anticancer properties of cisplatin and dacarbazine in the human melanoma A375 cell line. **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 4, p. 1481–1495, 25 fev. 2019.

PLATSIDAKI, E. et al. An unusual early onset of lentigo maligna in the fourth decade of life. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 85, n. 1, p. 129, 1 jan. 2019.

PLOTINO, G.; GRANDE, N. M.; MERCADE, M. **Photodynamic therapy in endodontics** *International Endodontic Journal* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jun. 2019.

PODERYS, V. et al. Protein-stabilized gold nanoclusters for PDT: ROS and singlet oxygen generation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, p. 111802, mar. 2020.

POLYAK, A.; ROSS, T. L. Nanoparticles for SPECT and PET Imaging: Towards Personalized Medicine and Theranostics. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 34, p. 4328–4353, 3 dez. 2018.

PORA, A. et al. Hemidesmosomes and focal adhesions treadmill as separate but linked entities during keratinocyte migration. **Journal of Investigative Dermatology**, 2 abr. 2019.

PORTILHO, F. L. et al. Magnetic core mesoporous silica nanoparticles doped with dacarbazine and labelled with ^{99m}Tc for early and differential detection of metastatic melanoma by single photon emission computed tomography. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, 2018.

PRADO, A. L. et al. RADIOFÁRMACOS Adelaide Letícia PRADO, Ediltes Ana de

- OLIVEIRA, Eliane Silva Ferreira ALMEIDA, Paulo NERIS, Robson José DURÃES, Rodrigo MAGALHÃES, Rosana MALTA, Kássio LACERDA (orientador) 1. p. 2014–2015, 2015.
- PRADO, G.; SVOBODA, R. M.; RIGEL, D. S. What's New in Melanoma. **Dermatologic Clinics**, v. 37, n. 2, p. 159–168, abr. 2019.
- PRASAD, R.; KATIYAR, S. K. Crosstalk Among UV-Induced Inflammatory Mediators, DNA Damage and Epigenetic Regulators Facilitates Suppression of the Immune System. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, n. 4, p. 930–936, jul. 2017.
- QUINN, C. et al. Relative Efficacy of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Dacarbazine, and Glycoprotein 100 in Metastatic Melanoma: An Indirect Treatment Comparison. **Advances in therapy**, v. 34, n. 2, p. 495–512, 2017.
- RADIN, A. et al. **Radiofarmácia**. [s.l.: s.n.].
- RAPOSO, C. D. et al. Development of Novel Galactosylated PLGA Nanoparticles for Hepatocyte Targeting Using Molecular Modelling. **Polymers**, v. 12, n. 1, p. 94, 4 jan. 2020.
- RAWSON, R. V et al. Unexpected UVR and non-UVR mutation burden in some acral and cutaneous melanomas. **Laboratory Investigation**, v. 97, n. 2, p. 130–145, 9 fev. 2017.
- READ, J.; WADT, K. A. W.; HAYWARD, N. K. Melanoma genetics. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 1, p. 1–14, jan. 2016.
- REIFARTH, M.; HOEPPENER, S.; SCHUBERT, U. S. **Uptake and Intracellular Fate of Engineered Nanoparticles in Mammalian Cells: Capabilities and Limitations of Transmission Electron Microscopy—Polymer-Based Nanoparticles** **Advanced Materials** Wiley-VCH Verlag, , 1 mar. 2018.
- REYNOLDS, A. M.; PORTER, K. K. **Characterizing Indeterminate Renal Masses with Molecular Imaging: the Role of ^{99m}Tc -MIBI SPECT/CT** **Current Urology Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 nov. 2017.
- RICCI-JUNIOR, E. et al. Nanocarriers as phototherapeutic drug delivery system: Appraisal of three different nanosystems in an in vivo and in vitro exploratory study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 43–49, mar. 2018a.
- RICHTIG, G. et al. Beyond the *BRAF*^{V600E} hotspot: biology and clinical implications of rare *BRAF* gene mutations in melanoma patients. **British Journal of Dermatology**, v. 177, n. 4, p. 936–944, out. 2017.
- RIEFOLO, M. et al. Interplay between small and long non-coding RNAs in cutaneous melanoma: a complex jigsaw puzzle with missing pieces. **Molecular oncology**, v. 13, n. 1, p. 74–98, jan. 2019.
- RINNERTHALER, M.; RICHTER, K. The Influence of Calcium on the Skin pH and Epidermal Barrier During Aging. In: **Current problems in dermatology**. [s.l.] Karger Publishers, 2018. v. 54p. 79–86.
- RIZWANULLAH, M. et al. Polymer-Lipid Hybrid Nanoparticles: A Next-Generation

Nanocarrier for Targeted Treatment of Solid Tumors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, 16 jan. 2020.

RODRIGO, A. : et al. **UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA INSTITUTO DE QUÍMICA CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA MONOGRAFIA DE PROJETO FINAL DE CURSO Medicina Nuclear: do surgimento à atualidade pela ótica dos radionuclídeos**. [s.l: s.n.].

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C. et al. Advances in Immunotherapy for Melanoma: A Comprehensive Review. **Mediators of inflammation**, v. 2017, p. 3264217, 2017.

ROH, M. R. et al. Genetics of melanocytic nevi. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 28, n. 6, p. 661–672, nov. 2015.

ROSA, T. G. et al. Microradiopharmaceutical for Metastatic Melanoma. **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 12, p. 2922–2930, 23 dez. 2017.

ROSSI, M. et al. Familial Melanoma: Diagnostic and Management Implications. **Dermatology practical & conceptual**, v. 9, n. 1, p. 10–16, jan. 2019.

RUNDLE, P. Photodynamic Therapy for Eye Cancer. **Biomedicines**, v. 5, n. 4, 8 dez. 2017.

RÜNGER, T. M. Mechanisms of Melanoma Promotion by Ultraviolet Radiation. **The Journal of investigative dermatology**, v. 136, n. 9, p. 1751–1752, 1 set. 2016.

RUSH, P. S. et al. Insulinoma-associated 1: A novel nuclear marker in Merkel cell carcinoma (cutaneous neuroendocrine carcinoma). **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 45, n. 2, p. 129–135, 1 fev. 2018.

SABAT, R. et al. T cell pathology in skin inflammation. **Seminars in immunopathology**, v. 41, n. 3, p. 359–377, maio 2019.

SACCHETTO, L. et al. Trends in incidence of thick, thin and in situ melanoma in Europe. **European Journal of Cancer**, v. 92, p. 108–118, mar. 2018.

SAHLE, F. F. et al. Skin Diseases Associated with the Depletion of Stratum Corneum Lipids and Stratum Corneum Lipid Substitution Therapy. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 28, n. 1, p. 42–55, 2015.

SALVAING, J. et al. Assessment of “one-step” versus “sequential” embryo culture conditions through embryonic genome methylation and hydroxymethylation changes. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 32, n. 4, p. 967, 2017.

SAMPAIO E RIVITTI. **Anatomia e Fisiologia da Pele**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://srvd.grupoa.com.br/uploads/imagensExtra/legado/R/RIVITTI_Evandro/Manual_Dermato_Clinica_Rivitti_Sampaio/Lib/Cap_01.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2019.

SANTOS-OLIVEIRA, R. Nanoradiopharmaceuticals: Is that the Future for Nuclear Medicine? **Current Radiopharmaceuticalse**, v. 4, n. 2, p. 140–143, 3 maio 2011.

SANTOS-OLIVEIRA, R. Desenvolvimento de Sistema Troiano de Entrega de Fármacos:

Nanopartículas Biencapsuladas com Dacarbazina e Ftalocianina de Zinco Radiomarcadas com Técnico. 2018.

SANTOS-OLIVEIRA, R. Application of Technetium 99 Metastable Radioactive Nanosystems: Nanoparticles, Liposomes, and Nanoemulsion for Biomedical Application. **Current Pharmacology Reports**, v. 5, n. 4, p. 281–302, 15 ago. 2019.

SANTOS-OLIVEIRA, R.; STABIN, M. G. Dose calculation of radioactive nanoparticles: first considerations for the Design of Theranostic Agents. **Biomedical Microdevices**, v. 20, n. 4, 1 dez. 2018.

SANZ RESSEL, B. L.; MASSONE, A. R.; BARBEITO, C. G. Immunohistochemical expression of selected phosphoproteins of the mTOR signalling pathway in canine cutaneous squamous cell carcinoma. **The Veterinary Journal**, v. 245, p. 41–48, mar. 2019.

SARKAR, D. et al. Epigenetic regulation in human melanoma: past and future. **Epigenetics**, v. 10, n. 2, p. 103–21, 2015.

SASSE, A. D. et al. Chemoimmunotherapy versus chemotherapy for metastatic malignant melanoma. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2, p. CD005413, 6 fev. 2018.

SCATENA, C. et al. Dabrafenib and Trametinib prolong coagulation through the inhibition of tissue factor in BRAFv600e mutated melanoma cells in vitro. **Cancer cell international**, v. 19, p. 223, 2019.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 971–984, 15 set. 2018.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos** *Química Nova*, set. 2003.

SCHIERBECK, J.; VESTERGAARD, T.; BYGUM, A. Skin Cancer Associated Genodermatoses: A Literature Review. **Acta Dermato Venereologica**, p. 0, 2019.

SCHNEIDER, C. et al. Acidification is an Essential Process of Cold Atmospheric Plasma and Promotes the Anti-Cancer Effect on Malignant Melanoma Cells. **Cancers**, v. 11, n. 5, p. 671, 14 maio 2019.

SCHUITMAKER, J. J. et al. Photodynamic therapy: A promising new modality for the treatment of cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 34, n. 1, p. 3–12, 1996.

SEMINERIO, I. et al. Infiltration of FoxP3+ Regulatory T Cells is a Strong and Independent Prognostic Factor in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancers**, v. 11, n. 2, p. 227, 15 fev. 2019.

SENER, E. et al. Investigation of BRAF mutation analysis with different technical platforms in metastatic melanoma. **Pathology - Research and Practice**, v. 213, n. 5, p. 522–530, maio 2017.

SHAIN, A. H.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 29 jun. 2016.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. **Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications** *Drug Discovery Today* Elsevier Ltd, , 1 nov. 1999.

SHI, H. et al. Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance. **Nature communications**, v. 3, p. 724, 6 mar. 2012.

SHI, Q.; HE, Q.; WEI, J. MicroRNA-342 prohibits proliferation and invasion of melanoma cells by directly targeting Zinc-finger E-box binding homeobox 1. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, 2018.

SHU, S. LA et al. Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts by melanoma exosome microRNA favours a pre-metastatic microenvironment. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 12905, 27 ago. 2018.

SHYUR, L.-F. et al. Taiwanin A inhibits MCF-7 cancer cell activity through induction of oxidative stress, upregulation of DNA damage checkpoint kinases, and activation of p53 and FasL/Fas signaling pathways. **Phytomedicine**, v. 18, n. 1, p. 16–24, 15 dez. 2010.

SIBATA, C. H. et al. Photodynamic therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 33, n. 8, p. 869–80, ago. 2000.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5–29, jan. 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, jan. 2019a.

SIMON, A.; KOURIE, H. R.; KERGER, J. Is there still a role for cytotoxic chemotherapy after targeted therapy and immunotherapy in metastatic melanoma? A case report and literature review. **Chinese Journal of Cancer**, v. 36, n. 1, p. 1–5, 2017.

SKUSE A. **What Was Cancer? Definition, Diagnosis and Cause - Constructions of Cancer in Early Modern England - NCBI Bookshelf**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547261/>>. Acesso em: 31 jan. 2020.

SMIT, K. N. et al. Aberrant MicroRNA Expression and Its Implications for Uveal Melanoma Metastasis. **Cancers**, v. 11, n. 6, p. 815, 12 jun. 2019.

SOBCZYNSKI, J.; POLSKI, A. Nanocarriers for Photosensitizers for Use in Antimicrobial Photodynamic Therapy. In: **Nanostructures for Antimicrobial Therapy: Nanostructures in Therapeutic Medicine Series**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 481–502.

SOLÉ, C. et al. The Circulating Transcriptome as a Source of Biomarkers for Melanoma. **Cancers**, v. 11, n. 1, 10 jan. 2019.

SOLIT, D. B.; ROSEN, N. Resistance to BRAF Inhibition in Melanomas. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 8, p. 772–774, 24 fev. 2011.

SOO CHOI, H. et al. Renal clearance of quantum dots. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1165–1170, out. 2007.

SOTGIA, F.; FIORILLO, M.; LISANTI, M. P. Hallmarks of the cancer cell of origin: Comparisons with “energetic” cancer stem cells (e-CSCs). **Aging**, v. 11, n. 3, p. 1065–1068, 13 fev. 2019.

SOTIROPOULOU, P. A.; BLANPAIN, C. Development and homeostasis of the skin epidermis. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 7, p. 1–9, jul. 2012.

SOURA, E. et al. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 3, p. 395–407, mar. 2016.

SPATHIS, A. et al. BRAF Mutation Status in Primary, Recurrent, and Metastatic Malignant Melanoma and Its Relation to Histopathological Parameters. **Dermatology practical & conceptual**, v. 9, n. 1, p. 54–62, jan. 2019.

STÉPHANOU, A.; BALLESTA, A. pH as a potential therapeutic target to improve temozolomide antitumor efficacy : A mechanistic modeling study. **Pharmacology Research and Perspectives**, v. 7, n. 1, 1 fev. 2019.

STRÖMBERG, U.; HOLMÉN, A.; PETERSON, S. Spatial disparities in melanoma incidence and prognosis with consideration to stage at diagnosis, gender and marital status. **Spatial and Spatio-temporal Epidemiology**, v. 19, p. 21–27, nov. 2016.

SUGARBAKER, E. V. Cancer metastasis: A product of tumor-host interactions. **Current Problems in Cancer**, v. 3, n. 7, p. 1–59, 1 jan. 1979.

SUNDARARAJAN, S.; BADRI, T. **Cancer, Metastatic Melanoma**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2019.

TAN, Y. et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy of blood serum based on gold nanoparticles for the diagnosis of the oral squamous cell carcinoma. **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, 7 abr. 2017.

TARAFDER, A. K. et al. Rab11b Mediates Melanin Transfer between Donor Melanocytes and Acceptor Keratinocytes via Coupled Exo/Endocytosis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 1056–1066, 1 abr. 2014.

TAUHATA, L. et al. **RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA: FUNDAMENTOS INSTITUTO DE RADIOPROTEÇÃO E DOSIMETRIA COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR**. [s.l.: s.n.].

TEIMOURI, F.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma: A meta-analysis consisting of 1314 patients. **Melanoma Research**, v. 23, n. 5, p. 381–389, 2013.

TERHEYDEN, P.; KRACKHARDT, A.; EIGENTLER, T. The systemic treatment of melanoma. **Deutsches Aerzteblatt Online**, v. 116, n. 29–30, p. 497–504, 22 jul. 2019.

THAKUR, N. S. et al. Facile development of biodegradable polymer-based nanotheranostics: Hydrophobic photosensitizers delivery, fluorescence imaging and photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 193, p. 39–50, 1 abr. 2019.

THEODORATOU, E. et al. Nature, Nurture, and Cancer Risks: Genetic and Nutritional

Contributions to Cancer. **Annual Review of Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 293–320, 21 ago. 2017.

THYAGARAJAN, A.; SHABAN, A.; SAHU, R. P. MicroRNA-Directed Cancer Therapies: Implications in Melanoma Intervention. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 364, n. 1, p. 1–12, 2018.

TRIESSCHEJIN, M. et al. **Oncology Photodynamic Therapy**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030646>>. Acesso em: 26 jan. 2020.

TRUBINI, S. et al. Novel BRAF mutation in melanoma: A case report. **Molecular and Clinical Oncology**, v. 8, n. 3, p. 460–462, 12 jan. 2018.

TSENG, H.-W. et al. Metformin Treatment Suppresses Melanoma Cell Growth and Motility Through Modulation of microRNA Expression. **Cancers**, v. 11, n. 2, p. 209, 11 fev. 2019.

UMANSKY, V. et al. The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression. **Vaccines**, v. 4, n. 4, p. 36, 3 nov. 2016.

USHIO, N. et al. Identification of dysregulated microRNAs in canine malignant melanoma. **Oncology letters**, v. 17, n. 1, p. 1080–1088, jan. 2019.

VALKO-ROKYTOVSKÁ, M. et al. Specific Urinary Metabolites in Malignant Melanoma. **Medicina**, v. 55, n. 5, p. 145, 16 maio 2019.

VALLI, F. et al. Oxidative stress generated by irradiation of a zinc(II) phthalocyanine induces a dual apoptotic and necrotic response in melanoma cells. **Apoptosis**, v. 24, n. 1–2, p. 119–134, 2 fev. 2019.

VALLI, F. et al. Crosstalk between ROS-dependent apoptotic and autophagic signaling pathways in Zn(II) phthalocyanine photodynamic therapy of melanoma. **Free Radical Biology and Medicine**, jan. 2020.

VALSAMI-JONES, E.; LYNCH, I. **How safe are nanomaterials?** Science American Association for the Advancement of Science, , 23 out. 2015.

VAN DER LEEST, R. J. T. et al. Increasing time trends of thin melanomas in The Netherlands: What are the explanations of recent accelerations? **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 18, p. 2833–2841, dez. 2015.

VAN ROY, F. **Beyond E-cadherin: Roles of other cadherin superfamily members in cancer** **Nature Reviews Cancer**, fev. 2014.

VARAMO, C. et al. MicroRNAs role as potential biomarkers and key regulators in melanoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 56, n. 1, p. 3–10, 1 jan. 2017.

VELA-ROMERA, A. et al. Characterization of the human ridged and non-ridged skin: a comprehensive histological, histochemical and immunohistochemical analysis. **Histochemistry and cell biology**, v. 151, n. 1, p. 57–73, jan. 2019.

VERDEL, N. et al. Physiological and structural characterization of human skin in vivo using combined photothermal radiometry and diffuse reflectance spectroscopy. **Biomedical optics express**, v. 10, n. 2, p. 944–960, 1 fev. 2019a.

- VERVER, D. et al. Risk stratification of sentinel node–positive melanoma patients defines surgical management and adjuvant therapy treatment considerations. **European Journal of Cancer**, v. 96, p. 25–33, jun. 2018.
- VICENTE, A. L. S. A. **Perfil Molecular de Melanomas Cutâneos e de Mucosas**. [s.l.] Fundação Pio XII, hospital do Câncer de Barretos, 2016.
- VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016.
- VILLANUEVA, J.; HERLYN, M. Melanoma and the tumor microenvironment. **Current oncology reports**, v. 10, n. 5, p. 439–46, set. 2008.
- VIZCARDO-GALINDO, G.; LEÓN-VELARDE, F.; VILLAFUERTE, F. C. High-Altitude Hypoxia Decreases Plasma Erythropoietin Soluble Receptor Concentration in Lowlanders. **High Altitude Medicine & Biology**, p. ham.2019.0118, 23 jan. 2020.
- WANG, H. et al. Pro-tumor activities of macrophages in the progression of melanoma. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 13, n. 7, p. 1556–1562, 2017.
- WANG, H. et al. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. **Clinical Epigenetics**, v. 10, n. 1, p. 59, 23 dez. 2018.
- WANG, H. et al. Nanoparticles of Metal-Organic Cages Overcoming Drug Resistance in Ovarian Cancer. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, 1 fev. 2019.
- WANG, Y. F. et al. Apoptosis Induction in Human Melanoma Cells by Inhibition of MEK Is Caspase-Independent and Mediated by the Bcl-2 Family Members PUMA, Bim, and Mcl-1. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 16, p. 4934–4942, 15 ago. 2007.
- WARD, W. H. et al. **Clinical Presentation and Staging of Melanoma**. [s.l.] Codon Publications, 2017.
- WEBER, J. et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 19, p. 1824–1835, 9 nov. 2017.
- WEHLER, E. et al. Economic burden of toxicities associated with treating metastatic melanoma in eight countries. **The European Journal of Health Economics**, v. 18, n. 1, p. 49–58, 31 jan. 2017.
- WEI, C. et al. Real-time imaging tracking of a dual fluorescent vaccine delivery system based on ovalbumin loaded zinc phthalocyanine-incorporated copolymer nanoparticles. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 100–112, 1 jan. 2019.
- WEI, Z. et al. Trafficking pathway between plasma membrane and mitochondria via clathrin-mediated endocytosis. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 6, p. 539–548, 2018.
- WEIDE, B.; NERI, D.; ELIA, G. Intralesional treatment of metastatic melanoma: a review of therapeutic options. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, v. 66, n. 5, p. 647–656, maio 2017.
- WHITEMAN, D. C.; GREEN, A. C.; OLSEN, C. M. The Growing Burden of Invasive

Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 6, p. 1161–1171, jun. 2016.

WHITEMAN, D. C.; PAVAN, W. J.; BASTIAN, B. C. **The melanomas: A synthesis of epidemiological, clinical, histopathological, genetic, and biological aspects, supporting distinct subtypes, causal pathways, and cells of origin** *Pigment Cell and Melanoma Research*, out. 2011.

WHO. **WHO | World Health Statistics 2018: Monitoring health for the SDGs**. Disponível em: <https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2018/en/>. Acesso em: 3 jan. 2020.

WILMOTT, J. S. et al. Intratumoral Molecular Heterogeneity in a BRAF-Mutant, BRAF Inhibitor-Resistant Melanoma: A Case Illustrating the Challenges for Personalized Medicine. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 11, n. 12, p. 2704–2708, 1 dez. 2012.

WILMS, C. et al. MYSM1/2A-DUB is an epigenetic regulator in human melanoma and contributes to tumor cell growth. **Oncotarget**, v. 8, n. 40, p. 67287–67299, 15 set. 2017.

WILSON, M. A.; SCHUCHTER, L. M. Chemotherapy for melanoma. In: **Cancer Treatment and Research**. [s.l.] Kluwer Academic Publishers, 2016. v. 167p. 209–229.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology: Fifth Edition**. [s.l.] Elsevier Inc., 2012.

WITTGEN, H. G. M.; VAN KEMPEN, L. C. L. T. Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. **Melanoma research**, v. 17, n. 6, p. 400–9, 1 dez. 2007.

WONG, V. W. et al. **Stem cell niches for skin regeneration** *International Journal of Biomaterials*, 2012.

WRIGHT, C. L. et al. **Theranostic Imaging of Yttrium-90** *BioMed Research International* Hindawi Publishing Corporation, , 2015.

WU, M. et al. Size-dependent cellular uptake and localization profiles of silver nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 4247–4259, 2019.

WU, Y.-W. et al. Smart blood cell and microvesicle-based Trojan horse drug delivery: Merging expertise in blood transfusion and biomedical engineering in the field of nanomedicine. **Transfusion and Apheresis Science**, v. 54, n. 2, p. 309–318, abr. 2016.

XIN, Y. et al. Meta-analysis of the safety and efficacy of interferon combined with dacarbazine versus dacarbazine alone in cutaneous malignant melanoma. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 16, 2016.

YABROFF, K. R. et al. Minimizing the burden of cancer in the United States: Goals for a high-performing health care system. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 20 fev. 2019.

YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **Journal of extracellular vesicles**, v. 4, p. 27066, 2015.

- YANG, L. et al. Baseline platelet counts and derived inflammatory biomarkers: prognostic relevance in metastatic melanoma patients receiving Endostar plus dacarbazine and cisplatin. **Cancer Management and Research**, v. Volume 11, p. 3681–3690, abr. 2019.
- YANG, Y. et al. Reactive Oxygen Species in the Immune System. **International Reviews of Immunology**, v. 32, n. 3, p. 249–270, 25 jun. 2013.
- YE, Y.; WU, Y.; WANG, J. Pyrroline-5-carboxylate reductase 1 promotes cell proliferation via inhibiting apoptosis in human malignant melanoma. **Cancer management and research**, v. 10, p. 6399–6407, 2018.
- YOO, J. W.; GIRI, N.; LEE, C. H. PH-sensitive Eudragit nanoparticles for mucosal drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 262–267, 17 jan. 2011.
- YOSHIKAWA, H. et al. Radiobiological Characterization of Canine Malignant Melanoma Cell Lines with Different Types of Ionizing Radiation and Efficacy Evaluation with Cytotoxic Agents. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 4, 15 fev. 2019.
- YOUSEF, H.; SHARMA, S. **Anatomy, Skin (Integument), Epidermis**. [s.l.: s.n.].
- YU, W. et al. Zinc phthalocyanine encapsulated in polymer micelles as a potent photosensitizer for the photodynamic therapy of osteosarcoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 14, n. 4, p. 1099–1110, 1 jun. 2018.
- YU, Y. P. et al. Identification of recurrent fusion genes across multiple cancer types. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1074, 31 jan. 2019.
- YUAN, G. et al. Primary malignant melanoma of the cervix: Report of 14 cases and review of literature. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 73162–73167, 22 set. 2017.
- YUAN, T.-A. et al. Race-, Age-, and Anatomic Site-Specific Gender Differences in Cutaneous Melanoma Suggest Differential Mechanisms of Early- and Late-Onset Melanoma. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 6, p. 908, 13 mar. 2019.
- YUNG, C. W.; WINSTON, E. M.; LORINCZ, A. L. Dacarbazine-induced photosensitivity reaction. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 4, n. 5, p. 541–3, maio 1981.
- YURYEV, M. et al. Active diffusion of nanoparticles of maternal origin within the embryonic brain. **Nanomedicine**, v. 11, n. 19, p. 2471–2481, out. 2016.
- ZAIDI, M. R.; DAY, C.-P.; MERLINO, G. From UVs to Metastases: Modeling Melanoma Initiation and Progression in the Mouse. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381–2391, 1 out. 2008.
- ZENDEDEL, E.; ATKIN, S. L.; SAHEBKAR, A. Use of stem cells as carriers of oncolytic viruses for cancer treatment. **Journal of Cellular Physiology**, 15 fev. 2019.
- ZHANG, T. et al. The genomic landscape of cutaneous melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 29, n. 3, p. 266–283, maio 2016a.

- ZHANG, X. et al. Somatic hypermutation of the YAP oncogene in a human cutaneous melanoma. **Molecular Cancer Research**, p. molcanres.0407.2018, 4 mar. 2019.
- ZHANG, Z. et al. Self-Delivered and Self-Monitored Chemo-Photodynamic Nanoparticles with Light-Triggered Synergistic Antitumor Therapies by Downregulation of HIF-1 α and Depletion of GSH. **ACS Applied Materials & Interfaces**, p. acsami.9b23325, 24 jan. 2020.
- ZHAO, X. et al. The Prognostic Significance of Low-Frequency Somatic Mutations in Metastatic Cutaneous Melanoma. **Frontiers in oncology**, v. 8, p. 584, 2018.
- ZHOU, H. et al. Dense and Dynamic Polyethylene Glycol Shells Cloak Nanoparticles from Uptake by Liver Endothelial Cells for Long Blood Circulation. **ACS Nano**, v. 12, n. 10, p. 10130–10141, 23 out. 2018.
- ZHOU, S.; KHANAL, S.; ZHANG, H. Risk of immune-related adverse events associated with ipilimumab-plus-nivolumab and nivolumab therapy in cancer patients. **Therapeutics and clinical risk management**, v. 15, p. 211–221, 2019.
- ZHU, Y. et al. A potential role of microRNAs in protein accumulation in cellular senescence analyzed by bioinformatics. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179034, 7 jun. 2017.
- ZHU, Y. et al. Overexpression of microRNA-612 Restrains the Growth, Invasion, and Tumorigenesis of Melanoma Cells by Targeting Espin. **Molecules and cells**, v. 41, n. 2, p. 119–126, 28 fev. 2018.
- ZIMMER, L. et al. Ipilimumab alone or in combination with nivolumab after progression on anti-PD-1 therapy in advanced melanoma. **European Journal of Cancer**, v. 75, p. 47–55, abr. 2017.
- ZIMMERLÉ, V. et al. Reconnaissance et prise en charge initiale du mélanome par des médecins généralistes : enquête dans un département rural à très faible densité médicale. **La Presse Médicale**, v. 47, n. 4, p. e35–e42, abr. 2018.
- ZÖLLER, N. N. et al. Assessment of Melanogenesis in a Pigmented Human Tissue-Cultured Skin Equivalent. **Indian journal of dermatology**, v. 64, n. 2, p. 85–89, 2019.
- ZUR MÜHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 1998.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética



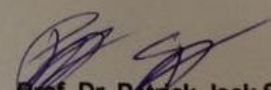
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**DESENVOLVIMENTO DE NANORRADIOFARMACOS**”, registrada com o nº **181/17** sob a responsabilidade de **EMERSON SOARES BERNARDES** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN–CNEN/SP), em reunião de 19/01/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro/2017 a Dezembro/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /BALB/c Nude
Nº de animais	300 camundongos
Peso/Idade	8 a 10 semanas
Sexo	150 Machos 150 Fêmeas
Origem	Biotério IPEN

São Paulo, 19 de Janeiro de 2017.


Prof. Dr. Patrick Jack Spencer
 Vice coordenador da CEUA-IPEN

ANEXO B - Artigo**Dual Encapsulated Dacarbazine and Zinc Phthalocyanine Polymeric
Nanoparticle for Photodynamic Therapy of Melanoma**

Sara Rhaissa Rezende do Reis¹, Edward Helal-Neto¹, Suyene Rocha Pinto¹,
Filipe Leal Portilho¹, Luciana Betzler de Oliveira Siqueira², Eduardo Ricci-
Junior², Amar Si Dahoumane³, Frank Alexis³, Luciana Magalhães Rebelo
Alencar⁴, Ralph Santos-Oliveira^{1,5*}

1. Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro, Brazil
2. Rio de Janeiro Federal University, Faculty of Pharmacy, Rio de Janeiro, Brazil
3. School of Biological Sciences and Engineering, Yachay Tech, San Miguel de Urcuquí, Imbabura 100650, Ecuador.
4. Physics Department, Federal University of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil
5. Zona Oeste State University, Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil.

All correspondence to:

Dr. Ralph Santos-Oliveira
Brazilian Nuclear Energy Commission
Nuclear Engineering Institute
Rio de Janeiro/RJ, Brazil
Rua Helio de Almeida, 75, Ilha do Fundão-Rio de Janeiro-Brazil
E-mail: roliveira@ien.gov.br