

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA - UNB
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

NAOMÍ SOUZA RODRIGUES

NANOFORMULAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O POTENCIAL
ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE TIROSINA QUINASE IBRUTINIBE EM MODELO *IN*
VITRO DE MELANOMA

BRASÍLIA, DF

2025

NAOMÍ SOUZA RODRIGUES

**NANOFORMULAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O POTENCIAL
ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE TIROSINA QUINASE IBRUTINIBE EM
MODELO *IN VITRO* DE MELANOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo

Brasília–DF

2025

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

RR696nn Rodrigues, Naomí Souza
NANOFORMULAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O POTENCIAL
ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE TIROSINA QUINASE IBRUTINIBE EM
MODELO IN VITRO DE MELANOMA / Naomí Souza Rodrigues;
orientador Felipe Saldanha de Araújo. -- Brasília, 2025.
79 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) --
Universidade de Brasília, 2025.

1. Melanoma. 2. Ibrutinibe. 3. Nanoformulação. I.
Saldanha de Araújo, Felipe, orient. II. Título.

Naomí Souza Rodrigues

**NANOFORMULAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O POTENCIAL
ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE TIROSINA QUINASE IBRUTINIBE EM
MODELO *IN VITRO* DE MELANOMA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em ___ de _____ de 2025.

Banca Examinadora

Presidente - Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araujo, Universidade de Brasília.

Membro externo - Dra. Bruna Cândido Guido, Hospital da Criança de Brasília.

Membro interno - Prof. Dr. Luiz Antonio Soares Romeiro, Universidade de Brasília.

Suplente - Prof. Dr. Enrique Roberto Arganaraz, Universidade de Brasília.

“Pois a sabedoria é melhor do que as joias, e tudo o que se possa desejar não se compara com ela” - Provérbios 8:11

DEDICATÓRIA

Com imenso carinho, dedico este trabalho à memória de minha avó Aida. Sua partida deixou um vazio em meu coração, mas sua lembrança continua a me guiar. Foi um exemplo constante em minha vida, o que me proporcionou força e determinação necessárias para seguir em frente. Agradeço por todo o apoio e incentivo durante a vida. A luta contra o câncer foi um exemplo de coragem e resiliência, e me impulsionou ainda mais a terminar esse projeto. Que este trabalho possa, de alguma forma, honrar sua memória e contribuir para a melhoria da vida de outras pessoas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder força e sabedoria para concluir esse sonho.

À minha família, minha eterna gratidão. A minha mãe, por seu amor incondicional e por sempre está disposta a me ajudar. Ao meu pai, por sempre acreditar em mim e me incentivar a seguir com esse projeto e nunca me deixou desistir. Ao meu irmão, por ser meu exemplo. À tia Jacy, por sua presença constante e palavras de incentivo. À minha avó, Eva, que mesmo distante, sempre torceu por mim e sei que suas orações são pilares na minha vida. E, especialmente, à memória de minha avó Aida, que tanto comemorou minha entrada no mestrado, tenho certeza que estaria orgulhosa neste momento.

Agradeço ao meu namorado, Alison, por sua parceria e apoio em todos os momentos, desde a instalação dos programas para análise dos dados até as palavras de conforto e ser presente nos momentos mais difíceis.

Gostaria de agradecer as “gurias” do LHCT: Luma, Amandda, Isabella, Elizabete e Nakaly, agradeço por compartilhar seus conhecimentos e experiências, por me acolherem e me mostrarem o quanto a pesquisa pode ser gratificante. Inclusive, encorajando nos momentos em que os experimentos não saia conforme planejado.

Sou muito grata as minhas amigas: Nathalia, Maria Aline, Lilian, Elen, Isabelle, Gabrielle e Júlia por estarem ao meu lado, me apoiando e celebrando minhas conquistas

Gostaria de agradecer a minha chefe, Luciana, por ter me ajudado e incentivado a seguir esse projeto, sou profundamente grata por sua compreensão e apoio. Muito obrigada, Bárbara e Leonardo, vocês me ajudaram muito. Fazer mestrado já é difícil e fazer mestrado trabalhando 44h semanais e quase impossível, mas com vocês o fardo foi mais leve. Obrigada também Luciene e Maria Clara, vocês sempre me motivaram com palavras de apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo, expresso minha mais sincera gratidão por sua confiança, orientação e paciência. Seus ensinamentos foram essenciais para minha formação e me permitiram crescer tanto profissionalmente quanto pessoalmente.

Por fim, agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. A vocês, muito obrigada.

RESUMO

RODRIGUES, Naomí Souza. **NANOFORMULAÇÃO COMO ESTRATÉGIA PARA REALÇAR O POTENCIAL ANTICÂNCER DO INIBIDOR DE TIROSINA QUINASE IBRUTINIBE EM MODELO *IN VITRO* DE MELANOMA.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2024.

O melanoma cutâneo, embora represente uma pequena parcela dos cânceres de pele, é o tipo mais agressivo e letal, originando-se da transformação maligna dos melanócitos. O tratamento do melanoma varia conforme o estágio da doença e pode incluir remoção cirúrgica do tumor, quimioterapia e imunoterapia. Diante disso, o Ibrutinibe (IBR), um inibidor de tirosina quinase, demonstra potencial para o tratamento de tumores sólidos, como o melanoma. No entanto, sua baixa biodisponibilidade e efeitos adversos limitam sua aplicação clínica. Neste estudo, investigamos a utilização de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) como estratégia para otimizar a entrega do Ibrutinibe e potencializar sua ação em modelos *in vitro* de melanoma. Para avaliar a eficácia do CLN + IBR, realizamos ensaios *in vitro* utilizando as linhagens de melanoma MeWo, SK-MEL-28 e WM164. Avaliamos a citotoxicidade da nanoformulação por meio do ensaio MTT, a proliferação celular pelo ensaio CFSE, a progressão do ciclo celular, a migração celular por *wound healing assay* e a capacidade de formação de colônias. Além disso, investigamos os mecanismos de ação da CLN + IBR, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por citometria de fluxo, a integridade da membrana mitocondrial utilizando rodamina 123, danos celulares pela dosagem de LDH e a formação de poros na membrana plasmática das células de melanoma. A indução de morte celular foi avaliada por meio dos ensaios de anexina V/PI e pela análise da expressão de genes de morte por PCR em tempo real e da atividade das caspases 3/7. Nossos resultados sugerem que a CLN + IBR potencializa a atividade antitumoral, induzindo morte celular por mecanismos necróticos e formação de poros na membrana das células tumorais. Não observamos inibição da proliferação pelo CFSE, mas identificamos inibição da migração

e formação de colônias das células de melanoma. Esses achados demonstram que a nanoformulação do Ibrutinibe apresentou resultados promissores em realçar o potencial antitumoral do inibidor de tirosina quinase, superando efeitos prévios observados pelo uso do fármaco livre.

Palavras-chave: melanoma, ibrutinibe, carreadores lipídicos nanoestruturados, nanoformulação

ABSTRACT

RODRIGUES, Naomí Souza. **NANOFORMULATION AS A STRATEGY TO ENHANCE THE ANTICANCER POTENTIAL OF THE TYROSINE KINASE INHIBITOR IBRUTINIB IN AN IN VITRO MELANOMA MODEL.** Dissertation (Master's in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2024.

Cutaneous melanoma, although representing a small proportion of skin cancers, is the most aggressive and lethal type, originating from the malignant transformation of melanocytes. The treatment of melanoma varies according to the stage of the disease and may include surgical removal of the tumor, chemotherapy, and immunotherapy. In this context, Ibrutinib (IBR), a tyrosine kinase inhibitor, shows potential for the treatment of solid tumors, such as melanoma. However, its low bioavailability and adverse effects limit its clinical application. In this study, we investigated the use of nanostructured lipid carriers (NLCs) as a strategy to optimize the delivery of Ibrutinib and potentiate its action in vitro models of melanoma. To evaluate the efficacy of NLC + IBR, we performed in vitro assays using the melanoma cell lines MeWo, SK-MEL-28, and WM164. We evaluated the cytotoxicity of the nanoformulation by MTT assay, cell proliferation by CFSE assay, cell cycle progression, cell migration by wound healing assay and colony formation capacity. In addition, we investigated the mechanisms of action of CLN + IBR, including the generation of reactive oxygen species (ROS) by flow cytometry, mitochondrial membrane integrity using rhodamine 123, cell damage by LDH measurement and pore formation in the plasma membrane of melanoma cells. Cell death induction was evaluated by annexin V/PI assays and by analyzing the expression of death genes by real-time PCR and caspase 3/7 activity. Our results suggest that CLN + IBR enhances antitumor activity, inducing cell death through necrotic mechanisms and formation of pores in the cell membrane. We did not observe inhibition of proliferation by CFSE, but it was noticed inhibition of migration and colony formation by melanoma cells. These findings

demonstrate that the Ibrutinib nanoformulation showed promising results in enhancing the antitumor potential of the tyrosine kinase inhibitor, overcoming the limitations of the free drug.

Keywords: melanoma, ibrutinib, nanostructured lipid carriers, nanoformulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele.....	19
Figura 2. Classificação do melanoma.....	21
Figura 3. Estrutura dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	28
Figura 4. Viabilidade celular na linhagem MeWo, SK - MEL28, WM164 e HFF-1.....	44
Figura 5. CLN + IBR induz morte celular em linhagens de melanoma.....	45
Figura 6. CLN + IBR induz liberação de LDH nas linhagens de melanoma.....	48
Figura 7. Tratamento com a dose IC ₅₀ do CLN + IBR gera estresse oxidativo nas células de melanoma.....	48
Figura 8. CLN+ IBR gera perda do potencial de membrana mitocondrial.....	50
Figura 9. Atividade das caspases 3/7 nas linhagens de melanoma.....	51
Figura 10. Análise da proliferação celular.....	53
Figura 11. Bloqueio do ciclo celular.....	54
Figura 12. CLN + IBR impede a formação de colônias.....	56
Figura 13. Migração celular é inibida após tratamento com dose IC ₂₅ de CLN + IBR.....	57
Figura 14. Formação de poros na membrana plasmática das células de melanoma.....	60
Figura 15. Dose IC ₅₀ de CLN + IBR modifica a expressão de genes relacionados à morte celular, proliferação e migração.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes e sequência dos <i>primers</i> utilizados para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	42
Tabela 2. Dose IC ₅₀ necessária de cada tratamento utilizado nas linhagens celulares estudadas.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT = do inglês “*AKT Serine/Threonine Kinase*”

ATM = do inglês “*Ataxia Telangiectasia Mutated*”

BAK = do inglês “*BCL2 Antagonist/Killer*”

BAX = do inglês “*BCL2-Associated X Protein*”

BCL2 = do inglês “*BCL2 Apoptosis Regulator*”

BCR = do inglês “*BCR Activator of RhoGEF And GTPase*”

BMX = do inglês “*Non-receptor Tyrosine Kinase*”

BRAF = do inglês “*serine/threonine-protein kinase B-Raf*”

BTK = do inglês “*Bruton Tyrosine Kinase*”

CASP3 = do inglês “*Caspase 3*”

CASP8 = do inglês “*Caspase 8*”

CDKN2A = do inglês “*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*”

cDNA = do inglês “*complementary DNA*”

CFSE = do inglês “*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*”

CLN = do inglês “*nanosstructured lipid carriers*”

CTLA-4 = do inglês “*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4*”

CXCR-4 = do inglês “*C-X-C chemokine receptor type 4*”

CXCR-5 = do inglês “*C-X-C motif chemokine receptor 5*”

DDCt = do inglês “*Delta-Delta Ct*”

DMEM = do inglês “*Dulbecco's Modified Eagle Medium*”

DMSO = do inglês “*Dimethyl sulfoxide*”

DNA = do inglês “*deoxyribonucleic acid*”

EGFR = do inglês “*Epidermal growth factor receptor*”

ERK = do inglês “*Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (MAPK1)*”

GAPDH = do inglês “*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*”

HEPES = do inglês “*N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid*”

HRK = do inglês “*Harakiri, BCL2 Interacting Protein*”

KIT = do inglês “*KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*”

ITK = do inglês “*Tyrosine-protein kinase*”

LDH = lactato desidrogenase

MAPK = do inglês “*Mitogen-activated protein kinase*”

mg = miligramas

mL = mililitros

mM = milimolar

MTT = brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolim]

NF1 = do inglês “*Neurofibromin 1*”

NFKB = do inglês “*Nuclear Factor Kappa B*”

nM = nanomolar

NRAS = do inglês “*Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*”

PBS = do inglês “*Phosphate Buffered Saline*”

PCR = do inglês “*Polimerase Chain Reaction*”

PD-1 = do inglês “*Programmed cell death protein 1*”

PDL-1 = do inglês “*Programmed death ligand 1*”

PI3K = do inglês “*Phosphoinositide 3-kinase*”

PIK3C = do inglês “*Aphosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*”

P53 = do inglês “*Tumor Protein P53*”

PI = do inglês “*Propidium Iodide*”

RLK = do inglês “*Receptor Like Kinase*”

RNA = do inglês “*Ribonucleic Acid*”

rpm = do inglês “*rotations per minute*”

RPMI = do inglês “*Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*”

SFB = soro fetal bovino

TEC = do inglês “*Protein Tyrosine Kinase*”

TP73 = do inglês “*Tumor Protein P73*”

UV = do inglês “*Ultra Violet*”

µg = micrograma

µL = microlitro

µM = micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Melanoma: definição, incidência e tratamento.....	19
1.2. Uso do inibidor de tirosina quinase Ibrutinibe frente ao tratamento do melanoma.....	25
1.3. Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) como transportador do Ibrutinibe.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos.....	30
3. METODOLOGIA.....	31
3.1 Preparo do CLN.....	31
3.2. Cultivo Celular.....	31
3.3. Viabilidade Celular.....	32
3.4. Ensaio de apoptose por Anexina-V e Iodeto de Propídeo.....	33
3.5. Liberação da Lactato Desidrogenase (LDH).....	34
3.6. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	35
3.7. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	35
3.8. Ativação das Caspases 3/7.....	36
3.9. Proliferação Celular.....	37
3.10. Análise de Ciclo Celular.....	38
3.11. Ensaio Clonogênico.....	38
3.12. Ensaio de Migração - técnica de “wound scratch assay”.....	39
3.13. Formação de poros na membrana plasmática.....	40
3.14. PCR em tempo real.....	40
3.15. Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS.....	41
4.1. CLN + IBR reduz a viabilidade celular das linhagens: MeWo, SK-MEL-28, WM164 e HFF-1.....	43
4.2 CLN + IBR induz morte celular nas linhagens de melanoma.....	45
4.3. Liberação de LDH após tratamento com CLN + IBR.....	47

4.4. CLN + IBR induz a geração de EROs em células de melanoma.....	48
4.5. Análise do potencial de membrana mitocondrial.....	49
4.6. Atividade das caspases 3/7 nas linhagens de melanoma.....	51
4.7. Análise da proliferação celular após tratamento com CLN + IBR.....	52
4.8. Tratamento com dose IC ₅₀ do CLN + IBR induz a um aumento de células na fase sub-G1 do ciclo celular	54
4.9. CLN + IBR impede unidades formadoras de colônia nas três linhagens avaliadas.....	55
4.10. Migração celular é inibida após tratamento com dose IC ₅₀ de CLN + IBR.....	57
4.11. Tratamento com dose IC ₅₀ de CLN + IBR induz a formação de poros na membrana plasmática das células de melanoma.....	60
4.12. Análise da expressão dos genes relacionados à morte celular, migração e proliferação.....	61
5. DISCUSSÃO.....	66
6. CONCLUSÃO.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Melanoma: definição, incidência e tratamento

O melanoma cutâneo surge a partir da transformação maligna dos melanócitos, células que possuem como principal função a melanogênese. Essas células estão localizadas na camada basal da epiderme do tecido cutâneo. A pele é composta por três camadas principais: a hipoderme, a derme e a epiderme (Figura 1). A epiderme, a camada mais externa da pele, é constituída por várias subcamadas, sendo a basal a mais profunda. Nesta camada, encontram-se os queratinócitos, responsáveis pela produção de queratina, e os melanócitos, que sintetizam a melanina, o pigmento que confere cor à pele e protege contra a radiação ultravioleta (LOPES *et al.*, 2022; WAGSTAFF *et al.*, 2022).

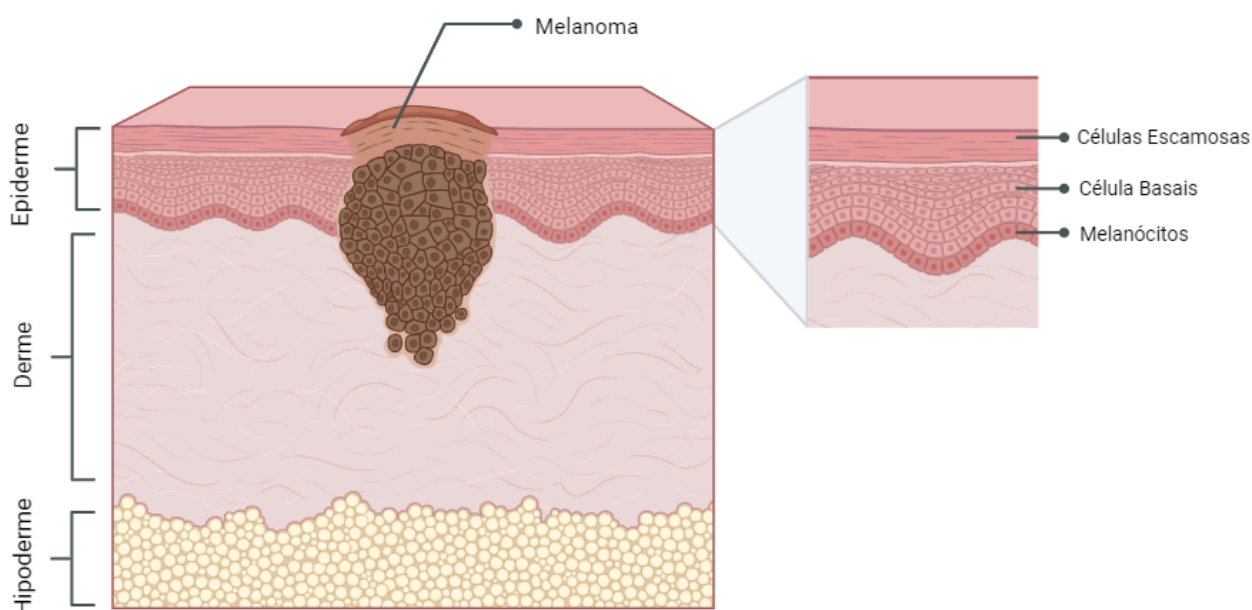


Figura 1. Camadas da pele. Origem do melanoma nos melanócitos presente na epiderme (imagem criada no BioRender).

Apesar de não ser o câncer de pele mundialmente mais comum, representando 5% dos casos, o melanoma é a forma mais agressiva dos carcinomas de pele e está associado ao maior número de casos de morte, com uma taxa de mortalidade de 65% (DAVEY *et al.*, 2021). Sua

agressividade é dada pelo potencial metastático, um processo pelo qual as células tumorais saem do seu local primário, perdem a adesão célula-célula, ocorrendo degradação da matriz celular e invasão dos tecidos adjacentes. Neste processo, as células tumorais entram na corrente sanguínea e colonizam órgãos distantes, como o fígado, o cérebro e o pulmão. Além disso, um dos fatores que contribui para a metástase é a capacidade das células tumorais de induzir a formação de novos vasos sanguíneos, processo conhecido como angiogênese. A angiogênese é essencial para o crescimento tumoral, pois fornece nutrientes e oxigênio às células cancerígenas. (DAVEY et al.,2021; SAUD et al.,2022).

Devido às mudanças de estilo de vida e alterações relacionadas à exposição UV, a incidência do melanoma vem aumentando anualmente, tornando-se um problema de saúde pública global. Segundo Zanoni et al., (2023), o melanoma cutâneo é o 12º câncer mais frequente em todo o mundo. Além disso, o número de casos é maior em pessoas com fenótipo racial de pele clara, bem como, regiões geográficas com maior exposição solar possuem altas taxas de incidência conforme observadas em países como Austrália e Nova Zelândia, onde se registram cerca de 60 casos por 100.000 habitantes anualmente (SCHADENDORF et al., 2015). Na Europa, a taxa é de 20 casos por 100.000 habitantes, enquanto no Brasil, embora o câncer de pele seja bastante comum, representando 30% dos casos de tumores malignos, o melanoma corresponde a apenas 4% desses casos, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Em contraste com outros tipos de câncer, o melanoma cutâneo apresenta uma característica peculiar: sua incidência é maior em pessoas de meia-idade, com uma idade média de diagnóstico de 57 anos. Enquanto o câncer de cólon, próstata e pulmão acometem predominantemente indivíduos mais idosos, com idade média de diagnóstico em torno dos 70 anos. É interessante notar que a relação entre idade e sexo influencia a incidência do

melanoma. Em indivíduos mais jovens, a taxa de incidência é ligeiramente maior em mulheres. No entanto, a partir dos 55 anos, essa tendência se inverte, e os homens apresentam taxas mais elevadas. Essa diferença pode estar relacionada a fatores como hábitos de exposição solar, ocupação e outros fatores socioculturais (LEONARDI et al. 2018; LOPES et al.,2022; DAVEY et al.,2021).

Um fator determinante do melanoma para determinar a extensão da doença, o prognóstico e o planejamento do tratamento é a sua classificação (Figura 2). Essa classificação se baseia em características como a espessura do tumor (medida pela espessura de Breslow), a presença de ulceração e a extensão da invasão para os linfonodos. Nos estágios I e II, o melanoma está restrito a epiderme e não apresenta metástase. A espessura do tumor é relativamente pequena e não há evidência de invasão dos linfonodos. No estágio III, o melanoma já invadiu camadas mais profundas da pele e pode ter se espalhado para os linfonodos regionais. A presença de ulceração também é um fator importante, pois indica um tumor mais agressivo. O estágio IV representa a forma mais agressiva da doença, com metástase para órgãos distantes, como o cérebro e pulmão (POKLEPOVIC, AS; LUKE, 2020; WAGSTAFF et al., 2022).

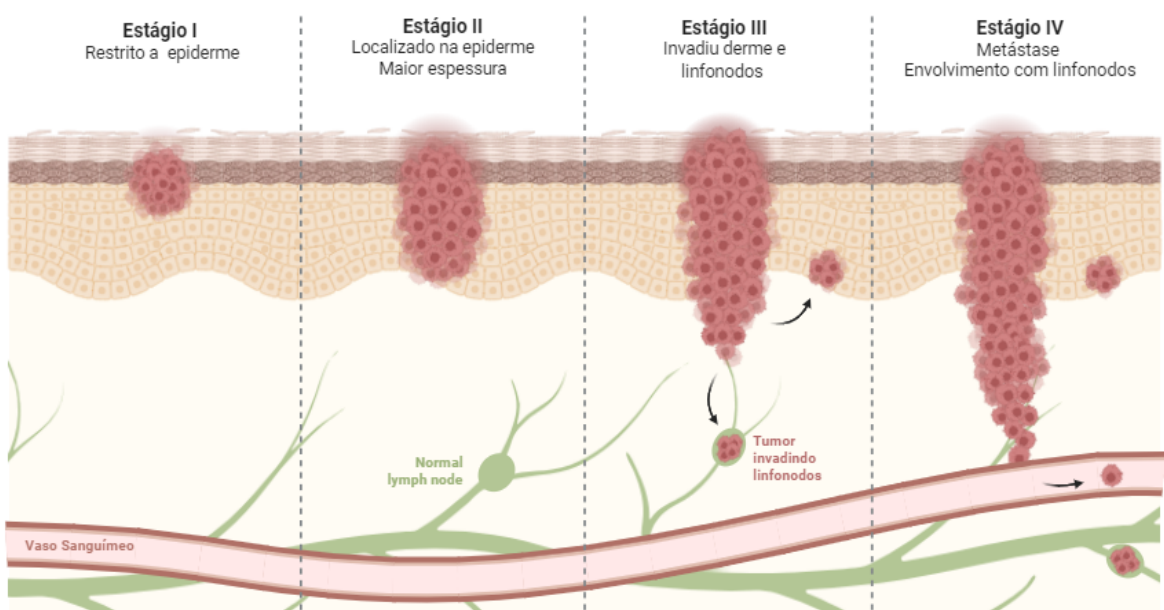


Figura 2. Classificação do melanoma. Representação de como é dada a classificação do melanoma de acordo com invasão as camadas mais profundas da pele, envolvimento com linfonodos e metástase (imagem criada no BioRender).

A agressividade do melanoma é impulsionada por um conjunto de alterações genéticas que levam à proliferação celular descontrolada, à resistência à morte celular programada (apoptose) e à capacidade de invadir tecidos e órgãos distantes. O melanoma não possui uma mutação universal, porém, as mutações mais frequentes no melanoma acometem genes que regulam a proliferação celular, como *BRAF*, *NRAS* e *NFI*, além de genes que controlam a apoptose, como *TP53*, e genes que regulam o ciclo celular, como *CDKN2A* (DIMITRIOU et al. 2018; LEONARDI et al. 2018). Essas alterações genéticas resultam na ativação constitutiva das duas principais vias de sinalização, a via MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno), o que promove perda do controle da proliferação celular, sobrevivência e invasão das células tumorais. A segunda via é PI3K/AKT, que também implica nos processos de proliferação celular, sobrevivência e angiogênese tumoral. Além disso, mutações no receptor de tirosina quinase *KIT* podem ativar a via de sinalização do fator de crescimento epidérmico (EGFR), contribuindo para o crescimento tumoral e a resistência a terapias (LEONARDI et al. 2018; DIMITRIOU et al. 2018).

A via MAPK, desempenha um papel central na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. No melanoma, cerca de 90% dos casos apresentam ativação constitutiva dessa via, impulsionando o crescimento descontrolado das células tumorais. Uma das principais causas da ativação da via MAPK no melanoma é a mutação no gene *BRAF*. Este gene codifica uma proteína quinase que, quando mutada, adquire uma atividade enzimática aumentada de forma permanente. A mutação mais comum é a $BRAF^{V600E}$, que consiste na substituição de um aminoácido valina pelo ácido glutâmico na posição 600 da

proteína BRAF. Essa alteração confere à proteína BRAF uma atividade constitutiva, ou seja, ela se torna constantemente ativa, independentemente dos sinais externos. A ativação constitutiva da BRAF^{V600E} leva à fosforilação e ativação de proteínas da via MAPK, como MEK e ERK. Essa cascata de sinalização promove a proliferação celular, a inibição da apoptose e a invasão tumoral, contribuindo para o desenvolvimento e a progressão do melanoma (LEONARDI et al. 2018; COLOMBINO et al. 2024).

A segunda maior causa de melanoma cutâneo é dado por alterações no gene *NRAS* que contribui significativamente para a ativação da via MAPK. Mutações no gene *NRAS* levam à produção de uma proteína RAS com atividade constitutiva. Essa ativação anormal da RAS resulta em uma hiperativação tanto da via MAPK quanto da via PI3K. Outro gene importante no desenvolvimento do melanoma é o *NFI*. Esse gene codifica uma proteína supressora de tumor que, quando mutada, perde sua função de inibir a atividade da proteína RAS. A perda da função de *NFI* leva a um aumento da atividade da RAS, resultando em uma hiperativação das vias MAPK e PI3K, similar ao que ocorre nas mutações no próprio gene *NRAS* (LEONARDI et al. 2018; DIMITRIOU et al. 2018).

O tratamento do melanoma cutâneo varia significativamente dependendo do estágio em que a doença se encontra. Nos estágios iniciais, quando o tumor está restrito à epiderme, a taxa de cura pode chegar a 90%. Nesse caso, a cirurgia é o tratamento padrão, com excelentes resultados quando o tumor tem bordas bem definidas e não há envolvimento dos linfonodos. No entanto, a taxa de cura diminui drasticamente para cerca de 10% quando o melanoma já está em estágio metastático. Nesses casos, o tratamento pode envolver uma combinação de cirurgias, quimioterapia, imunoterapia e terapia direcionada. A radioterapia e a quimioterapia apresentam limitações no tratamento do melanoma. O melanoma é conhecido por sua resistência à radiação, devido à sua capacidade de reparar rapidamente os danos causados ao

DNA pelas radiações ionizantes. A quimioterapia, por sua vez, também apresenta desafios no tratamento do melanoma, sendo baixa especificidade dos quimioterápicos, resultante de efeitos colaterais significativos que limita sua eficácia. A dacarbazina (DTIC) é o quimioterápico mais utilizado para o melanoma, mas apresenta taxas de resposta relativamente baixas, variando entre 10% e 20% (LOPES et al.,2022; VIEGAS et al.,2022).

A imunoterapia tem revolucionado o tratamento do melanoma, oferecendo novas perspectivas para pacientes com doença avançada. Essa abordagem terapêutica visa estimular o próprio sistema imunológico do paciente a reconhecer e gerar uma resposta frente as células tumorais. As células cancerígenas, incluindo as do melanoma, desenvolvem mecanismos para evadir a resposta imune como a expressão de proteínas de *checkpoint* imune, CTLA-4, PD-1, PD-L1 e LAG-3. Essas proteínas atuam como inibidores no sistema imunológico, estimulam a tolerância, o que leva a um perfil imunossupressor e impede que os linfócitos T eliminem as células tumorais (JENKINS et al.,2021; LOPES et al.,2022).

O tratamento com anticorpos monoclonais, como ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab e relatlimab, bloqueia a ação dessas proteínas de *checkpoint*, liberando os linfócitos T para atacar as células tumorais. Outra abordagem inovadora é a terapia com vírus oncolíticos, como o talimogene laherparepvec (T-VEC), que infecta e destrói as células tumorais, além de estimular o sistema imune. Apesar dos avanços, a imunoterapia não é isenta de efeitos adversos, que podem incluir reações autoimunes, através da interrupção da tolerância imune. Além disso, nem todos os pacientes respondem à imunoterapia, e a resistência ao tratamento pode se desenvolver (JENKINS et al.,2021; LOPES et al.,2022).

1.2. Uso do inibidor de tirosina quinase Ibrutinibe frente ao tratamento do melanoma

O Ibrutinibe é um fármaco desenvolvido para inibir de forma irreversível a tirosina quinase Bruton (BTK), sendo muito utilizado no tratamento de neoplasias hematológicas (MASSÓ-VALLÉS et al.,2016). As tirosinas quinases são enzimas que desempenham um papel fundamental na regulação de diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte celular. Elas atuam como catalisadores na fosforilação de proteínas, modificando suas funções e desencadeando cascatas de sinalização. Uma atividade anormal das tirosinas quinases está frequentemente associada a neoplasias. Alterações genéticas ou epigenéticas podem levar à ativação constitutiva dessas enzimas, promovendo a proliferação celular descontrolada, angiogênese, resistência à apoptose e evasão da resposta imune (HENDRIKS et al.,2014)

BTK desempenha um papel crucial na maturação e ativação das células B, sendo essencial para a resposta imune humoral. Essa enzima é ativada por fosforilação em resposta à ligação de antígenos ao receptor de células B (BCR), desencadeando uma cascata de sinalização que regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. Além de sua função na sinalização de BCR, BTK participa de outras vias de sinalização celular, incluindo aquelas mediadas por receptores de quimiocinas, como CXCR4 e CXCR5. Esses receptores estão envolvidos em processos como migração celular, adesão e invasão, sendo cruciais para a metástase tumoral. Outra importante interação é com cinases, como ERK e JNK, que estão associadas à proliferação celular e à resposta ao estresse, respectivamente. A ativação desregulada da BTK tem sido implicada no desenvolvimento e progressão de diversos tipos de câncer, incluindo linfomas e leucemias. Uma isoforma oncogênica de BTK tem sido frequentemente expressa em tumores sólidos. Devido ao seu papel central na oncogênese, BTK tem se tornado um alvo promissor para o desenvolvimento de novas terapias, contra o

câncer. Inibidores da BTK têm demonstrado eficácia para o tratamento de neoplasias hematológicas e sólidas (MASSÓ-VALLÉS et al.,2016; SZKLENER et al.,2022).

Nesse contexto, o Ibrutinibe atua principalmente ao se ligar irreversivelmente ao sítio ativo de BTK, mais especificamente ao resíduo de cisteína 481. Essa interação inibe a atividade da BTK e, de forma não seletiva, de outras tirosinas quinases que compartilham um resíduo de cisteína similar em seus sítios ativos, como membros da família TEC (ITK, TEC, BMX e RLK/TXK), quinases da família EGFR e as quinases BLK e JAK3. Importante destacar que a inibição desses alvos é importante para terapia frente aos tumores sólidos, uma vez que, essas proteínas estão alteradas em diversas neoplasias sólidas (MOLINA-CERRILLO et al., 2017; SZKLENER et al.,2022).

Uma das principais ações antitumorais do Ibrutinibe é a modulação da resposta imune. Ao inibir a cinase ITK, o Ibrutinibe promove a polarização dos linfócitos Th2 CD4+ em direção ao perfil Th1, o que leva a um aumento da atividade de linfócitos T CD8+ citotóxicos. Essa mudança no perfil imune favorece a eliminação de células tumorais e reverte os mecanismos de escape imune frequentemente observados em diversos tipos de câncer, como melanoma, adenocarcinoma de próstata e de pâncreas (MOLINA-CERRILLO et al., 2017; REN et al., 2022).

Além disso, o Ibrutinibe também exerce um impacto significativo no microambiente tumoral. Células imunossupressoras, como as células mieloides supressoras (MDSCs) e os macrófagos associados a tumores (TAMs) contribuem para a evasão imune tumoral. Essas células expressam BTK, e a inibição dessa quinase pode reverter esse processo, ao reduzir a produção de citocinas imunossupressoras por essas células e promover a diferenciação de MDSCs em células dendríticas maduras. Dessa forma, o Ibrutinibe contribui para a

remodelação do microambiente tumoral, tornando-o mais favorável à eliminação de células tumorais (MOLINA-CERRILLO et al., 2017; REN et al., 2022).

Como pode ser visto, as interações do Ibrutinibe em inibir a atividade das cinases fundamentais para o desenvolvimento do câncer sugere o seu uso no tratamento de tumores sólidos. No entanto, sua eficácia frente ao tratamento de diversos tipos de câncer pode gerar efeitos adversos que, em alguns casos, levam à redução da dose ou ao abandono do tratamento. Os efeitos adversos mais comuns incluem fibrilação atrial, hemorragias, danos hepáticos, anemia e infecções oportunistas (LASICA; TAM, 2020). Um dos principais desafios para a utilização tópica do Ibrutinibe é a baixa biodisponibilidade do fármaco. A epiderme é composta por camadas e os tumores invasivos frequentemente se localizam na sua camada mais profunda, o que dificulta a penetração de substâncias. Essa limitada permeação cutânea impede que concentrações terapêuticas do fármaco alcancem o local da lesão, comprometendo assim sua eficácia. Além disso, o caráter lipofílico do Ibrutinibe, aliado à natureza lipofílica da camada córnea, pode limitar ainda mais sua penetração passiva. Diante desse cenário, o desenvolvimento de formulações inovadoras, como sistemas de liberação transdérmica e nanotecnologia, representa uma estratégia promissora para otimizar a entrega tópica do Ibrutinibe e para aumentar a sua eficácia no tratamento de tumores cutâneos (ALBUQUERQUE, et al., 2024).

1.3. Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) como transportador do Ibrutinibe

A reformulação de fármacos com o uso de nanopartículas surge como uma estratégia promissora para otimizar tratamentos oncológicos. Considerando o tempo, custo e incertezas envolvidos no desenvolvimento de novas moléculas, a utilização de nanopartículas como carreadores para fármacos já estabelecidos com atividade antineoplásica apresenta diversas vantagens. Essas nanoestruturas podem melhorar significativamente a biodisponibilidade dos

fármacos no tecido tumoral, além de proteger os princípios ativos contra degradação (PEREIRA, et al., 2023).

Dentre as diversas opções de nanopartículas, os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) destacam-se por sua alta capacidade de encapsular substâncias lipofílicas, característica comum a muitos fármacos antineoplásicos (PEREIRA, et al., 2023). Além disso, os CLN apresentam boa estabilidade coloidal e podem ser produzidos a um custo relativamente baixo. Com relação à estrutura (Figura 3), os CLNs são sistemas complexos formados por uma matriz lipídica sólida, uma fase lipídica líquida e uma fase aquosa contendo tensoativos. Essa composição única confere aos CLN propriedades vantajosas como a capacidade de encapsular fármacos lipofílicos, alta estabilidade e facilidade de produção em larga escala (CASARINI et al., 2021; MOURA, et al., 2021).

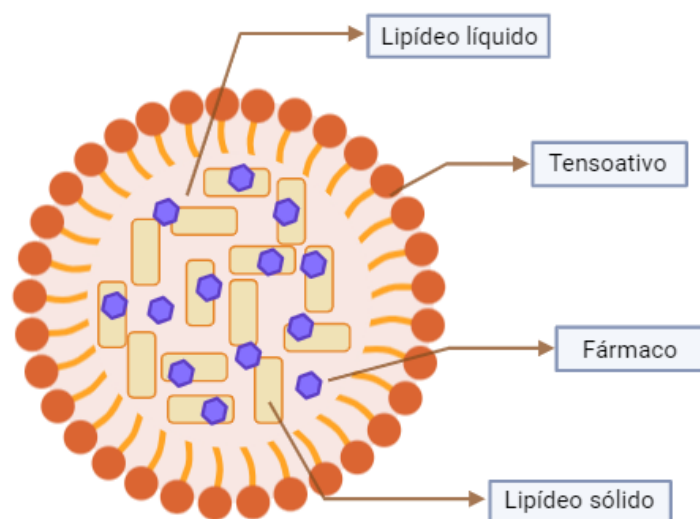


Figura 3. Estrutura dos carreadores lipídicos nanoestruturados. Os CLNs são compostos por lipídeos líquidos, sólidos e tensoativos que permitem a entrega do fármaco (imagem criada no BioRender).

A preparação dos CLN geralmente ocorre na ausência de solventes orgânicos, utilizando processos como a homogeneização de alta pressão. O tamanho nanométrico das partículas aumenta significativamente a área de contato com a pele, facilitando a interação com o estrato córneo. A presença de lipídios na formulação promove um efeito oclusivo, aumentando a hidratação cutânea e potencializando a penetração transdérmica do fármaco encapsulado. Comparados a outros sistemas carreadores lipídicos, como lipossomas e nanopartículas sólidas lipídicas, os CLN apresentam maior eficiência de encapsulação e retenção do fármaco, garantindo uma liberação mais controlada e prolongada. A matriz interna dos CLN, composta por lipídios sólidos (ácidos graxos, esteróis e glicerídeos) e líquidos, proporciona um ambiente ideal para a encapsulação de diversos fármacos, especialmente aqueles com caráter lipofílico como o Ibrutinibe (BELOQUI et al., 2016; CASARINI et al., 2021).

Embora o Ibrutinibe demonstre potencial na inibição de cinases associadas à progressão de tumores sólidos como o melanoma, suas limitações, como baixa biodisponibilidade e efeitos adversos, restringem seu uso clínico. Neste estudo, exploramos a utilização de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) como uma estratégia para otimizar a entrega do Ibrutinibe e potencializar sua ação em modelos *in vitro* de melanoma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

- Avaliar o efeito anticâncer do Ibrutinibe (IBR) associado a carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) em modelo de melanoma *in vitro*, usando as linhagens celulares MeWo, SK-MEL-28 e WM164.

2.2. Objetivos Específicos:

- Investigar se CLNs potencializam o efeito citotóxico do Ibrutinibe nas linhagens de melanoma MeWo, SK-MEL-28 e WM164;
- Analisar se CLN+ IBR induz morte celular das linhagens MeWo, SK-MEL-28 e WM164;
- Avaliar se CLN + IBR inibe os principais mecanismos na carcinogênese do melanoma, como proliferação e migração celular, geração de EROs, capacidade de formação de colônias e permeabilidade de membrana mitocondrial, nas linhagens MeWo, SK-MEL-28 e WM164;
- Determinar se CLN + IBR modula a expressão de genes-chave relacionados aos processos celulares descritos acima;

3. METODOLOGIA

3.1 Preparação do CLN

A CLN foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia de Medicamentos, Alimentos e Cosméticos - Faculdade de Ciências e Saúde, Universidade de Brasília. Foi feita por meio do aquecimento a 80° de uma solução contendo a fase oleosa (500mg de ácido oleico e 500mg de ácido esteárico) e tensoativos (500mg de Tween 80 e 500mg de lecitina de soja) sob agitação constante (300 RPM). Após fusão completa dos componentes, foi adicionado 500µL de água (80°) ainda sob agitação, para a obtenção da microemulsão. A microemulsão foi dispersa em fase aquosa (tampão pH 5,5) com alta velocidade de agitação (13.000 RPM) no UltraTurrax por 5min, mantido em banho de gelo. Dado isso, a dispersão foi levada a sonificação, amplitude de 20%, com pulso contínuo de 5 min. A esse sistema foram incorporados o Ibrutinibe sendo 1mg por mL. A formulação da CLN seguiu o delineamento experimental planejado por meio do *Software Design-expert 12*, definindo a quantidade da fase sólida e tensoativos de 500mg e volume final da formulação em 15mL em fase aquosa.

3.2 Cultivo Celular

Nesse projeto foram usadas as linhagens humanas de melanoma MeWo, SK-MEL-28 e WM164. Informações acerca dessas células foram obtidas no site *American Type Culture Collection* (ATCC) (www.atcc.org) para as linhagens MeWo e SK-MEL-28, enquanto a linhagem WM164 no site *Rockland* (www.rockland.com). A WM164 é uma linhagem celular obtida do melanoma metastático que estava presente no braço de um homem com 22 anos, esse tumor estava em estágio IV com disseminação superficial. Essa linhagem ainda possui mutação específica no gene BRAF. Já a linhagem celular MeWo foi extraída do nódulo linfático, região metastática, de um homem com 78 anos, portador de um melanoma maligno. Essas células, exibem morfologia fibroblastóide. A linhagem SK-MEL-28 é uma linhagem de

melanócitos isolados na pele de um homem de 51 anos, portador de um melanoma maligno. Para controle experimental, foi utilizado fibroblastos humanos primários (HFF-1), obtidos de pele abdominal, que nos foram cedidos pela Profa. Juliana Lott de Carvalho (Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília).

As linhagens de melanoma foram cultivadas em garrafas de 75cm², com meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI1640), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, 2mM de L-glutamina e 100 µg/mL de antibióticos (penicilina e estreptomicina). Enquanto a linhagem HFF-1 foi cultivada com o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 10% de SFB e 2mmol/L de penicilina/estreptomicina. As células foram acondicionadas em incubadora úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C de temperatura, sendo o crescimento celular monitorado diariamente por microscópio de inversão AE200. O meio de cultura foi trocado a cada 48h e a obtenção das células ao fim do cultivo celular foi realizada com uso de tripsina 0,05%.

3.3 Viabilidade Celular

A viabilidade/citotoxicidade das células MeWo, SK-MEL-28, WM164 e HFF-1 sob o tratamento com CLN + IBR foi avaliado pelo ensaio de redução do sal tetrazolium ou MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5diphenyltetrazoliumbromide, Sigma-Aldrich). Por meio deste ensaio, a viabilidade celular é avaliada diretamente pela atividade mitocondrial, uma vez que, a redução do MTT em cristais de Formazan (cor roxo azulada) é feita por mitocôndrias integras. Logo, mudanças na concentração de MTT estão relacionadas as variações das atividades mitocondriais que, por sua vez, estão relacionadas à viabilidade celular. Para a realização do ensaio, cada linhagem celular foi cultivada em placa de 96 poços, em concentrações de 7x10³ células, em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As placas foram mantidas em incubadora úmida com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24

horas de incubação, as células foram tratadas em três grupos distintos de tratamento, porém todos receberam as mesmas concentrações crescentes (1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M) de cada condição experimental. O primeiro grupo recebeu tratamento de CLN+ IBR, o segundo recebeu o tratamento com CLN vazias (sem o IBR) e o terceiro grupo recebeu o tratamento apenas com o IBR. As células foram tratadas por 24h e, após esse período, foi adicionado 10 μ L de MTT (5 mg/mL) em cada poço. Em seguida, as placas foram mantidas em incubação por 4h e, posteriormente, o sobrenadante de cada poço foi removido e 100 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionado em cada poço. Os cristais de formazan foram dissolvidos mediante homogeneização em bandeja agitadora (Global) por 15 minutos. Após esse período, foi realizada a leitura das placas por meio de espectrofotometria de absorvância no leitor de placas Multiskan FC (ThermoScientific), em comprimento de onda de 570nm. Com os resultados obtidos, estabelecemos uma análise por regressão linear para determinar as doses de IC_{50} e IC_{25} dos tratamentos utilizados. O cálculo foi feito utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, Inc.).

3.4. Ensaio de apoptose por Anexina-V e Iodeto de Propídeo

No intuito de avaliar apoptose celular das linhagens de melanoma após tratamento com as doses IC_{50} de CLN + IBR e de Ibrutinibe (fármaco livre), utilizamos o ensaio de Anexina-V e Iodeto de Propídeo (PI). Para tal, cada linhagem celular (MeWo, SK-MEL-28 e WM164) foi cultivada em placas de 12 poços, com 8×10^4 células por poço em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram mantidas em estufa incubadora úmida com atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C, por 24h. Após o tempo de incubação, as células foram tratadas com IC_{50} de cada condição experimental (grupo que recebeu CLN + IBR e outro grupo que recebeu apenas IBR) e incubadas novamente por 24h. Após esse período, as células foram dissociadas das placas com adição de 300 μ L de accutase (Gibco) em cada poço

por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada poço 900µL de meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB, as células foram recolhidas para tubos de citometria e lavadas, duas vezes, com PBS gelado, por centrifugação à 1.000 rpm por 5 min. O pellet de células formado após a última centrifugação foi ressuspensionado em tampão de ligação produzido *in house* (140mM de NaCl, 4mM de KCl, 10mM de HEPES/NaOH e 0,75mM de MgCl₂ dissolvidos em 200ml de água Mili-Q pH ajustado para 7,4) (TRAHTEMBERG et al., 2007). Foi adicionado 1,5mM de CaCl₂ e, logo em seguida, realizamos a marcação com Anexina-V -FITC (BD Bioscience) e incubamos as amostras por 15 minutos ao abrigo da luz. Dado o tempo de incubação, foi pipetado 200µL de PBS em cada tubo e a amostra foi homogeneizada. No momento da aquisição, as células foram marcadas com 3µL Iodeto de Propídio (Life Science) e adquirido 10.000 eventos no citômetro de fluxo BD FACSVerse™. Para cada linhagem celular foi utilizado controle positivo (células tratadas com DMSO 5%) e controle negativo (células não tratadas). Os resultados foram analisados no software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC).

3.5. Liberação da Lactato Desidrogenase (LDH)

No intuito de avaliar citotoxicidade e dano celular, foi utilizado o kit CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen), o qual permite quantificar a enzima LDH, liberada para o meio extracelular após a ocorrência de danos na membrana plasmática. O princípio do ensaio consiste na redução de um sal tetrazólico a um produto formazan vermelho que pode ser medido espectrofotometricamente. Cada linhagem celular foi plaqueada em placas de 96 poços, sendo utilizado 7x10³ células por poço, com meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas com atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C, por 24h. Após este período, as células receberam o tratamento com a dose IC₅₀ de CLN + IBR e foram levadas para a incubação por 24h. Após o tempo de tratamento, 50µL do sobrenadante foi

transferido para uma placa de 96 poços e foi adicionado 50µL do reagente *Reaction Mixture*. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, foi adicionado 50µL de *Stop Solution* para finalizar a reação. A placa foi submetida à espectrofotometria de absorvância em dois comprimentos de onda, 490nm no leitor de placas Multiskan FC (ThermoScientific) e 680nm no leitor DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter). Para determinar a absorvância das amostras, o valor da absorvância de 680nm foi subtraído do valor de 490nm.

3.6. Formação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas linhagens de melanoma após o tratamento com nanopartículas carregadas com Ibrutinibe, utilizamos o ensaio com CellROX® Green (Thermo Fisher Scientific). Esta sonda fluorescente permeável é oxidada por EROs, emitindo fluorescência, que pode ser detectada por citometria de fluxo. Para isso, as linhagens de melanoma foram cultivadas em placas de 12 poços e tratadas com a dose IC₅₀ de CLN + IBR por 24 horas. Em seguida, as amostras foram incubadas com o CellROX Green por 30 minutos, protegidas da luz. Após a incubação, as células foram colhidas com 300µL de accutase (Gibco), sendo a enzima posteriormente neutralizada com meio RPMI1640 10% de SFB. Em seguida, as amostras foram lavadas com 500µL PBS, centrifugadas à 1.000 rpm por 5 min e ressuspensas com 500µL de PBS. Foram analisados em um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™, com a aquisição de 10.000 eventos. A fluorescência foi medida no canal FL-1. Os controles positivos e negativos foram utilizados, seguindo a instrução do fabricante. Os resultados foram analisados no software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC).

3.7. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Alterações do potencial de membrana mitocondrial foram avaliadas por uso da sonda rodamina 123. Por ser permeável às células, essa sonda fluorescente é capaz de se ligar a mitocôndria de células viáveis. Logo, alterações no potencial de membrana mitocondrial levam à diminuição na captação do sinal fluorescente desse corante. Para esse ensaio, as linhagens celulares foram plaqueadas em placas de 12 poços, sendo utilizado 8×10^4 células por poço em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As amostras foram mantidas em incubação com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C , por 24h. Após esse período, as células essas foram tratadas com a dose IC_{50} de CLN+ IBR e levadas para a incubação por 24h. Depois desse período, as células foram dissociadas da placa por 300 μL com uso de Accutase (Gibco), lavadas com 400 μL de PBS, centrifugadas à 1.000 rpm por 5 min, e ressuspensas com 300 μL de RPMI sem SFB. Nesse momento, cada linhagem recebeu 5 μL de rodamina 123 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após incubação por 20 minutos ao abrigo da luz, as amostras foram novamente lavadas com PBS, e levadas para aquisição de 10.000 eventos de cada condição experimental no citômetro de fluxo BD FACSCalibur™. Para controle positivo do experimento foi utilizado peróxido de hidrogênio 500 μM . Os resultados foram analisados no software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC).

3.8. Ativação das Caspases 3/7

Para dosar a atividade das enzimas caspases 3 e 7 após o tratamento das linhagens de melanoma com as nanopartículas carregadas com Ibrutinibe, foi utilizado o kit Caspase-Glo® 3/7 Assay (Promega). Trata-se de um ensaio luminescente, em que a intensidade de luz gerada é diretamente proporcional a atividade das caspases 3/7 presentes na amostra. Para isso, 7×10^3 células de cada linhagem foram plaqueadas em placa de 96 poços de fundo branco, com meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As amostras foram incubadas com atmosfera de 5% de CO_2 a 37°C , por 24h. Dado esse período, as células foram expostas ao

tratamento com a dose IC_{50} de CLN + IBR por 24h. No dia seguinte, foi adicionado 100 μ L do reagente de Caspase-Glo® 3/7 em cada poço, a placa foi protegida da luz e levada para bandeja agitadora sob agitação de 300 - 500rpm por 30 segundos. Após incubação por 3h, a ativação das caspases 3/7 foi mensurada pela leitura do sinal de luminescência no equipamento GloMax® Explore Multimode Microplate Reader (Promega) do Laboratório de Baculovírus - IB, UnB.

3.9. Proliferação Celular

Para avaliar o impacto do CLN + IBR sobre a proliferação celular das linhagens MeWo, SK-MEL-28 e WM164 foi utilizado o Carboxyfluorescein Succinimidy Ester (CFSE, Sigma-Aldrich). O CFSE é uma molécula fluorescente ao permear células viáveis. Desse modo, a cada divisão celular, a intensidade de fluorescência é reduzida, uma vez que, a célula mãe divide seu conteúdo fluorescente para as células-filhas. Para esse ensaio, cada linhagem celular foi plaqueada em placa de 12 poços, sendo utilizado 8×10^4 células por poço, em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. As amostras foram incubadas em estufa incubadora úmida com atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C, por 24h. No dia seguinte, as células foram tripsinizadas e submetidas à marcação com 10 μ M de CFSE em 1mL de PBS, por 10 minutos a 37 °C. Em seguida, as amostras receberam 5 volumes de RPMI 10% SFB gelado e foram incubadas no gelo por 10 minutos. Posteriormente, foi realizado duas lavagens com 5mL de PBS e centrifugação a 1.200 rpm por 10 min. Depois, as células foram contadas e 8×10^4 células foram plaqueadas em placas de 12 poços com volume final 1mL por poço. Posteriormente, as células foram colocadas em cultura por 24h e, após esse período, as amostras foram tratadas com a dose IC_{50} de CLN + IBR por 24h e 48h. Por fim, as células foram dissociadas com 300 μ L de accutase (Gibco), ressuspensas em 900 μ L meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB, e lavadas, duas vezes, com PBS gelado em

centrifugação à 1.000 rpm por 5 min. Um total de 10.000 eventos foi adquirido, grupo controle e tratado, no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience). A análise dos dados foi feita pelo software FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC).

3.10. Análise de Ciclo Celular

Com o propósito de avaliar o efeito do tratamento do CLN + IBR sobre o ciclo celular das linhagens de melanoma (MeWo, SK-MEL-28 e WM164), 2×10^5 células foram cultivadas em meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB, em placa de 06 poços. Dado o tempo de confluência, as células foram tratadas com a dose IC_{50} de CLNs + IBR por 24h. No dia seguinte, as células foram dissociadas com 300 μ L de accutase (Gibco), recolhidas com 900 μ L meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB para tubos cônicos de 15mL, lavadas duas vezes com PBS gelado em centrifugação à 2.000 rpm por 5 min. Em seguida, as células foram ressuspensas gota a gota com 5 mL de metanol gelado no vortex e fixadas em gelo por 30 min. Depois da fixação, as amostras foram centrifugadas por 2.000 rpm por 5 min, lavadas com PBS gelado, ressuspensas com 50 μ L da solução de RNase (100 μ g/mL) e incubadas por 15 min em temperatura ambiente. Após a incubação, foi pipetado 400 μ L da solução de PI (50 μ g/mL) e as amostras foram novamente incubadas por 15 min ao abrigo de luz em temperatura ambiente. Por fim, as amostras foram transferidas para tubos de citometria com 500 μ L de PBS e adquiridas no citômetro FACSCalibur (BD Bioscience), sendo 100.000 eventos adquiridos.

3.11. Ensaio Clonogênico

Para avaliar a capacidade clonogênica das linhagens celulares de melanoma, 2×10^5 células foram cultivadas em placas de 6 poços contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com dose IC_{25} da formulação CLN+IBR e incubadas por mais 24

horas. Após esse período, as células foram ressuspensas e 2×10^3 células por poço foram cultivadas em novas placas. Três grupos foram estabelecidos: controle (tratado apenas com meio de cultura), tratamento inicial (tratado com CLN+IBR e posteriormente com meio de cultura) e tratamento contínuo (tratado com CLN+IBR durante todo o experimento). A partir desse dia, o crescimento das células foi acompanhado, sendo esse considerado o primeiro do experimento. No quarto dia de experimento foi feita a troca do meio nas placas, de forma que o grupo controle recebia apenas o meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB e o grupo tratado recebia o meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB mais a dose IC_{25} de corresponde de cada linhagem celular. No sétimo dia, o meio dos poços foi retirado e adicionado paraformaldeído 4%, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, o fixador foi descartado e adicionado cristal violeta 1% e novamente incubado por 30 minutos, seguido da remoção do cristal com lavagem dos poços com PBS para remoção do excesso de corante. Dado esse procedimento, foi feita a análise quantitativa e registro fotográfico das condições experimentais.

3.12. Ensaio de Migração - técnica de “wound scratch assay”

Seguindo o protocolo publicado por LIANG et al., (2007), avaliamos a capacidade migratória das linhagens celulares de melanoma após o tratamento com CLN + IBR. Para isso, 2×10^5 células foram cultivadas em placa de 06 poços, com meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB, até que uma confluência de 80% fosse alcançada. Após, foram realizadas “arranhaduras” no fundo, de cada poço, com o auxílio da ponteira p200. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e ao grupo tratamento foi administrado a dose de IC_{25} do CLN + IBR em meio RPMI1640 suplementado com 3% de SFB. A capacidade migratória das linhagens celulares foi acompanhada por registro fotográfico nos tempos 0h, 24h, 48h, 72h e 96h em uma região delimitada da arranhadura, por uso do

microscópio invertido AE200 em aumento de x100. As imagens da área de migração, dos diferentes tempos do ensaio, foram analisadas no software ImageJ (National Institutes of Health).

3.13. Formação de poros na membrana plasmática

Para avaliar a capacidade do tratamento com CLN+IBR de induzir a formação de poros na membrana plasmática de células de melanoma (MeWo, SK-MEL-28 e WM164), realizamos um ensaio para avaliação da formação de poros na membrana, com uso de PI. As células foram cultivadas em placas de 96 poços com fundo escuro com 7×10^3 células por poço em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após esse período, as células foram tratadas com a dose IC₅₀ de CLN+IBR, e com 3µg/mL de PI. A fluorescência do PI foi monitorada por espectrofluorimetria (Spectramax) por 12 horas, com leituras a cada 30 minutos utilizando excitação em 538 nm e emissão em 617 nm. Um grupo controle, tratado apenas com PI, foi incluído para avaliar a permeabilidade basal das células. Os dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 7.0.

3.14. PCR em tempo real

Foi utilizado a técnica de PCR em tempo real para avaliar a expressão dos genes relacionados aos processos celulares investigados nesse trabalho. Para isso, 2×10^5 células foram cultivadas por 24h em placa de 06 poços, com meio RPMI1640 suplementado com 10% de SFB. Após este período, o grupo tratado foi adicionado da dose IC₅₀ do CLN + IBR cultivado por mais 24h. O RNA das células foi obtido por uso do TRI Reagent (Sigma Aldrich) e quantificado no equipamento Nanodrop One (Thermo Scientific). Em seguida, o DNA complementar (cDNA) foi obtido a partir de 1,5µg de RNA, por uso do High Capacity Reverse Transcription Kit, seguindo as instruções do fabricante (Thermo Fisher). Com o

cDNA das amostras foi feito a PCR em tempo real empregando o SYBR Green (Thermo Fisher) no equipamento QuantStudio 1 (Thermo Fisher). Os genes alvos avaliados foram: *ATM*, *BAX*, *BAK*, *BCL2*, *CDK1*, *CDK2*, *CASP3*, *CASP8*, *CXCR4*, *CXCR7*, *RIP1* primers apresentados na Tabela 01. As reações foram realizadas em duplicatas. A análise relativa da expressão gênica foi obtida pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001; PFAFFL, 2001), após normalização dos dados pela diferença do valor Ct entre os genes alvo e o gene calibrador (*GAPDH*).

3.15. Análise estatística

Os resultados obtidos neste estudo foram analisados quantitativamente. Cada ensaio foi realizado em triplicata, sendo as análises estatísticas feitas utilizando o software Prism 7 (GraphPad Software). A normalização dos dados foi feita pelo teste Shapiro-Wilk. O teste T foi empregado para comparações numéricas entre dois grupos não pareados. Enquanto, para a comparação entre três ou mais grupos foi realizado o teste ANOVA. Resultados que apresentaram limiar de diferença entre os grupos com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Para fins de interpretação dos níveis de significância foi adotado * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

Tabela 1. Genes e sequência dos primers utilizados neste estudo para avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.

Gene	Sequência (5' – 3')
ATM	<i>foward</i> GCACAGAAGTGCCTCCAATTC <i>reverse</i> ACATTCTGGCACGCTTTGG
BAK	<i>foward</i> GTTTTCCGCAGCTACGTTTTT <i>reverse</i> GCAGAGGTAAGGTGACCATCTC
BAX	<i>foward</i> CAGACCGTGACCATCTTTGT <i>reverse</i> GCCTCAGCCCATCTTCTTC
BCL2	<i>foward</i> CAAAGCTGCAGGCTGTTTAAG <i>reverse</i> GTCTGTCTGTGTGTGTGATGT
CASP3	<i>foward</i> CTAGCGGATGGGTGCTATTG <i>reverse</i> GATACACAGCCACAGGTATGAG
CASP8	<i>foward</i> GGATGGCCACTGTGAATAACTG <i>reverse</i> TCGAGGACATCGCTCTCTCA
CXCR4	<i>foward</i> CATCCTCATCCTGGCTTTCTT <i>reverse</i> CACACCCTTGCTTGATGATTTC
CXCR7	<i>foward</i> GTGGTGGTCTGGGTGAATATC <i>reverse</i> ATGTAGCAGTGCGTGTTCATAG
CDK1	<i>foward</i> CTTGGCTTCAAAGCTGGCTC <i>reverse</i> GGGTATGGTAGATCCCGGCT
CDK2	<i>foward</i> CCAGGAGTTACTTCTATGCCTGA <i>reverse</i> TTCATCCAGGGGAGGTACAAC
GAPDH	<i>foward</i> TCAACGACCACTTTGTCAAGCTCAGCT <i>reverse</i> GGTGGTCCAGGGGTCTTAC
RIPK1	<i>foward</i> TTACATGGAAAAGGCGTGATACA <i>reverse</i> AGGTCTGCGATCTTAATGTGGA
RIPK3	<i>foward</i> CTGAGTGGCTAAACAAACTGAATC <i>reverse</i> AGGTAGGGCGCATCTG

4. RESULTADOS

4.1 CLN + IBR reduz a viabilidade celular das linhagens MeWo, SK-MEL-28, WM164 e HFF-1

A viabilidade das linhagens celulares MeWo, SK-MEL-28 e WM164 foi avaliada após tratamento com IBR isolado, CLN vazia e a combinação de ambos (CLN +IBR), utilizando o ensaio MTT conforme apresentado na Figura 4. Observou-se que o IBR induziu toxicidade na linhagem MeWo a partir de 25 μ M ($p = 0,021$), enquanto a CLN apresentou efeito tóxico a partir de 1 μ M ($p < 0,0001$). A combinação CLN+IBR potencializou esse efeito, com toxicidade a partir de 1 μ M ($p < 0,0001$) e redução na viabilidade celular. Na linhagem SK-MEL-28, o IBR foi tóxico a partir de 25 μ M ($p = 0,033$), a CLN a partir de 5 μ M ($p = 0,0008$) e CLN+IBR a partir de 2 μ M ($p = 0,0409$). Na linhagem WM164, o IBR mostrou toxicidade a partir de 25 μ M ($p = 0,0082$), a CLN a partir de 1 μ M ($p < 0,0001$) e CLN+IBR também a partir de 1 μ M ($p < 0,0301$). Embora o valor de p para CLN+IBR na linhagem WM164 não tenha sido tão significativo, a análise dos dados de viabilidade nas doses de 25 μ M, 50 μ M e 100 μ M indicou maior eficácia da CLN+IBR em reduzir a viabilidade celular. Além disso, conforme indicado na Tabela 2, a combinação de Ibrutinibe com CLN apresentou menor dose inibitória (IC_{50}) nas três linhagens de melanoma testadas, indicando maior potência em relação ao fármaco livre.

A avaliação da toxicidade em fibroblastos humanos revelou que todas as formulações testadas foram tóxicas. Observamos que a combinação CLN + IBR apresentou a menor dose inibitória (8,4 μ M), seguida pela formulação com CLN (10,08 μ M) e, por fim, o Ibrutinibe isolado (58,64 μ M).

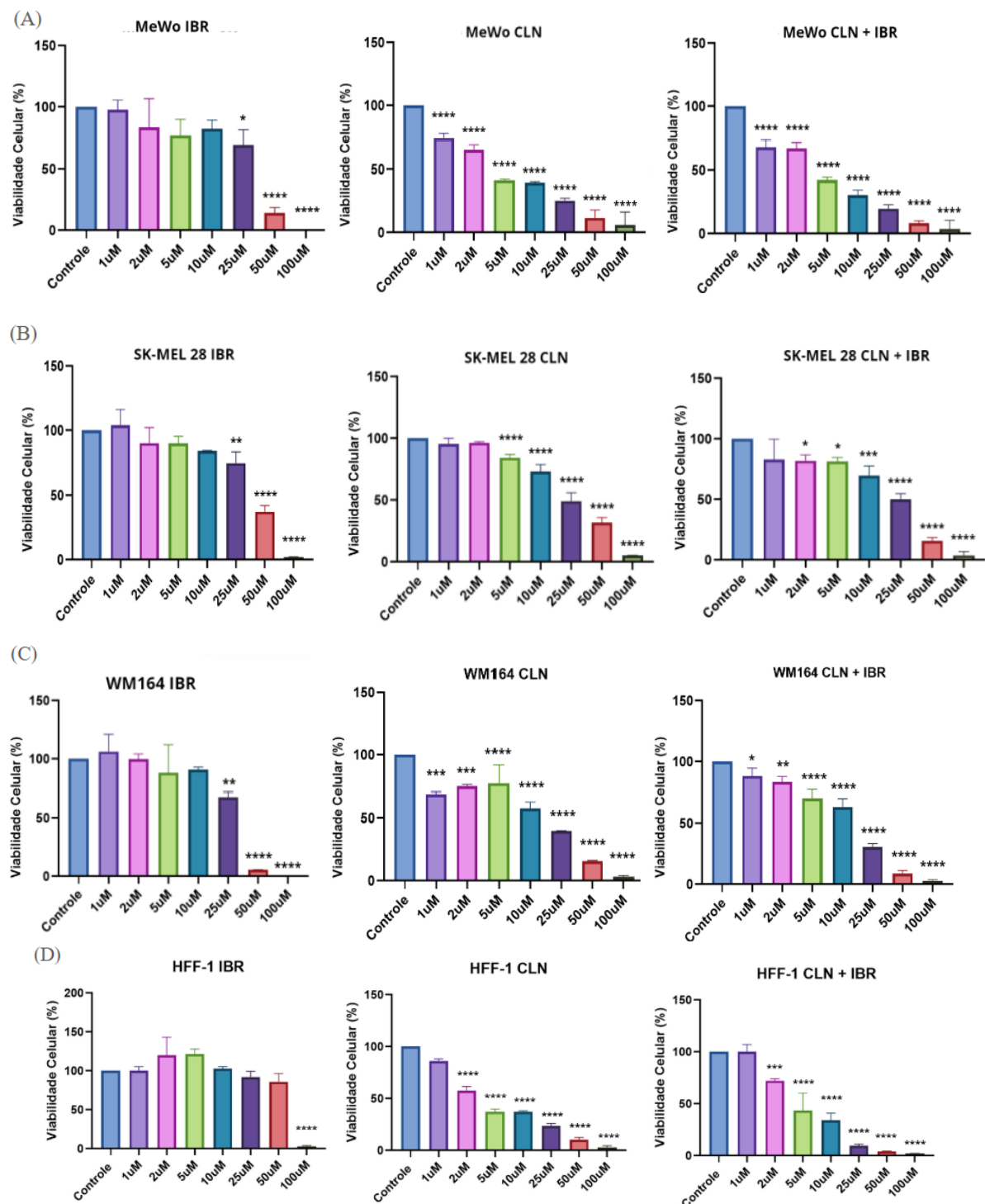


Figura 4. Viabilidade celular na linhagem MeWo, SK - MEL28 e WM164 . Avaliação da viabilidade celular nas linhagens MeWo (A), SK-MEL28 (B), WM164 (C) e HFF-1 (D) em concentrações crescentes utilizando Ibrutinibe (IBR), CLN isolado e CLN com Ibrutinibe (CLN+IBR) por 24h. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. Os resultados foram analisados pelo teste ANOVA. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

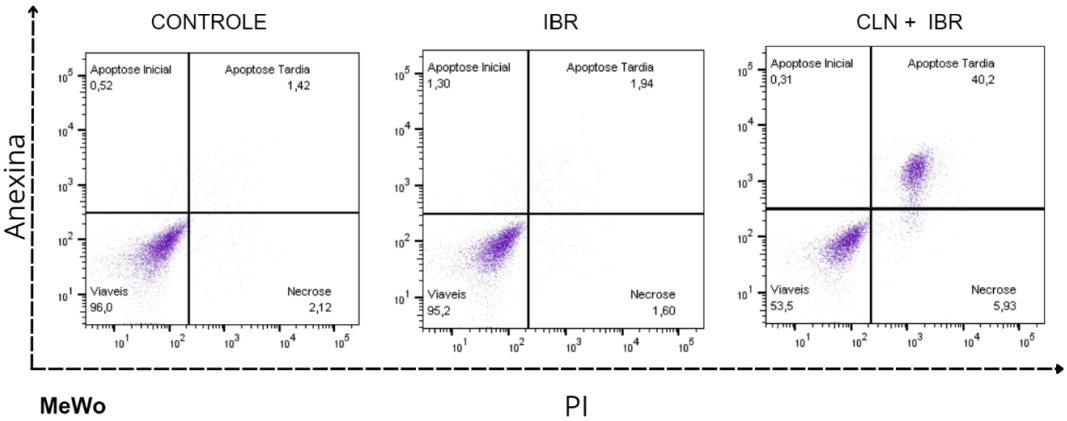
Tabela 2. Dose IC₅₀ necessária de cada tratamento utilizado nas linhagens celulares estudadas.

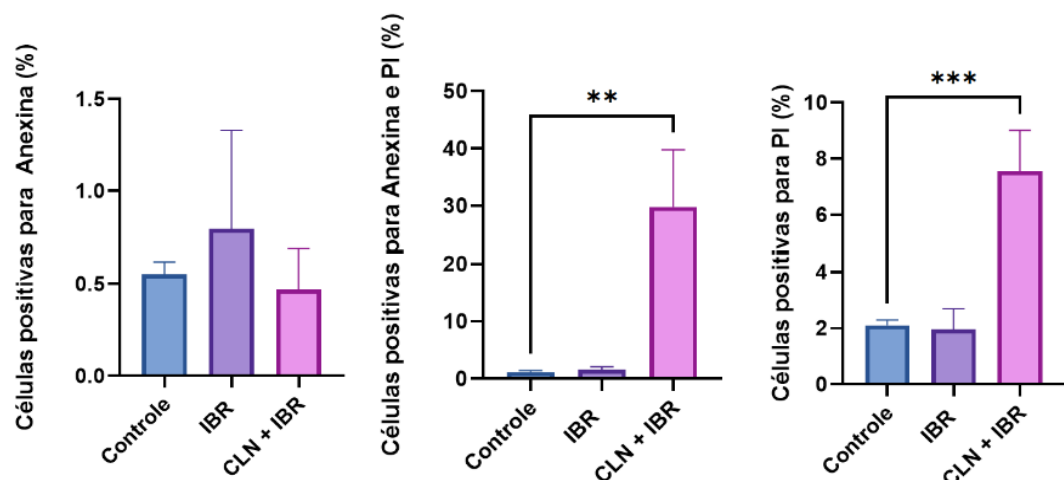
Tratamento	MeWo	SK-MEL-28	WM164	HFF-1
IBR	35,72µM	96,45µM	29,76µM	58,64µM
CLN	7,54µM	82,19µM	27,68µM	8,44µM
CLN + IBR	6,3µM	29,52µM	18,26µM	10,08µM

4.2 CLN + IBR induz morte celular nas linhagens de melanoma

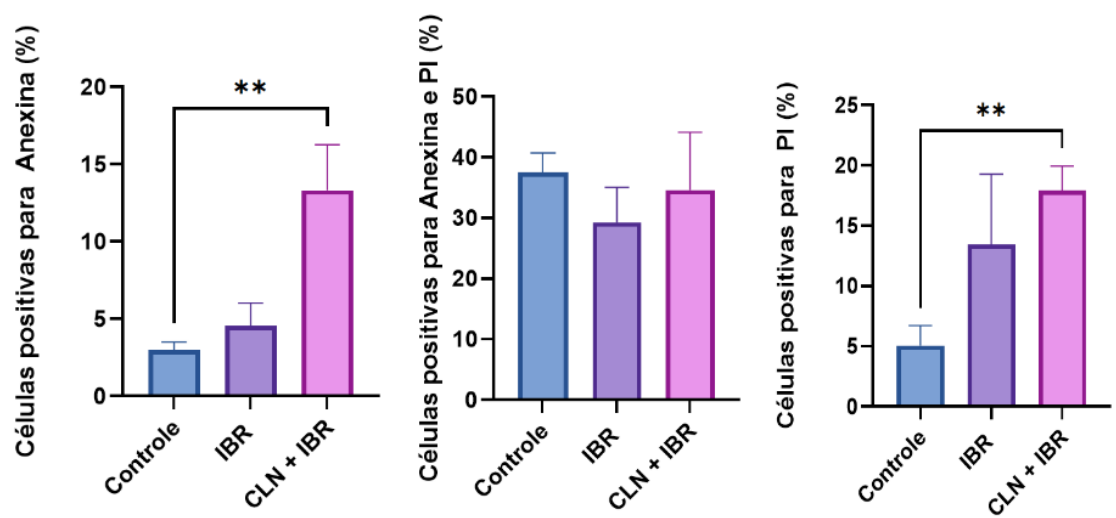
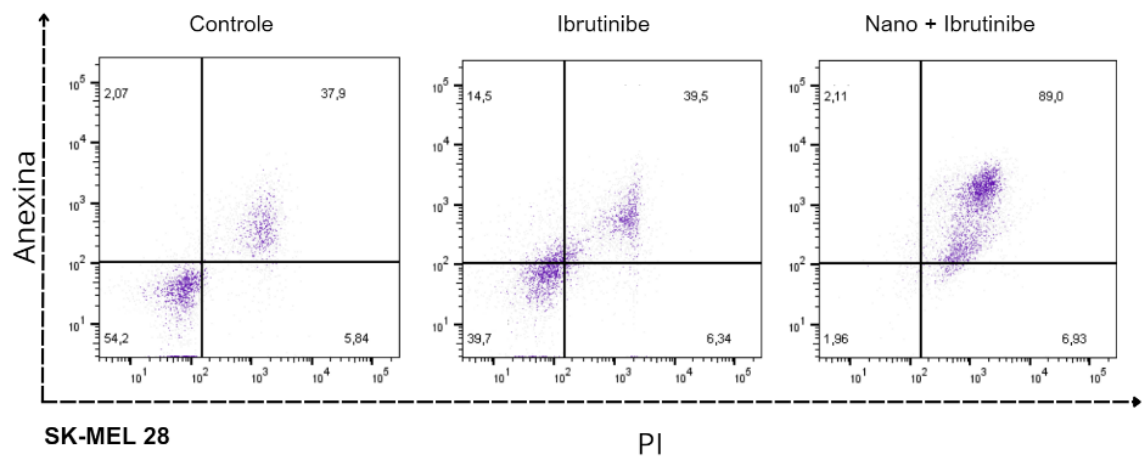
No intuito de avaliar qual tipo de morte celular foi induzida pelo tratamento CLN + IBR, foi realizado um ensaio por citometria de fluxo com os marcadores Anexina-V e PI nas linhagens de melanoma MeWo, SK-MEL28 e WM164. Os resultados demonstraram um aumento significativo na permeabilização da membrana plasmática, evidenciado pelo aumento da positividade para PI em todas as linhagens tratadas com CLN+IBR (MeWo: p=0,0008; SK-MEL-28: p=0,0098; WM164: p=0,0492), efeito não observado com o tratamento com IBR isolado. Além disso, a combinação CLN+IBR induziu apoptose de forma mais eficiente, com aumento significativo na porcentagem de células em apoptose tardia nas linhagens MeWo (p=0,0016) (Figura 5A) e WM164 (p=0,0009) e em apoptose inicial nas linhagens SK-MEL-28 (p=0,0011) (Figura 5B) e WM164 (p=0,0027) (Figura 5C).

5. (A)





(B)



(C)

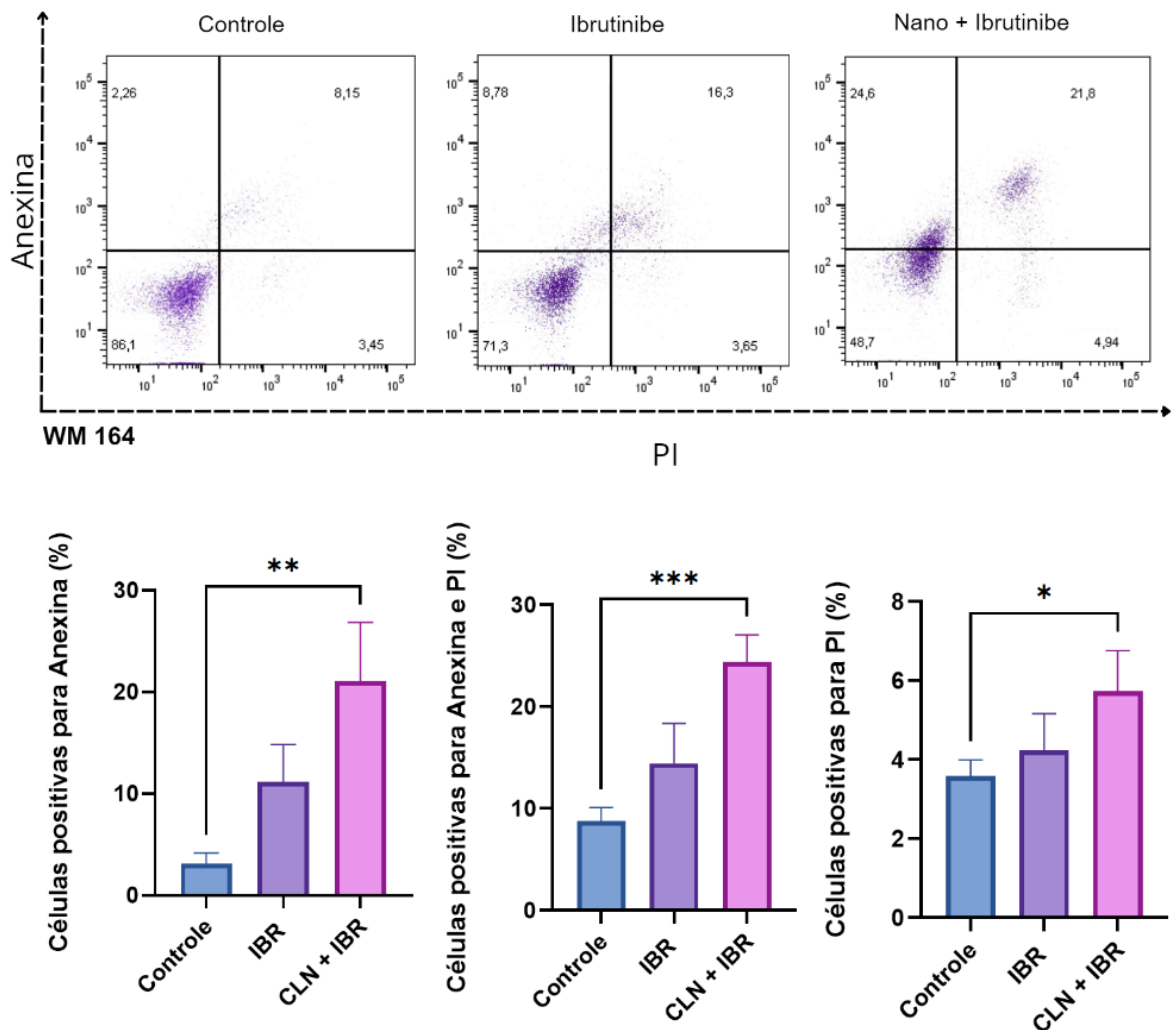
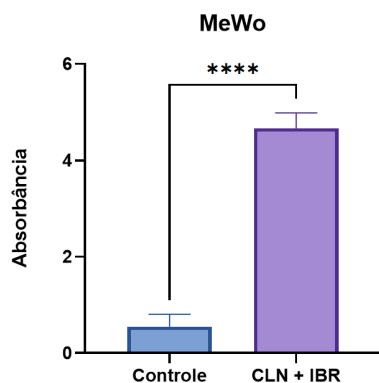


Figura 5. CLN + IBR induz morte celular em linhagens de melanoma. A análise por citometria de fluxo, utilizando os marcadores Annexina-V e PI, revela que o tratamento com a combinação de CLN+IBR por 24 horas promove um aumento significativo na morte celular em comparação ao tratamento com IBR isolado nas linhagens celulares MeWo (A), SK-MEL-28 (B) e WM164 (C). Os dados foram analisados por ANOVA. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

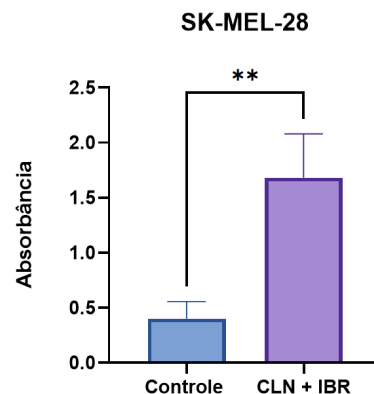
4.3 Liberação de LDH após tratamento com CLN + IBR

A liberação de LDH foi quantificada nas células MeWo, SK-MEL-28 e WM164 após o tratamento com a dose IC_{50} do CLN + IBR. Como pode ser visto na Figura 6, um aumento significativo de LDH foi identificado no sobrenadante do grupo tratado nas linhagens MeWo ($p < 0,001$), SK-MEL 28 ($p < 0,0065$) e WM164 ($p < 0,003$), comparado as células não tratadas.

6. A.



B.



C.

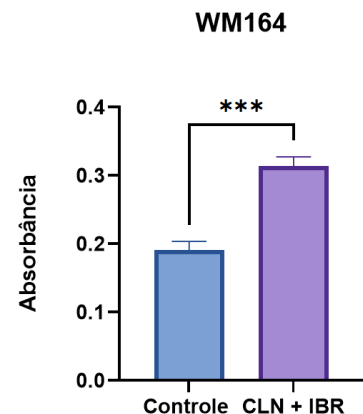
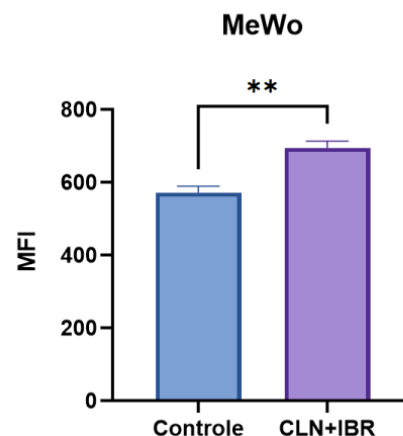
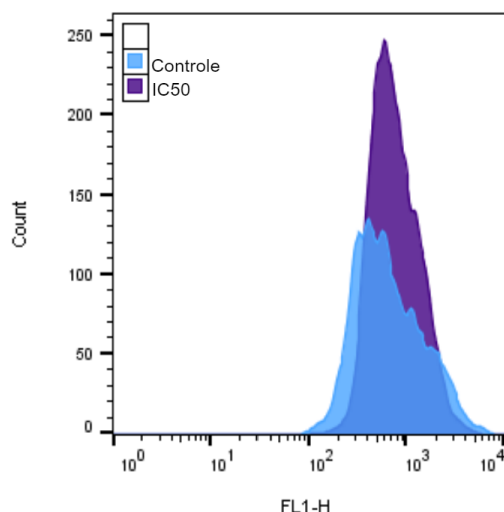


Figura 6. CLN + IBR induz liberação de LDH nas linhagens de melanoma. A dosagem de lactato desidrogenase (LDH) foi realizada utilizando o kit CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay (Invitrogen). Nos grupos tratados com a dose IC_{50} do CLN + IBR, nas linhagens MeWo (A), SK-MEL-28 (B) e WM164 (C) houve aumento significativo da liberação de LDH. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. Os resultados foram analisados por teste T. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

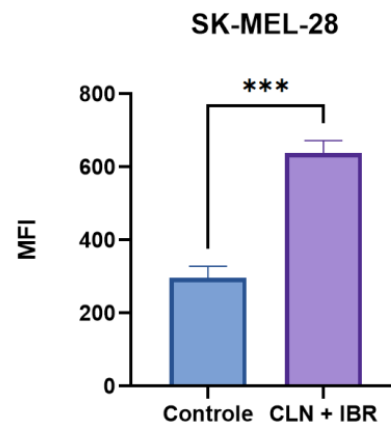
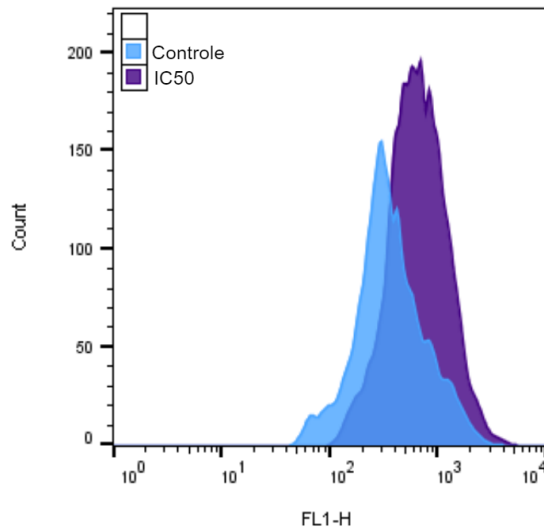
4.4 CLN + IBR induz a geração de EROs em células de melanoma

Para investigar o envolvimento das EROs na morte celular induzida com a dose IC_{50} do CLN + IBR, utilizamos o corante fluorescente CellROX Green e quantificamos a produção de EROs por citometria de fluxo. Os resultados obtidos demonstraram um aumento significativo na intensidade de fluorescência nas linhagens de melanoma MeWo ($p=0,0012$), SK-MEL-28 ($p=0,0002$), e WM164 ($p=0,0096$) tratadas com a dose IC_{50} em comparação ao grupo controle, indicando aumento na produção de EROs pelas células (Figura 7 A, B e C).

7. A.



B.



C.

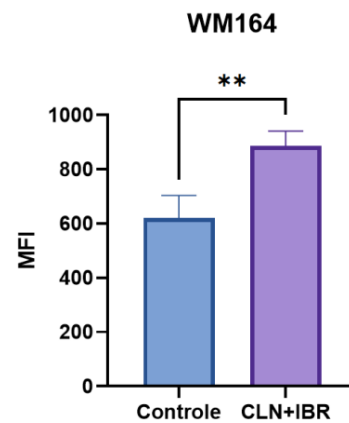
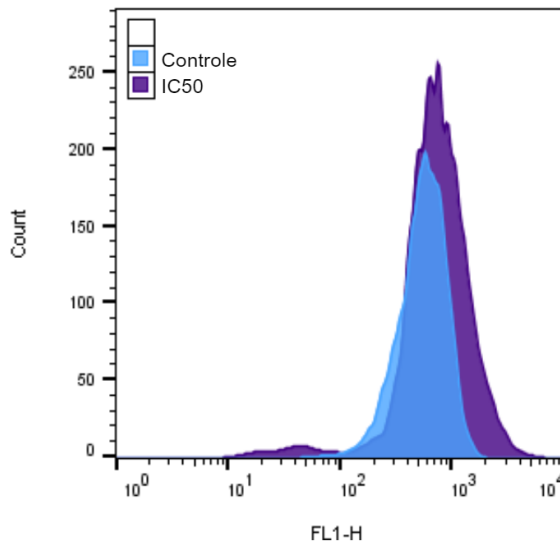


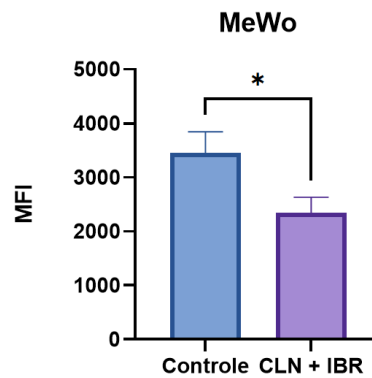
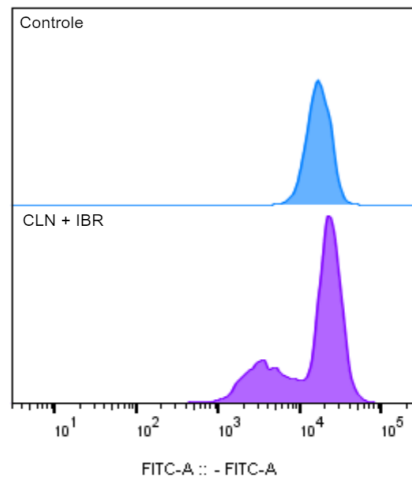
Figura 7. Tratamento com a dose IC₅₀ do CLN + IBR gera estresse oxidativo nas células de melanoma. Houve um aumento significativo na intensidade média de fluorescência, indicando um incremento na produção de EROs nas três linhagens celulares MeWo (A), SK-MEL-128 (B) e WM164 (C) em comparação ao grupo controle. Resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ desvio padrão. Os resultados foram analisados por teste T. ** p<0,01 e *** p<0,001.

4.5 Análise do potencial de membrana mitocondrial

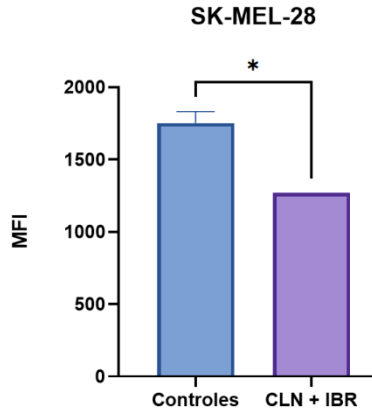
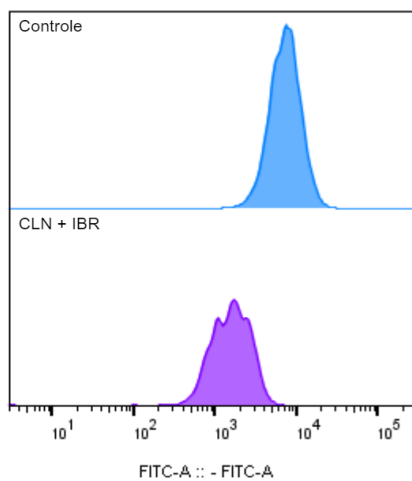
Avaliou-se o efeito do tratamento com a dose IC₅₀ do CLN + IBR sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das linhagens de melanoma, utilizando a sonda fluorescente rodamina 123. Observou-se uma redução significativa no $\Delta\Psi_m$ em todas as linhagens tratadas

quando comparadas ao grupo controle (Figura 8). A despolarização mitocondrial foi mais pronunciada na linhagem WM164 ($p < 0,0001$), seguida por MeWo ($p = 0,0164$) e SK-MEL-28 ($p = 0,0336$). Esses resultados indicam uma despolarização da membrana mitocondrial, sugerindo que o tratamento induz a permeabilização da membrana mitocondrial.

8. A



B.



C.

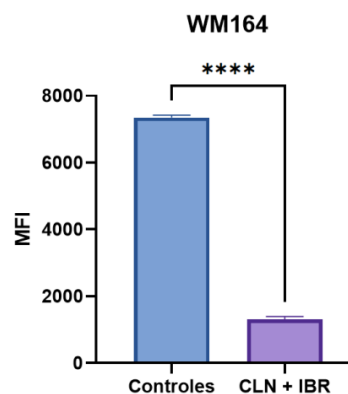
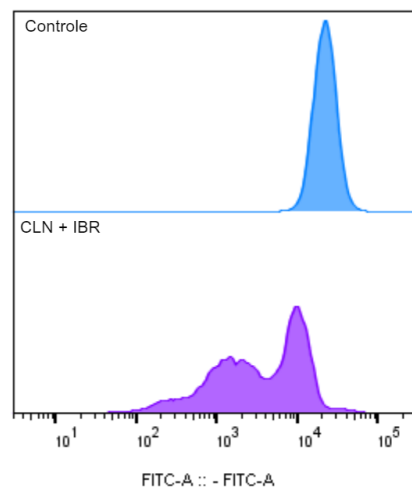
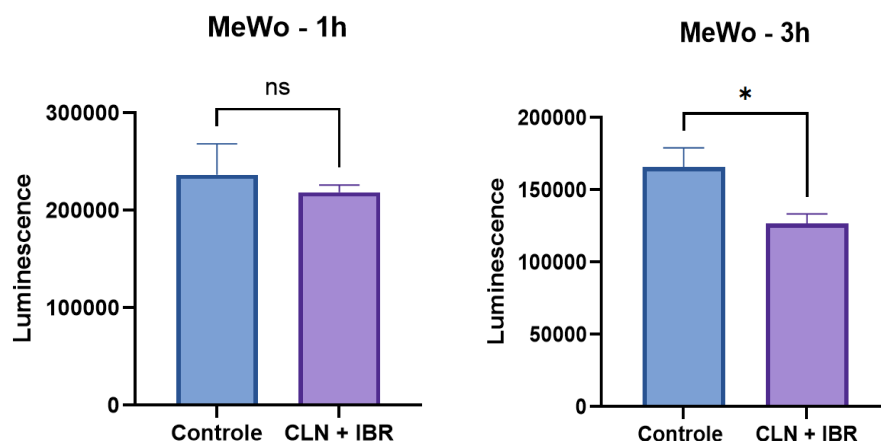


Figura 8. CLN+ IBR gera perda do potencial de membrana mitocondrial. Apresentação dos gráficos com a média de intensidade de fluorescência e gráficos em barra que demonstram uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial após o uso do IC₅₀ de CLN + IBR nas linhagens MeWo (A), SK-MEL-128 (B) e WM164 (C). Os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. Os resultados foram analisados por teste T. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; e **** $p < 0,0001$.

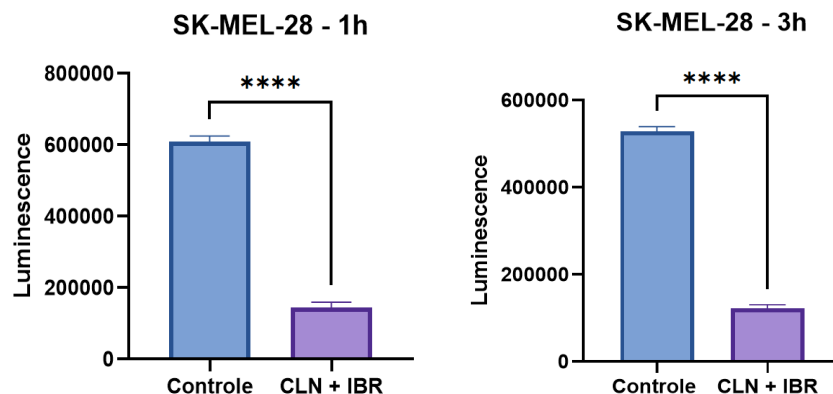
4.6 Atividade das caspases 3/7 nas linhagens de melanoma

Com objetivo de detalhar a morte celular observada no ensaio de Anexina-V/PI, foi analisado a atividade das caspases 3/7 nas linhagens de melanoma. Houve uma diminuição significativa da atividade das enzimas nos grupos tratados com a dose IC₅₀ de CLN + IBR quando comparado ao grupo controle. Tal redução não teve diferença estatística na linhagem de MeWo dosada após 1h, porém foi observada uma redução de $p < 0,0106$ na mesma linhagem após 3 horas (Figura 9A), já nas linhagens de SK-MEL28 e WM164 teve redução em ambos os tempos dosagem com $p < 0,0001$ em ambas as células (Figura 9B e C). Em conjunto, esses achados demonstram que a morte celular observada não envolve a ativação das caspases 3/7.

9. A.



B.



C.

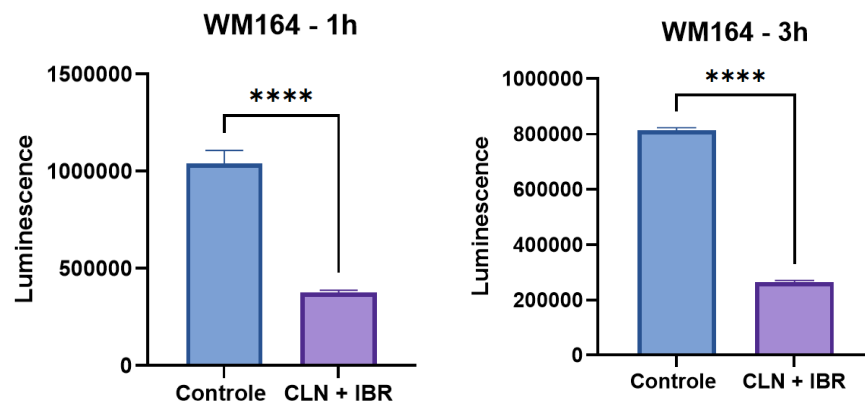


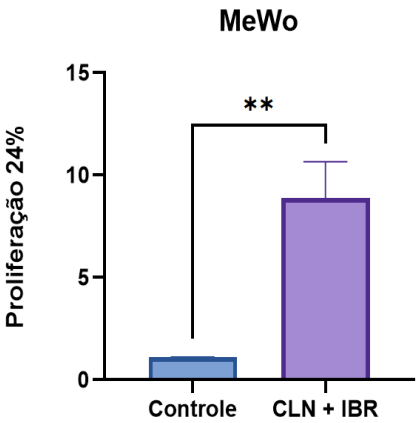
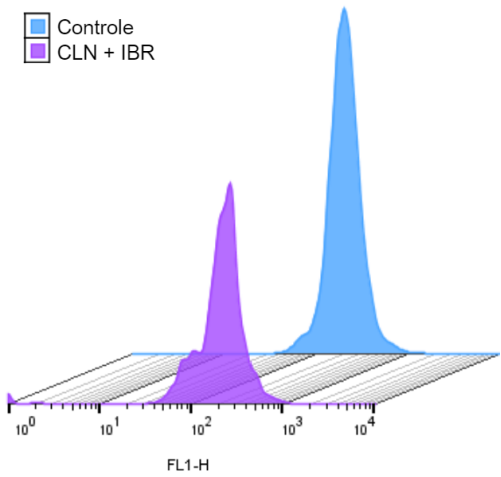
Figura 9. Atividade das caspases 3/7 nas linhagens de melanoma. Diminuição das caspases 3/7 nos tratados com dose de IC_{50} do CLN + IBR por 24h. A linhagem MeWo (A) só teve diminuição significativa na dosagem de 3h, enquanto SK-MEL-28 (B) e WM164 (C) houve diminuição significativa nos tempos de 1h e 3h. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. Os resultados foram analisados por teste T.* significa $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$.

4.7. Análise da proliferação celular após tratamento com CLN + IBR

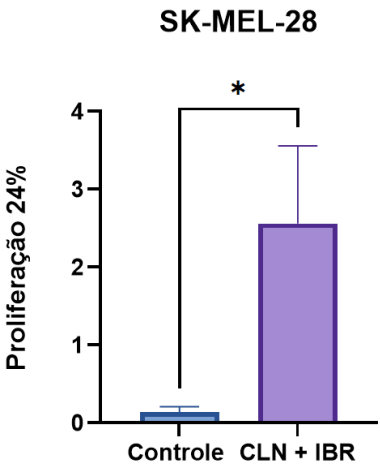
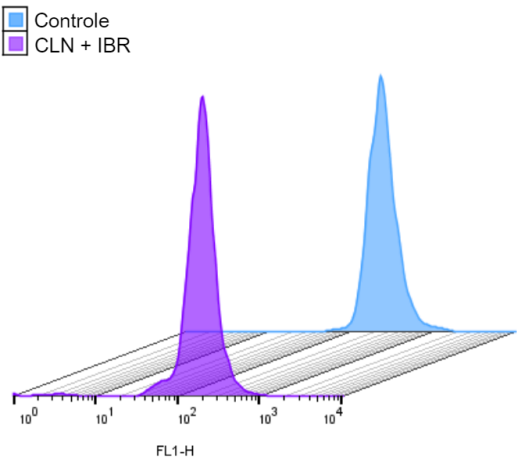
Para investigar o efeito da dose IC_{50} de CLN+IBR na proliferação celular, realizamos ensaios de citometria de fluxo utilizando o marcador CFSE nas linhagens de melanoma MeWo, SK-MEL-28 e WM164. Após 24 de tratamento, observamos uma tendência de aumento na intensidade de fluorescência nas células tratadas em comparação com o grupo controle. Indicando um ligeiro aumento proliferação celular nas linhagens MeWo e

SK-MEL-28 ($p=0,0016$ e $p=0,0135$, respectivamente). No entanto, não observamos diferença significativa na linhagem WM164.

10 A.



B.



C.

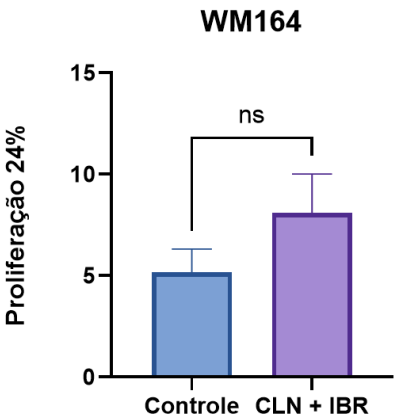
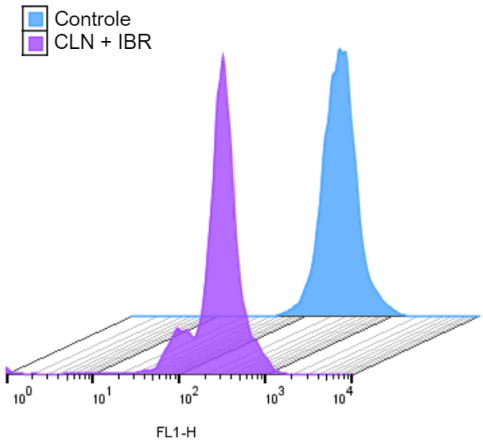
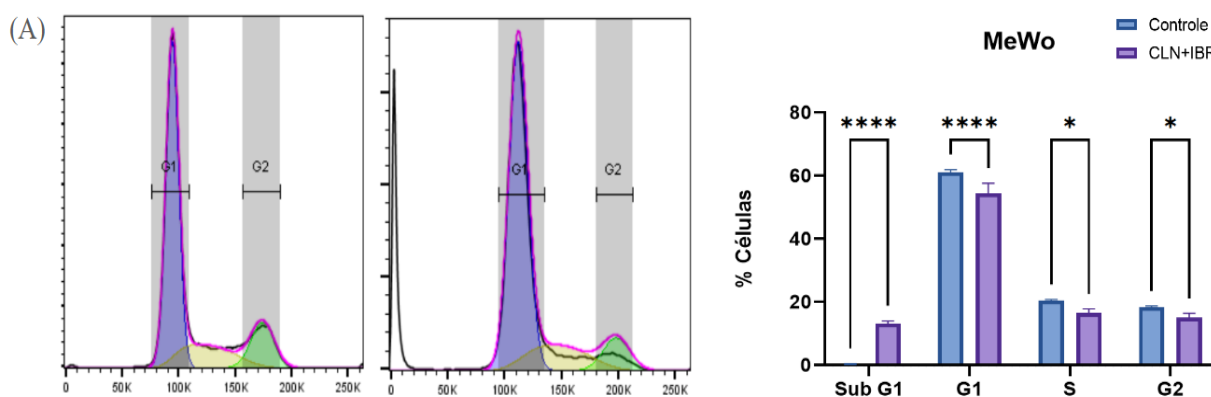


Figura 10. Análise da proliferação celular. A análise por citometria de fluxo da intensidade de fluorescência do CFSE não revelou diferença significativa na proliferação celular das linhagens de melanoma MeWo, SK-MEL-28 e WM164 tratadas com a dose IC₅₀ de CLN+IBR por 24 horas. No entanto, após 48 horas de tratamento, observamos uma redução significativa na proliferação celular, como demonstrado nos gráficos de barras e histogramas (Figuras 10A-C). Os dados foram representados utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA. *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

4.8. Tratamento com dose IC₅₀ do CLN + IBR induz a um aumento de células na fase sub-G1 do ciclo celular

Para elucidar o efeito do CLN + IBR sobre o ciclo celular em células de melanoma, as linhagens MeWo, SK-MEL-28 e WM164 foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. Conforme demonstrado na Figura 11 (A, B e C), o tratamento provocou um aumento da porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo celular nas três linhagens, sendo MeWo e SK-MEL-28 $p < 0,0001$ e WM164 $p = 0,022$. Essa aumento de células na fase sub-G1 gerou consequente redução no número de células nas fases S, MeWo ($p = 0,0131$), SK-MEL-28 ($p = 0,008$) e WM164 ($p = 0,0421$) e G2/M, MeWo ($p = 0,0403$), SK-MEL-28 ($p = 0,0023$) e WM164 ($p = 0,0038$). Esse aumento da população de células em sub-G1 ($p < 0,0001$) nas três linhagens estudadas, indica a ocorrência de morte celular por danos ao DNA.

11.



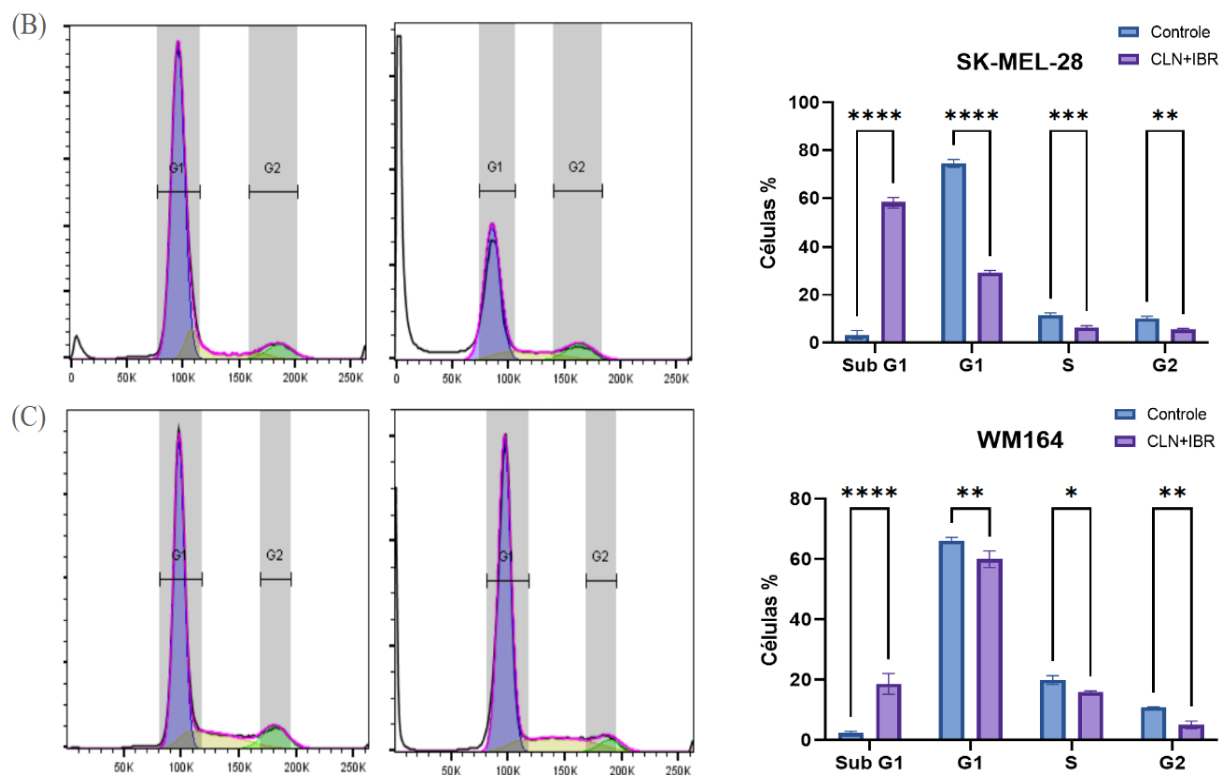
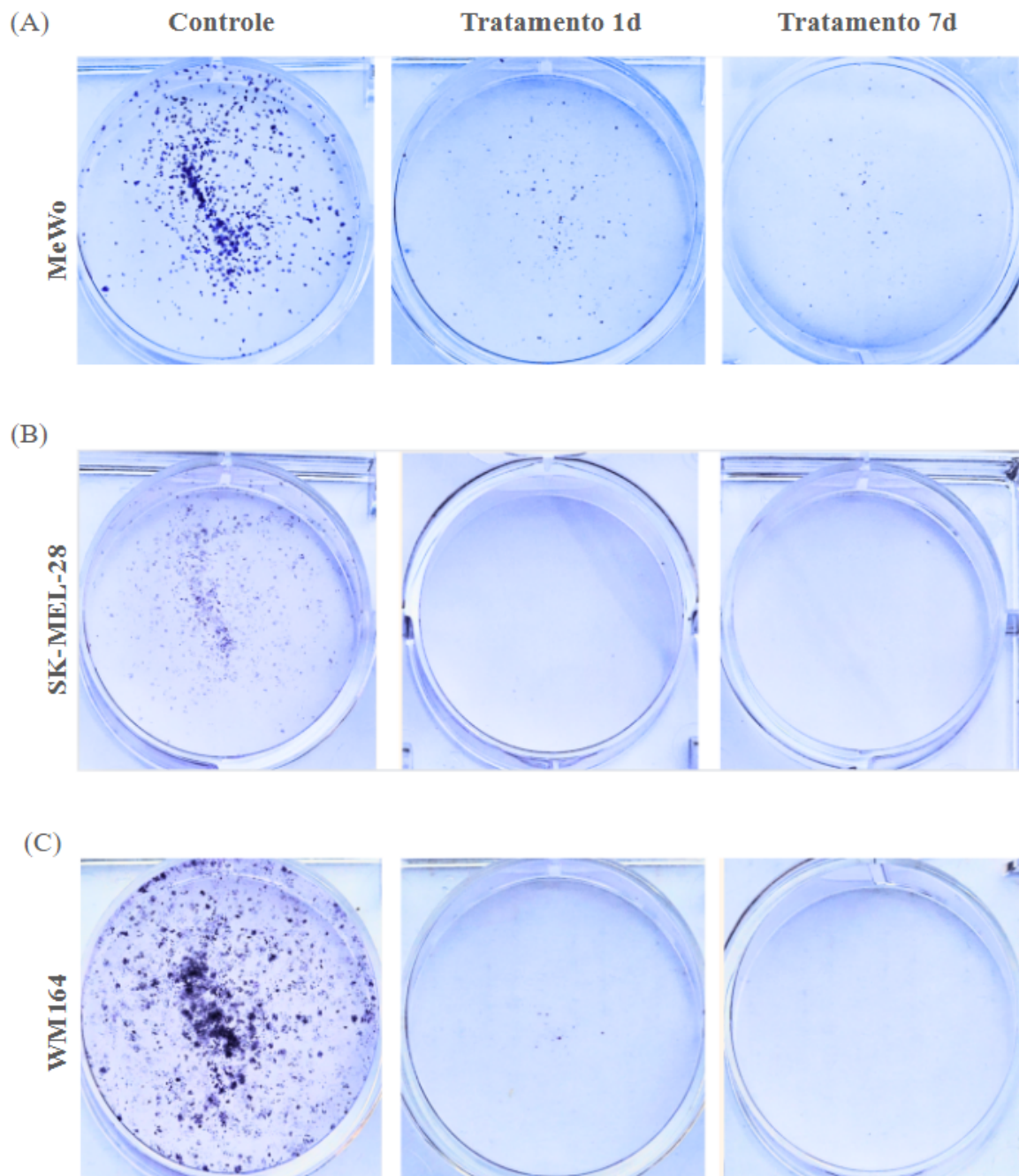


Figura 11. Bloqueio do ciclo celular. Os gráficos da análise por citometria de fluxo mostrou bloqueio do ciclo celular nas linhagens de melanoma MeWo (A) e SK-MEL-28 (B). Em paralelo a isso, observou se aumento expressivo de células na fase Sub G1 nas três linhagens estudadas ($p < 0,0001$). Os dados obtidos após análise por ANOVA. * significa $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$.

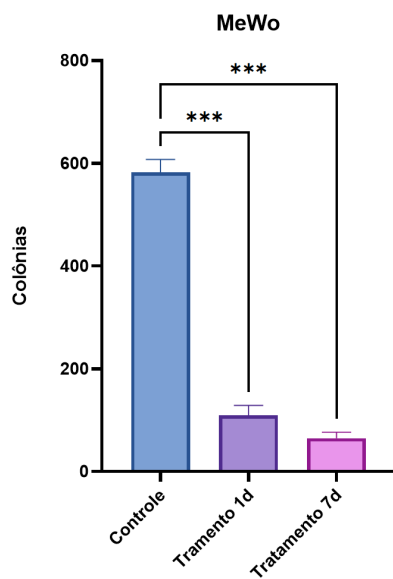
4.9 CLN + IBR impede unidades formadoras de colônia nas três linhagens avaliadas

Na avaliação clonogênica, observamos que o tratamento com a dose IC_{25} do CLN + IBR resultou em uma inibição significativa da formação de colônias, conforme apresentado na Figura 12, sendo MeWo ($p < 0,0001$ e $p < 0,0002$), SK-MEL ($p < 0,0001$) e WM164 ($p < 0,0001$ e $p < 0,0004$), na linhagem SK-MEL28, a redução foi tão acentuada que não foi possível observar colônias na placa após o tratamento.

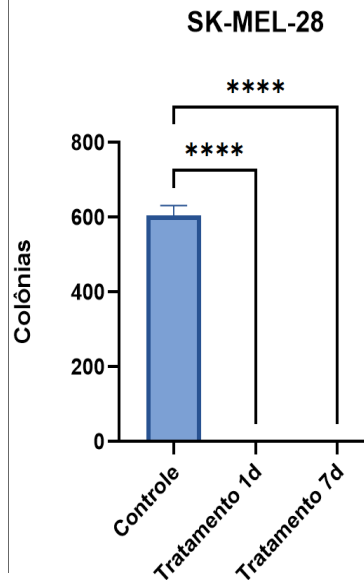
12.



D.



E.



F.

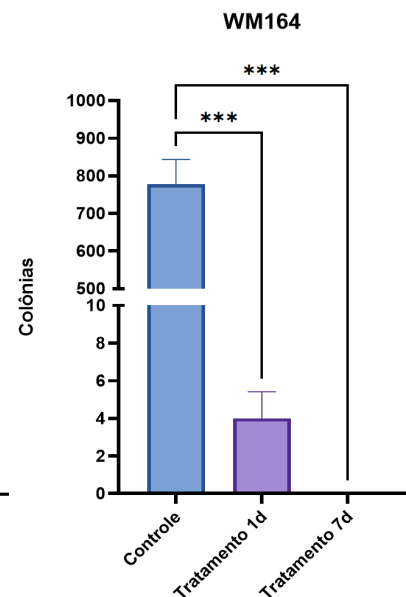
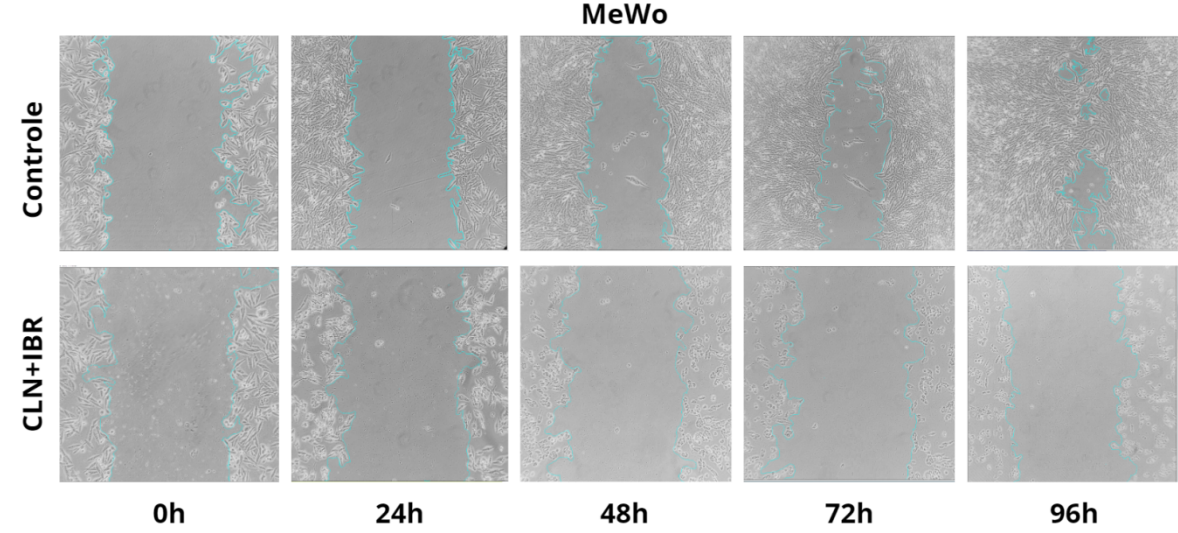


Figura 12. CLN + IBR impede a formação de colônias. Inibição da formação de colônias em grupos tratados com dose IC_{25} da CLN + IBR por 1 e 7 dias. Colônias das linhagens MeWo (A), SK-MEL-28 (B) e WM164 (C). Gráfico da contagem das colônias nas linhagens MeWo (D), SK-MEL (E) e WM164 (F). Os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão. Os resultados foram analisados por ANOVA.*** significa $p < 0,001$.

4.10. Migração celular é inibida após tratamento com dose IC_{50} de CLN + IBR

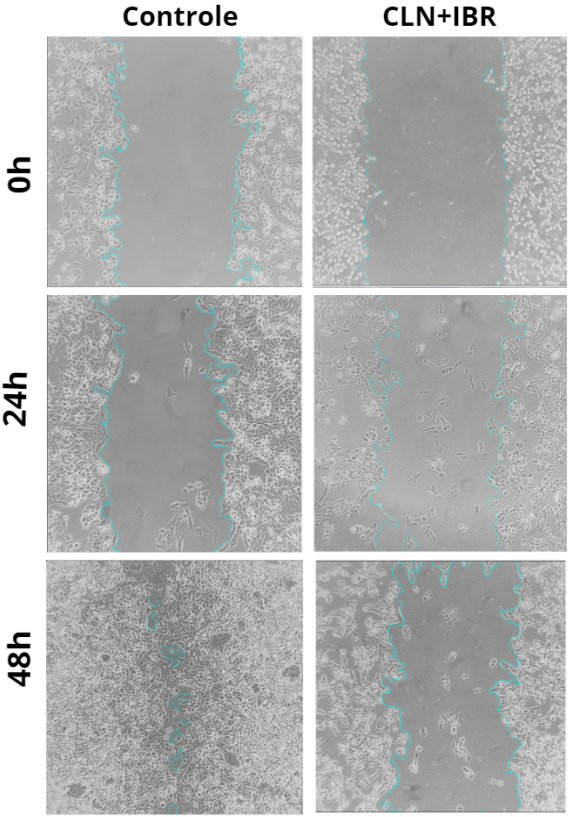
Para avaliar o impacto do tratamento com dose IC_{25} do CLN + IBR na capacidade migratória das células, foi realizado um ensaio de migração utilizando a técnica de “*wound scratch assay*”. Esse método permitiu quantificar a área livre das feridas. Nos três tipos de linhagens estudadas (MeWo, SK-MEL-28 e WM164), observou-se que o tratamento inibe a migração celular quando comparada ao grupo controle, sendo essa diferença de $p < 0,0001$ nas três linhagens estudadas (Figura 13 A-F).

13. A.



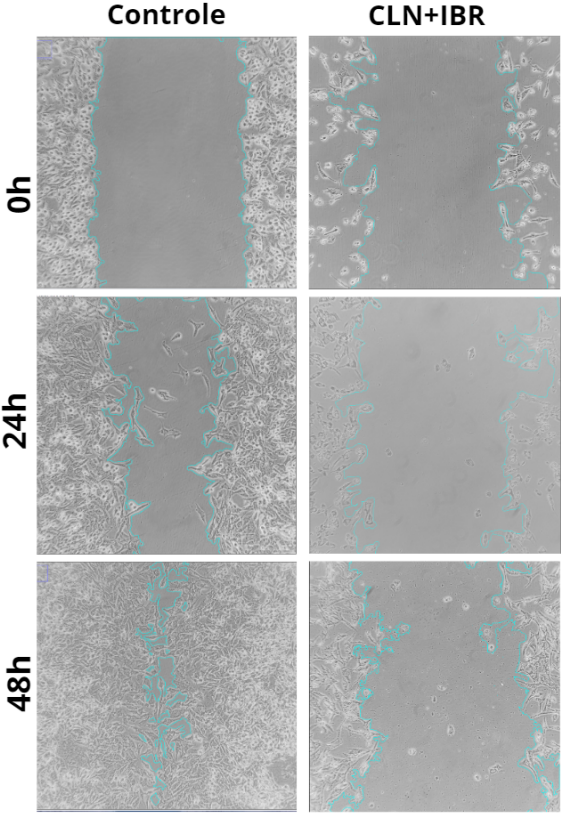
B.

SK-MEL-28

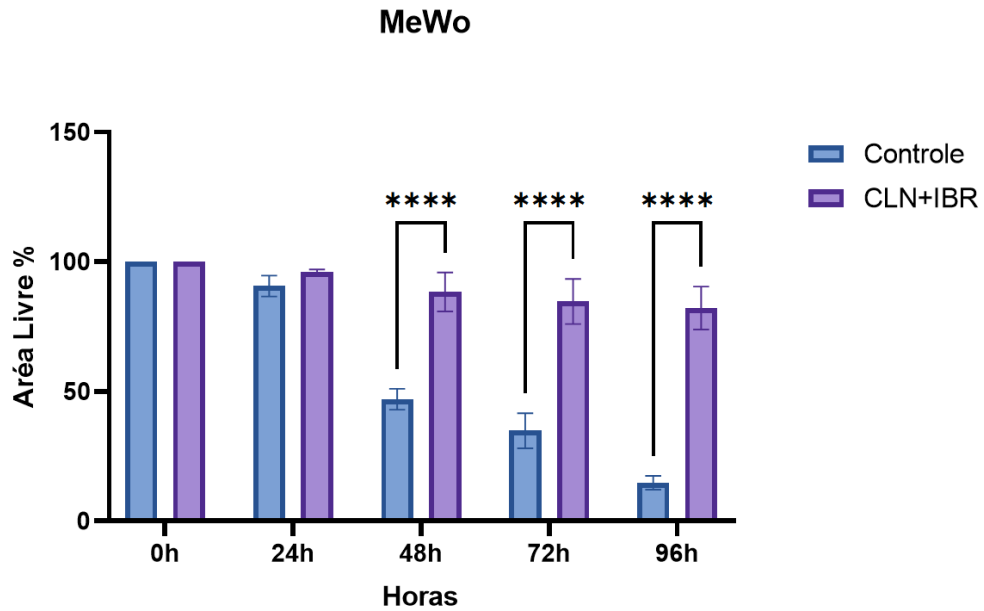


C.

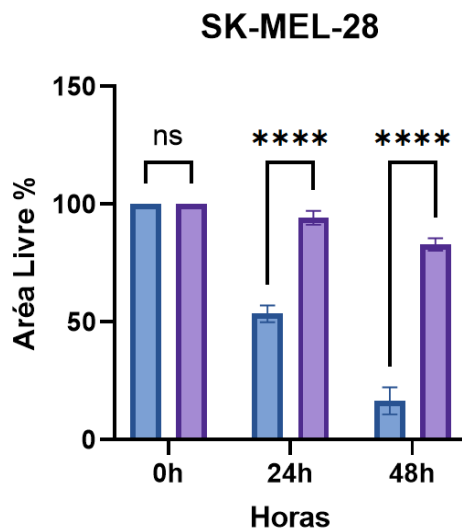
WM164



D.



E.



F.

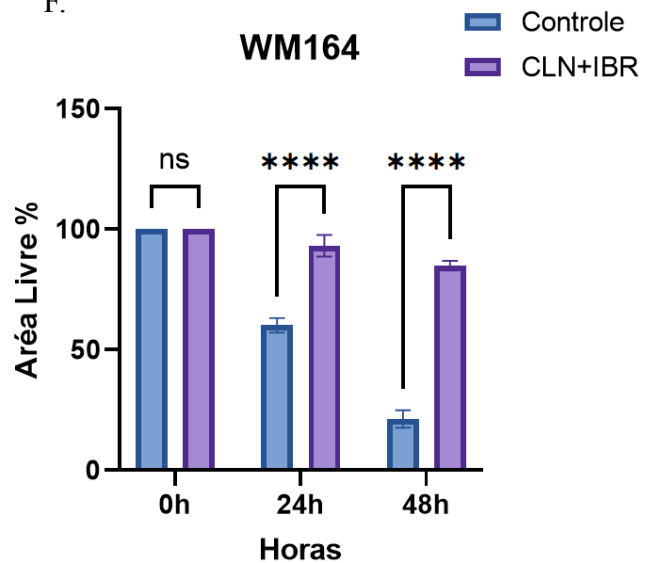
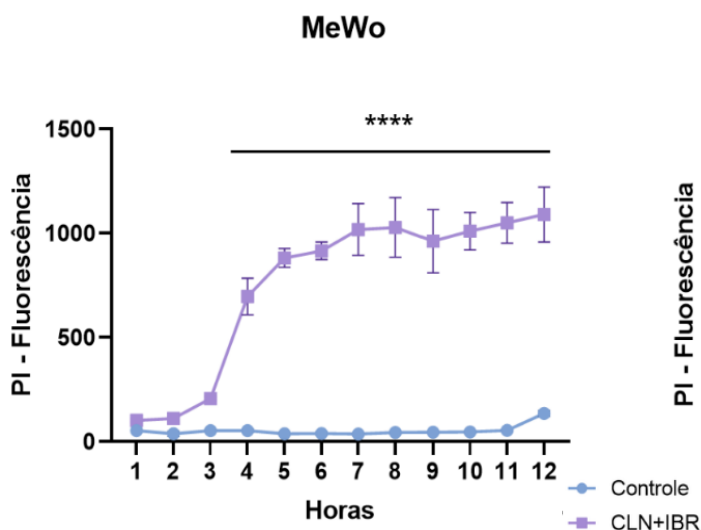


Figura 13. Migração celular é inibida após tratamento com dose IC_{25} de CLN + IBR . Inibição da migração celular em grupos tratados com dose IC_{25} de CLN + IBR por 24h. Após o tratamento, as culturas de células foram acompanhadas no intuito de avaliar a capacidade migratória. A linhagem MeWo (A) com o crescimento de 96h para o fechamento da placa, as linhagens SK-MEL (B) e WM (C) teve o crescimento de 48h. Os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão teste ANOVA. **** significa $p < 0,0001$.

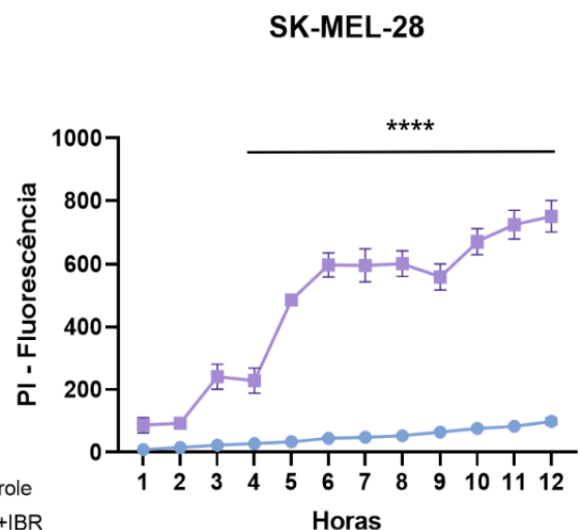
4.11. Tratamento com dose IC₅₀ de CLN + IBR induz a formação de poros na membrana plasmática das células de melanoma.

No intuito de avaliar se o tratamento com dose IC₅₀ do CLN + IBR induz a formação de poros na membrana plasmática nas linhagens celulares estudadas, realizamos um ensaio de formação de poros utilizando PI. O PI é uma substância fluorescente que se intercala ao DNA de células com a membrana plasmática comprometida. Observamos um aumento significativo na fluorescência do PI em todas as linhagens celulares a partir de 4 horas de tratamento, indicando a formação de poros na membrana. A diferença foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) para as linhagens MeWo e SK-MEL-28, e para a linhagem WM164 a partir de 5 horas ($p < 0,0001$). A Figura 14 (A, B e C) mostra o aumento gradual da fluorescência do PI ao longo do tempo em todas as linhagens, corroborando a hipótese de que o tratamento com CLN+IBR induz a formação de poros na membrana plasmática das células de melanoma.

14. A.



B.



C.

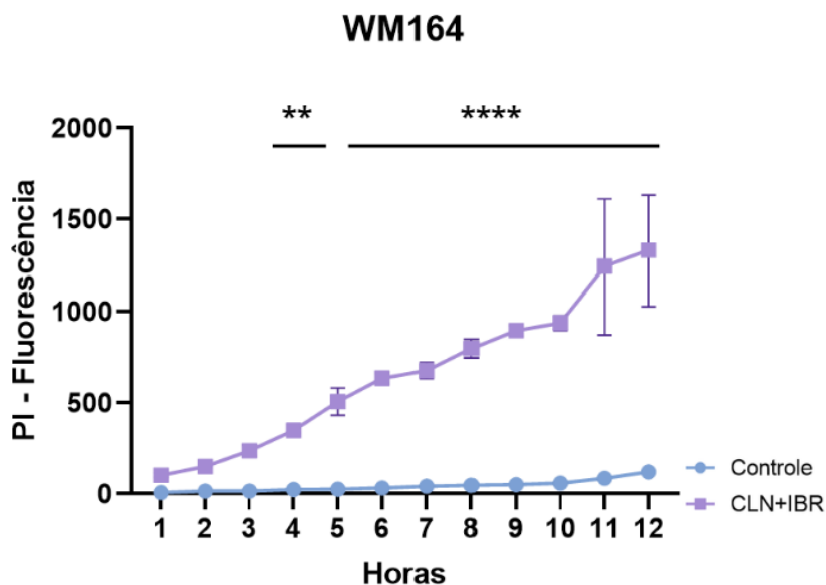


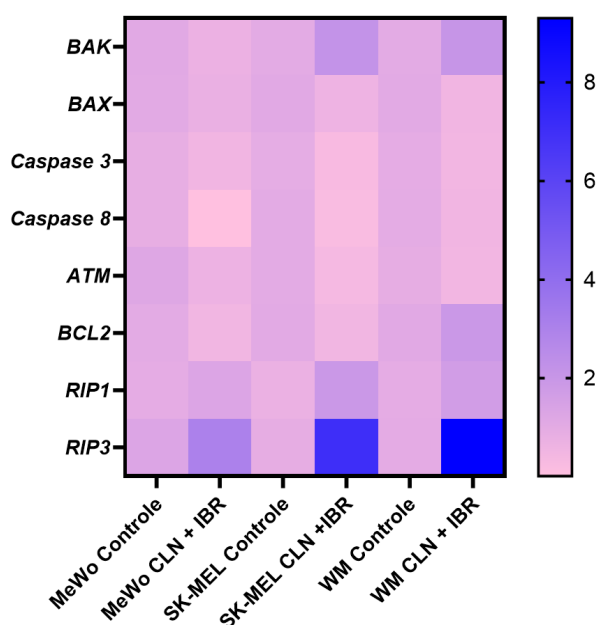
Figura 14. Formação de poros na membrana plasmática das células de melanoma. As células MeWo (A), SK-MEL-28 (B) e WM164 (C) foram tratadas com a dose IC_{50} de CLN+IBR e incubadas com PI. A fluorescência do PI foi medida a cada 30 minutos para avaliar a formação de poros na membrana. Observa-se um aumento significativo na fluorescência do PI a partir de 4 horas de tratamento em todas as linhagens celulares estudadas. Os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão teste ANOVA ** $p < 0,01$, **** significa $p < 0,0001$.

4.12. Análise da expressão dos genes relacionados à morte celular, migração e proliferação

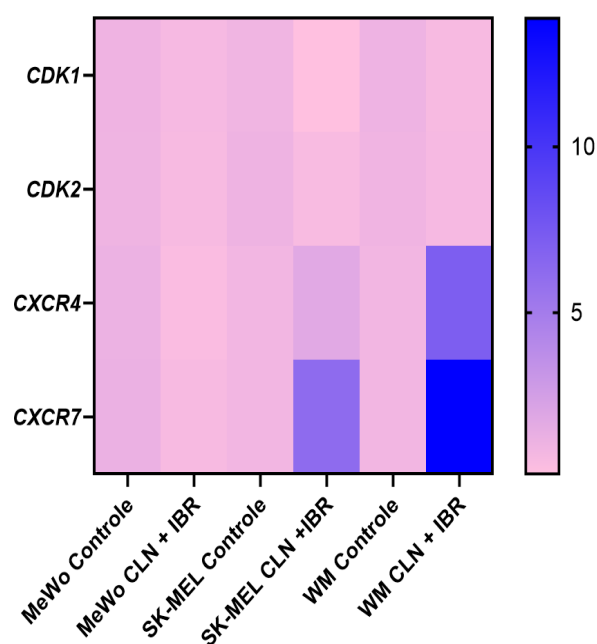
Para corroborar os resultados obtidos nos experimentos anteriores, avaliamos a expressão de genes-chave envolvidos em processos de morte, migração e proliferação celular em células de melanoma tratadas com IC_{50} do CLN + IBR (Figura 15). Observamos uma redução significativa na expressão dos genes pró-apoptóticos *ATM*, *BAX*, *CASPASE 3* e *CASPASE 8* nas linhagens celulares MeWo, SK-MEL-28 e WM164 ($p \leq 0,0340$). No entanto, a expressão do gene *BAK* aumentou nas linhagens SK-MEL-28 ($p = 0,0016$) e WM164 ($p = 0,0222$). A expressão do gene anti-apoptótico *BCL2* apresentou um perfil diferenciado entre

as linhagens: aumento em WM164 ($p = 0,0028$), redução em MeWo ($p = 0,0004$) e sem alteração estatística em SK-MEL-28. Concomitantemente, houve um aumento significativo na expressão dos genes *RIP1* e *RIP3*, relacionados à necroptose, em todas as linhagens celulares ($p \leq 0,0188$), sugerindo a indução dessa via alternativa de morte celular após tratamento com CLN+IBR o que correlaciona com os achados nos ensaios de avaliação da atividade das caspases 3/7 e Anexina V + PI . Em relação à proliferação celular, houve uma diminuição significativa na expressão dos genes *CDK1* e *CDK2* nas linhagens SK-MEL-28 ($p \leq 0,0007$) e WM164 ($p \leq 0,0133$). Na linhagem MeWo, a expressão do gene *CDK2* também foi significativamente reduzida ($p = 0,0008$), enquanto a redução no gene *CDK1* não atingiu significância estatística. No entanto, a migração celular, avaliada pela expressão dos genes relacionados, *CXCR4* e *CXCR7*, não foi significativamente afetada nas linhagens SK-MEL-28 e WM164 onde observamos um aumento da expressão, embora na linhagem MeWo tenha sofrido alteração na expressão desses genes em que se observou uma diminuição ($p \leq 0,0138$).

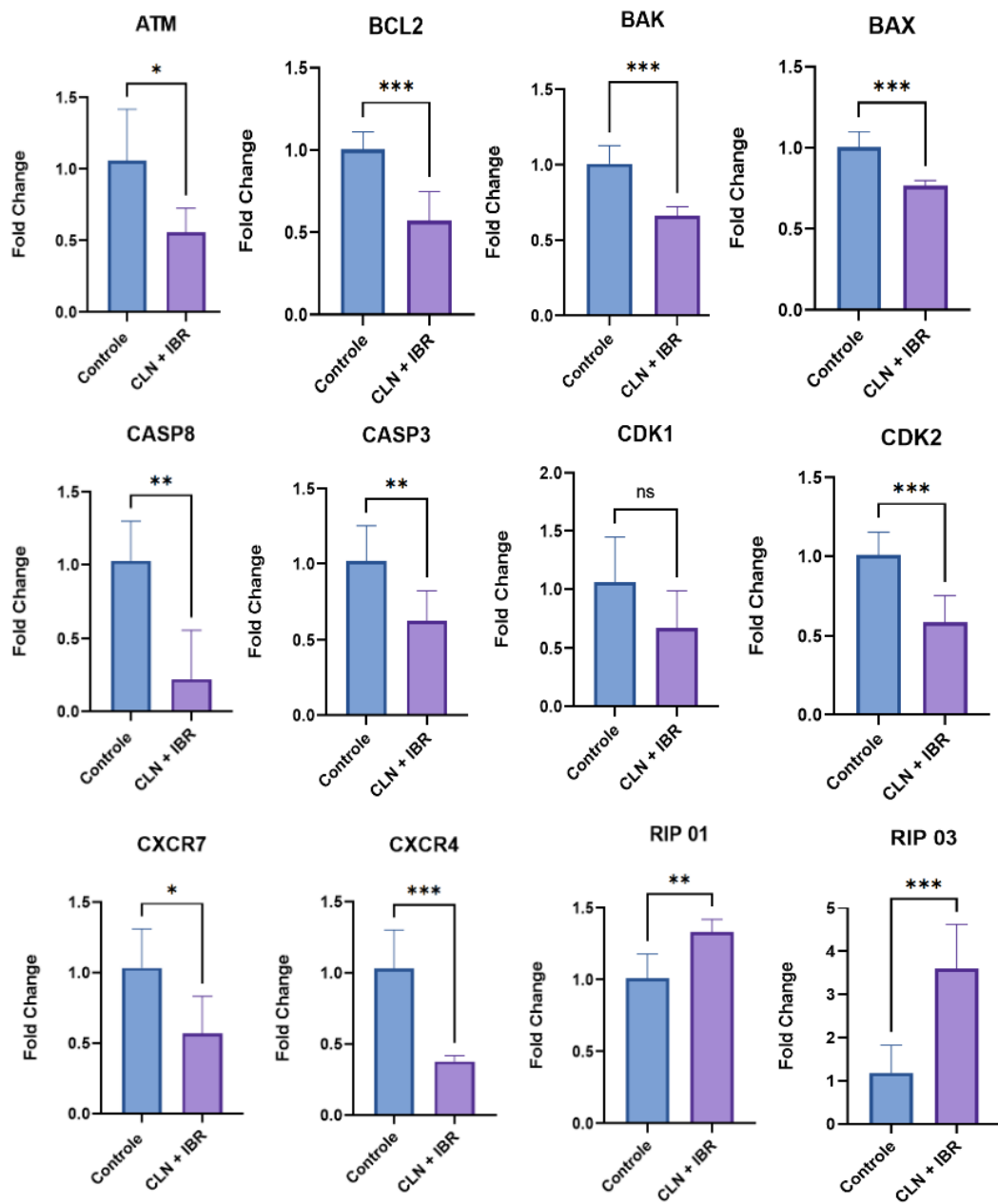
15. (A)



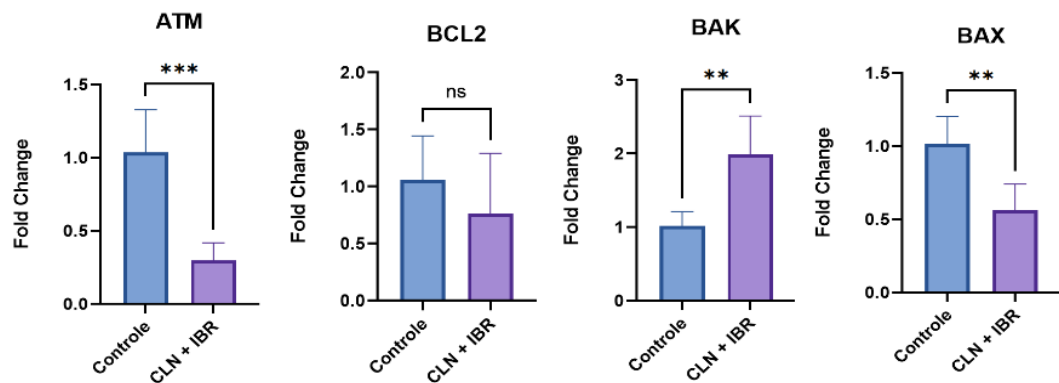
(B)

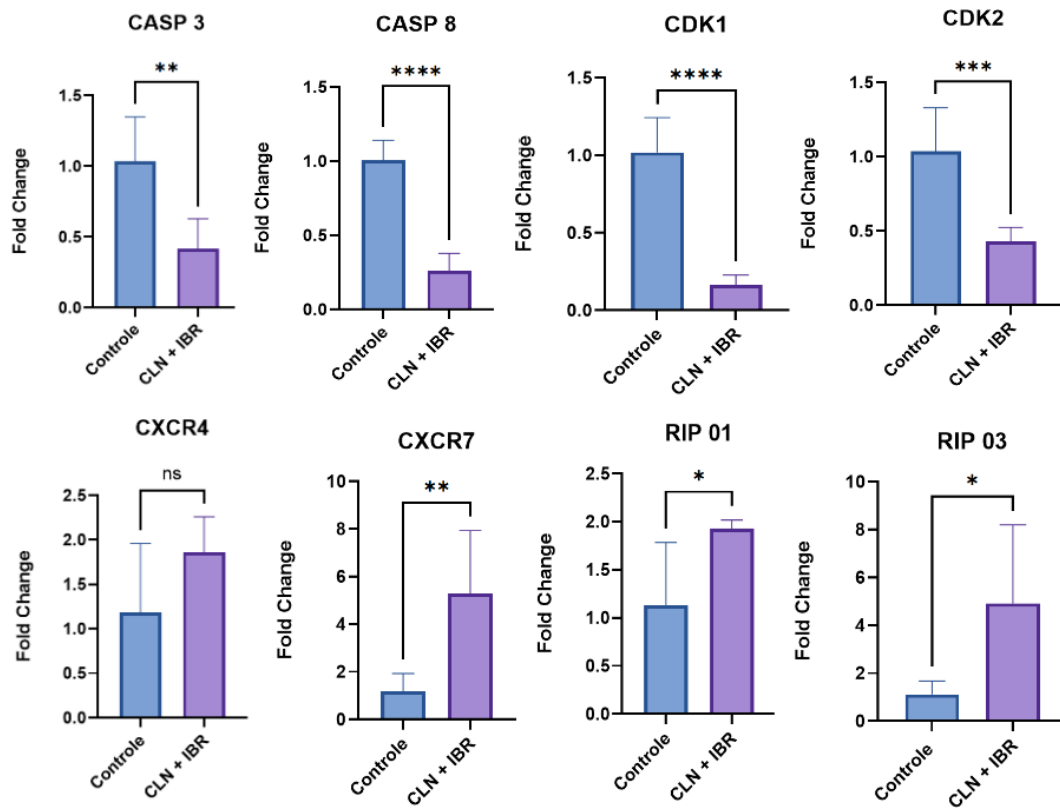


MeWo (C)

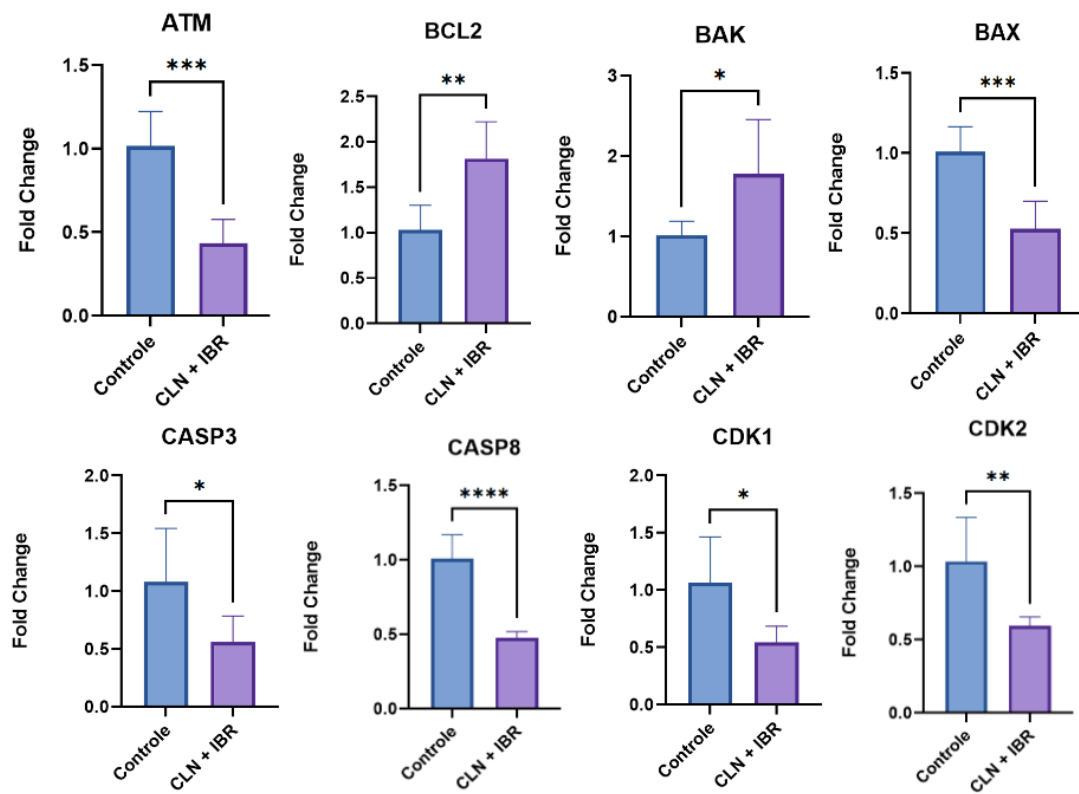


SK-MEL-28 (D)





WM164 (E)



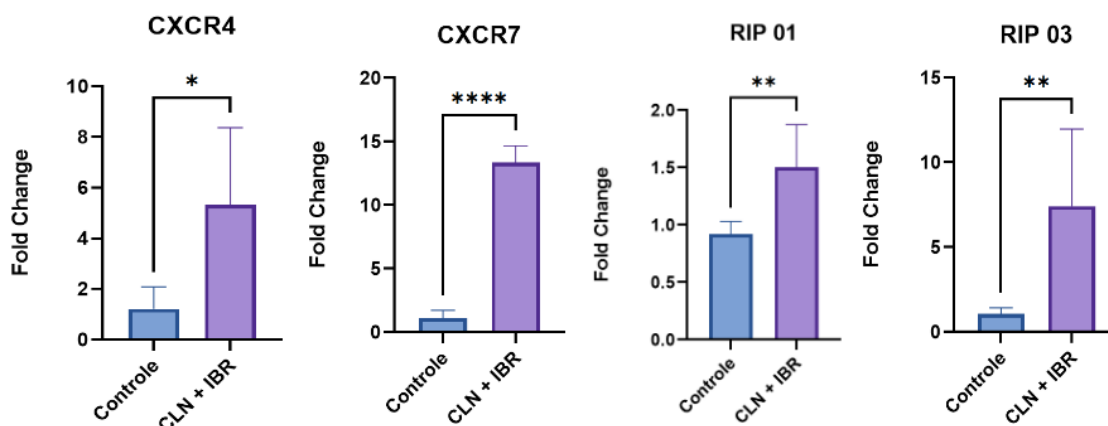


Figura 15. Dose IC₅₀ de CLN + IBR modula a expressão de genes relacionados à morte celular, proliferação e migração nas linhagens alviadas. Gráfico de *Heat Map* para avaliar a expressão dos principais genes relacionados a morte celular (Figura 14 A), proliferação e migração (Figura 14 B) após o uso do IC₅₀ CLN + IBR. Gráficos em barras da expressão dos genes nas linhagens MeWo (C), SK-MEL-28 (D) e WM164 (E) as reações foram feitas em duplicatas e o valor relativo Fold Change foi obtido pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os valores médios de Ct das amostras controle foram usados como referência. Todos os resultados foram expressos utilizando a média $\pm$ o desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

O Ibrutinibe demonstra efeitos antitumorais em tumores sólidos devido à sua capacidade de inibir de forma irreversível a Bruton's tyrosine kinase (BTK) e outras cinases contendo resíduos de cisteína similares (SZKLENER, et al., 2022). No entanto, a baixa biodisponibilidade deste fármaco, especialmente para tumores invasivos localizados na camada epidérmica basal, limita sua eficácia no tratamento de melanomas (ALBUQUERQUE, et al., 2024). Neste contexto, o nosso estudo propõe o uso de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com Ibrutinibe para melhorar a eficácia do fármaco, otimizando sua liberação e absorção.

Neste estudo, avaliamos inicialmente a citotoxicidade do CLN + IBR em concentrações crescentes em três linhagens celulares de melanoma (MeWo, SK-MEL28 e WM164), utilizando o ensaio colorimétrico de MTT. A fim de avaliar a influência da nanoformulação na atividade antitumoral do fármaco, comparamos os resultados obtidos com a citotoxicidade do Ibrutinibe livre e de nanopartículas lipídicas nanoestruturadas (CLNs) vazias. Os resultados obtidos indicam que a CLN + IBR apresentou maior efeito citotóxico em comparação ao fármaco livre e às CLNs vazias nas três linhagens celulares de melanoma avaliadas (MeWo, SK-MEL28 e WM164). Observamos uma dose IC_{50} de 6,30 μM para CLN + IBR na linhagem MeWo, enquanto para o Ibrutinibe livre e as CLNs vazias, os valores foram, respectivamente, de 35,72 μM e 7,54 μM . Resultados semelhantes foram encontrados para as outras duas linhagens, com CLN + IBR demonstrando menor IC_{50} em todos os casos, sendo de 29,52 μM para SK-MEL28 e 18,26 μM para WM comparado a 96,45 μM para SK-MEL28 e 29,76 μM para WM164 utilizando o fármaco livre e 82,19 μM para SK-MEL28 e 27,68 μM para WM164 quando utilizado a CLN vazia. Um estudo realizado por Lins et al., (2024) avaliou o efeito da citotoxicidade do Ibrutinibe nas linhagens de melanoma e mostrou

uma dose inibitória semelhante ao que encontramos, sendo 20,47 μM para MeWo, 32,98 μM para SK-MEL-28 e 28,14 μM para WM164. Comparando os valores encontrados é possível observar que o uso da nanoformulação pode oferecer vantagens em termos de eficácia do fármaco. Além disso, nossos resultados estão semelhantes aos achados de Pohl (2023), que demonstraram a redução da viabilidade de células de melanoma murino (B16-F10) após tratamento com CLN e quercetina, a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$ desse tratamento, após a avaliação pelo ensaio MTT. É importante destacar que a nanoformulação desenvolvida também se mostrou tóxica para fibroblastos de pele humana, portanto, uma eventual entrega desse produto deveria ser em área tumoral bem delimitada.

Com objetivo de melhor avaliar o efeito tóxico do tratamento das linhagens de melanoma com CLN + IBR, fizemos o ensaio de Anexina-V e PI. A nanoformulação de ibrutinibe induziu um perfil de morte celular complexo nas células de melanoma, sugerindo o envolvimento de apoptose e necrose. As linhagens SK-MEL-28 e WM164 apresentaram apoptose inicial em resposta ao tratamento, onde foi observado maior número de células positivas para Anexina V, enquanto a apoptose tardia, células positivas para Anexina V e PI, foi observada predominantemente nas linhagens MeWo e WM164. No entanto, identificamos que o aumento na porcentagem de células PI^+ foi o efeito mais pronunciado nesse ensaio, evidenciado o aumento dessas células nas três linhagens estudadas. Estudos semelhantes que demonstraram o potencial de nanopartículas em induzir morte celular em células tumorais, Khorsandi et al. (2024) observaram aumento da necrose em células de adenocarcinoma de pulmão (A549) após tratamento com nanopartículas sólidas combinadas com miricetina, enquanto Viegas et al. (2022) relatou indução de apoptose e necrose em células de carcinoma epidermoide (A431) utilizando CLNs combinadas com 5-fluorouracil e siRNA.

Nesse sentido, investigamos também o efeito citotóxico do tratamento (CLN + IBR) explorado neste estudo, pela dosagem do lactato desidrogenase (LDH) um biomarcador de dano celular. Após o tratamento com CLN + IBR nas três linhagens de melanoma estudadas, observou-se um aumento significativo na atividade da enzima analisada. Esses resultados corroboram os achados do ensaio de Anexina V e PI, durante a necroptose ou necrose possivelmente induzida pelas CLNs tem se na perda da integridade da membrana celular, o que resulta na liberação de enzimas como a LDH (CUMMINGS, et al., 2012). Essa perda permite a liberação de moléculas endógenas, conhecidas como DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns) que, por sua vez, desencadeiam uma resposta inflamatória, amplificando o dano tecidual (BARBOSA, et al., 2018).

Outro DAMP avaliado nesse estudo foi as espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas derivadas do metabolismo intracelular das mitocôndrias, retículo endoplasmático e peroxissomos. Em concentrações fisiológicas, as EROs desempenham um papel importante na regulação de diversos processos celulares, como proliferação, diferenciação, migração e morte celular. No entanto, quando presentes em concentrações que excedem os níveis fisiológicos, as EROs se tornam altamente reativas, causando danos oxidativos a proteínas, lipídios e DNA, e podem induzir a morte celular por apoptose ou necrose (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016; VILLALPANDO-RODRIGUEZ; GIBSON, 2021).

A avaliação da produção de EROs por citometria de fluxo revelou um aumento significativo nessas moléculas em todas as linhagens de melanoma estudadas após o tratamento com CLN + IBR. Esse achado corrobora os resultados obtidos nos ensaios anteriores e está em linha com estudos prévios que demonstram o papel central das EROs na indução de morte celular. O aumento das EROs, associado à perda da integridade da

membrana plasmática, sugere que a morte celular induzida pelas nanopartículas ocorre predominantemente por necrose. Mecanismos como o estresse oxidativo mitocondrial e a disfunção da cadeia transportadora de elétrons podem estar envolvidos nesse processo (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Um estudo realizado por Sonkusre e Cameotra, (2017) demonstrou que o tratamento de nanopartículas de selênio biogênicas induzem o aumento de EROs e morte celular não apoptótica em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata.

Para avaliar o impacto do tratamento com CLN + IBR sobre a integridade mitocondrial, utilizamos o ensaio com Rodamina 123. Essa sonda fluorescente acumula-se nas mitocôndrias com potencial de membrana intacto (CUI; PARK; PARK, 2020). A mitocôndria desempenha um papel crucial na regulação da morte celular. Em seu interior, estão armazenados componentes capazes de induzir a apoptose. Portanto, a integridade da membrana mitocondrial é fundamental para a sobrevivência celular, pois a sua ruptura libera esses componentes pró-apoptóticos. Vários estímulos podem desencadear a abertura de um poro na membrana mitocondrial, levando ao inchaço da matriz e à liberação de proteínas como o citocromo c. Além disso, a entrada de prótons na matriz mitocondrial colapsa o potencial de membrana, comprometendo a produção de ATP. Essa disputa entre a ativação das caspases e a depleção de ATP determina o tipo de morte celular, que pode ser por apoptose ou necrose. A apoptose ocorre quando a abertura do poro é restrita a algumas mitocôndrias, permitindo que outras continuem a produzir ATP. No entanto, se o poro se abre rapidamente em muitas mitocôndrias, a célula não consegue gerar energia suficiente por meio da glicólise e a depleção de ATP inibe a apoptose, levando à necrose (PAROLIN; REASON, 2001).

Observamos uma diminuição significativa na fluorescência da Rodamina 123 nas células tratadas com CLN + IBR em comparação com o grupo controle, indicando a perda do

potencial de membrana mitocondrial. Esses resultados, juntamente com os dados obtidos nos ensaios de Anexina V/PI e LDH, sugerem que o tratamento com CLN + IBR induz a morte celular por via mitocondrial, possivelmente através da ativação da necrose ou apoptose.

Neste estudo, investigamos o impacto do tratamento combinado com CLN + IBR no ciclo celular de linhas celulares de melanoma. O ciclo celular, composto pelas fases G1, S, G2 e M, é rigorosamente regulado por um complexo sistema de proteínas, incluindo ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs). A formação de complexos ciclina-CDK é essencial para a progressão do ciclo celular, impulsionando a transição entre as fases S e M. Inibidores de cinases dependentes de ciclina (CKIs) atuam como reguladores negativos, impedindo a progressão descontrolada do ciclo celular. Dentre as CDKs, a CDK1 desempenha um papel crucial na transição da fase G2 para a mitose (fase M), formando complexo com as ciclinas A e B. A CDK2, por sua vez, está envolvida na transição da fase G1 para a fase S, formando complexo com as ciclinas E e A. Sendo a desregulação das CDKs um fato importante na tumorigênese do melanoma (REN, et al., 2020; SHEPPARD; MCARTHUR., 2013). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com CLN + IBR diminuiu a expressão dos genes de CDK1 e CDK2 nas três linhagens de melanoma (MeWo, SK-MEL-28 e WM164).

Além disso, indentificamos que a nanoformulação induziu a um acúmulo de células na fase sub-G1 do ciclo celular, consequentemente provocando diminuição na porcentagem de células nas fases G1, fases S e G2/M do ciclo. Esse acúmulo de células na fase sub-G1, indica a ocorrência de morte celular, por dano ao DNA. Um estudo feito por Fuster et al. (2023) demonstraram que nanopartículas de fibroína de seda funcionalizadas com ácido fólico e carregadas com Ibrutinibe induziram parada do ciclo celular na fase G1 em células de câncer cervical (HeLa) e de mama (BT474 e SKBR3), sugerindo a indução de morte celular. Em linha com esses resultados, Ren., et al. (2022) observaram que a conjugação do Ibrutinibe a

agonistas de receptores *Toll-like* promoveu a interrupção do ciclo celular na fase G1 em células de melanoma murino (B16) e humano (A375). Esses estudos convergem para a hipótese de que a conjugação do Ibrutinibe a nanopartículas ou a agonistas de TLRs potencializa sua atividade antitumoral em comparação ao fármaco livre, possivelmente através da indução de morte celular.

Com base nos resultados anteriores, investigamos a expressão dos genes *CXCR4* e *CXCR7*. Essas quimiocinas são superexpressas em células tumorais, incluindo células endoteliais, e ao formar um eixo de sinalização CXCL12-CXCR4/CXCR7 desempenham o papel de manter um ambiente imunossupressor que favorece a sobrevivência, proliferação e angiogênese do tumor (YANG et al.,2023). Nesse sentido, investigamos o papel dos receptores *CXCR4* e *CXCR7* na resposta ao tratamento, avaliamos a expressão desses genes nas linhagens de melanoma MeWo, SK-MEL-28 e WM164 após a exposição às CLN+IBR. Observamos uma diminuição na expressão de *CXCR4* e *CXCR7* na linhagem MeWo em comparação com o grupo controle. No entanto, não detectamos diminuição na expressão desses genes nas linhagens SK-MEL-28 e WM164.

Ainda no sentido de avaliar o potencial migratório das linhagens de melanoma após o tratamento com CLN + IBR, realizamos o ensaio de migração por *wound healing* (cicatrização de ferida) nas três linhagens de melanoma. Os resultados demonstraram uma inibição significativa da migração celular após o tratamento ($p < 0,0001$). Esses achados estão em concordância com estudos prévios de Zhu et al. (2020), que observaram a inibição da migração de células tumorais de câncer de próstata após o tratamento com Ibrutinibe. Um estudo realizado por Ren et al. (2021) usando um análogo do Ibrutinibe inibiu a proliferação e migração celular, pelo ensaio de cicatrização de feridas, em linhagem de melanoma murino (B16).

Em concordância com os achados de Ren et al. (2021), que demonstraram a inibição da formação de colônias em células de melanoma murino após tratamento com análogo de Ibrutinibe, nossos resultados também indicaram uma diminuição significativa na tumorigenicidade das linhagens celulares de melanoma humano MeWo e WM164. De forma surpreendente, observamos uma inibição completa da formação de colônias na linhagem SK-MEL-28, sugerindo uma sensibilidade particular desta linhagem ao tratamento.

Diante desses resultados, investigamos o mecanismo de morte celular induzido pelo tratamento com CLN + IBR em linhagens de melanoma. Avaliamos a expressão de genes-chave envolvidos na apoptose, como: *ATM*, *BAX*, *CASPASE 3* e *CASPASE 8*. Observamos uma redução na expressão desses genes nas três linhagens estudadas. Entretanto, nas linhagens SK-MEL-28 e WM164 detectamos um aumento da expressão do gene *BAK*. A seleção desses genes foi baseada no fato de que a apoptose, ou morte celular programada, depende de sua expressão para desencadear eventos cruciais como a ativação de proteases, a fragmentação do DNA e a fagocitose das células mortas. A apoptose pode ser induzida por diferentes vias, sendo as principais as vias extrínseca e intrínseca. Sendo a via extrínseca iniciada por receptores de morte na membrana celular, enquanto a via intrínseca envolve principalmente a mitocôndria. Na via intrínseca, a permeabilização da membrana mitocondrial leva à liberação do citocromo c para o citosol. O citocromo c se associa ao fator de ativação de protease apoptótica-1 (Apaf-1) e à caspase-9, formando o apoptossomo. Esse complexo ativa a caspase-3, iniciando uma cascata proteolítica que culmina na morte celular. A regulação da permeabilização mitocondrial é influenciada pela família *BCL-2*, sendo a *BAX* e a *BAK* proteínas pró-apoptóticas que promovem a permeabilização, enquanto a *BCL-2* é uma proteína anti-apoptótica que inibe esse processo (CUI; PARK; PARK, 2020; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Ainda nesse sentido, a ativação da

proteína *ATM* é desencadeada por danos ao DNA. Essa ativação culmina na fosforilação e ativação da proteína *p53*, um importante supressor de tumores, por meio de duas vias principais: fosforilação direta pela *ATM* ou fosforilação indireta mediada pela cinase *Chk2*. Uma vez ativada, a proteína *p53* induz a transcrição do gene *BAX*, promovendo a permeabilização da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, a ativação da via intrínseca da apoptose (AKI, T.; UEMURA, K., 2016).

Nesse cenário, não podemos concluir que a morte celular gerada nas linhagens SK-MEL-28 e WM164 seja por apoptose com base em apenas um gene (*BAK*) que foi expresso positivamente, visto a complexidade e a participação de outros genes nessa via. Além disso, decidimos avaliar a atividade das caspases 3 e 7 por ensaio de luminescência. Os resultados demonstraram uma redução na atividade dessas proteases nas células MeWo, SK-MEL-28 e WM164 após o tratamento com CLN + IBR, corroborando com os dados obtidos pela PCR, que indicaram uma diminuição na expressão dos genes relacionados à apoptose.

A inibição da apoptose pode estar relacionada à ativação de vias alternativas de morte celular, como a necroptose, o bloqueio da caspase-8 promove a formação do necrossomo, um complexo proteico que ativa as cinases *RIPK1* e *RIPK3*. A *RIPK3*, por sua vez, fosforila a proteína *MLKL*, que se insere na membrana plasmática, formando poro e levando à ruptura celular, caracterizando a necroptose como uma forma de morte celular programada dependente de *RIPK3* e *MLKL* (XINLONG et al., 2019).

Com base nesse conhecimento, avaliamos a expressão dos genes *RIPK1* e *RIPK3* em linhagens de melanoma tratadas com CLNs + IBR. Observamos um aumento significativo na expressão desses genes em comparação ao grupo controle. Esses resultados corroboram com a hipótese de que a morte celular induzida pelo tratamento ocorre predominantemente por

necroptose, como sugerido nos ensaios anteriores. A indução da necroptose pode ser uma estratégia promissora para o tratamento de tumores resistentes à apoptose, como o melanoma. Os resultados obtidos neste estudo estão semelhantes ao encontrado na literatura, como demonstrado por Viegas *et al.* (2022), que observaram atividade antitumoral em um modelo de xenotransplante de melanoma após o tratamento tópico com CLNs combinadas com 5-fluorouracil e siRNA. A indução de necrose celular sugere que essa via de morte celular pode ser um mecanismo promissor para o tratamento de melanoma, especialmente quando combinada com outras terapias, sendo eficaz em tumores que desenvolveram mecanismos de resistência aos tratamentos convencionais.

Adicionalmente, para investigar o mecanismo de ação do CLN+IBR, avaliamos a formação de poros na membrana plasmática de células de melanoma através da quantificação da fluorescência do iodeto de propídio (PI). Após o tratamento com CLN+IBR, as células foram monitoradas por 12 horas. Observamos um aumento significativo na fluorescência do PI nas células tratadas em comparação com o grupo controle, indicando um aumento na permeabilidade da membrana plasmática e a formação de poros. Os resultados obtidos neste estudo estão em linha com os dados anteriores, os quais demonstraram um aumento na expressão dos genes *RIPK1* e *RIPK3*. Essa evidência, juntamente com o aumento da permeabilidade da membrana plasmática, sugere fortemente que o mecanismo de morte celular induzido pelo CLN+IBR envolve necroptose. Nossos achados estão em concordância com os de Xinlong et al. (2019), que em sua revisão destacaram o potencial de nanopartículas em sensibilizar células à necroptose, uma forma de morte celular programada alternativa à apoptose.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a nanoformulação do ibrutinibe potencializa significativamente a eficácia do fármaco no tratamento do melanoma *in vitro* frente as linhagens MeWo, SK-MEL-28 e WM164. A associação do ibrutinibe com carreadores lipídicos nanoestruturados permitiu uma concentração inibitória menor quando comparada ao uso do fármaco isolado como avaliado pelo ensaio de MTT. Nossos resultados evidenciaram a capacidade do CLN+ IBR em inibir a migração, a formação de colônias e induzir a morte celular por mecanismos apoptóticos e necróticos. Apesar de não inibir a proliferação celular pelo ensaio de CFSE.

A análise da expressão gênica associada a liberação de LDH e à formação de poros na membrana sugere que a necroptose pode ser uma das vias de morte celular predominantes nesse processo.

Esses achados demonstram que a nanoformulação do Ibrutinibe apresentou resultados promissores em realçar o potencial antitumoral do inibidor de tirosina quinase, superando as limitações do fármaco livre. No entanto, é fundamental que estudos futuros investiguem a eficácia e segurança da nanoformulação em modelos animais e, posteriormente, em ensaios clínicos, a fim de validar os resultados obtidos *in vitro* e traduzir essa abordagem para a prática clínica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKI, T.; UEMURA, K. Cell Death and Survival Pathways Involving ATM Protein Kinase. **Genes**, v.12, n.1, p.1581, 2021.

ALBUQUERQUE, L.F.F. et al. Ibrutinib Topical Delivery for Melanoma Treatment: The Effect of Nanostructured Lipid Carriers' Composition on the Controlled Drug Skin Deposition. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v.237, p.113875, 2024.

BARBOSA LA, et al. RIPK1-RIPK3-MLKL-Associated Necroptosis Drives *Leishmania infantum* Killing in Neutrophils. **Frontiers in Immunology**, v.14, n.9, p.1818, 2018.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured Lipid Carriers: Promising Drug Delivery Systems for Future Clinics. **Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine**, v. 12, n. 1, p.10143–161, 2016.

CASARINI, T. P. A. et al. Innovative Hydrogel Containing Polymeric Nanocapsules Loaded with Phloretin: Enhanced Skin Penetration and Adhesion. **Materials science & engineering. C, Materials for biological applications**, v. 120, p. 111681, 2021.

COLOMBINO, M. et al. Heterogeneous pathogenesis of melanoma: BRAF mutations and beyond. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 201, p.104435, 2024.

CUI, X.Y.; PARK, S.H.; PARK, W.H. Auranofin inhibits the proliferation of lung cancer cells via necrosis and caspase-dependent apoptosis. **Oncology Reports**, v.44, p. 2715-2724, 2020.

CUMMINGS, B. S. et al. Measurement of Cell Death in Mammalian Cells. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 12.8. 1-12.8. 24, 2012.

DAVEY, M.G. et al. A Review of Epidemiology and Cancer Biology of Malignant Melanoma. **Cureus**, v.13, n.5, p.15087, 2021.

DIMITRIOU, F., KRATTINGER, R., Ramelyte, E. et al. The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe. **Current Oncology Reports**, v. 20, n.87, p.60, 2018.

FUSTER, MG; et al. Folic Acid-Modified Ibrutinib-Loaded Silk Fibroin Nanoparticles for Cancer Cell Therapy with Over-Expressed Folate Receptor. **Pharmaceutics**, v.15, n.4, p.1186, 2023.

HENDRIKS, RW; YUVARAJ S, KIL LP. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. **Nature Reviews Cancer**, v.14, n.4, p.219-232, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Câncer de pele melanoma. 2021a. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>. Acesso em: 22 setembro de 2024.

JENKINS, R. W.; FISHER, D. E. Treatment of advanced melanoma in 2020 and beyond. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 141, n.1, p. 23–31, 2021.

KHORSANDI, L. et al. Myricetin Loaded Solid Lipid Nanoparticles Upregulate MLKL and RIPK3 in Human Lung Adenocarcinoma. **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, v. 26, p. 899–910, 2020.

LASICA, M.; TAM, C. S. Management of ibrutinib toxicities: a practical guide. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 15, n. 3, p. 177–186, jun. 2020.

LEONARDI, G. C. et al. Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p.329-333, 2007.

LINS, F. V. et al. Ibrutinib Modulates Proliferation, Migration, Mitochondrial Homeostasis, and Apoptosis in Melanoma Cells. **Biomedicines**, v. 12, n. 5, p. 1012, 2024.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPES, J. et al. Melanoma management: from epidemiology to treatment and latest advances. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4652, 2022.

MASSÓ-VALLÉS, D.; JAUSET, T.; SOUCEK, L. Ibrutinib repurposing: from B-cell malignancies to solid tumors. **Oncoscience**, v. 3, n. 5-6, p. 147-148, 2016.

MAUREEN, R. D.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v.1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

MOLINA-CERRILLO, J. et al. Tirosina quinase de Bruton (BTK) como um alvo promissor em tumores sólidos. **Cancer Treatment Reviews**, v. 58, p. 41–50, 2017.

MOURA, L. D. et al. Docetaxel and lidocaine co-loaded (NLC-in-hydrogel) hybrid system designed for the treatment of melanoma. **Pharmaceutics**, v. 13, n.10, p. 1552, 2021.

PAROLIN, Mônica Beatriz; REASON, Iara J. Messias. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, p. 138-144, 2001.

PEREIRA, I. et al. Nanodelivery systems for cutaneous melanoma treatment. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 184, p. 214–247, 2023.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p.45, 2001.

POHL, A. R. **Estudo comparativo entre nanopartículas lipídicas sólidas com curcumina e capsaicina, e carreador lipídico nanoestruturado com quercetina no tratamento do melanoma**. 2023. 95f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Nanociências) - Universidade Franciscana, Santa Maria, RS.

POKLEPOVIC, A. S.; LUKE, J. J. Considering adjuvant therapy for stage II melanoma. **Cancer**, v. 126, n.6, p. 1166-1174, 2020.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.

REN, M. et al. Cell cycle regulation by berberine in human melanoma A375 cells. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 169, n. 4, p. 491-496, 2020.

REN, Sumei et al. Discovery of novel ibrutinib analogues to treat malignant melanoma. **Bioorganic Chemistry**, v. 117, p. 105419, 2021.

REN, S.; WANG, X.; JIN, G. Conjugate of ibrutinib with a TLR7 agonist suppresses melanoma progression and enhances antitumor immunity. **International Journal of Biological Sciences**, v. 18, n. 1, p. 166-179, 2022.

SAUD, A. et al. Melanoma metastasis: what role does melanin play? (Review). **Oncology Reports**, v. 48, n. 6, p. 217, dez. 2022.

SCHADENDORF, D. et al. Melanoma. **Nature reviews Disease primers**, v. 1, n. 1, p. 1-20, 2015.

SZKLENER, K. et al. Ibrutinib in the treatment of solid tumors: current state of knowledge and future directions. **Cells**, v. 11, n. 8, p. 1338, 2022.

SHEPPARD, K. E.; MCARTHUR, G. A. The cell-cycle regulator CDK4: an emerging therapeutic target in melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5320-5328, 2013.

SONKUSRE, P.; CAMEOTRA, S. S. Biogenic selenium nanoparticles induce ROS-mediated necroptosis in PC-3 cancer cells through TNF activation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 43, 7 jun. 2017.

TRAHTEMBERG, U. et al. Calcium, leukocyte cell death and the use of annexin V: fatal encounters. **Apoptosis**, v. 12, n. 10, p. 1769-1780, 2007.

VIEGAS, Juliana Santos Rosa. **Desenvolvimento de carreador lipídico nanoestruturado contendo pool de siRNAs associados a agente antitumoral como uma abordagem terapêutica multifuncional para o câncer de pele**. 2022. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

VILLALPANDO-RODRIGUEZ, G. E.; GIBSON, S. B. Reactive oxygen species (ROS) regulates different types of cell death by acting as a rheostat. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, n. 1, p. 9912436, 2021.

YANG, Y. et al. CXCL12-CXCR4/CXCR7 axis in cancer: from mechanisms to clinical applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3341-3359, 2023.

XINLONG Z., et al. Targeting necroptosis as an alternative strategy in tumor treatment: From drugs to nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 349, p. 213-226, 2022.

WAGSTAFF, William et al. Melanoma: Molecular genetics, metastasis, targeted therapies, immunotherapies, and therapeutic resistance. **Genes & diseases**, v. 9, n. 6, p. 1608-1623, 2022.

ZANONI, Rodrigo Daniel et al. Estudo epidemiológico descritivo do melanoma no brasil e suas macrorregiões nos últimos 5 anos. **Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1331-1341, 2023.

ZHU, Zhen et al. Bruton's tyrosine kinase (BTK) inhibitor (ibrutinib)-suppressed migration and invasion of prostate cancer. **OncoTargets and therapy**, p. 4113-4122, 2020.