



Universidade de Brasília

MARIA VICTÓRIA SOUTO SILVA

**ANÁLISE DE TOXICIDADE E DERMATOCINÉTICA DO IBRUTINIB EM MODELOS
DE PELE HUMANA**

BRASÍLIA, 2024

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA VICTÓRIA SOUTO SILVA

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde na Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof. Dra. Juliana Lott de Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins
Gelfuso

BRASÍLIA

2024

MARIA VICTÓRIA SOUTO SILVA

**ANÁLISE DE TOXICIDADE E DERMATOCINÉTICA DO IBRUTINIB EM MODELOS
DE PELE HUMANA**

**Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.**

Aprovado em 28 de junho de 2024

BANCA EXAMINADORA

Juliana Lott de Carvalho

Universidade de Brasília

Marilia Martins Melo

Universidade Federal de Minas Gerais

Maria de Fátima Borin

Universidade de Brasília

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo à minha orientadora, Juliana Lott, por me permitir fazer parte deste mundo incrível e desafiador da pesquisa. Sou grata por sua confiança, por compartilhar sua experiência e conhecimento ao longo desses anos, e por sempre me inspirar a buscar mais. Você é uma grande inspiração e serei eternamente grata!

Agradeço também ao meu co-orientador, Guilherme Gelfuso, por sempre estar disponível e disposto a ajudar. Às professoras Luciana Hagström, Mariana Hecht e Nadjar Nitz, obrigada por serem profissionais tão incríveis e inspiradoras. A ciência precisa de mais pessoas como vocês. Obrigada por todas as conversas e conselhos durante esse tempo.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório Interdisciplinar de Biociências: Bruno Dallago, Isabela, Fábio e Peter, por me ajudarem nessa jornada. Vocês foram essenciais para o sucesso do meu trabalho.

Ao médico Dr. Carpaneda, obrigada por disponibilizar o material da sua clínica para minha pesquisa, e à Professora Eliza, por abrir as portas do seu laboratório.

Meu agradecimento especial ao professor Felipe Marques, da graduação, por me incentivar a seguir na pesquisa e me direcionar ao caminho onde estou hoje. Sem seus conselhos e confiança, eu não estaria aqui.

À minha aluna de iniciação científica, Mayra Mendes, obrigada por toda a disposição e vontade de aprender e ajudar.

Aos amigos que fiz nesta jornada: Ludmilla Melanie, Illana Mazzoleni, Marina Dias, Antônio Vitor, Giovana Kim, sou muito grata por todos os momentos e por tornarem minha caminhada mais leve. À Stephani Barcelos e Vitória Pessoa, que estão comigo desde o início, não teria chegado aqui sem o apoio de vocês. Vocês foram essenciais e transformaram tudo em algo mais alegre e leve, formando uma segunda família para mim no ambiente acadêmico.

Agradeço também às minhas amigas, que mesmo distantes, foram fundamentais nesta jornada: Barbara Ribeiro, Emanuella Lobato e Isabela Corrêa. Obrigada por sempre me apoiarem, sinto a presença de vocês em todas as minhas conquistas.

Aos amigos que fiz durante essa trajetória: Emãnuella Melgaço, Erika, Maycon, Débora Marinho, Cristy Alves e Gabriela Pereira, obrigada por todo o conhecimento compartilhado e apoio.

Sou extremamente grata à minha família: minha avó Benedita Souto, minha tia Simone Araújo, e minhas primas Letícia Araújo e Roberta Araújo (in memoriam). Vocês são mulheres incríveis que me ensinaram a correr atrás dos meus sonhos. Obrigada por sempre estarem ao meu lado.

Agradeço ao meu pai, Nilton Alves, e ao meu irmão, Newton Souto, por todo o apoio nesta jornada.

Ao Patrick que chegou na minha vida no final dessa jornada mas tem sido essencial em cada momento, obrigada por todo apoio, você também faz parte dessa conquista.

E, finalmente, obrigada à minha mãe, Maria Aparecida, por todas as bênçãos de ser sua filha. Obrigada por nunca me desmotivar e sempre ser a primeira a me apoiar em qualquer situação. Sem seu exemplo de mulher guerreira, esforçada e batalhadora, eu não seria metade da mulher que sou hoje. Tudo que faço é por você e para você.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 10262842.

“Estou entre aqueles que acham que a ciência tem uma grande beleza.”

Marie Curie

RESUMO

O ibrutinibe (IBR) é um inibidor da tirosina quinase sob investigação em ambientes pré-clínicos e clínicos como tratamento alternativo para o melanoma. No entanto, a biodisponibilidade oral limitada do IBR e a necessidade de altas doses do medicamento para matar as células do melanoma são importantes desafios para viabilizar a utilização clínica do fármaco para este fim. Considerando que o melanoma está restrito à pele em estágios iniciais, a aplicação tópica de IBR pode constituir uma via de administração eficaz e com menor risco de efeitos adversos. No entanto, o desenvolvimento de formulações tópicas para o fármaco demandam estudos iniciais acerca do seu perfil de toxicidade e permeação na pele humana. Neste estudo, determinamos a toxicidade e a dermatocinética do IBR utilizando células primárias humanas e culturas organotípicas de explantes de pele humana (do inglês, *human organotypic skin explant cultures, hOSEC*). Depois de demonstrar que fibroblastos e queratinócitos primários humanos apresentam genes alvo de IBR, a citotoxicidade do fármaco foi determinada utilizando os ensaios de metabolização do MTT e marcação com anexina V/PI. A toxicidade do IBR na pele foi avaliada utilizando o ensaio de metabolização do TTC, e o potencial de irritação foi estabelecido utilizando avaliação histológica. Finalmente, a permeação cutânea do IBR foi avaliada *ex vivo* para determinar a dermatocinética do medicamento. Nossas descobertas revelam que o IBR exerce toxicidade dose-dependente em células da pele. Os queratinócitos apresentaram IC₅₀ na mesma faixa de concentração que as células do melanoma, enquanto os fibroblastos apresentaram uma sensibilidade menor à droga. A aplicação tópica do medicamento induziu pouca irritação e toxicidade na pele, e o medicamento demonstrou permear com sucesso o estrato córneo e atingir as camadas viáveis da pele em concentrações terapêuticas. De modo geral, nossos dados incentivam a aplicação tópica do IBR no tratamento do melanoma, abrindo caminho para futuros estudos no tema.

Palavras-chave: modelo *hOSEC*; Modelos alternativos à experimentação animal; Melanoma; Permeação cutânea; SKMEL-28

ABSTRACT

Ibrutinib (IBR) is a tyrosine kinase inhibitor under investigation in preclinical and clinical settings as an alternative treatment for melanoma. However, the limited oral bioavailability of IBR and the need for high doses of the drug to kill melanoma cells are important challenges to be overcome before the clinical use of the drug for this purpose. Considering that melanoma is restricted to the skin in its early stages, topical application of IBR may constitute an effective route of administration with a lower risk of adverse effects. However, the development of topical formulations for the drug requires initial studies on IBR's toxicity and permeation profiles in human skin. In this study, we determined the toxicity and dermatokinetics of IBR using human primary cells and human organotypic skin explant cultures (hOSEC). After demonstrating that primary human fibroblasts and keratinocytes present IBR target genes, the cytotoxicity of the drug was determined using MTT and annexin V/PI assays. IBR skin toxicity was assessed using the TTC assay, and irritation potential was established using histological evaluation. Finally, the skin permeation of the IBR was evaluated *ex vivo* to determine the dermatokinetics of the drug. Our findings reveal that IBR exerts dose-dependent toxicity on skin cells. Keratinocytes showed IC₅₀ in the same concentration range as melanoma cells, while fibroblasts showed a lower sensitivity to the drug. Topical application of the drug induced little skin irritation and toxicity, and the drug was shown to successfully permeate the stratum corneum and reach viable layers of the skin in therapeutic concentrations. Overall, our data encourage the topical application of IBR in the treatment of melanoma, paving the way for future studies on the topic.

Keywords: hOSEC model; Alternative models; Melanoma; Skin permeation; SKMEL-28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da pele e os tipos celulares que a constituem.

Figura 2: Representação dos estágios do melanoma.

Figura 3: Estrutura molecular do IBR.

Figura 4: Desenho experimental.

Figura 5: Culturas de explantes de pele organotípica humana.

Figura 6: qRT-PCR de genes alvo IBR em células primárias da pele.

Figura 7: Citotoxicidade do IBR em relação às células primárias da pele humana.

Figura 8: Indução apoptótica por IBR em células primárias da pele humana.

Figura 9: Potencial de irritação do IBR em modelos *hOSEC*.

Figura 10: Observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* tratadas com IBR adicionado ao meio de cultura de tecidos.

Figura 11: Observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* tratadas com IBR adicionadas ao meio de cultura de tecidos.

Figura 12: Análise dermatocinética IBR em pele humana.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência de primers.

Tabela 2: Pontuação final de tolerância do teste de irritação histológica *ex vivo*.

Tabela 3: Classificação das observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* tratadas com IBR adicionado ao meio de cultura de tecidos.

Tabela 4: Classificação das observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* tratadas com IBR administrado topicamente.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT - Proteína quinase B

AMP - Adenosina monofosfato

ATCC - *American Type Culture Collection*

ATM - *Serine/threonine kinase*

ATP – Adenosina trifosfato

ATR - Proteína quinase Ataxia-Telangiectasia and Rad3-related

BCR-Abl - Proto-oncogene 1, tirosina quinase não receptora

BMX - *Cytoplasmic tyrosine-protein kinase*

BRAF - proto-oncogene B-Raf, serina/treonina quinase (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase)

BTK – Tirosina quinase de Bruton

CDKN2A - Inibidor de quinase dependente de ciclina 2

cDNA – DNA complementar

CO₂ – Gás carbônico

CTLA4 - Proteína 4 associada ao linfócito T citotóxico

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EC – Estrato córneo

EGFR – *Epidermal growth factor receptor*

ERBB2 - *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2*

ERBB4 - *Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4*

FA – Fibrilação atrial

FAK - Quinase de adesão focal

FDA - *Food and Drug Administration*

GAPDH - *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

hOSEC - Culturas organotípicas de explantes de pele humana

HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*

IBR – Ibrutinibe

IL2 - interleucina-2

ITK – Tirosina quinase

ITQs – Inibidores de tirosina quinase

JAK3 - *Janus kinase 3*

KSFM – *Keratinocyte serum-free medium*

LLC - Leucemia linfocítica crônica

MAPK - *Mitogen activated protein kinase*

MC – Melanoma cutâneo

MEC – Matriz extracelular

MEK – Metiletilcetona

mRNA – RNA mensageiro

MTT – Método colorimétrico de metabolização do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

NF- κ B - Fator nuclear kappa B

NRAS – *NRAS proto-oncogene, GTPase*

PBS – *Phosphate-buffered saline*

PD1 - *Programmed Cell Death 1*

PI - Iodeto de Propídio

PI3K - Fosfoinositídeo 3-quinase

PR – Pele remanescente

qRT-PCR - Reação de Transcriptase combinada com a Reação em Cadeia da Polimerase

RLK - *Receptor-like kinases*

RNA – Ácido ribonucleico

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

TEC - Tec proteína tirosina quinase

TERT - Transcriptase reversa da telomerase

TFK - Quinases da família Tec

TTC – Método colorimétrico de metabolização do cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio

TXK - *TXK tyrosine kinase*

UVR – Radiação ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1. A pele e suas estruturas	20
2.2. MELANOMA	24
2.3. Alternativas terapêuticas para o melanoma	28
2.4. Inibidores de Tirosina Quinase	30
2.5. IBRUTINIBE	32
2.6. Tratamento Tópico para o melanoma	35
3. OBJETIVOS	37
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Materiais	38
4.2. Aprovação em comitê de ética	38
4.3. Desenho experimental	38
4.4. Isolamento e cultura de células primárias da pele	39
4.5. Detecção qRT-PCR de genes alvo IBR	40
4.6. Ensaio de viabilidade celular	41
4.6.1. Ensaio de MTT	41
4.6.2. Ensaio de detecção de apoptose	41
4.7. Cultura Organotípica de Explante de Pele Humana (hOSEC)	42
4.8. Ensaio de viabilidade tecidual	43
4.8.1. Ensaio de TTC	43
4.8.2. Avaliação histológica de irritação da pele	43
4.9. Permeação cutânea do IBR e análise dermatocinética	45
4.10. Análise de dados	46
5. RESULTADOS	46
5.1. Células primárias da pele humana apresentam genes alvo IBR	46
5.2. Células primárias da pele humana e do melanoma apresentam sensibilidade diferente ao IBR	47
5.3. A toxicidade do IBR em modelo hOSEC depende da via de administração	49
5.4. O IBR permeia com sucesso o estrato córneo	54
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	59
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
9. REFERÊNCIAS	61
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	67
ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA	

1. INTRODUÇÃO

A pele, um órgão complexo que cobre todo o corpo, atua como uma barreira protetora vital entre o organismo e o ambiente. Além de evitar perdas de água e eletrólitos e reduzir a penetração de substâncias químicas, ela protege contra microrganismos nocivos. Além disso, a pele desempenha um papel crucial na regulação da temperatura corporal e na defesa imunológica (KHAVKIN; ELLIS, 2011b; WONG et al., 2016a). Composta por três camadas - epiderme, derme e hipoderme - a pele abriga uma variedade de células que a moldam, como queratinócitos e fibroblastos, e células especializadas, incluindo células imunes, células de Merkel e melanócitos (STRASHILOV; YORDANOV, 2021).

Os melanócitos normais têm um papel essencial na proteção da pele contra a radiação ultravioleta (UVR) e na regulação da pigmentação. No entanto, quando há disfunção dos melanócitos, pode ocorrer uma proliferação anormal e transformação em melanoma maligno (HONDA et al., 2024). O melanoma representa a variante mais agressiva e desafiadora do câncer de pele, resultante da mutação na linhagem celular dos melanócitos epidérmicos (ZHAN et al., 2024). No entanto, esse tipo de câncer não se limita apenas à pele e pode ser encontrado em outros órgãos, como os olhos, ouvidos, trato gastrointestinal e mucosas oral e genital (MARGOLIS; MARKOVITS; MARKEL, 2019). Ao longo das últimas décadas, o melanoma demonstrou aumento de incidência nos países desenvolvidos, especialmente entre populações de pele mais clara, compreendendo 1,7% dos diagnósticos globais de câncer. Embora constitua apenas 1% dos casos de câncer de pele, o melanoma é responsável por mais de 80% das fatalidades relacionadas a esse tipo de câncer (LONG et al., 2023; SAGINALA et al., 2021), demandando urgente avanço das estratégias de diagnóstico e tratamento.

O melanoma cutâneo (MC) surge devido ao acúmulo progressivo de mutações genéticas que afetam a proliferação, diferenciação e morte dos melanócitos. Mais de 75% dos casos de MC em populações caucasianas são atribuídos ao efeito mutagênico da UVR (LONG et al., 2023). Apesar de ser menos prevalente do que outros tipos de câncer de pele, o melanoma tem chamado mais atenção devido à sua capacidade significativa de se espalhar para outras partes do corpo, tornando-se uma condição altamente invasiva e metastática (ZHAO et al., 2023).

Vale ressaltar que o melanoma é um tipo de câncer influenciado por múltiplos fatores, incluindo tanto elementos extrínsecos, como o ambiente, quanto fatores intrínsecos, como a predisposição genética (READ; WADT; HAYWARD, 2016). Sob uma perspectiva molecular, o melanoma é caracterizado por uma variedade de mutações somáticas que podem impulsionar a progressão da doença. Essas alterações geralmente afetam genes essenciais em processos como proliferação celular, crescimento, metabolismo, determinação da identidade celular, controle da apoptose, regulação do ciclo celular e senescência, como o *BRAF* e o *NRAS*. O acúmulo dessas mutações segue padrões específicos, dando origem a diferentes vias de progressão da doença e resultando nos diversos subtipos de melanoma (SHAIN; BASTIAN, 2016). Todos os melanomas, sem exceção, apresentam múltiplas alterações genéticas que afetam mais de uma via biológica (YEH; BASTIAN, 2021). A classificação do melanoma se baseia na espessura do tumor (pontuação de Breslow), no envolvimento dos gânglios linfáticos e na presença de metástases. Esses fatores dividem a gravidade do melanoma em quatro estágios: estágio I e II para doença localizada e estágio III e IV para metástases para os linfonodos locais ou metástases à distância, respectivamente (VILLANI et al., 2022).

Embora a ressecção local ainda seja o principal método de tratamento para o melanoma, é importante ressaltar que o prognóstico geralmente é desfavorável. O uso da quimioterapia marca um importante avanço do melanoma, no entanto, é importante destacar que as reações adversas e desenvolvimento de resistência tumoral são suas grandes limitações (MOSER; GROSSMAN, 2018). Os primeiros avanços foram alcançados com o desenvolvimento de inibidores de tirosina quinase, como o Dabrafenide, que visa a proteína mutada *BRAF*. Embora essa abordagem tenha demonstrado melhorias clínicas e gerado poucos efeitos adversos, o benefício obtido ainda parece ser temporário, uma vez que uma parte dos pacientes eventualmente desenvolve resistência ao medicamento, levando a recidiva e progressão da doença (FLAHERTY et al., 2012). Essa realidade contrasta com os avanços terapêuticos mais consistentes observados em outros tipos de tumores sólidos e doenças onco-hematológicas, especialmente através do uso do inibidor de tirosina quinase ibrutinibe (IBR) (ROSKOSKI, 2024).

Alterações genéticas, incluindo translocações, mutações e superexpressão, desempenham papel crucial na patogênese de diversas doenças, através da desregulação da atividade da proteína

quinase. Por isso, as proteínas quinases emergem como alvos terapêuticos fundamentais no século 21 (ROSKOSKI, 2024).

O IBR é um dos poucos inibidores de tirosina quinase que têm sido explorados no tratamento de câncer sólido e não sólido, tendo como seu principal alvo a tirosina quinase de Bruton (BTK) (PAN et al., 2007; PAYDAS, 2019). O IBR atua principalmente na BTK, ligando-se ao aminoácido Cys-481 no domínio de ligação ao ATP. A BTK é essencial para a via de sinalização do receptor de antígeno nas células B, sendo um eficiente quimioterápico para leucemias que envolvem este tipo celular.

Ao longo dos anos, outros alvos foram gradualmente descritos para o IBR, como a quinase indutora de IL-2 (ITK), que influencia a ativação da via de sinalização de NF-KB. É relevante notar que o resíduo de cisteína alvo do ibrutinib também está presente em outras proteínas tirosina quinase, permitindo sua ação em diversos outros alvos moleculares, como membros da família TFK (quinases da família Tec) (ITK, TEC [*Tyrosine-protein kinase*], BMX [*Cytoplasmic tyrosine-protein kinase*] e RLK [*Receptor-like kinases*] / TXK [*TXK tyrosine kinase*]), quinases da família EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*) (EGFR, ERBB2 [*Human epidermal growth factor receptor 2*] / HER2 [*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*] e ERBB4 [*Receptor tyrosine-protein kinase erbB-4*] / HER4 [*Human Epidermal growth factor Receptor-type 4*]) e outras quinases, como BLK (*Tyrosine-protein kinase*) e JAK3 (*Janus Kinase 3*) (SINGH; PETTER; KLUGE, 2010). O IBR foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para tratar várias condições, incluindo linfoma de células do manto, leucemia linfocítica crônica, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de zona marginal e doença crônica do enxerto contra hospedeiro após transplante de células-tronco.

Geralmente bem tolerado, o IBR oferece respostas rápidas e duradouras, embora possa causar efeitos colaterais, que variam de leves a graves. Os efeitos colaterais mais comuns do IBR são: diarreia, infecção do trato respiratório superior, sangramento, fadiga e efeitos colaterais cardíacos, sendo algum desses efeitos de maior importância, como sangramentos e alterações cardíacas. Apesar do efeito terapêutico do IBR ter se mostrado efetivo para determinadas indicações terapêuticas, existe uma taxa de descontinuação da terapia entre 11 e 50% (PAYDAS, 2019). A biodisponibilidade oral do ibrutinib é restrita devido ao seu intenso metabolismo de primeira passagem e sua baixa solubilidade, levando à disponibilização em formas farmacêuticas de alta

dose para compensar essa limitação (SHAKEEL et al., 2015). Sendo assim, é interessante considerar a aplicação tópica desta terapia no tratamento do melanoma, como já sugerido na literatura para certos quimioterápicos (CSÁNYI et al., 2019), trazendo como benefício a redução ou completa eliminação de efeitos colaterais relacionados à administração oral. Para isso, são necessários estudos sobre a toxicidade, irritação e absorção cutânea deste composto, uma vez que não há literatura que descreva o uso dessa droga para aplicação tópica na pele.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. A pele e suas estruturas

A pele é um órgão complexo constituído por múltiplas camadas de tecido e vários tipos de células, como melanócitos, células endoteliais, queratinócitos, fibroblastos e células imunes associadas. Ela também possui uma alta densidade de matriz extracelular (MEC), que contribui para sua resistência e flexibilidade. Mais de um século de pesquisas sobre a pele e sua estrutura tem proporcionado uma compreensão cada vez mais detalhada deste órgão, incluindo sua microanatomia e a diversidade de células imunitárias e outras que contém (DYRING-ANDERSEN et al., 2020).

Atuando como uma barreira protetora vital entre o organismo e o ambiente, além de evitar perdas de água e eletrólitos e reduzir a penetração de substâncias químicas, a pele nos protege contra microrganismos nocivos. A pele desempenha ainda um papel crucial na regulação da temperatura corporal e na defesa imunológica (KHAVKIN; ELLIS, 2011a; WONG et al., 2016b).

Sendo composta por três camadas principais - epiderme, derme e hipoderme - e abriga uma variedade de células que desempenham papéis essenciais na sua estrutura e função (figura 1). Entre essas células estão os queratinócitos e fibroblastos, que são os principais componentes da epiderme e derme, respectivamente. Além disso, existem células especializadas, como células imunes, células de Merkel e melanócitos, que desempenham funções específicas na pele (STRASHILOV; YORDANOV, 2021).

Na superfície da pele, a epiderme atua como uma armadura do corpo. É uma fina camada de epitélio escamoso estratificado que repousa sobre uma membrana basal da matriz extracelular, separando-a da derme subjacente, derivada do mesênquima, e de seus apêndices, como os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas (FUCHS; RAGHAVAN, 2002). A epiderme é resistente, capaz de suportar os traumas físicos e químicos do dia a dia, e como um tecido autorrenovável, possui capacidade proliferativa suficiente para regenerar uma nova epiderme que cobre a superfície do corpo (BARONI et al., 2012).

Sendo um epitélio em constante renovação, a epiderme é subdividida em camadas ou estratos. A camada mais profunda é a camada basal, localizada logo acima da derme. Acima dela, encontram-se a camada espinhosa e a camada granular. A camada mais superficial é o estrato córneo (BARONI et al., 2012).

A camada basal da pele é a camada mais profunda da epiderme, em contato direto com a derme subjacente. Ela é composta por uma única fileira de células cúbicas ou colunares e contém queratinócitos em mitose contínua, responsáveis pela renovação celular. Também abriga melanócitos, que produzem melanina, e células de Merkel, associadas à percepção sensorial. As células da camada basal são responsáveis pela renovação contínua da epiderme, com 15% delas constantemente envolvidas neste processo. As células restantes estão em estado de repouso ou quiescentes, entrando em ação quando é necessária uma maior proliferação, como em processos regenerativos. Na epiderme saudável, um equilíbrio entre os processos de proliferação e descamação resulta em uma renovação completa da epiderme aproximadamente a cada 28 dias (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

A camada espinhosa, localizada logo acima da camada basal, é formada por várias camadas de células poliédricas que se tornam mais achatadas à medida que se movem para a superfície. Suas células estão interligadas por desmossomos, conferindo resistência mecânica, e também contêm células de Langerhans, que participam da resposta imunológica. A camada granulosa, situada acima da camada espinhosa, é composta por 2 a 5 camadas de células achatadas que começam a morrer e contêm grânulos de querato-hialina. Esses grânulos se acumulam e liberam substâncias que contribuem para a formação de uma barreira impermeável e o endurecimento das células. A camada lúcida, presente apenas em pele espessa (como nas palmas das mãos e solas dos pés), fica entre a camada granulosa e o estrato córneo. É uma fina camada de células claras e anucleadas que fornece uma proteção adicional em áreas sujeitas a fricção intensa. A camada córnea é a camada mais externa da epiderme. É composta por várias camadas de células mortas, achatadas e anucleadas (corneócitos), impregnadas de queratina. Esta camada atua como uma barreira física, protegendo contra traumas, patógenos e perda de água. As células descamam continuamente, sendo substituídas por novas células provenientes das camadas mais profundas (BARONI et al., 2012; KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011).

O tipo celular predominante na epiderme é o queratinócito, que é nucleado e viável desde a camada basal até a camada granular (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008). Os queratinócitos sintetizam e expressam diversas proteínas estruturais e lipídios ao longo de sua maturação. Durante as etapas finais de sua diferenciação, eles sofrem alterações profundas em sua estrutura, transformando-se em células escamosas planas e anucleadas do estrato córneo. Essas células atuam principalmente com filamentos de queratina, circundados por um envelope lipídico ligado covalentemente. Os desmossomos, que conectam queratinócitos adjacentes, são essenciais para a coesão celular nas camadas nucleadas, sendo eliminados durante o processo de descamação (BARONI et al., 2012).

Além dos queratinócitos, a epiderme abriga outros tipos de células importantes, presentes tanto como populações residentes quanto populações transitórias, relacionadas à resposta imune. Estas incluem células de Langerhans, células de Merkel, melanócitos e linfócitos. Esses tipos celulares migram para a epiderme no início da embriogênese (melanócitos e células de Langerhans), ao longo da vida após estímulo (linfócitos), ou ainda se diferenciam *in situ*, provavelmente a partir de uma célula progenitora ectodérmica/queratinócito (células de Merkel) (BARONI et al., 2012; WICKETT; VISSCHER, 2006).

As células de Langerhans, derivadas da medula óssea, são elementos imunocompetentes cruciais para a barreira imunológica da epiderme e participam principalmente da dermatite alérgica de contato. As células de Merkel estão envolvidas na constituição do componente nervoso sensorial da pele, contribuindo para a percepção tátil. Os melanócitos, originários da crista neural, residem na camada basal da epiderme. Eles produzem grânulos de pigmento chamados melanossomas, que contêm melanina. A função principal dos melanócitos é proteger a pele da radiação ultravioleta e dar cor à pele. Os melanossomas, uma vez transferidos para os queratinócitos, protegem o núcleo dessas células contra os danos causados pela luz ultravioleta. Linfócitos e leucócitos polimorfonucleares também podem ser encontrados na epiderme em condições anormais, atuando como componentes do sistema imunológico celular da pele e participando de respostas imunológicas específicas (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011; WICKETT; VISSCHER, 2006).

A derme é a camada intermediária da pele, situada entre a epiderme e a hipoderme (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010). É composta principalmente por tecido conjuntivo e é responsável

por conferir resistência e elasticidade à pele. É uma camada de tecido conjuntivo que se encontra externamente pela junção com a epiderme e internamente pela gordura subcutânea. Sua espessura varia amplamente, sendo menos de 1 mm nas pálpebras e mais de 5 mm nas costas. Sendo composta por duas regiões principais: a derme papilar e a derme reticular. A derme papilar é a camada superior, fina e contígua com as cristas da epiderme. Abaixo dela, encontra-se a derme reticular. Os constituintes principais da derme incluem células, substância fundamental e fibras. A substância fundamental é composta por polissacarídeos e proteínas que interagem para formar macromoléculas proteoglicanas, que têm propriedades higroscópicas. As células predominantes são os fibroblastos, responsáveis pela síntese das fibras de colágeno e elastina. O colágeno é o componente principal, representando 75% do peso seco e até 30% do volume da derme, com predominância de colágeno tipo I (75%) e colágeno tipo III (15%) (KHAVKIN; ELLIS, 2011b).

Os fibroblastos são células predominantes na derme, responsáveis por sintetizar e remodelar a MEC. Uma de suas características distintivas é a capacidade de remodelação, que é apoiada pela produção de metaloproteinases de clivagem e seus inibidores. A síntese de colágeno tipo I é a principal e unificadora característica dos fibroblastos (RIPPA; KALABUSHEVA; VOROTELYAK, 2019).

Na derme, encontramos uma série de estruturas importantes que contribuem para a função e proteção da pele. Estas incluem vasos sanguíneos e linfáticos, assim como as estruturas anexas, como glândulas sebáceas e sudoríparas, além dos folículos pilosos e a origem das unhas. Essas estruturas são compostas por queratina e desempenham papéis essenciais na proteção e na melhoria da função tátil da pele (VENUS; WATERMAN; MCNAB, 2010).

A hipoderme, localizada abaixo da derme e acima do músculo subjacente, desempenha papéis cruciais na termorregulação, atua como um reservatório de células progenitoras e participa de importantes sinalizações parácrinas e endócrinas. Principalmente composta por tecido adiposo, a hipoderme passa por mudanças significativas na sua conformação com o avançar da idade. A gordura subcutânea desempenha um papel crucial na proteção da pele contra as altas tensões mecânicas concentradas nos tecidos ósseos, como nos pés. A perda de gordura subcutânea com o envelhecimento torna a pele dos indivíduos idosos mais suscetível a altas pressões mecânicas, isquemia tecidual local e formação de úlceras (BLAIR et al., 2020).

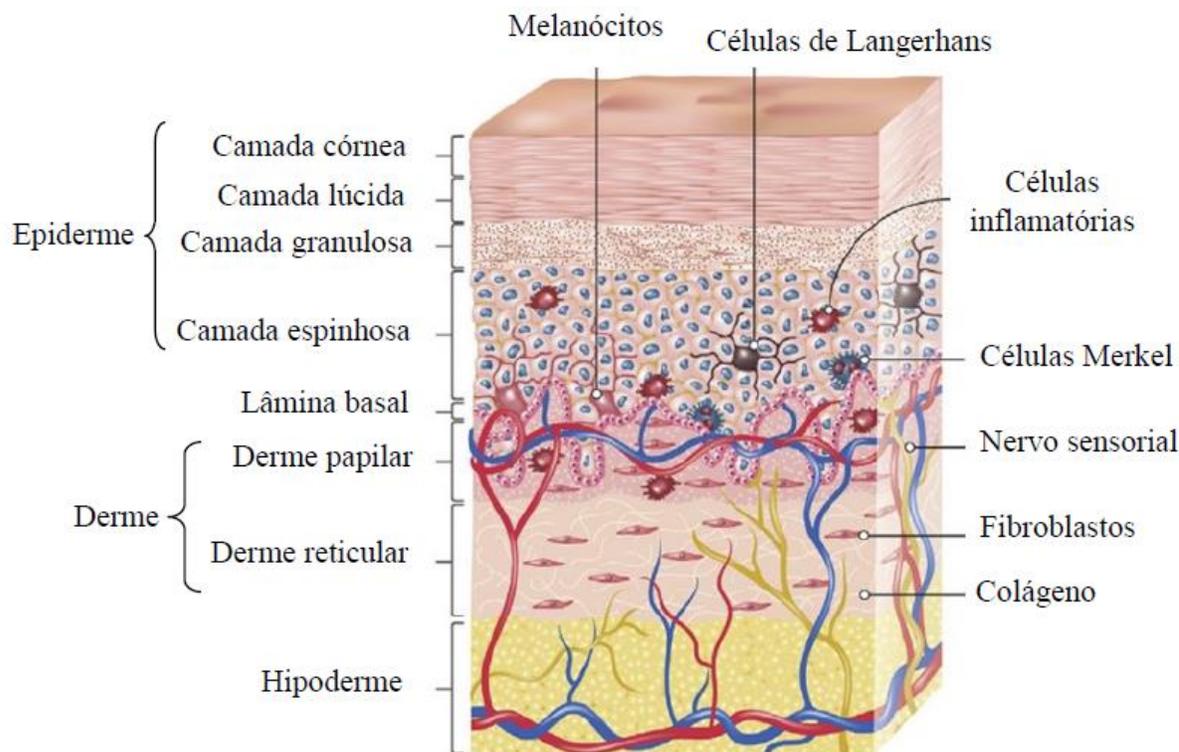


Figura 1: Estrutura da pele e os tipos celulares que a constituem. Fonte: Adaptado de RAHMATI et al., 2020.

2.2. MELANOMA

O melanoma é reconhecido como a forma mais agressiva e desafiadora de câncer de pele, resultante de mutações na linhagem celular dos melanócitos epidérmicos (ZHAN et al., 2024). Sua notoriedade reside na capacidade significativa de se espalhar para outras partes do corpo, tornando-o uma condição altamente invasiva e metastática (ZHAO et al., 2023). Apesar de representar apenas 1% dos casos de câncer de pele, o melanoma é responsável por mais de 80% das fatalidades relacionadas a esse tipo de câncer (LONG et al., 2023; SAGINALA et al., 2021) et al., 2021). No Brasil, no ano de 2023, o número de novos casos de melanoma é estimado em 8.980, o que representa um risco de 4,13 por 100 mil habitantes. Dentre esses casos, 4.640 ocorrem em homens e 4.340 em mulheres. Isso se traduz em um risco estimado de 4,37 casos novos por 100 mil homens e 3,90 por 100 mil mulheres (INCA, 2023).

O melanoma surge de transformações malignas dos melanócitos, células responsáveis pela produção de pigmentos. Quando localizado na camada basal da epiderme da pele, é denominado melanoma cutâneo, sendo o mais comum. No entanto, como os melanócitos estão presentes em

diversas partes do corpo, como olhos, ouvidos, trato gastrointestinal, genitália, sistema urinário e meninges, também podem ocorrer casos de melanoma em mucosas ou outros tipos, como o melanoma ocular (STRASHILOV; YORDANOV, 2021).

A produção de melanina pelos melanócitos é uma característica única dessas células, e a patogênese do melanoma cutâneo está diretamente relacionada às propriedades da melanina. A melanina possui um complexo de propriedades antioxidantes e pró-oxidantes. Sua conversão de antioxidante para agente pró-oxidante, sob a influência de diversos fatores etiológicos como radiação UV, metais pesados, herbicidas, entre outros, é o evento patogênico crítico e inicial que desencadeia a carcinogênese. A ação pró-oxidante da melanina resulta no aumento dos níveis de radicais de oxigênio intracelular, causando danos à molécula de DNA dos melanócitos. Essas mutações resultam na ativação excessiva de diversas vias de sinalização celular, levando à proliferação descontrolada, desdiferenciação e imortalização de tipos celulares específicos (STRASHILOV; YORDANOV, 2021).

O melanoma é frequentemente classificado em estágios com base em critérios como a espessura do tumor, o envolvimento dos linfonodos e a presença de metástases. A classificação do melanoma é baseada na espessura do tumor (escore de Breslow), no envolvimento de linfonodos e na presença de metástases. Esses critérios dividem a gravidade do melanoma em quatro estágios: estágios I e II representam a doença localizada, enquanto os estágios III e IV indicam metástases para linfonodos locais ou metástases à distância, respectivamente (VILLANI et al., 2022). O sucesso do tratamento é fortemente influenciado pelo estágio de diagnóstico, com lesões localizadas apresentando uma alta taxa de sobrevida relativa em 5 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2024).

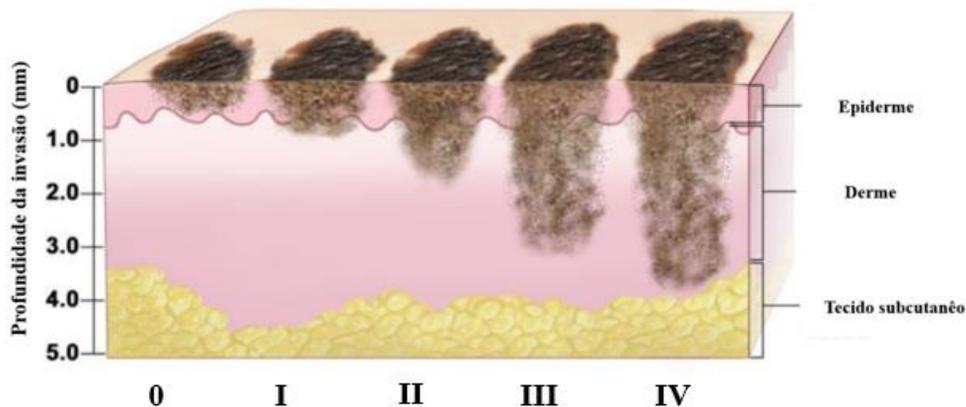


Figura 2: Representação dos estágios do melanoma. (0) Melanoma *in situ*. (I) e (II) Melanoma localizado. (III) Melanoma com metástase em linfonodos locais. (IV) Melanoma com metástase a distância. Fonte: Adaptado de NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI), 2021.

Um diagnóstico precoce e preciso do melanoma é essencial, pois os melanomas finos têm um prognóstico mais favorável em comparação com os melanomas espessos. Isso se deve ao fato de que os melanomas finos geralmente representam lesões precoces que ainda não desenvolveram a capacidade biológica de se metastatizar. Portanto, quando tratados adequadamente, a maioria dos melanomas finos pode ser curada. Por outro lado, a maioria dos melanomas avançados tende a ser letal, apesar dos recentes avanços em imunoterapias direcionadas. A distinção entre tumores melanocíticos benignos e malignos pode ser feita com relativa facilidade por meio de histopatologia tradicional (LEACHMAN et al., 2017).

O desenvolvimento do melanoma é frequentemente resultado de uma interação complexa entre fatores genéticos e ambientais (STRASHILOV; YORDANOV, 2021). Fatores de risco genéticos incluem história familiar de melanoma, presença de certos genes associados ao câncer de pele e características fenotípicas, como pele clara, cabelos claros e olhos claros, que aumentam a sensibilidade à radiação ultravioleta. Fatores ambientais incluem exposição excessiva à radiação ultravioleta, seja por exposição solar intensa ou uso de camas de bronzamento, história de queimaduras solares graves, imunossupressão, exposição a produtos químicos carcinogênicos, como arsênio, e outros fatores relacionados ao estilo de vida, como tabagismo e dieta.

O prognóstico do melanoma também é influenciado por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos (READ; WADT; HAYWARD, 2016). Molecularmente, o melanoma é caracterizado por várias mutações somáticas que impulsionam a progressão da doença. Essas mutações frequentemente afetam genes como *BRAF* e *NRAS*, que são essenciais para a proliferação celular, crescimento, metabolismo, determinação da identidade celular, controle da apoptose, regulação do ciclo celular e senescência. O acúmulo dessas mutações segue padrões específicos, originando diferentes vias de progressão da doença e resultando em subtipos distintos de melanoma (SHAIN; BASTIAN, 2016).

Os melanomas contêm múltiplas alterações genéticas que afetam diversas vias de sinalização. Isso reflete a presença de vários mecanismos supressores de tumor em organismos de vida longa, como os humanos. A progressão do melanoma normalmente ocorre em etapas discretas, à medida que essas vias são gradualmente corrompidas. Esse processo pode resultar em neoplasias parcialmente transformadas, nas quais a progressão é interrompida temporária ou permanentemente (YEH; BASTIAN, 2021).

Exemplos disso são os nevos melanocíticos, que são proliferações clonais de melanócitos que adquiriram uma mutação promotora de proliferação, mas mantêm mecanismos supressores de tumor, resultando em um estado estável. Na maioria dos nevos, essa mutação é *BRAF V600E*, que ativa fortemente a via *MAPK (Mitogen activated protein kinase)*. Outras mutações que iniciam o nevo afetam diferentes componentes da via *MAPK*, e como essas mutações são suficientes para ativar a via, geralmente apenas uma delas está presente em um determinado nevo (YEH; BASTIAN, 2021).

A progressão ocasional de um nevo ocorre quando uma das células constituintes adquire uma mutação adicional que supera o mecanismo de restrição da proliferação. Isso normalmente envolve a inativação de *CDKN2A* ou a mutação do promotor *TERT*, destacando a importância da senescência replicativa e induzida por oncogenes para manter essas neoplasias benignas sob controle. Esses fatores ajudam a explicar por que alguns nevos permanecem benignos enquanto outros progridem para melanoma maligno. Além disso, os melanomas avançados geralmente apresentam uma combinação complexa de mutações adicionais que afetam várias vias de

sinalização, incluindo a via PI3K/AKT, a via de sinalização de receptores de tirosina-quinase, e outras vias de reparo de DNA e apoptose (YEH; BASTIAN, 2021).

2.3. Alternativas terapêuticas para o melanoma

A remoção cirúrgica do tumor e do tecido circundante é o principal tratamento para melanoma localizado. Para tumores com mais de 0,8 mm de espessura ou ulcerados, realiza-se biópsia do linfonodo sentinela. Se houver células de melanoma nos linfonodos sentinela, os linfonodos restantes na área podem ser removidos. Embora a ressecção local continue a ser o principal método de tratamento do melanoma, o prognóstico geralmente permanece desfavorável, tornando essencial a adoção de tratamentos combinados (MOSER; GROSSMAN, 2018). Em casos de melanoma metastático, por exemplo, a cirurgia pode ser usada, mas não é curativa e precisa ser complementada por outros tratamentos, como a quimioterapia (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

O tratamento quimioterápico para pacientes com melanoma tem sido historicamente limitado em termos de eficácia. Antes do advento da imunoterapia e das terapias direcionadas, a quimioterapia era uma das poucas opções disponíveis para melanoma metastático. A dacarbazina foi o agente quimioterápico mais amplamente utilizado para melanoma e é aprovada pelo FDA para este fim. No entanto, as taxas de resposta à dacarbazina são geralmente baixas, variando de 10% a 20%, e as respostas duradouras são raras (MIDDLETON et al., 2000).

Outros agentes quimioterápicos, como temozolomida, cisplatina, vinblastina e carmustina, também foram usados, frequentemente em combinações conhecidas como "*biochemo*" quando combinados com interleucina-2 (IL-2) e interferon, mas com sucesso limitado (PATEL et al., 2011).

A introdução da imunoterapia (como os inibidores de *checkpoint* PD-1 e CTLA-4) e das terapias direcionadas (como os inibidores de BRAF e MEK) revolucionou o tratamento do melanoma, tornando a quimioterapia uma opção de segunda linha ou de resgate para muitos pacientes. A quimioterapia ainda pode ser usada em casos específicos, especialmente quando outras terapias não são eficazes ou não estão disponíveis, mas não é mais a abordagem padrão para o tratamento de melanoma avançado (ATKINS et al., 2008; HAMID et al., 2019; LONG et al., 2016).

Diversas terapias direcionadas foram desenvolvidas para tratar os defeitos moleculares no melanoma. Entre as mais promissoras estão os inibidores de BRAF, vemurafenib e dabrafenib, aprovados em 2011 e 2013, respectivamente, para melanomas metastáticos e irrecutíveis com mutação BRAF. Embora eficazes para cerca de metade dos pacientes, a maioria desenvolve resistência secundária em pouco tempo. Os mecanismos dessa resistência têm sido estudados e novas medicações e combinações de tratamentos estão sendo desenvolvidas para obter efeitos mais duradouros (DAVIS; SHALIN; TACKETT, 2019).

Os primeiros progressos foram alcançados com a introdução de inibidores da tirosina quinase, como o dabrafenib, que têm como alvo a proteína BRAF mutada. Essa abordagem demonstrou melhorias clínicas com poucos efeitos adversos, mas o benefício tende a ser temporário, já que muitos pacientes desenvolvem resistência ao medicamento, resultando em recidiva e progressão da doença (FLAHERTY et al., 2012). Esse cenário contrasta com os avanços terapêuticos mais consistentes observados em outros tipos de tumores sólidos e doenças onco-hematológicas, principalmente com o uso do inibidor de tirosina quinase IBR, no qual atua inibindo as via TFK (ITK, TEC, BMX e RLK), também nas quinases da família EGFR (EGFR, ERBB2, HER2, ERBB4) e outras quinases como, BLK e JAK3 (ROSKOSKI, 2024; SINGH; PETTER; KLUGE, 2010).

A diversidade de alvos do ibrutinib proporcionou um melhor entendimento dos processos biológicos que podem ser modulados por este inibidor, além da clássica inibição da via BTK. Alguns efeitos anticâncer promovidos pelo ibrutinib ocorrem através da via EGFR, como demonstrado em modelos de câncer de esôfago, pulmão e fígado, onde o inibidor contribui para reduzir a proliferação celular, a migração e induzir a morte das células tumorais (LIN et al., 2020; LUO et al., 2021; WU et al., 2015). Em modelos de câncer de mama, o uso de ibrutinib inibe a fosforilação de HER2, BTK, Akt e Erk, induzindo a clivagem de caspase 3 e a morte celular (WANG et al., 2016b). A inibição de BTK pelo ibrutinib em modelos experimentais de câncer gástrico também está associada à redução tumoral, tanto pelo controle da proliferação celular quanto pela indução de morte celular (WANG et al., 2016a).

2.4. Inibidores de Tirosina Quinase

No genoma humano, foram identificadas noventa tirosinas quinases, das quais cinquenta e seis são tirosina quinases receptoras e trinta e duas são tirosina quinases celulares (SHYAM SUNDER; SHARMA; POKHAREL, 2023). Elas desempenham papéis essenciais em diversos processos celulares ao catalisar a transferência de grupos fosfato de moléculas de ATP (adenosina trifosfato) para substratos específicos. Essa fosforilação pode ativar ou inativar proteínas, alterando suas funções e, assim, regulando várias vias celulares (WANG et al., 2016b).

Na proliferação celular, as quinases são fundamentais na regulação do ciclo celular. Por exemplo, as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) controlam a progressão pelas diferentes fases do ciclo celular, como a transição de G1 para S e a entrada na mitose, etapas críticas para a replicação e divisão celular. Quinases como a AKT também desempenham um papel crucial na promoção da sobrevivência celular ao inibir vias apoptóticas. A ativação da via PI3K/AKT é essencial para a inibição da apoptose e a promoção da sobrevivência celular, protegendo as células contra diversos tipos de estresse e danos (MANNING; CANTLEY, 2007; SHARIATI; MERIC-BERNSTAM, 2019).

Além disso, as quinases estão envolvidas na diferenciação de células-tronco em tipos celulares específicos. A via MAPK/ERK, por exemplo, é importante na diferenciação de várias células, incluindo neurônios e células musculares. A regulação precisa desses processos é vital para o desenvolvimento e a manutenção dos tecidos. Na movimentação e migração celular, a sinalização por quinases, como as quinases da família Src e FAK (quinase de adesão focal), regula a reestruturação do citoesqueleto, permitindo a migração celular. Isso é crucial em processos como cicatrização de feridas, resposta imunológica e metástase do câncer, onde a mobilidade celular desempenha um papel fundamental (PEARSON et al., 2001).

Quinases também regulam o metabolismo celular, ajustando as atividades metabólicas conforme necessário. A AMPK (proteína quinase ativada por AMP) é um exemplo de sensor de energia que responde a mudanças nos níveis de ATP e regula o metabolismo energético, promovendo a produção de ATP e inibindo processos anabólicos que consomem energia. Na resposta ao estresse e reparação de DNA, quinases como a ATM e ATR são ativadas em resposta a danos no DNA, iniciando vias de sinalização que resultam na parada do ciclo celular e na ativação de mecanismos de reparo de DNA. Esse processo é crucial para manter a integridade genética e

prevenir a propagação de danos (HARDIE, 2007; MITRA; HANSON; SCHLAEPFER, 2005; SHILOH, 2003).

Por fim, as quinases desempenham um papel importante na regulação da resposta imunológica. Elas estão envolvidas na ativação e diferenciação de células imunes, bem como na mediação de respostas inflamatórias. A função apropriada dessas quinases é essencial para uma resposta imunológica eficaz e equilibrada. Em resumo, as quinases são reguladoras versáteis e críticas de diversos processos celulares, incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação, migração, metabolismo e resposta ao estresse (NEWTON; TURKA, 2012; SMITH-GARVIN; KORETZKY; JORDAN, 2009).

Os inibidores de tirosina quinase (ITQs) utilizados em terapias direcionadas são projetados para interromper as vias celulares que regulam o crescimento de células malignas. Esses ITQs podem ser classificados em pequenas moléculas e macromoléculas, como anticorpos monoclonais, polipeptídeos, conjugados anticorpo-fármaco e ácidos nucleicos (SHYAM SUNDER; SHARMA; POKHAREL, 2023). Conseqüentemente, as proteínas quinases se tornaram alguns dos alvos terapêuticos mais significativos do século 21 (ROSKOSKI, 2024).

Entre 25-33% dos esforços de desenvolvimento de medicamentos nos Estados Unidos e globalmente têm como alvo essas enzimas. O sucesso clínico do imatinibe no tratamento da leucemia mieloide crônica positiva para o cromossomo Filadélfia, alcançado em 2001, impulsionou a busca por antagonistas terapêuticos de proteínas quinases biodisponíveis por via oral. Esse sucesso notável deve-se ao bloqueio pelo imatinibe da proteína tirosina quinase quimérica ativa BCR-Abl, o defeito bioquímico responsável pela leucemia (ROSKOSKI, 2024).

Os ITQs atuam bloqueando vias de sinalização que envolvem receptores tirosina quinase e/ou quinases intracelulares, fundamentais para a proliferação celular e a angiogênese tumoral. A seletividade de ligação dos diferentes ITQs aos seus alvos influencia sua potência, mecanismo de ação, seletividade e perfil de segurança. Por exemplo, os ITQs de pequenas moléculas podem atravessar a membrana celular para inibir quinases intracelulares diretamente, enquanto os anticorpos monoclonais se ligam a receptores na superfície celular, bloqueando a ativação de sinais de crescimento (SHYAM SUNDER; SHARMA; POKHAREL, 2023).

Além disso, os ITQs têm mostrado eficácia em vários tipos de câncer, incluindo leucemias, linfomas e tumores sólidos, ao interferir nas vias de crescimento específicas das células cancerígenas. Contudo, a resistência ao tratamento e os efeitos colaterais ainda representam desafios significativos, demandando desenvolvimento contínuo de novas gerações de ITQs com maior especificidade e menor toxicidade (EBRAHIMI et al., 2023).

Uma dessas quinases é a tirosina quinase de Bruton (BTK), que está recebendo atenção cada vez maior, uma vez que os inibidores desta quinase (BTKIs) demonstraram efeitos anticancerígenos notáveis em investigações clínicas (ROZKIEWICZ et al., 2023). Recentemente, a BTK foi identificada como um alvo terapêutico promissor. Sendo uma enzima crucial na via de sinalização do receptor de antígeno de células B, desempenha um papel vital no desenvolvimento, diferenciação e funcionamento normal das células B. Além disso, a BTK está envolvida na iniciação, sobrevivência e progressão de distúrbios linfoproliferativos de células B maduras (AKINLEYE et al., 2013).

2.5. IBRUTINIBE

IBR (1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-fenoxifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidinil]-2-propen-1-ona) é um inibidor da tirosina quinase amplamente explorado no tratamento de cânceres sólidos e não sólidos, tendo a tirosina quinase de Bruton (BTK) como seu principal alvo (PAN et al., 2007; PAYDAS, 2019). O IBR é rapidamente absorvido após a administração oral, atingindo o pico médio de concentração plasmática (C_{max}) em 1 a 2 horas, com uma meia-vida de aproximadamente 4 a 6 horas. Ele é principalmente metabolizado pelo citocromo P450 (CYP3A) no metabólito PCI-45227 (PAYDAS, 2019). IBR atua ligando-se ao aminoácido Cys 481 no domínio de ligação ao ATP da BTK, uma enzima essencial para a via de sinalização do receptor de antígeno nas células B. Além disso, IBR inibe a quinase indutora de IL-2 (ITK), afetando a ativação da via NF-κB. O resíduo cisteína alvo da IBR também está presente em outras proteínas tirosina quinases, permitindo sua ação em diversos alvos moleculares, como membros da família TFK (ITK, TEC, BMX e RLK/TXK), quinases da família EGFR (EGFR, ErbB2/HER2 e ErbB4/HER4), e outras quinases, como BLK e JAK3, podendo então, atuar em outros tipos de tumores (SINGH; PETTER; KLUGE, 2010).

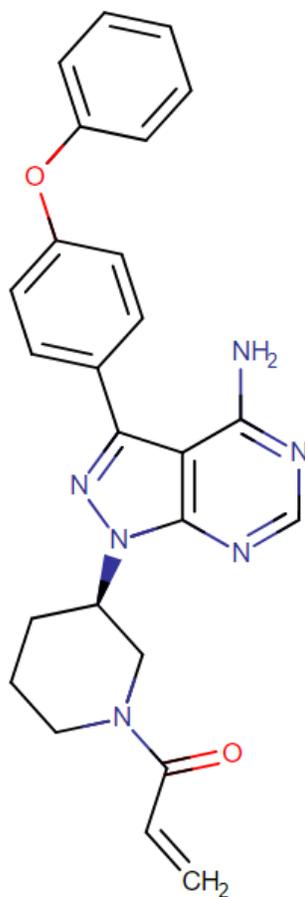


Figura 3: Estrutura molecular do IBR. Fonte: Adaptado de Drugbank, 2023.

O IBR é uma droga aprovado pelo FDA para tratar linfoma de células do manto, leucemia linfocítica crônica, macroglobulinemia de Waldenstrom, linfoma de zona marginal e doença crônica do enxerto contra hospedeiro após transplante de células-tronco, entre outros (PAYDAS, 2019). Embora o IBR tenham sido aprovados pela FDA como tratamento de primeira linha para LLC maligna de células B, já existem estudos demonstrando a utilização dessa droga para o tratamento de tumores sólidos para determinar o seu papel no microambiente tumoral (MESSEX; LIOU, 2021; SUN et al., 2018).

Geralmente bem tolerado, o IBR oferece respostas rápidas e duradouras, embora possa causar efeitos colaterais como diarreia, infecção do trato respiratório superior, sangramento, fadiga e efeitos colaterais cardíacos, como a fibrilação atrial (FA). **Esses eventos geralmente**

são leves (grau I–II). Contudo, a FA e o sangramento são importantes e podem ser graves. Os efeitos colaterais de grau \geq III requerem monitoramento rigoroso. Apesar de sua eficácia terapêutica, a taxa de descontinuação da terapia com IBR varia entre 11% e 50% devido a esses efeitos adversos (PAYDAS, 2019).

Eventos dermatológicos relacionados ao ibrutinib (IBR) são frequentes, mas geralmente de intensidade leve a moderada, incluindo irritação cutânea, hematomas, petéquias, equimoses, abscessos cutâneos, edema periférico, estomatite/mucosite e, em casos graves, eventos hemorrágicos (NOCCO et al., 2022; SIBAUD et al., 2020). Além disso, há relatos na literatura indicando que o IBR pode induzir câncer de pele, embora esses dados sejam controversos e mais estudos sejam necessários para esclarecer seus efeitos colaterais na pele.

O IBR tem uma especificidade limitada e também afeta outras quinases, como o receptor do fator de crescimento endotelial, o que sugere que a droga pode causar toxicidades cutâneas (SUN et al., 2022). Pacientes em tratamento com IBR podem desenvolver uma variedade de manifestações cutâneas. Entre elas estão:

Irritação Cutânea e Dermatite:

A irritação cutânea e a dermatite são comuns, muitas vezes apresentando-se como erupções cutâneas que podem variar de leves a moderadas em intensidade. Essas reações geralmente ocorrem nas primeiras semanas de tratamento e podem ser gerenciadas com corticosteroides tópicos e anti-histamínicos (NOCCO et al., 2022; PAYDAS, 2019; SUN et al., 2022).

Hematomas, Petéquias e Equimoses:

Hematomas, petéquias (pequenos pontos vermelhos devido ao sangramento sob a pele) e equimoses (manchas roxas) são frequentemente relatados e resultam da inibição da agregação plaquetária pelo IBR. Embora esses eventos sejam geralmente de baixo grau, é importante monitorar os pacientes para prevenir complicações hemorrágicas mais graves (NOCCO et al., 2022; PAYDAS, 2019; SUN et al., 2022)..

Abscessos Cutâneos e Infecções:

O desenvolvimento de abscessos cutâneos e outras infecções da pele pode ocorrer devido à imunossupressão induzida pelo tratamento. A prática de uma boa higiene e cuidados com a pele, juntamente com a vigilância regular, são essenciais para o manejo desses efeitos (NOCCO et al., 2022; PAYDAS, 2019; SUN et al., 2022)..

Edema Periférico:

O edema periférico, ou inchaço nas extremidades, é outro efeito adverso que pode impactar a qualidade de vida dos pacientes. Este sintoma é geralmente manejado com medidas de suporte, como elevação dos membros e uso de meias de compressão (NOCCO et al., 2022; PAYDAS, 2019; SUN et al., 2022)..

Estomatite/Mucosite:

A inflamação da mucosa oral, conhecida como estomatite ou mucosite, pode causar desconforto significativo e dificultar a alimentação. O tratamento inclui agentes tópicos e medidas de suporte para aliviar a dor e promover a cicatrização (NOCCO et al., 2022; PAYDAS, 2019; SUN et al., 2022)..

Eventos Hemorrágicos Graves:

Embora raros, eventos hemorrágicos graves podem ocorrer e requerem uma intervenção imediata. A avaliação regular da função plaquetária e o ajuste da dosagem do IBR podem ser necessários para prevenir esses eventos (NOCCO et al., 2022; PAYDAS, 2019; SUN et al., 2022).

2.6. Tratamento Tópico para o melanoma

O tratamento tópico para melanoma é uma abordagem pouco comum, geralmente reservada para casos de melanoma *in situ* ou estágios iniciais, onde a doença está localizada na camada superior da pele e não se espalhou para camadas mais profundas ou para outras partes do corpo. As opções de tratamento tópico incluem: imiquimod, tretinoína, 5-fluorouracil (NAHM et al., 2021; VAIENTI; CALZARI; NAZZARO, 2023).

O tratamento tópico para melanoma, especialmente em casos de melanoma *in situ* ou em estágios iniciais, apresenta algumas vantagens. É uma abordagem minimamente invasiva, evitando

cortes e suturas, o que reduz o risco de complicações cirúrgicas e resulta em menos cicatrizes, melhorando os resultados estéticos, especialmente em áreas visíveis como o rosto. Além disso, muitos tratamentos tópicos podem ser aplicados em casa, eliminando a necessidade de hospitalização ou visitas frequentes ao consultório médico, e evitando a dor e o desconforto associados aos procedimentos cirúrgicos. Outra vantagem significativa é a preservação do tecido saudável ao redor da lesão, crucial em áreas onde a remoção cirúrgica pode ser desfigurante ou comprometer a função. Tratamentos tópicos também podem ser utilizados como adjuvantes após a cirurgia para eliminar células cancerígenas residuais, potencialmente melhorando as taxas de cura. Eles oferecem uma alternativa viável para pacientes não elegíveis para cirurgia devido a condições médicas, idade avançada ou outras contra indicações, proporcionando uma opção de tratamento eficaz para esse grupo (VAIENTI; CALZARI; NAZZARO, 2023).

Embora esses benefícios sejam notáveis, é importante considerar que a eficácia dos tratamentos tópicos pode ser menor em comparação com a cirurgia, com um risco maior de recidiva. A adequação do tratamento tópico deve ser cuidadosamente avaliada por um dermatologista ou oncologista especializado, levando em conta o tipo, localização e estágio do melanoma (SWETTER et al., 2019).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil de irritação e toxicidade do IBR na pele, além de investigar a capacidade de permeação dessa droga através das camadas cutâneas, visando seu potencial uso como medicação tópica no futuro.

3.2. Objetivos específicos

- Estabelecer um protocolo replicável para o isolamento de células primárias da pele a partir do tecido humano.
- Avaliar se as células primárias da pele, queratinócitos e fibroblastos expressam genes-alvo do IBR.
- Determinar o perfil de toxicidade do IBR em células primárias da pele, além de células de melanoma.
- Determinar o perfil de toxicidade e irritação do IBR em modelos de pele humana.
- Avaliar a permeação da droga nas camadas da pele.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

Todos os reagentes foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) e BD Biosciences (New Jersey, EUA).

4.2. Aprovação em comitê de ética

Os procedimentos presentes neste estudo foram aprovados pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade de Brasília (Protocolo nº 30175020.0.0000.5558). As amostras foram obtidas após consentimento dos pacientes.

4.3. Desenho experimental

Neste estudo, os efeitos tóxicos do IBR em fibroblastos e queratinócitos primários humanos foram investigados através de testes de viabilidade celular e apoptose. Foram utilizadas células primárias obtidas por isolamento de pele humana, com experimentos realizados utilizando pelo menos três réplicas biológicas e técnicas. Como parâmetro comparativo, também foi determinada a toxicidade do fármaco em células da linhagem tumoral SKMEL-28 adquiridas da ATCC (*American Type Culture Collection*). Após esta etapa, foram determinadas a toxicidade e a irritação do IBR em culturas organotípicas de explantes de pele humana (*hOSEC*), utilizando testes de viabilidade tecidual e de irritação histológica. Por fim, analisamos a permeação cutânea do IBR utilizando o modelo *hOSEC* para determinar sua dermatocinética. Os métodos realizados em cada experimento são descritos abaixo.

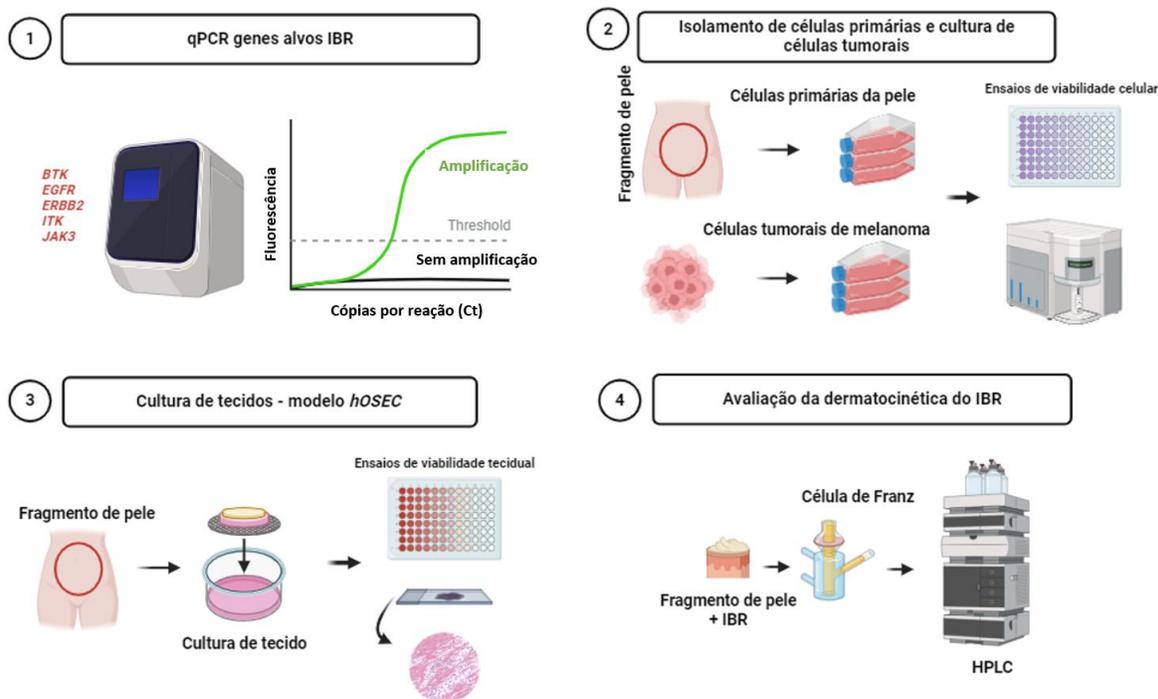


Figura 4: Desenho experimental. Este estudo incluiu 4 fases diferentes. **1.** qRT-PCR de genes alvo IBR para avaliar a expressão gênica desses genes em células primárias de pele humana e melanoma. **2.** Queratinócitos e fibroblastos primários humanos foram isolados e tratados com concentrações crescentes de IBR para realizar ensaios de metabolização do MTT e detecção de apoptose. Células de melanoma também foram investigadas **3.** Modelos *hOSEC* foram utilizados para determinar o perfil de toxicidade e irritação do IBR aplicado topicamente e nos meios de cultura de tecidos em diferentes concentrações. Foi realizado o ensaio de metabolização do TTC, bem como o escore de irritação cutânea por histologia. **4.** Avaliação da dermatocinética IBR em *hOSEC*. A permeação do fármaco foi determinada após 12 e 24 horas da aplicação do IBR utilizando HPLC.

4.4. Isolamento e cultura de células primárias da pele

Queratinócitos e fibroblastos foram isolados de fragmentos de pele humana retirados de pacientes saudáveis submetidos a procedimentos de abdominoplastia.

Após a remoção da hipoderme, foi realizada a desinfecção da pele em PBS + antibiótico e antimicótico a 1% e álcool 70%, então, o tecido foi fragmentado em pequenos pedaços e tratado com solução dispase II (4 mg/mL) preparada em PBS + antibiótico e antimicótico a 1%, durante a noite a 4°C, para separar a derme da epiderme. Em seguida, a solução dispase foi inativada com meio DMEM completo e a derme foi separada da epiderme com auxílio de tesoura e pinça estéreis.

A digestão da epiderme foi realizada com tripsina (0,05 %) por 10 minutos para isolamento dos queratinócitos, e a digestão da derme foi realizada com colagenase tipo II (1 mg/1 mL) por 3 horas para obtenção de fibroblastos.

Os fragmentos resultantes da digestão da epiderme foram filtrados em peneira celular 100 µM e centrifugados a 1.200 rpm por 4 minutos. As células foram ressuspensas em meio KSFM (*Keratinocyte serum-free medium*) e plaqueadas a 1×10^5 células/cm². Para os fibroblastos, após a digestão, a colagenase foi inativada utilizando meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com 10% de SFB. Os fragmentos foram então centrifugados a 2.000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos. As células foram expandidas ao atingir aproximadamente 90% de confluência. Queratinócitos das passagens 1-3 e fibroblastos das passagens 3-5 foram utilizados nos experimentos.

4.5. Detecção qRT-PCR de genes alvo IBR

O RNA total foi isolado de queratinócitos, fibroblastos e células SKMEL28 utilizando o reagente Trizol, seguindo as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi determinada pela leitura de absorbância a 260/280 nm no *Nanodrop One* (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). A integridade do RNA isolado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras foram então transcritas reversamente usando o kit de transcrição reversa de alta capacidade de acordo com as instruções do fabricante.

Os níveis transcritos de mRNA de *EGFR*, *JAK3*, *BTK*, *ITK* e *ERBB2* foram determinados utilizando primers específicos (Tabela 1). O gene calibrador utilizado foi a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), permitindo análise comparativa pelo método $2^{-(\text{DDCt})}$.

Tabela 1: Sequência de primers.

GENE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
<i>GAPDH</i>	ACATCGCTCAGACACCATG	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
<i>EGFR</i>	TTCAGGAGCTGTACGTGCATT	CACAAGCGCTGTGTACCCCT
<i>JAK3</i>	GCCTGGAGTGGCATGAGAA	CCCCGGTAAATCTTGGTGAA
<i>BTK</i>	TCTGAAGCGATCCCAACAGAA	TGCACGGTCAAGAGAAACAGG
<i>ITK</i>	GATCAACTGCCTCCACATTG	GGGCATCACCTCTTAGCACA
<i>ERBB2</i>	CGGGGTTCCCTCCCCTAATG	CGGGGTTCCCTCCCCTAATG

4.6. Ensaio de viabilidade celular

4.6.1. Ensaio de MTT

A viabilidade de queratinócitos, fibroblastos e células de melanoma da linhagem SKMEL-28 foi avaliada pelo método colorimétrico de metabolização do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que se baseia em a capacidade de células viáveis de reduzir o sal de tetrazólio em cristais de formazan (BURANAAMNUAY, 2021). Sete mil células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas de plaqueamento, a aderência celular foi verificada e o meio foi substituído por meio de cultura fresco (KSFM para queratinócitos, DMEM suplementado com SFB e antibióticos para fibroblastos e células SKMEL-28) contendo IBR solubilizado em DMSO em diferentes concentrações (0, 1, 2, 5, 10, 25, 50 e 100 μ M). Após 48 horas de incubação, o meio de cultura foi trocado novamente por 90 μ L de meio fresco mais 10 μ L de solução MTT (5 mg/mL em PBS). Após incubação das placas por 4 horas a 37°C, 5% de CO₂ e protegidas da luz, foram adicionados 100 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais de formazan. A absorbância foi medida em 540 nm (LEITE et al., 2021). Os valores de IC₂₅ e IC₅₀ foram calculados para cada tipo de célula utilizando análise de regressão não linear no GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

4.6.2. Ensaio de detecção de apoptose

O ensaio foi realizado por citometria de fluxo e dois corantes foram utilizados para avaliar a morte celular: Anexina V e Iodeto de Propídio (PI). Para isso, foram plaqueadas 8×10^5 células e, após 24 horas de incubação para adesão à superfície de cultura, o meio de cultura foi trocado por meio de cultura fresco adicionado de IBR nas concentrações IC₂₅ e IC₅₀. Após 48 horas de incubação, as células foram colhidas, coletadas e coradas com os respectivos corantes, conforme instruções do fabricante. Dez mil eventos de cada amostra foram registrados usando o citômetro de fluxo *Attune® NxT Acoustic Focusing Cytometer* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). As células negativas para Anexina V e PI foram consideradas viáveis, enquanto as positivas para Anexina V e negativas para PI, bem como as positivas para ambos os corantes, foram consideradas apoptóticas. Os dados foram analisados utilizando o software *FlowJo 10.0.7* (Treestar, Inc., Ashland, OR, EUA) (LINS et al., 2024).

4.7. Cultura Organotípica de Explante de Pele Humana (*hOSEC*)

Explantos de pele saudáveis foram obtidos de pacientes saudáveis submetidos à abdominoplastia que assinaram o termo de consentimento prévio ao procedimento.

A pele foi desinfetada e a hipoderme removida. Em seguida, foi seccionado com punchs de 6 mm. Os fragmentos foram posicionados sobre uma grade metálica estéril em placas de 6 poços, mantendo a derme em contato com o meio de cultura (DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina) e a epiderme em contato com o ar. Os fragmentos foram incubados a 37°C, 5% CO₂ (LEITE et al., 2021).

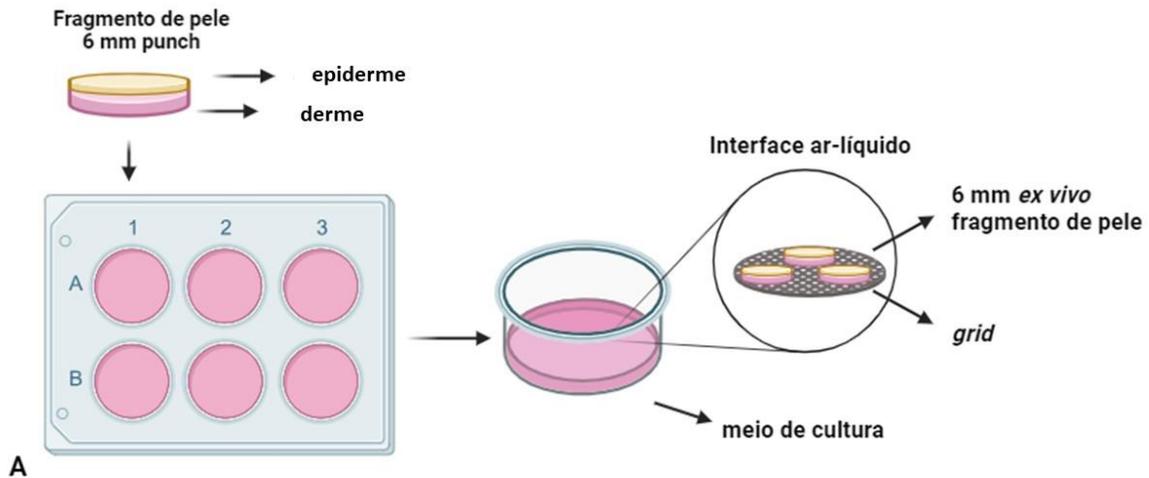


Figura 5: Culturas de explantes de pele organotípica humana. Fragmentos de pele obtidos de doadores saudáveis foram processados e cortados em fragmentos circulares de 6 mm. Os explantes foram mantidos em interface ar-líquido por até 7 dias. Fonte: Autoria própria, 2024.

4.8. Ensaio de viabilidade tecidual

4.8.1. Ensaio de TTC

Para avaliar a viabilidade do *hOSEC*, foi utilizado um método colorimétrico de metabolização do cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio (TTC). O ensaio serve como um indicador do estado metabólico do tecido, utilizado para distinguir entre partes metabolicamente ativas e inativas (VOSTÁLOVÁ et al., 2018). Para tanto, foi realizado o preparo da pele conforme descrito anteriormente. Os fragmentos de pele foram então tratados topicamente com 25 µL de IBR em diferentes concentrações e também tratados com adição de IBR ao meio (0, 10, 25, 50 e 100 µM). Como controle negativo de viabilidade foram adicionados dois grupos experimentais, constituídos por fragmentos de pele tratados com 50% de DMSO e 20% de SDS. Os tratamentos foram mantidos por 48 horas. Após o período de incubação, os fragmentos foram transferidos para uma placa de 24 poços, sendo um fragmento por poço. Em seguida, 1 mL de solução de TTC a 2% diluída em DMEM sem vermelho de fenol foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada novamente por 2 horas. Após esta etapa, os fragmentos foram lavados com PBS e em seguida com uma mistura de etanol 70% e solução de DMSO (1:1, v/v). A extração foi realizada durante a noite, à temperatura ambiente, em agitador de placas protegido da luz. Posteriormente, amostras de 200 µL foram retiradas de cada poço e transferidas para uma placa de 96 poços, onde a absorbância foi medida a 485 nm.

4.8.2. Avaliação histológica de irritação da pele

Alterações histológicas de *hOSEC* foram observadas após os fragmentos de pele serem tratados topicamente com crescentes concentrações de IBR (0, 10, 25, 50 e 100 µM). Como controles positivos de irritação, as amostras foram tratadas com DMSO 50% ou SDS 20%. Após 48 horas, os fragmentos de pele foram fixados em formol a 10% e embebidos em parafina. Foram desidratados em banhos de etanol de grau crescente e clarificados com xileno antes de serem incluídos em parafina, corados com Hematoxilina e Eosina, além de Tricromo de Masson utilizando protocolos padrão. Em seguida, os cortes de tecido foram analisados por um patologista cego para os grupos experimentais. Os resultados da análise histológica foram realizados conforme descrito por Matarrese et al., 2021, sob supervisão de um especialista em patologia. Todas as avaliações foram realizadas de forma independente por um patologista que desconhecia os grupos experimentais, garantindo imparcialidade nas análises. Os cortes transversais foram minuciosamente examinados, observando-se uma variedade de possíveis alterações, classificadas

em uma escala de 0 a 4. Foram estabelecidos critérios específicos para os controles validarem os resultados do experimento, como segue: (1) A qualidade histológica do não tratado os controles devem ser bons o suficiente para permitir uma análise detalhada. (2) Os controles não tratados deverão apresentar resultados histológicos semelhantes, com possíveis alterações como exocitose com ou sem espongiase, edema perinuclear, atribuíveis principalmente a artefatos de preparação. Contudo, tais alterações não devem ultrapassar o grau 2 e/ou comprometer interpretações mais sérias. (3) Os controles positivos para morte (tratados com DMSO ou SDS) devem apresentar alterações mais graves do que os controles negativos não tratados. (4) A gravidade dessas alterações deve ser dose-dependente e, na dose mais alta (100 µM), os explantes de pele devem apresentar lesões pré-necróticas ou necróticas intensas.

Esses critérios foram estabelecidos para garantir a confiabilidade e relevância dos resultados obtidos na análise histológica da irritação cutânea, fornecendo assim uma base sólida para a interpretação dos dados (MATARRESE et al., 2021).

Tabela 2: Pontuação final de tolerância do teste de irritação histológica *ex vivo*.

Tolerância	Comparação histológica entre controles e amostras tratadas com IBR
EXCELENTE	Uma única alteração histológica (1)
MUITO BOM	Pequenas alterações histológicas Uma estrutura única com classificação mais alta (2) em comparação ao controle
BOM	Alterações histológicas Pelo menos 2 estruturas com classificação superior (2) em comparação com o controle
MÉDIO	Alterações histológicas marcadas Uma única estrutura é classificada como 3 ou múltiplas mudanças estruturais classificadas como 2

RUIIM

Alterações histológicas graves

Uma única estrutura é classificada como 4 ou múltiplas alterações estruturais classificadas como 3 ou múltiplas estruturas que não podem ser observadas devido a outras alterações

4.9. Permeação cutânea do IBR e análise dermatocinética

O procedimento de preparação da pele foi conduzido conforme explicado anteriormente. Diferentemente dos experimentos anteriores, os fragmentos foram cortados em círculos com área de aproximadamente 2 cm² e armazenados a 4°C para serem utilizados posteriormente em 30 dias. A concentração de IBR utilizada no experimento foi de 1 mg/mL (2,27 mM). Os fragmentos foram colocados em células de difusão vertical tipo Franz, posicionadas entre os compartimentos doador e receptor. O compartimento receptor foi preenchido com PBS, suplementado com 10% de Tween80 para garantir condições de afundamento, enquanto o compartimento doador foi preenchido com 500 µL de IBR a 1 mg/mL. O sistema foi mantido a 37°C em banho térmico, com agitação moderada (300 rpm) por 12 e 24 horas.

Ao final do experimento, o estrato córneo (EC) e o restante da pele (PR) foram separados pela técnica de *tape stripping*. Resumidamente, os fragmentos de pele foram limpos com água para retirada da solução IBR e fixados em suporte de espuma com o EC voltado para cima. Utilizamos 15 fitas adesivas para retirada do EC, fixando cada fita sobre o tecido e retirando-a com um único movimento. Em seguida, os fragmentos do PR foram cortados em pequenas porções. Cada camada foi colocada individualmente em frascos âmbar contendo 5 mL de metanol para extração do fármaco, mantendo agitação moderada (300 rpm) por 24 horas. Os extratos foram posteriormente levados para análise por HPLC em coluna de fase reversa C18 (150 mm x 4,5 mm, 5 µm), com fase móvel composta por acetonitrila e água acidificada (ácido fosfórico 0,01M) na proporção de 35:65 (v/v). A vazão foi de 1,0 mL/min, o volume de injeção da amostra foi de 20 µL, o forno da coluna foi mantido a 35°C e o fármaco foi detectado a 359 nm, com tempo médio de retenção de IBR de 8,9 minutos. O software Shimadzu LC foi utilizado para adquirir, analisar e gerar relatórios sobre os dados obtidos, previamente validados pelo nosso grupo (ALBUQUERQUE et al., 2024).

4.10. Análise de dados

Os dados da análise histológica foram analisados qualitativamente. Os demais resultados foram analisados quantitativamente. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão (DP) ou erro padrão. As diferenças entre as quantidades liberadas ou penetradas do fármaco de cada formulação foram analisadas por ANOVA, seguida do teste de Tukey. As variáveis “toxicidade”, “migração” e “expressão do gene X” foram testadas quanto à normalidade através do teste de Lilliefors. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas por ANOVA e testes post hoc de Tukey ou Bonferroni. A significância estatística foi fixada em $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Células primárias da pele humana apresentam genes alvo IBR

Primeiro determinamos se os queratinócitos e fibroblastos primários humanos apresentam genes alvo IBR. Através do qRT-PCR, mostramos que ambos os tipos de células primárias apresentam níveis variáveis de níveis de transcrição dos principais genes alvo da IBR, mas em magnitude semelhante à linha celular de melanoma SKMEL-28 (Figura 6A-E). Além disso, foram observadas tendências para maior expressão de *EGFR* em queratinócitos e expressão de *BTK* em fibroblastos.

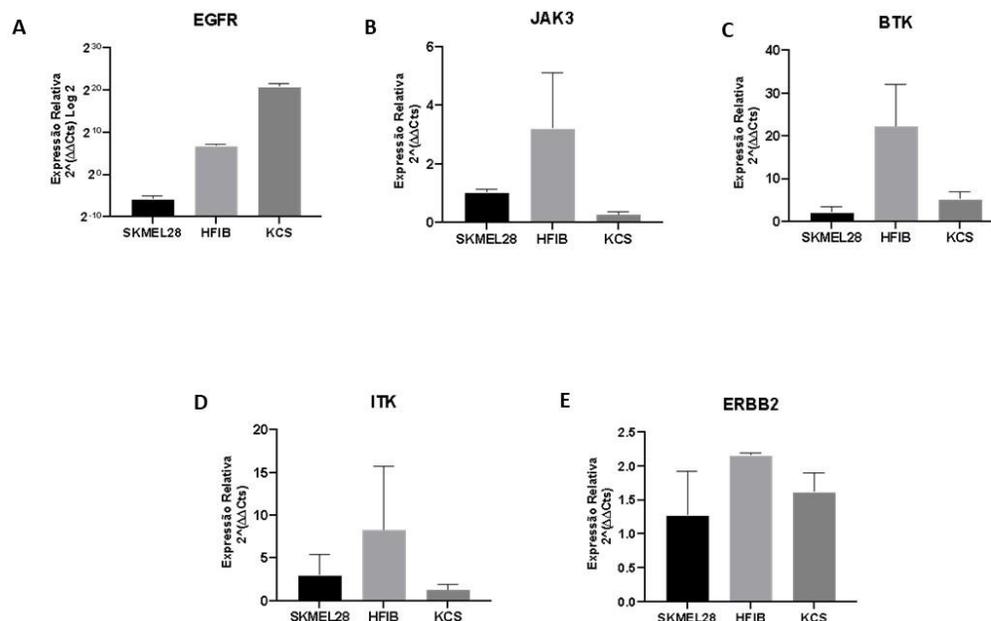


Figura 6: qRT-PCR de genes alvo IBR em células primárias da pele. Os níveis de mRNA de *EGFR* (A), *JAK3* (B), *BTK* (C), *ITK* (D) e *ERBB2* (E) foram determinados em fibroblastos primários humanos (HFIB) e queratinócitos (KCS). Os dados foram normalizados para os níveis de mRNA de SKMEL-28 e são representados com média e erro padrão. Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas.

5.2. Células primárias da pele humana e do melanoma apresentam sensibilidade diferente ao IBR

O ensaio MTT foi utilizado para avaliar a sensibilidade das células ao IBR (Figura 7A-E). Os fibroblastos apresentaram menor sensibilidade à droga em comparação aos demais tipos celulares, enquanto os queratinócitos foram mais sensíveis ao IBR em comparação aos fibroblastos e à linhagem celular de melanoma SKMEL28. A droga reduziu significativamente a viabilidade dos fibroblastos em concentrações >50 μM (0 x 50 μM , $p = 0,0009$; 0 x 100 μM $p < 0,0001$) (Figura 7A). As células epidérmicas primárias apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade quando tratadas com >25 μM IBR ($p = 0,02$) (Figura 7B). Células da linha celular de melanoma SKMEL28 mostraram uma redução na viabilidade celular a partir de 5 μM IBR ($p = 0,0001$) em comparação com o controle (Figura 7C). Os resultados de viabilidade foram utilizados para calcular o IC_{50} do IBR em cada tipo de célula, sendo o IC_{50} do IBR em fibroblastos 31,54 μM , versus 4,60 μM em queratinócitos e 8,22 μM em células SKMEL28 (Figura 7D-E).

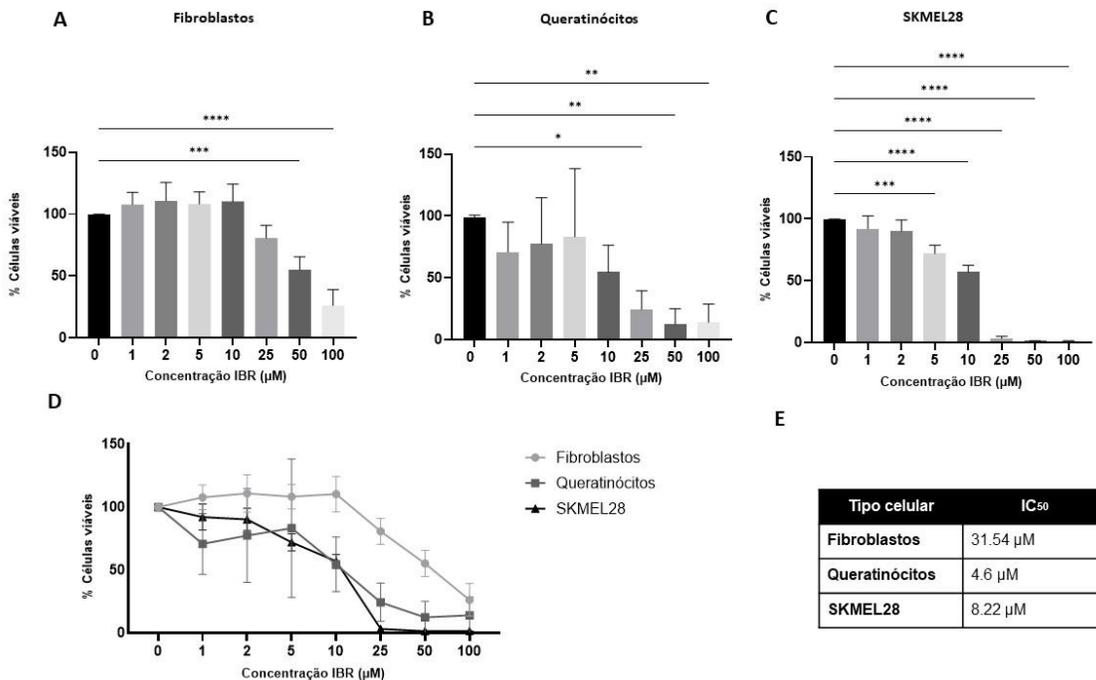


Figura 7: Citotoxicidade do IBR em relação às células primárias da pele humana. Fibroblastos primários da pele humana (A), queratinócitos (B) e células SKMEL-28 (C) foram tratados com doses crescentes de IBR por 48 horas e tiveram sua viabilidade avaliada pelo ensaio MTT. (D) Citotoxicidade dose-resposta do IBR para os diferentes tipos de células testados. Os dados obtidos do ensaio MTT foram utilizados para determinar o IC50 do IBR para cada tipo de célula (E). Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

Resultados anteriores do nosso grupo indicaram que o IBR induz a morte celular do melanoma através da indução de apoptose (LINS et al., 2024). Portanto, também avaliamos se o tratamento de células com IC₅₀ IBR induziu coloração com anexina V/PI. Nossos resultados mostraram que nos fibroblastos houve uma tendência ao aumento de células anexinas V+ após o tratamento com o IC₅₀, e um aumento significativo no total de células apoptóticas após tratamento com 100 µM IBR (Figura 5). Tais observações são compatíveis com a indução apoptótica. Nos queratinócitos, a apoptose não foi induzida significativamente. Considerando que o IBR inibe a sinalização do *EGFR* e que a inibição do *EGFR* promove a cornificação dos queratinócitos, é possível que a redução do MTT observada tenha resultado da inibição da proliferação dos queratinócitos e não da indução da apoptose.

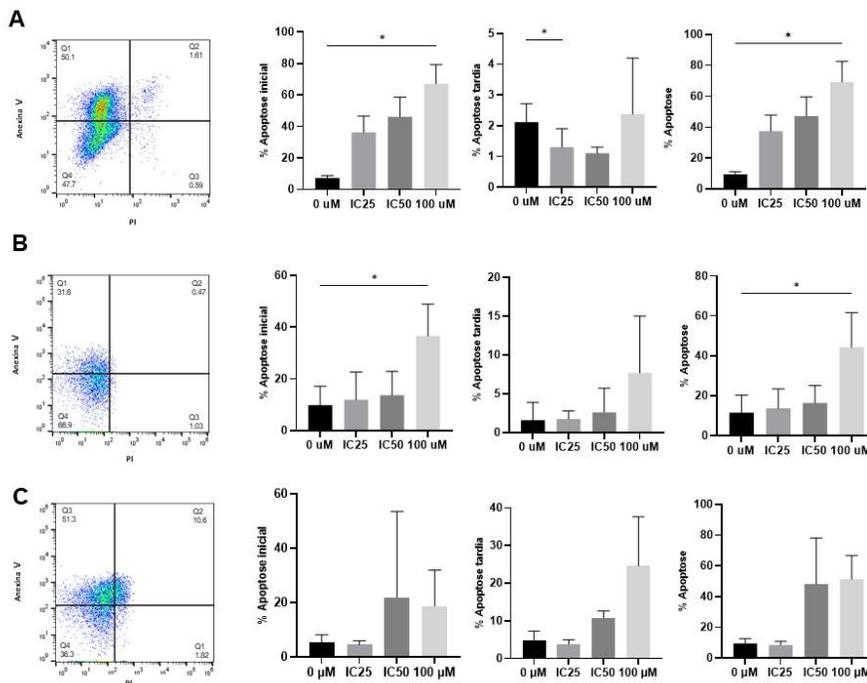


Figura 8: Indução apoptótica por IBR em células primárias da pele humana. Fibroblastos primários da pele humana (A), queratinócitos (B) e células SKMEL28 (C) foram tratados com IC₂₅, IC₅₀, bem como doses altas (100 µM) de IBR por 48 h e tiveram sua viabilidade avaliada usando a anexina V e Coloração PI. Gráficos de pontos representativos são mostrados à esquerda. Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

5.3. A toxicidade do IBR em modelo *hOSEC* depende da via de administração

O teste de viabilidade *hOSEC* realizado pelo método TTC, considerado o melhor teste para esse tipo de avaliação (VOSTÁLOVÁ et al., 2018). Quando o IBR foi adicionado ao meio de cultura de tecidos por 48 horas, os modelos *hOSEC* apresentaram perda significativa de viabilidade tecidual nas concentrações de 50 µM (p<0,05) e 100 µM (p<0,001), em comparação aos controles não tratados (Figura 9A). Tanto o DMSO quanto o SDS foram utilizados como controles positivos de toxicidade/irritação e, embora o tratamento com DMSO não tenha afetado a viabilidade do tecido, o tratamento com SDS resultou em uma redução significativa na viabilidade em comparação ao controle (p<0,0001). Curiosamente, quando repetimos ambos os ensaios aplicando IBR em cima de modelos *hOSEC* imitando uma aplicação tópica, a toxicidade do medicamento foi reduzida. No ensaio TTC, apenas o SDS promoveu toxicidade tecidual significativa, enquanto o IBR não foi tóxico até 100 µM (Figura 9B).

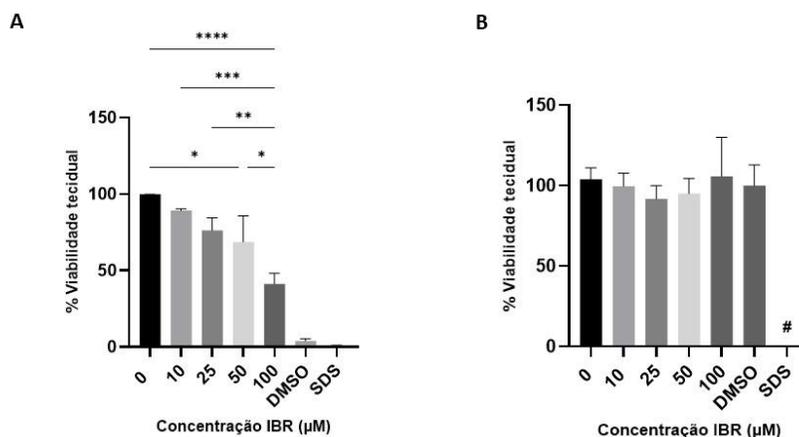


Figura 9: Potencial de irritação do IBR em modelos *hOSEC*. Culturas de explantes de pele organotípica humana foram tratadas com doses crescentes de IBR. A droga foi adicionada ao meio de cultura de tecidos (A) ou administrada topicamente (B). Após 48 h, a viabilidade metabólica tecidual foi avaliada pelo ensaio TTC. Os dados foram analisados por meio de ANOVA seguida de teste post-hoc de Tukey para comparações múltiplas. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; # $p < 0,0001$ comparado a todos os outros grupos.

A avaliação histológica da irritação cutânea revelou que as amostras *hOSEC* mantiveram estrutura normal nos períodos de observação de 48 horas, com raras alterações estruturais (Figura 10-11). Também como esperado, as amostras tratadas com SDS apresentaram alterações marcantes independente da via de administração (meio de cultura de tecidos ou aplicação tópica), sendo detectado intenso edema intracelular, lesão celular e alterações na junção dermoepidérmica. Enquanto o DMSO incluído no meio de cultura de tecidos promoveu alterações teciduais leves, quando aplicado topicamente, o medicamento apresentou menor índice de irritação. As amostras *hOSEC* apresentaram alterações histológicas progressivas com o aumento das doses de IBR, porém nunca atingindo o grau de irritação tecidual observado nas amostras tratadas com SDS (Figura 10-11, Tabela 3).

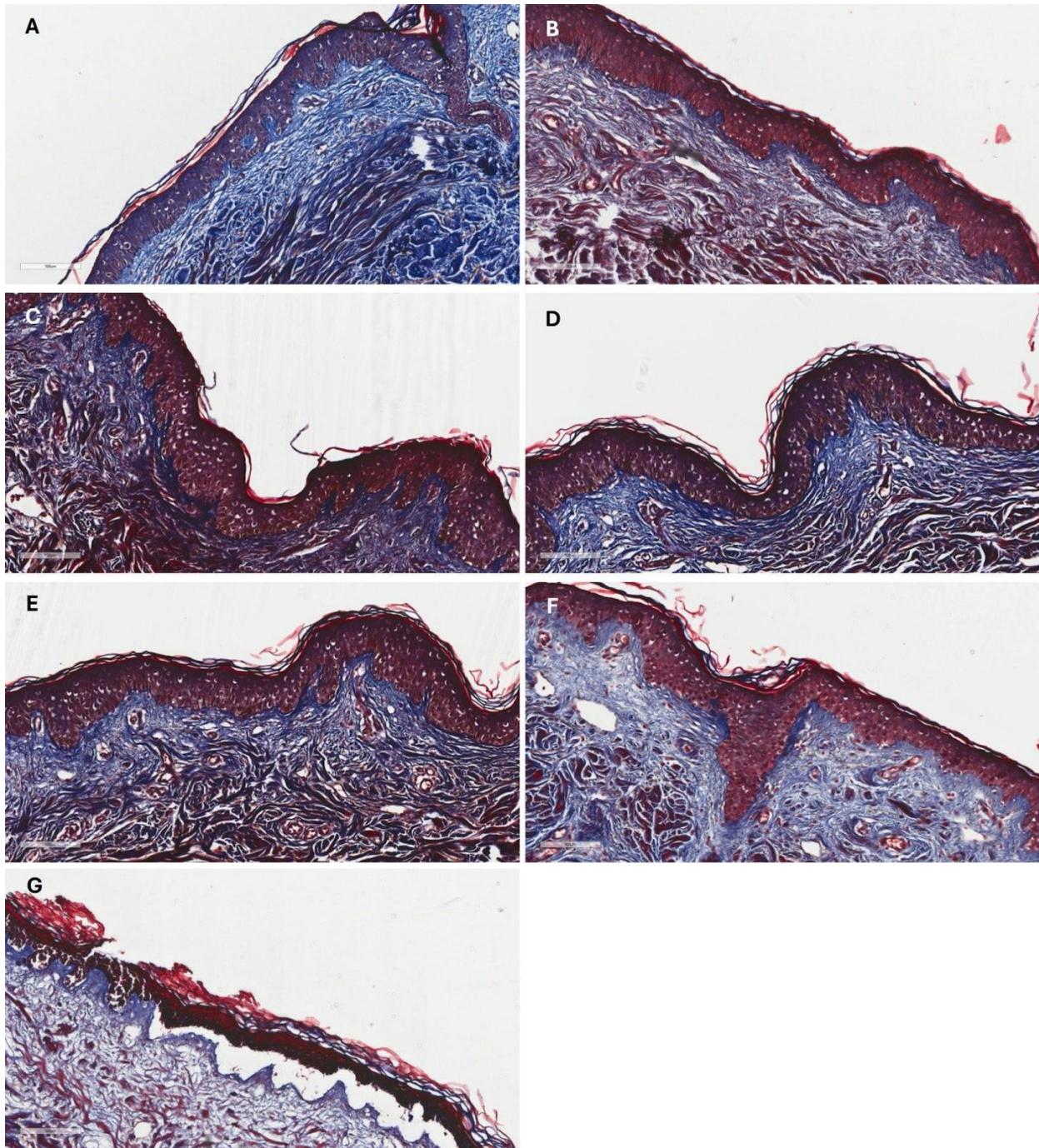


Figura 10: Observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* tratadas com IBR adicionado ao meio de cultura de tecidos. (A) Grupo controle com pouco edema perinuclear na epiderme. (B) Grupo tratado com 10 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (C) Grupo tratado com 25 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (D) Grupo tratado com 50 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (E) Grupo tratado com 100 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (F) Grupo tratado com DMSO apresentando picnose nuclear. (G) Grupo tratado com SDS apresentando pele necrótica e separação da junção dermoepidérmica. Barra de escala: 100 μm . Tricromo de Masson.

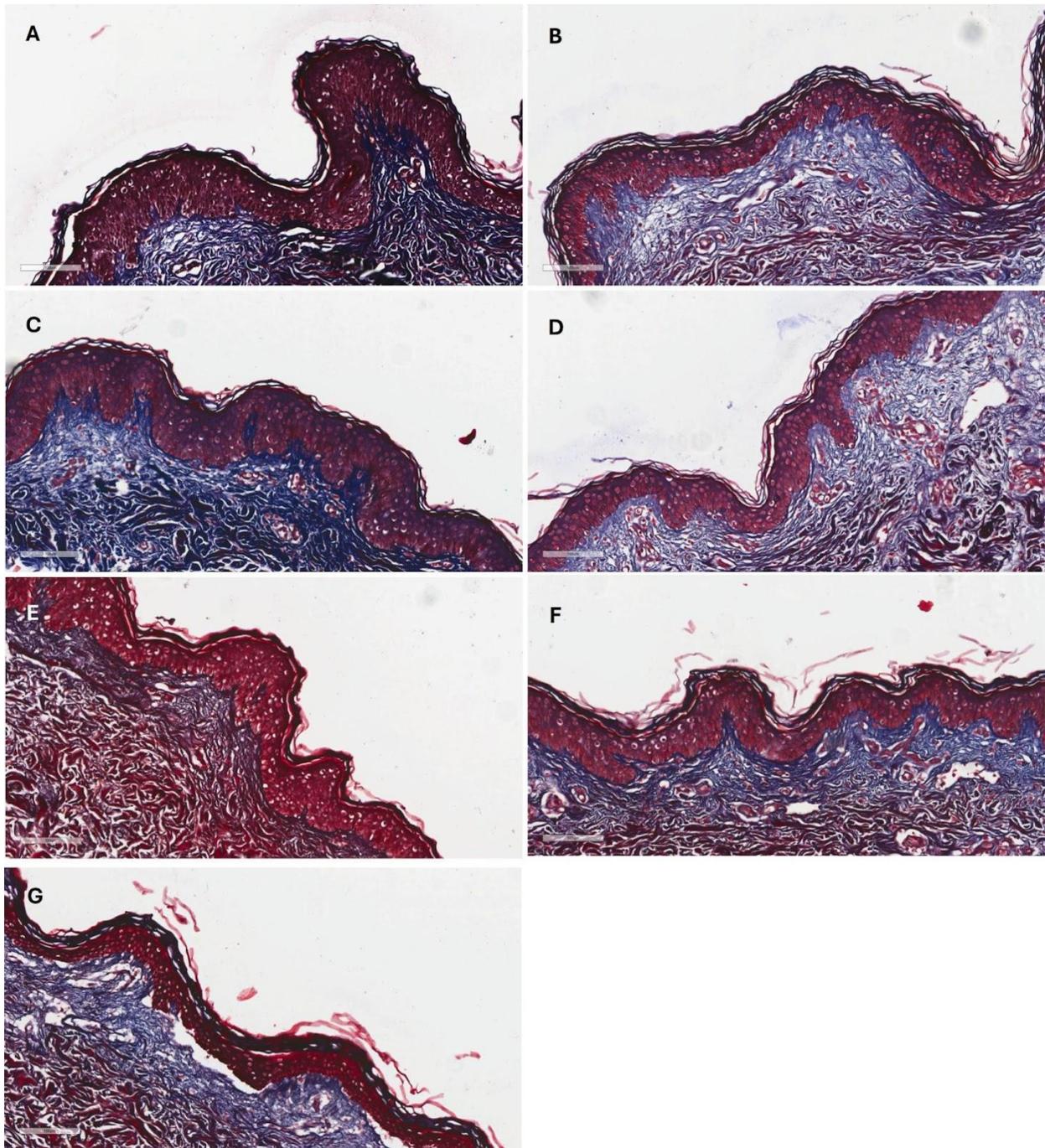


Figura 11: Observações histológicas de amostras de pele ex vivo tratadas com IBR adicionadas ao meio de cultura de tecidos. (A) Grupo controle com pouco edema perinuclear na epiderme. (B) Grupo tratado com 10 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (C) Grupo tratado com 25 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (D) Grupo tratado com 50 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (E) Grupo tratado com 100 μM apresentando leve edema perinuclear na epiderme. (F) Grupo tratado com DMSO apresentando picnose nuclear. (G) Grupo tratado com SDS apresentando pele necrótica e separação da junção dermoepidérmica. Barra de escala: 100 μm . Tricromo de Masson.

Tabela 3: Classificação das observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* tratadas com IBR adicionado ao meio de cultura de tecidos.

Tratamento	Score de Irritação	Edema intracelular			Lesões celulares		Lesões nucleares			Lesão dermo-epidérmica	Células inflamatórias
		Espongiose	Acanitólise	Vesículas (separação de queratinócitos)	Edema citoplasmático	Necrose de células epidérmicas	Edema perinuclear (epiderme)	Edema intranuclear	Picnose nuclear	Separação da junção dermo-epidérmica	Exocitose
Control	Muito bom	0	0	0	0 - 1	0	2	0	0 - 2	0	0
10 µM	Bom	0	0	0	0	0 - 1	2 - 3	0	2 - 3	0 - 2	0
25 µM	Médio	0	0	0	0	0 - 2	3 - 4	0	2 - 3	0 - 2	0
50 µM	Médio	0	0	0	0	0 - 1	3 - 4	0	2 - 3	0 - 2	0
100 µM	Médio	0	0	0	0	0	3 - 4	0	2 - 3	0	0
SDS	Ruim	2 - +4	2 - +4	0 - +4	0 - +4	+4 - 4	0 - +4	0 - +4	+4 - 4	+4 - 4	0 - +4
DMSO	Médio	0 - 2	0	0	0 - 1	0	0	0	2 - 3	0	0

Tabela 4: Classificação das observações histológicas de amostras de pele *ex vivo* tratadas com IBR administrado topicamente.

Tratamento	Edema intracelular	Lesões celulares	Lesões nucleares	Lesão dermo-epidérmica	Células inflamatórias
------------	--------------------	------------------	------------------	------------------------	-----------------------

	Score de Irritação	Espongiose	Acantólise	Vesículas (separação de queratinócitos)	Edema citoplasmático	Necrose de células epidérmicas	Edema perinuclear (epiderme)	Edema intranuclear	Picnose nuclear	Separação da junção dermo-epidérmica	Exocitose
Controle	Exceente	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
10 µM	Muito bom	0-1	0	0	0	0	2-3	0	0-1	0	0
25 µM	Muito bom	0	0	0	0	0-1	2-3	0	0-1	0	0
50 µM	Muito bom	0-1	0	0	0	0-1	2	0	1	0	0
100 µM	Médio	0	0	0	0	0-1	1-3	0	0-1	0	0
SDS	Ruim	0-1	2	2	0	3-4	0-2	0	3-4	3	0
DMSO	Bom	0	0	0	0	0-1	1-2	0	1	0	0

5.4. O IBR permeia com sucesso o estrato córneo

A permeação cutânea do IBR foi analisada em dois intervalos de tempo diferentes, 12 e 24 horas. Foram analisadas duas camadas da pele, o estrato córneo e o restante da pele. Este método é considerado confiável, pois foi desenvolvido utilizando pele e meio de cultura como matrizes para detecção de IBR. Observamos que o IBR foi capaz de penetrar no estrato córneo após 12 horas, sendo detectado tanto no estrato córneo quanto na pele remanescente (Figura 11). Após 24 horas de incubação, a quantidade de fármaco que atingiu ambas as camadas da pele aumentou, mostrando que a penetração do fármaco ainda ocorreu neste período de observação. A quantidade de droga observada na pele remanescente foi superior àquela detectada no estrato córneo após 12 ($p=0,0294$) e 24 horas ($p<0,0001$). Isto sugere que o IBR tem a capacidade de atingir diferentes camadas da pele quando administrado topicamente.

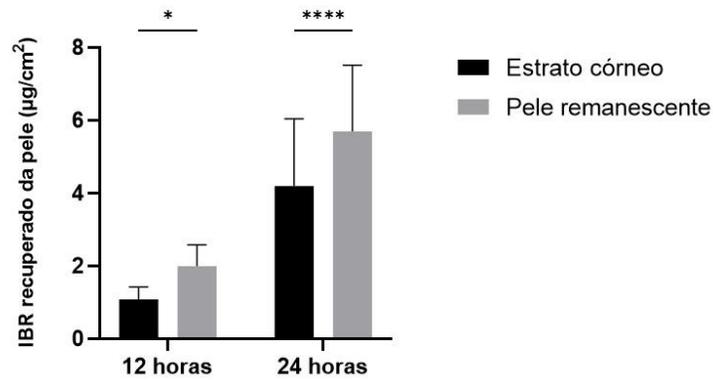


Figura 12: Análise dermatocinética IBR em pele humana. O IBR foi administrado topicamente em amostras de pele humana. A droga recuperada do estrato córneo e da pele remanescente após 12 e 24 horas foi determinada pelo método HPLC. Os dados foram analisados por meio de ANOVA Two-way seguida pelo teste post-hoc de Sidak para comparações múltiplas; * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$.

6. DISCUSSÃO

O IBR foi originalmente concebido como uma estratégia de tratamento para doenças malignas das células B, nas quais a BTK é uma proteína crucial para a sobrevivência e proliferação celular. Gradualmente, o IBR demonstrou ser capaz de modular pelo menos dez outras quinases, incluindo algumas enzimas associadas a tumores sólidos (MESSEX; LIOU, 2021). Tais observações fomentaram a investigação da IBR como uma possível estratégia de tratamento para tumores sólidos, como o melanoma (LINS et al., 2024; SUN et al., 2018).

A análise da segurança e eficácia do IBR como opção de tratamento para o melanoma está em andamento tanto em contextos pré-clínicos quanto clínicos. *In vitro*, tem sido consistentemente demonstrado que o IBR induz toxicidade significativa às células B leucêmicas em faixas nanomolares (SINHA et al., 2016; SUN et al., 2018). Para cânceres de pele, o IBR tem mostrado resultados promissores, como indutor eficaz de autofagia em carcinoma (SUN et al., 2018a) e apoptose em linhagens celulares de melanoma em faixas micromolares (LINS et al., 2024). Apoiando ainda mais o potencial clínico do IBR para o tratamento do melanoma, nosso grupo mostrou recentemente que a alta expressão de genes alvo do IBR está associada ao enriquecimento das vias de apoptose e necrose em amostras clínicas de melanoma (LINS et al. 2024). No entanto, o IBR não conseguiu promover benefícios clínicos quando administrado sistemicamente em pacientes com melanoma cutâneo metastático distante refratários ao tratamento durante um ensaio de fase II (MOSCHOS et al., 2021). Neste estudo, os participantes receberam doses mais altas de IBR do que a dose aprovada pela FDA e, embora os efeitos adversos (incluindo reações cutâneas) tenham afetado metade da coorte de pacientes, o perfil geral de efeitos colaterais da droga foi semelhante ao publicado anteriormente (GROMMES et al., 2019). A baixa biodisponibilidade oral do IBR (SHAKEEL et al., 2015), combinada com as altas doses necessárias para atingir efetivamente as células tumorais, pode ter contribuído para a ocorrência dos efeitos colaterais relatados.

Neste cenário, encontrar uma forma segura e eficaz de entregar o medicamento diretamente às células do melanoma pode ser uma estratégia eficaz para garantir o sucesso clínico futuro. Portanto, no presente estudo, levantamos a hipótese de que a via de administração tópica pode ser útil para tratar lesões de melanoma não metastático com IBR. Antes de propor tal via de

administração, pretendemos determinar a toxicidade cutânea, irritação e perfil dermatocinético do IBR utilizando modelos de pele *ex vivo*.

Primeiro, avaliamos se as células primárias da pele expressam genes alvo do IBR, como *EGFR*, *JAK3*, *BTK*, *ITK* e *ERBB2* (SINGH; PETTER; KLUGE, 2010). A expressão desses genes foi determinada em fibroblastos e queratinócitos da pele e comparada com os níveis de mRNA encontrados na linha celular de melanoma SKMEL-28. Foi observada uma expressão variável dos genes testados, mas na mesma faixa dos níveis de expressão encontrados na linhagem celular de melanoma.

Realizamos ensaios de viabilidade celular em fibroblastos, queratinócitos e células SKMEL-28 expostas a diferentes concentrações de IBR e observamos uma relação dose-resposta positiva na redução da viabilidade celular em células tratadas, de acordo com achados previamente documentados na literatura (LINS et al., 2024; SUN et al., 2018a). Em todos os tipos de células, o IBR parece reduzir a viabilidade celular através da indução apoptótica, semelhante às observações feitas pelo nosso grupo e outros (LINS et al., 2024; SUN et al., 2018a). Em comparação com a linhagem celular de melanoma SKMEL-28, os queratinócitos apresentaram sensibilidade semelhante à droga, enquanto os fibroblastos demonstraram maior resistência ao tratamento com IBR.

Considerando que a toxicidade dos medicamentos administrados topicamente é fortemente influenciada pela capacidade de penetração no estrato córneo, nos propusemos a investigar a toxicidade do IBR em culturas de explantes organotípicos de pele humana, conhecidos como *hOSEC*. Este modelo experimental representa uma abordagem *ex vivo* que se assemelha tanto quanto possível à pele humana em condições *in vitro* (ANDRADE et al., 2015). A adoção de modelos de explantes tem sido muito atrativa para estudos na área dermatológica devido à sua fácil obtenção e ao seu indiscutível potencial para mimetizar respostas teciduais e celulares, além de reduzir a dependência de testes em animais (MASSON-MEYERS et al., 2020a). O modelo *hOSEC* é capaz de reproduzir condições *in vivo*, mantendo temporariamente a viabilidade do tecido cutâneo através de um meio de cultura que fornece energia e nutrientes para as células sustentarem seu metabolismo. Sua principal vantagem reside na preservação do estrato córneo, bem como na presença de todos os tipos de células da pele. Além disso, a manutenção do *hOSEC* na interface ar-líquido possibilita o estudo de produtos tópicos e transdérmicos. Como limitações, o *hOSEC*

apresenta variabilidade entre pacientes, semelhante a todas as culturas primárias, e seu desempenho é estritamente dependente de condições otimizadas de cultura celular (FRADE et al., 2015; LEITE et al., 2021; MASSON-MEYERS et al., 2020b).

Aqui, empregamos o modelo *hOSEC* para avaliar a toxicidade e o potencial de irritação do IBR administrado topicamente. Os resultados revelaram que a aplicação tópica do medicamento não induziu toxicidade até uma concentração de 100 μM , enquanto a aplicação no meio de cultura comprometeu significativamente a atividade metabólica tecidual a partir de 50 μM . Para avaliar o potencial de irritação do IBR, avaliamos a estrutura do *hOSEC* utilizando análise histológica para identificar alterações estruturais induzidas pelo tratamento com IBR após duas vias de administração. Nossos resultados mostraram que a toxicidade do IBR é reduzida principalmente com a administração tópica. Mesmo na concentração mais alta testada, o IBR apresentou pontuação de irritação “Média”, o que é consistente com a classificação de não irritante em testes de contato realizados nos indivíduos (MATARRESE et al., 2021).

Complementando nossa análise, demonstramos que o IBR permeia o estrato córneo e atinge a epiderme e a derme viáveis (ALBUQUERQUE et al., 2024). Considerando que a toxicidade do medicamento pode ser influenciada pela sua dermatocinética, analisamos o perfil de permeação do IBR em diferentes momentos. Nossa análise mostrou que o IBR permeou continuamente o estrato córneo até 24 horas, que foi o maior período analisado. A penetração do fármaco na pele restante atingiu aproximadamente 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (~13,6 μM), que está na mesma faixa que a concentração IC50 do fármaco para a linhagem celular SKMEL-28.

7. CONCLUSÃO

Primeiramente, estabelecemos com sucesso um protocolo replicável para o isolamento de células primárias da pele a partir de tecido humano, garantindo a obtenção de amostras de alta qualidade para análises subsequentes.

Em seguida, avaliamos a expressão de genes-alvo do IBR tanto em queratinócitos e fibroblastos de pele primária quanto em células de melanoma SKMEL28. Nossos resultados demonstraram que todas essas células expressam os genes-alvo do IBR, confirmando sua relevância para o estudo.

O perfil de toxicidade do IBR foi determinado em células primárias da pele e em células de melanoma, revelando os efeitos da substância em ambos os tipos celulares. Adicionalmente, investigamos o perfil de toxicidade e irritação do IBR em modelos de pele humana, permitindo uma compreensão mais abrangente dos possíveis impactos da droga em tecidos cutâneos humanos.

Finalmente, avaliamos a permeação da droga nas diferentes camadas da pele, proporcionando dados importantes sobre a eficácia e a distribuição do IBR no tecido cutâneo.

Esses resultados contribuem significativamente para o entendimento do IBR e suas interações com células e tecidos da pele, oferecendo uma base sólida para futuras pesquisas e possíveis aplicações terapêuticas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo sugere que a administração tópica de IBR pode ser uma estratégia segura e viável para o tratamento local do melanoma. Esta abordagem merece investigação adicional, pois tem o potencial de substituir a administração sistêmica e reduzir ou até eliminar muitos dos efeitos colaterais associados. A aplicação tópica de medicamentos oferece uma vantagem significativa em termos de segurança. Ao limitar a exposição do composto ao local específico da lesão, a administração tópica minimiza os riscos de efeitos colaterais sistêmicos. Isso é particularmente relevante no tratamento do melanoma, onde os medicamentos utilizados frequentemente têm efeitos colaterais severos quando administrados sistemicamente. Além da segurança, a administração tópica é altamente viável e conveniente. A administração sistêmica de medicamentos, embora eficaz, é acompanhada por uma série de desafios. Esses incluem toxicidade geral, onde o medicamento afeta não apenas as células cancerosas, mas também células saudáveis, e complicações imunológicas, onde a resposta do sistema imunológico pode ser desencadeada de maneira indesejada. Além disso, a administração sistêmica pode ser desconfortável e inconveniente para os pacientes.

A administração tópica de IBR, ao atuar diretamente no local do melanoma, apresenta, portanto, uma solução potencial para esses problemas. Ao concentrar o efeito terapêutico exclusivamente na área afetada, espera-se que os pacientes experimentem menos efeitos colaterais e um melhor perfil de segurança.

Esta abordagem inovadora justifica investigação adicional e ensaios clínicos mais amplos. Se confirmada, a administração tópica de IBR pode se tornar uma alternativa viável e preferível à administração sistêmica, proporcionando um avanço significativo no tratamento do melanoma.

9. REFERÊNCIAS

- AKINLEYE, A. et al. Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 1, p. 59, 19 dez. 2013.
- ALBUQUERQUE, L. F. F. et al. Development and Validation of a Chromatographic Method for Ibrutinib Determination in Human and Porcine Skin. **Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 272–282, 27 fev. 2024.
- ANDRADE, T. A. et al. Ex vivo Model of Human Skin (hOSEC) as Alternative to Animal use for Cosmetic Tests. **Procedia Engineering**, v. 110, p. 67–73, 2015.
- ATKINS, M. B. et al. Phase III Trial Comparing Concurrent Biochemotherapy With Cisplatin, Vinblastine, Dacarbazine, Interleukin-2, and Interferon Alfa-2b With Cisplatin, Vinblastine, and Dacarbazine Alone in Patients With Metastatic Malignant Melanoma (E3695): A Trial Coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5748–5754, 10 dez. 2008.
- BARONI, A. et al. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 3, p. 257–262, maio 2012.
- BLAIR, M. J. et al. Skin Structure–Function Relationships and the Wound Healing Response to Intrinsic Aging. **Advances in Wound Care**, v. 9, n. 3, p. 127–143, 1 mar. 2020.
- BURANAAMNUAY, K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: a variety of the assay protocols. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 2, p. 251, 2021.
- CSÁNYI, E. et al. Development of Topical Nanocarriers for Skin Cancer Treatment Using Quality by Design Approach. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 35, p. 6440–6458, 13 dez. 2019.
- DAVIS, L. E.; SHALIN, S. C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. **Cancer Biology & Therapy**, v. 20, n. 11, p. 1366–1379, 2 nov. 2019.
- DYRING-ANDERSEN, B. et al. Spatially and cell-type resolved quantitative proteomic atlas of healthy human skin. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5587, 5 nov. 2020.
- EBRAHIMI, N. et al. Receptor tyrosine kinase inhibitors in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 80, n. 4, p. 104, 22 abr. 2023.
- FLAHERTY, K. T. et al. Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 2, p. 107–114, 12 jul. 2012.
- FRADE, M. A. C. et al. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 3, p. 347–350, jun. 2015.
- FUCHS, E.; RAGHAVAN, S. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 3, p. 199–209, mar. 2002.

GROMMES, C. et al. Phase 1b trial of an ibrutinib-based combination therapy in recurrent/refractory CNS lymphoma. **Blood**, v. 133, n. 5, p. 436–445, 31 jan. 2019.

HARDIE, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 774–785, out. 2007.

HAMID, O. et al. Five-year survival outcomes for patients with advanced melanoma treated with pembrolizumab in KEYNOTE-001. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 4, p. 582–588, abr. 2019.

HONDA, S. et al. Tyrosinase regulates the motility of human melanoma cell line A375 through its hydroxylase enzymatic activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 707, p. 149785, maio 2024.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, maio 2011a.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, n. 2, p. 229–234, maio 2011b.

KOLARSICK, P. A. J.; KOLARSICK, M. A.; GOODWIN, C. Anatomy and Physiology of the Skin. **Journal of the Dermatology Nurses' Association**, v. 3, n. 4, p. 203–213, jul. 2011.

LEACHMAN, S. A. et al. Assessing Genetic Expression Profiles in Melanoma Diagnosis. **Dermatologic Clinics**, v. 35, n. 4, p. 537–544, out. 2017.

LEITE, M. N. et al. Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 160, p. 105769, maio 2021.

LIN, C.-H. et al. Ibrutinib Potentiates Antihepatocarcinogenic Efficacy of Sorafenib by Targeting EGFR in Tumor Cells and BTK in Immune Cells in the Stroma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 19, n. 2, p. 384–396, 1 fev. 2020.

LINS, F. V. et al. Ibrutinib Modulates Proliferation, Migration, Mitochondrial Homeostasis, and Apoptosis in Melanoma Cells. **Biomedicines**, v. 12, n. 5, p. 1012, 4 maio 2024.

LONG, G. V. et al. Overall Survival and Durable Responses in Patients With *BRAF* V600–Mutant Metastatic Melanoma Receiving Dabrafenib Combined With Trametinib. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 8, p. 871–878, 10 mar. 2016.

LONG, G. V. et al. Cutaneous melanoma. **The Lancet**, v. 402, n. 10400, p. 485–502, ago. 2023.

LUO, Q.-Y. et al. A multi-kinase inhibitor APG-2449 enhances the antitumor effect of ibrutinib in esophageal squamous cell carcinoma via EGFR/FAK pathway inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v. 183, p. 114318, jan. 2021.

MARGOLIS, N.; MARKOVITS, E.; MARKEL, G. Reprogramming lymphocytes for the treatment of melanoma: From biology to therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 141, p. 104–124, fev. 2019.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, jun. 2007.

MASSON-MEYERS, D. S. et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 1–2, p. 21–37, 30 fev. 2020a.

MASSON-MEYERS, D. S. et al. Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 101, n. 1–2, p. 21–37, 30 fev. 2020b.

MATARRESE, P. et al. Assessment of an ex vivo irritation test performed on human skin explants and comparison of its results with those of a 24-/48-h human patch test for the evaluation of cosmetics. **Toxicology in Vitro**, v. 70, p. 105030, fev. 2021.

MESSEX, J. K.; LIOU, G.-Y. Targeting BTK Signaling in the Microenvironment of Solid Tumors as a Feasible Cancer Therapy Option. **Cancers**, v. 13, n. 9, p. 2198, 3 maio 2021.

MIDDLETON, M. R. et al. Randomized Phase III Study of Temozolomide Versus Dacarbazine in the Treatment of Patients With Advanced Metastatic Malignant Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 18, n. 1, p. 158–158, 1 jan. 2000.

MITRA, S. K.; HANSON, D. A.; SCHLAEPFER, D. D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 1, p. 56–68, 1 jan. 2005.

MOSCHOS, S. J. et al. Targeting the IL-2 inducible kinase in melanoma; a phase 2 study of ibrutinib in systemic treatment-refractory distant metastatic cutaneous melanoma: preclinical rationale, biology, and clinical activity (NCI9922). **Melanoma Research**, v. 31, n. 2, p. 162–172, abr. 2021.

MOSER, J.; GROSSMAN, K. Adjuvant therapy for resected high-risk melanoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 37, n. 2, p. 109–111, jun. 2018.

NAHM, W. J. et al. Treating Melanoma in Situ During a Pandemic with Telemedicine and a Combination of Imiquimod, 5-Fluorouracil, and Tretinoin. **Dermatology and Therapy**, v. 11, n. 1, p. 307–314, 17 fev. 2021.

NEWTON, R. H.; TURKA, L. A. Regulation of T Cell Homeostasis and Responses by Pten. **Frontiers in Immunology**, v. 3, 2012.

NOCCO, S. et al. Ibrutinib-associated dermatologic toxicities: A systematic review and meta-analysis. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 174, p. 103696, jun. 2022.

PAN, Z. et al. Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for Bruton's Tyrosine Kinase. **ChemMedChem**, v. 2, n. 1, p. 58–61, 15 jan. 2007.

PATEL, P. M. et al. Extended schedule, escalated dose temozolomide versus dacarbazine in stage IV melanoma: Final results of a randomised phase III study (EORTC 18032). **European Journal of Cancer**, v. 47, n. 10, p. 1476–1483, jul. 2011.

PAYDAS, S. Management of adverse effects/toxicity of ibrutinib. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 136, p. 56–63, abr. 2019.

PEARSON, G. et al. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions*. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 2, p. 153–183, 1 abr. 2001.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063–1072, 11 dez. 2008.

RAHMATI, M. et al. Designing multigradient biomaterials for skin regeneration. **Materials Today Advances**, v. 5, p. 100051, mar. 2020.

READ, J.; WADT, K. A. W.; HAYWARD, N. K. Melanoma genetics. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 1, p. 1–14, jan. 2016.

RIPPA, A. L.; KALABUSHEVA, E. P.; VOROTELYAK, E. A. Regeneration of Dermis: Scarring and Cells Involved. **Cells**, v. 8, n. 6, p. 607, 18 jun. 2019.

ROSKOSKI, R. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update. **Pharmacological Research**, v. 200, p. 107059, fev. 2024.

ROZKIEWICZ, D. et al. Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors (BTKIs): Review of Preclinical Studies and Evaluation of Clinical Trials. **Molecules**, v. 28, n. 5, p. 2400, 6 mar. 2023.

SAGINALA, K. et al. Epidemiology of Melanoma. **Medical Sciences**, v. 9, n. 4, p. 63, 20 out. 2021.

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

SHARIATI, M.; MERIC-BERNSTAM, F. Targeting AKT for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 28, n. 11, p. 977–988, 2 nov. 2019.

SHAKEEL, F. et al. Solubility and thermodynamic function of a new anticancer drug ibrutinib in 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol+water mixtures at different temperatures. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 89, p. 159–163, out. 2015.

SHYAM SUNDER, S.; SHARMA, U. C.; POKHAREL, S. Adverse effects of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy: pathophysiology, mechanisms and clinical management. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 262, 7 jul. 2023.

- SIBAUD, V. et al. Dermatological Toxicities of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 799–812, 1 dez. 2020.
- SINGH, J.; PETTER, R. C.; KLUGE, A. F. Targeted covalent drugs of the kinase family. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 475–480, ago. 2010.
- SINHA, S. et al. Sensitivity of Ibrutinib Exposed Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cells to Inhibition of Axl Receptor Tyrosine Kinase. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 2020–2020, 2 dez. 2016.
- STRASHILOV, S.; YORDANOV, A. Aetiology and Pathogenesis of Cutaneous Melanoma: Current Concepts and Advances. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 12, p. 6395, 15 jun. 2021.
- SUN, F.-D. et al. Ibrutinib presents antitumor activity in skin cancer and induces autophagy. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 22, n. 2, p. 561–566, jan. 2018.
- SUN, X. et al. Ibrutinib-related skin cancer: A pharmacovigilance study from the Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System. **European Journal of Cancer**, v. 160, p. 277–278, jan. 2022.
- SWETTER, S. M. et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 208–250, jan. 2019.
- VAIENTI, S.; CALZARI, P.; NAZZARO, G. Topical Treatment of Melanoma In Situ, Lentigo Maligna, and Lentigo Maligna Melanoma with Imiquimod Cream: A Systematic Review of the Literature. **Dermatology and Therapy**, v. 13, n. 10, p. 2187–2215, 24 out. 2023.
- VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. Basic physiology of the skin. **Surgery (Oxford)**, v. 28, n. 10, p. 469–472, out. 2010.
- VILLANI, A. et al. The Treatment of Advanced Melanoma: Therapeutic Update. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6388, 7 jun. 2022.
- VOSTÁLOVÁ, J. et al. Comparison of various methods to analyse toxic effects in human skin explants: Rediscovery of TTC assay. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 178, p. 530–536, jan. 2018.
- WICKETT, R. R.; VISSCHER, M. O. Structure and function of the epidermal barrier. **American Journal of Infection Control**, v. 34, n. 10, p. S98–S110, dez. 2006.
- WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92–98, 13 fev. 2016a.
- WONG, R. et al. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92–98, 13 fev. 2016b.
- YEH, I.; BASTIAN, B. C. Melanoma pathology: new approaches and classification*. **British Journal of Dermatology**, v. 185, n. 2, p. 282–293, 31 ago. 2021.

ZHAN, Y. et al. Extracellular vesicle-derived non-coding RNAs in remodeling melanoma. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 172, p. 116213, mar. 2024.

ZHAO, J. et al. Novel strategies in melanoma treatment using silver nanoparticles. **Cancer Letters**, v. 561, p. 216148, maio 2023.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso de células humanas para pesquisas in vitro, em substituição a experimentação animal.

Pesquisador: Juliana Lott de Carvalho

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 30175020.0.0000.5558

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.954.541

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa em sua primeira versão que visa investigar o uso de células humanas para pesquisas in vitro em substituição à experimentação em animais. A pele é o maior órgão do corpo e tem funções essenciais ao organismo como proteger o organismo de insultos externos, homeostase de fluidos e detecção sensorial. Por este motivo, é o primeiro órgão insultado por substâncias tóxicas aplicadas topicamente, lesões mecânicas, infecções, dentre outros. Pesquisas envolvendo este órgão incluem a busca de agentes regenerativos, que limitem o comprometimento estético e funcional da pele com cicatrizes; a avaliação da capacidade de novos produtos (ex. peptídeos) penetrarem na pele; a pesquisa envolvendo o envelhecimento da pele e desenvolvimento de novos extratos com potencial cosmético. Entre os modelos de pesquisa que representem a pele disponíveis atualmente estão as linhagens celulares imortalizadas, as células primárias (diretamente isoladas de tecidos humanos) e os modelos animais. Dentre eles, as células primárias destacam-se pois não são artificialmente imortalizadas como as linhagens celulares imortalizadas são, e não apresentam questões éticas nem dissimilaridade genética, como os modelos animais. Portanto, as células humanas compõem os modelos que mais fielmente mimetizam a pele humana e são interessantes também por substituir os animais como modelo de pesquisa. 30 indivíduos de 18 a 60 anos, de ambos os sexos, consideradas aptos (com base nos exames indicados pelo médico responsável) que passarão por procedimento cirúrgico estético (lipoaspiração, abdominoplastia, blefaroplastia, ou outros), que assinarem o TCLE irão compor a

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: cepfm@unb.br

Continuação do Parecer: 3.954.541

amostra. A estratégia de recrutamento será por meio de convite feito pela médica Dra. Márcia Moreira aos pacientes de sua clínica de cirurgia plástica que atenderem aos critérios de inclusão. Serão excluídos do estudo menores de 18 anos ou maiores de 60 anos e pacientes considerados inaptos a realizar o procedimento cirúrgico. A clínica Márcia Moreira Cirurgia Plástica, localizada em Brasília ficará responsável pela coleta do material humano (pele e tecido adiposo) que seria descartado. Será apresentado aos pacientes que irão realizar procedimentos de lipoaspiração, blefaroplastia, abdominoplastia, ou outros, o projeto de pesquisa e o TCLE. Evidencia-se que o procedimento de escolha dos indivíduos doadores das amostras não será alterado em nada em função do presente projeto. Apenas as amostras de tecido humano que seriam descartadas serão entregues à pesquisadora principal. Não haverá remuneração alguma à clínica ou aos pacientes. Os procedimentos para o isolamento das células da epiderme, derme e tecido adiposo estão detalhados no projeto de pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo da proposta é obter tecidos de pele e tecido adiposo humanos para isolamento, expansão, caracterização e utilização em pesquisa científica e tecnológica, aplicada sobretudo à testagem de novos cosméticos e medicamentos aplicados à pele humana.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco ou desconforto relatado pelo pesquisador é mínimo e que eventualmente será o da entrevista aplicada pela médica coletora do material. O risco atribuível às informações coletadas serão mitigadas pelo seu completo sigilo. Ademais, o procedimento cirúrgico pelo qual o paciente irá passar não será alterado de nenhuma forma em função da pesquisa, não acarretando nenhum risco adicional ao paciente neste estágio. Apenas após o procedimento, ao invés do excesso de tecido eventualmente retirado do paciente ser eliminado, este será encaminhado ao laboratório para isolamento de células e realização de pesquisa científica. Esta proposta poderá não trazer benefícios diretos ao paciente, mas as células obtidas a partir dos tecidos coletados serão de grande valia no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosméticos, objetos de pesquisa do grupo proponente. A proposta também propõe potencialmente salvar a vida de milhares de animais, que deixarão de ser usados em pesquisas para desenvolvimento destes produtos. O doador estará contribuindo para a evolução da ciência e desenvolvimento de produtos mais seguros e eficazes pelo simples gesto de doar os subprodutos da sua cirurgia, que normalmente seriam descartados. A participação na pesquisa não acarretará gasto ao paciente, sendo totalmente gratuita.

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: cepfm@unb.br

Continuação do Parecer: 3.954.541

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa prevê respeito ao participante em sua dignidade e autonomia, pondera os riscos e benefícios, garante o direito à privacidade das informações dos pacientes, bem como que o material biológico doado será utilizado exclusivamente na pesquisa. Por fim mostra o benefício social do desenvolvimento de um modelo para a testagem de drogas e medicamentos que trará um impacto socioambiental enorme frente à não utilização de experimentação em animais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados, em conformidade com a Resolução 466/CNS, os seguintes documentos: projeto detalhado da pesquisa, resumo estruturado, termo de ciência das instituições participantes, termo de compromisso dos pesquisadores, termo para utilização de dados individuais e institucionais, currículo lattes atualizado da pesquisadora principal, orçamento e cronograma atualizado. Cabe ressaltar que no projeto original consta o nome da pesquisadora associada, Dra. Márcia Moreira.

Recomendações:

Ajuntar ao processo o Currículo Lattes atualizado dos últimos 6 meses da Dra. Márcia Moreira.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta impedimentos éticos. O parecer do colegiado foi pela aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado em reunião extraordinária de 01/04/2020 aprovou o projeto. De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1. - 3.b. e XI. -2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa para o CEP-FM, através de Notificações submetidas pela Plataforma Brasil, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070199.pdf	12/03/2020 10:46:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Brochura.pdf	12/03/2020 10:46:20	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Orçamento.pdf	12/03/2020 10:44:48	Juliana Lott de Carvalho	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.954.541

Cronograma	Cronograma.pdf	12/03/2020 10:33:44	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	12_Termo_de_Resp_e_Compromisso_P esq_Responsvel.pdf	12/03/2020 10:24:16	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	04_Carta_de_Encaminhamento_de_proj etos.pdf	12/03/2020 10:22:33	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Juliana_Lott.pdf	12/03/2020 10:20:53	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_institucional.p df	12/03/2020 10:15:38	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Termo_concordancia_participante.pdf	12/03/2020 10:14:16	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pdf.pdf	12/03/2020 10:12:51	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12/03/2020 10:09:19	Juliana Lott de Carvalho	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BRASILIA, 04 de Abril de 2020

Assinado por:
Antônio Carlos Rodrigues da Cunha
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1918

E-mail: cepfm@unb.br

**ANEXO B – ARTIGO CIENTÍFICO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**

European Journal of Pharmaceutical Sciences
TOXICITY AND DERMATOKINETIC ANALYSIS OF IBRUTINIB IN HUMAN SKIN
MODELS
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	hOSEC model; Alternative models; Melanoma; Skin permeation; SKMEL-28
Corresponding Author:	Juliana Carvalho University of Brasilia BRAZIL
First Author:	Maria Victória Souto Silva
Order of Authors:	Maria Victória Souto Silva Elizabeth C. I. Bispo Lucas F. F. Albuquerque Stefhani M. de Barcelos Emãnuella M. Garcez Luana S. Quilici Eliza C. B. Duarte Jankerle N. Boeloni Felipe Saldanha-Araujo Guilherme M. Gelfuso Juliana Carvalho
Manuscript Region of Origin:	BRAZIL
Abstract:	Ibrutinib (IBR) is a tyrosine kinase inhibitor under investigation in pre-clinical and clinical settings as an alternative treatment for melanoma. Nevertheless, the limited oral bioavailability of IBR and the need for high doses of the drug to kill melanoma cells are major draw-backs for this purpose. Considering that melanoma is restricted to the skin at early stages, the topical application of IBR might constitute an effective and safer administration route. In this study, we determined the IBR toxicity and dermatokinetics using human primary cells and human organotypic skin explant cultures (hOSEC). After demonstrating that human primary fibroblasts and keratinocytes present IBR target genes, the cytotoxicity of the drug was determined using the MTT and annexin V/PI staining assays. IBR toxicity in the skin was assessed using the TTC assay, and the irritation potential was established using histological assessment. Finally, IBR cutaneous permeation was assessed ex vivo to determine the drug dermatokinetics. Our findings reveal that IBR exerts dose-dependent toxicity towards skin cells, keratinocytes presenting IC50 at the same range as melanoma cells. The topical application of the drug successfully reduced irritation and toxicity in the skin, and the drug was shown to successfully permeate the stratum corneum and reach the viable skin layers in therapeutic concentrations. Overall, our data encourages the topical application of IBR to treat melanoma, paving the way for future studies in the theme.

Juliana Lott de Carvalho
University of Brasilia
julianalott@gmail.com

Dr Christoph Saal, Editor in chief of the European Journal of Pharmaceutical Sciences.

June 9th, 2024.

As the principal investigator and correspondent author, I am pleased to submit the scientific manuscript entitled "**Toxicity and Dermatokinetic Analysis of Ibrutinib in Human Skin Models**" for consideration for publication in the European Journal of Pharmaceutical Sciences journal.

This study investigates the feasibility and safety of using topical ibrutinib (IBR) for melanoma treatment, addressing the limitations associated with its oral administration.

Ibrutinib, a tyrosine kinase inhibitor, has shown promise in pre-clinical and clinical settings for melanoma treatment. However, its limited oral bioavailability and the need for high doses to achieve therapeutic effects pose significant challenges. Given that melanoma is initially confined to the skin, we hypothesized that topical application of IBR might offer a more effective and safer administration route.

Our research involved a comprehensive evaluation of IBR's toxicity and dermatokinetics using human primary cells and human organotypic skin explant cultures (hOSEC). We found that IBR exhibits dose-dependent toxicity towards skin cells, with keratinocytes showing an IC50 similar to that observed in melanoma cells. Importantly, topical application of IBR significantly reduced irritation and toxicity, successfully permeating the stratum corneum and reaching therapeutic concentrations in the viable skin layers.

Our results support the potential of topical IBR as an effective treatment for melanoma. We believe that our findings offer a novel perspective on melanoma treatment and contribute valuable insights into the safe and effective use of IBR in clinical settings.

All authors declare that they have no conflicting interests. This manuscript has not been concurrently submitted to another journal, nor has it been previously published in any other form.

We would be privileged to receive constructive feedback on the prospects of publication in your journal. We sincerely thank you for your attention and interest and look forward to your contact.

Yours Sincerely,

Juliana Lott de Carvalho, PhD.

Faculty of Medicine
University of Brasilia

TOXICITY AND DERMATOKINETIC ANALYSIS OF IBRUTINIB IN HUMAN SKIN MODELS

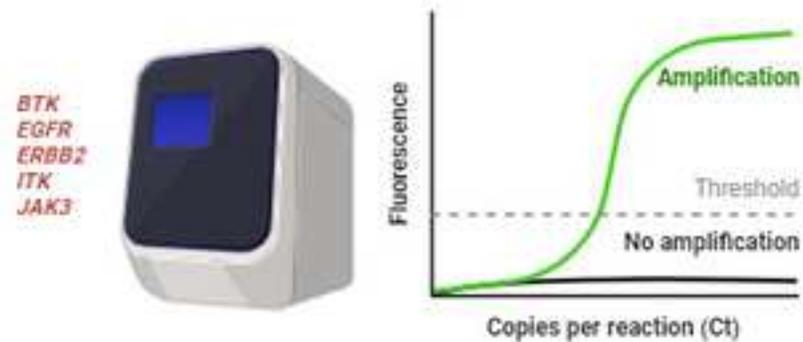
Maria Victória Souto Silva¹, Elizabete C. I. Bispo², Lucas F. F. Albuquerque³, Stephani M. de Barcelos¹, Emãnuella M. Garcez¹, Luana S. Quilici¹, Eliza C. B. Duarte⁴, Jankerle N. Boeloni⁵, Felipe Saldanha-Araujo², Guilherme M. Gelfuso³, Juliana Lott Carvalho^{1,4*}

ABSTRACT

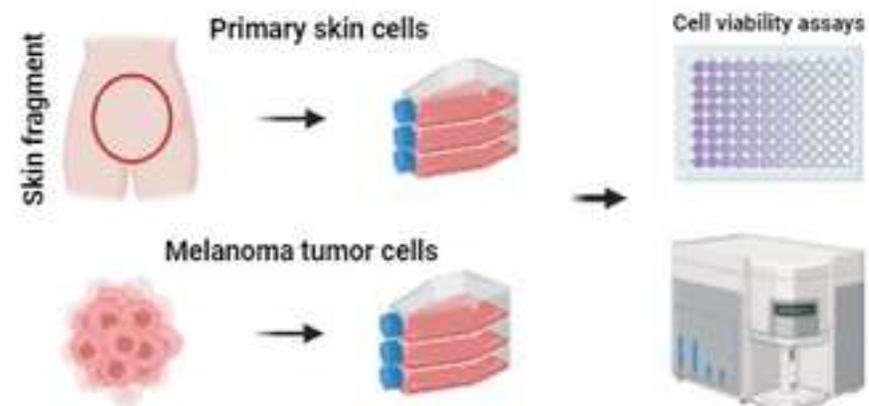
Ibrutinib (IBR) is a tyrosine kinase inhibitor under investigation in pre-clinical and clinical settings as an alternative treatment for melanoma. Nevertheless, the limited oral bioavailability of IBR and the need for high doses of the drug to kill melanoma cells are major draw-backs for this purpose. Considering that melanoma is restricted to the skin at early stages, the topical application of IBR might constitute an effective and safer administration route. In this study, we determined the IBR toxicity and dermatokinetics using human primary cells and human organotypic skin explant cultures (hOSEC). After demonstrating that human primary fibroblasts and keratinocytes present IBR target genes, the cytotoxicity of the drug was determined using the MTT and annexin V/PI staining assays. IBR toxicity in the skin was assessed using the TTC assay, and the irritation potential was established using histological assessment. Finally, IBR cutaneous permeation was assessed *ex vivo* to determine the drug dermatokinetics. Our findings reveal that IBR exerts dose-dependent toxicity towards skin cells, keratinocytes presenting IC_{50} at the same range as melanoma cells. The topical application of the drug successfully reduced irritation and toxicity in the skin, and the drug was shown to successfully permeate the stratum corneum and reach the viable skin layers in therapeutic concentrations. Overall, our data encourages the topical application of IBR to treat melanoma, paving the way for future studies in the theme.

Keywords: hOSEC model; Alternative models; Melanoma; Skin permeation; SKMEL-28.

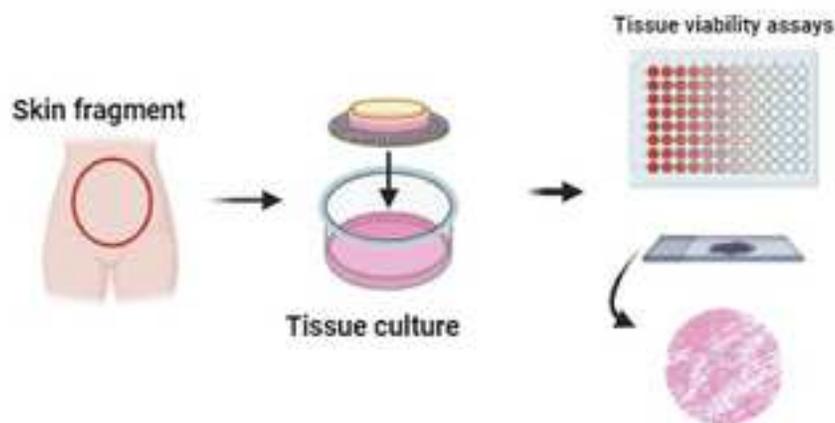
1 qPCR IBR target genes



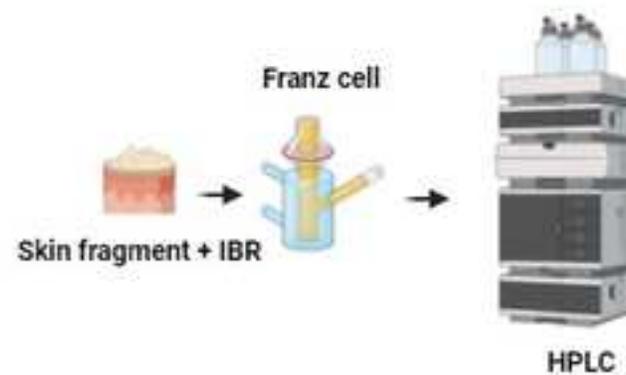
2 Isolation of primary cells and culture of tumor cells



3 Tissue culture - hOSEC model



4 Assessment of IBR dermatokinetics



TOXICITY AND DERMATOKINETIC ANALYSIS OF IBRUTINIB IN HUMAN SKIN MODELS

Maria Victória Souto Silva¹, Elizabete C. I. Bispo², Lucas F. F. Albuquerque³, Stephani M. de Barcelos¹, Emãnuella M. Garcez¹, Luana S. Quilici¹, Eliza C. B. Duarte⁴, Jankerle N. Boeloni⁵, Felipe Saldanha-Araujo², Guilherme M. Gelfuso³, Juliana Lott Carvalho^{1,4*}

¹Interdisciplinary Biosciences Laboratory, University of Brasilia, Faculty of Medicine, Brasília, DF, Brazil.

²Laboratory of Hematology and Stem Cells, University of Brasilia, Faculty of Health Sciences, Brasília, DF, Brazil.

³Laboratory of Food, Drugs, and Cosmetics (LTMAC), University of Brasilia, Brasília, DF, Brazil.

⁴Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, Department of Pathology, DF, Brazil.

⁵Federal University of Espírito Santo, Department of Veterinary Medicine, Center for Agricultural Sciences and Engineering, Alegre, ES, Brazil.

*Corresponding author. Interdisciplinary Biosciences Laboratory, Faculty of Medicine, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 70910-900 Brazil. julianalott@gmail.com

ABSTRACT

Ibrutinib (IBR) is a tyrosine kinase inhibitor under investigation in pre-clinical and clinical settings as an alternative treatment for melanoma. Nevertheless, the limited oral bioavailability of IBR and the need for high doses of the drug to kill melanoma cells are major draw-backs for this purpose. Considering that melanoma is restricted to the skin at early stages, the topical application of IBR might constitute an effective and safer administration route. In this study, we determined the IBR toxicity and dermatokinetics using human primary cells and human organotypic skin explant cultures (hOSEC). After demonstrating that human primary fibroblasts and keratinocytes present IBR target genes, the cytotoxicity of the drug was determined using the MTT and annexin V/PI staining assays. IBR toxicity in the skin was assessed using the TTC assay, and the irritation potential was established using histological assessment. Finally, IBR cutaneous permeation was assessed *ex vivo* to determine the drug dermatokinetics. Our findings reveal that IBR exerts dose-dependent toxicity towards skin cells, keratinocytes presenting IC_{50} at the same range as melanoma cells. The topical application of the drug successfully reduced irritation and toxicity in the skin, and the drug was shown to successfully permeate the stratum corneum and reach the viable skin layers in therapeutic concentrations. Overall, our data encourages the topical application of IBR to treat melanoma, paving the way for future studies in the theme.

Keywords: hOSEC model; Alternative models; Melanoma; Skin permeation; SKMEL-28.

INTRODUCTION

Normal melanocytes protect the skin against ultraviolet radiation and regulate pigmentation. However, when there is dysfunction in these melanocytes, abnormal proliferation and transformation into malignant melanoma can occur [1]. Melanoma represents the most aggressive and challenging variant of skin cancer, resulting from mutations in the epidermal melanocyte cell lineage [2]. Furthermore, this type of cancer presents a significant ability to spread to other parts of the body, becoming a highly invasive and metastatic condition [3]. Despite comprising only 1% of skin cancer cases, melanoma is responsible for more than 80% of fatalities related to this cancer type (LONG et al., 2023; SAGINALA et al., 2021).

Melanoma classification is based on tumor thickness (Breslow score), lymph node involvement, and presence of metastases. These factors divide the severity of melanoma into four stages: stages I and II for localized disease, and stages III and IV for metastases to local lymph nodes or distant metastases, respectively [6]. Treatment success is heavily influenced on the stage in which melanoma is diagnosed, localized lesions presenting a high 5-year relative survival rate (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2024).

Melanoma incidence and prognosis are determined by multiple factors, including environmental elements and genetic predisposition [7]. From a molecular perspective, melanoma is characterized by various somatic mutations that can drive disease progression. These changes generally affect genes like *BRAF* and *NRAS*, essential in cell proliferation, growth, metabolism, cell identity determination, control of apoptosis, regulation of the cell cycle, and senescence. The accumulation of such mutations follows specific patterns, giving rise to different pathways of disease progression and resulting in distinct subtypes of melanoma [8]. Nevertheless, all melanomas present multiple genetic alterations that affect more than one biological pathway [9].

While local resection remains the primary method of treatment for melanoma, it is crucial to acknowledge that the prognosis is generally unfavorable. Combined treatments are therefore indicated, chemotherapy marking an important advance in melanoma treatment, despite adverse reactions and resistance [10]. Early advances were achieved with the introduction of tyrosine kinase inhibitors, such as dabrafenib, which targets the BRAF mutated protein. This approach has demonstrated clinical improvements and generated few adverse effects, but the benefit obtained still appears to be temporary, as some patients eventually develop resistance to the drug, leading to disease relapse and progression [11]. Such context contrasts with the more consistent therapeutic

advances observed in other types of solid tumors and onco-hematological diseases, primarily through the use of the tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (IBR) [12].

IBR (1-[(3R)-3-[4-amino-3-(4-phenoxyphenyl)-1H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-1-yl]-1-piperidinyl]-2-propen-1-one) is one of the few tyrosine kinase inhibitors that has been explored in the treatment of solid and non-solid cancers, with Bruton's tyrosine kinase (BTK) being its main target [13], [14]. IBR acts mainly (but not only) on BTK, binding to the amino acid Cys 481 in the ATP-binding domain. BTK is essential for the antigen receptor signaling pathway in B cells. Furthermore, IBR inhibits IL-2-inducing kinase (ITK), compromising the activation of the NF-KB pathway. It is important to note that the target cysteine residue of IBR is also present in other protein tyrosine kinases, allowing its action on several other molecular targets, such as members of the TFK family (ITK, TEC, BMX and RLK / TXK), EGFR family kinases (EGFR, ErbB2 / HER2 and ErbB4 / HER4), and other kinases, such as BLK and JAK3 [15]. IBR is approved by the FDA to treat mantle cell lymphoma, chronic lymphocytic leukemia, Waldenstrom macroglobulinemia, marginal zone lymphoma, and chronic graft-versus-host disease after stem cell transplantation, among others [14]. Generally well tolerated, IBR offers quick and long-lasting responses, although it can cause side effects, such as diarrhea, upper respiratory tract infection, bleeding, fatigue and cardiac side effects [14]. Dermatological events related to IBR are frequent, but are generally mild to moderate in intensity. Skin toxicities associated with IBR include skin irritation, hematomas, petechiae, ecchymosis, skin abscesses, peripheral edema, stomatitis/mucositis, and, in severe cases, hemorrhagic events [16], [17]. Although the therapeutic effect has been shown to be effective, there is a therapy discontinuation rate of between 11 and 50% [14].

The adverse reactions to IBR can be explained in part by the restricted oral bioavailability, due to its intense first-pass metabolism and low solubility, leading to the use of in high-dose pharmaceutical forms [18]. In this context, the topical application of IBR might constitute an effective and safe administration route of this drug for early stage melanoma treatment, as already suggested in the literature for certain chemotherapy drugs [19]. The non-systemic application of the drug could possibly bring the benefit of reducing or completely eliminating side effects related to oral administration, without compromising the penetration of the drug in the site of interest. Nevertheless, at this point, there is no literature detailing the toxicity and irritation profile of IBR

to the human skin. Furthermore, the IBR skin absorption has only been recently described by our group in an animal model in vitro [20].

In this study, we aimed to determine the safety and dermatokinetics profile of IBR using human skin models, in order to pave the way for the topical application of this drug for treatment of melanoma in situ.

MATERIAL AND METHODS

Material

All reagents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA), and BD Biosciences (New Jersey, USA), unless stated otherwise.

Experimental design

In this study, the toxic effects of IBR on human primary fibroblasts and keratinocytes were investigated through cell viability and apoptosis tests. Primary cells obtained by isolation from human skin were used, with experiments carried out using at least three biological and technical replicates. As a comparative parameter, the toxicity of the drug was also determined in cells of the SKMEL-28 tumor lineage acquired from ATCC. After this step, the toxicity and irritation of IBR in human organotypic skin explant cultures (hOSEC) were determined, using tissue viability and histological irritation tests. Finally, we analyzed the skin permeation of IBR using the hOSEC model to determine its dermatokinetics (Figure 1). The methods performed in each experiment are described below.

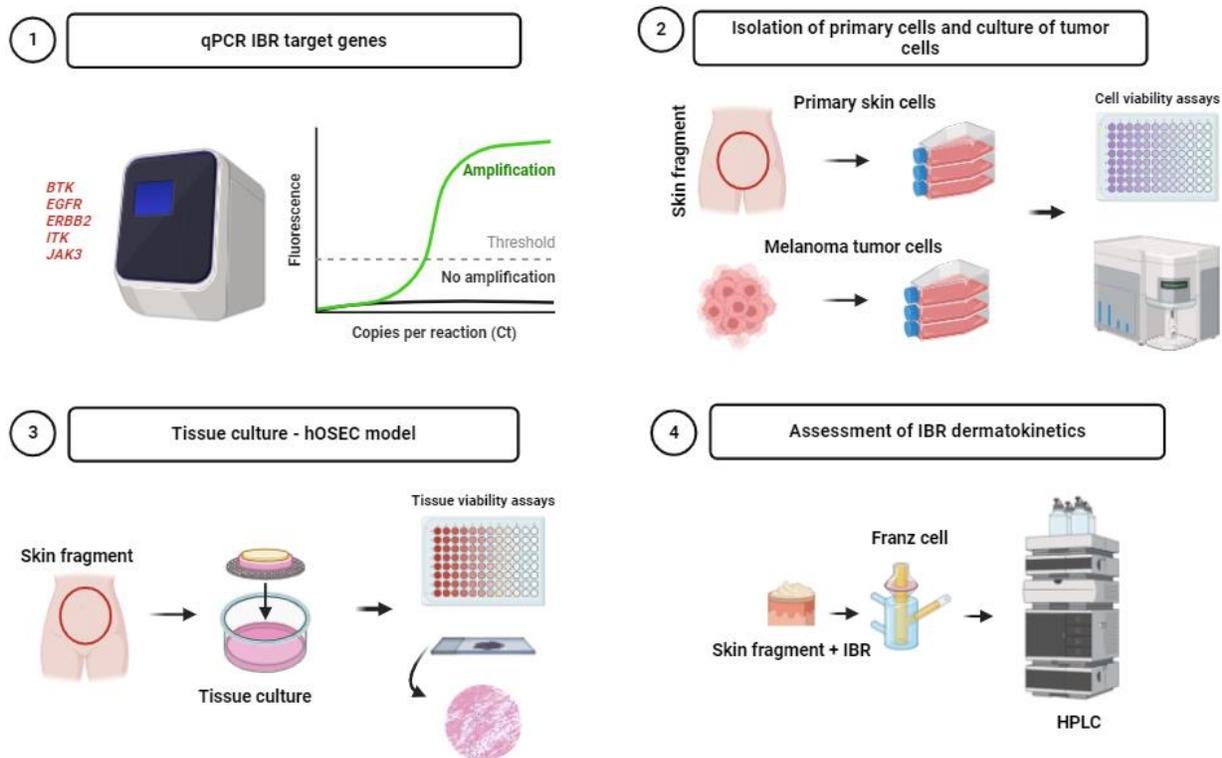


Figure 1: Experimental design. This study included 4 different phases. **1.** qRT-PCR of IBR target genes to evaluate the gene expression of these genes in primary human skin and melanoma cells. **2.** Human primary keratinocytes and fibroblasts were isolated and treated with increasing concentrations of IBR to carry out MTT metabolization and apoptosis detection assays. Melanoma cells were also investigated **3.** hOSEC models were used to determine the toxicity and irritation profile of IBR applied topically and in the tissue culture media at different concentrations. The TTC metabolization assay was performed, as well as skin irritation score by histology. **4.** Assessment of IBR dermatokinetics in hOSEC. Drug permeation was determined after 12 and 24 hours of IBR application using HPLC.

Isolation and culture of primary skin cells

Keratinocytes and fibroblasts were isolated from fragments of human skin taken from healthy patients undergoing abdominoplasty procedures. The procedure was approved by the research ethics committee of the University of Brasília (Protocol n. 30175020.0.0000.5558). Samples were obtained after consent from patients.

Following hypodermis removal, the tissue was fragmented into small pieces and treated with dispase solution (4 mg/mL) overnight at 4°C, to separate the dermis from the epidermis. Then, the dispase solution was inactivated and the dermis was separated from epidermis with the aid of sterile scissors and tweezers. Digestion of the epidermis was performed with trypsin (0.05%) for

10 minutes to isolate keratinocytes, and digestion of the dermis was performed with type II collagenase (1 mg/1 mL) for 3 hours to obtain fibroblasts.

The fragments resulting from the epidermis digestion were filtered through a 100 µM cell strainer and centrifuged at 1,200 rpm for 4 minutes. Cells were resuspended in KSFM medium and plated at 1×10^5 cells/cm². For fibroblasts, after digestion, collagenase was inactivated using DMEM medium supplemented with 10% FBS. The fragments were then centrifuged at 2,000 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded, and cells were cultured using DMEM medium supplemented with 10% FBS and antibiotics. Cells were expanded upon reaching approximately 90% confluency. Keratinocytes from passages 1-3 and fibroblasts from passages 3–5 were used in the experiments.

qRT-PCR detection of IBR target genes

Total RNA was isolated from keratinocytes, fibroblasts, and SKMEL28 cells using Trizol reagent, following the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined by absorbance reading at 260/280 nm on the Nanodrop One (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA). The integrity of the isolated RNA was confirmed by electrophoresis on a 1% agarose gel. The samples were then reverse-transcribed using the High Capacity Reverse Transcription kit according to the manufacturer's instructions.

The transcript levels of *EGFR*, *JAK3*, *BTK*, *ITK*, and *ERBB2* mRNA were determined using specific primers (Table 1). The calibrator gene used was Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), allowing comparative analysis using the $2^{-(DDCt)}$ method.

Table 1: Primer sequences.

GENE	FORWARD PRIMER	REVERSE PRIMER
<i>GAPDH</i>	ACATCGCTCAGACACCATG	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG
<i>EGFR</i>	TTCAGGAGCTGTACGTGCATT	CACAAGCGCTGTGTACCCT
<i>JAK3</i>	GCCTGGAGTGGCATGAGAA	CCCCGGTAAATCTTGGTGAA
<i>BTK</i>	TCTGAAGCGATCCCAACAGAA	TGCACGGTCAAGAGAAACAGG
<i>ITK</i>	GATCAACTGCCTCCACATTG	GGGCATCACCTCTTAGCACA

<i>ERBB2</i>	CGGGGTTTCCTTCCCCTAATG	CGGGGTTTCCTTCCCCTAATG
--------------	-----------------------	-----------------------

Cell viability assays

MTT assay

The viability of keratinocytes, fibroblasts, and melanoma cells from SKMEL-28 line was assessed using the colorimetric 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) metabolization method, which is based on the ability of viable cells to reduce tetrazolium salt in formazan crystals [21]. Seven thousand cells were seeded in 96-well culture plates. After 24 hours of plating, cell adherence was checked and the medium was replaced with fresh culture medium (KSFM for keratinocytes, DMEM supplemented with FBS and antibiotics for fibroblasts and SKMEL-28 cells) containing IBR at different concentrations (0, 1, 2, 5, 10, 25, 50 and 100 μM). After 48 hours of incubation, the culture medium was exchanged again for 90 μL of fresh medium plus 10 μL of MTT solution (5 mg/mL in PBS). After incubating the plates for 4 hours at 37°C, 5% CO₂ and protected from light, 100 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) were added to dissolve the formazan crystals. The absorbance was measured at 540 nm [22]. The IC₂₅ and IC₅₀ values were calculated for each cell type using nonlinear regression analysis in GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

Apoptosis detection assay

The assay was conducted using flow cytometry and two dyes were used to evaluate cell death: Annexin V and Propidium iodide (PI). For this, 8×10^5 cells were plated and, after 24 hours of incubation for adhesion to the culture surface, the culture medium was changed to fresh culture medium added with IBR at IC₂₅ and IC₅₀ concentrations. After 48 hours of incubation, the cells were harvested, collected and stained with the respective dyes, according to the manufacturer's instructions. Ten thousand events from each sample were recorded using the Attune[®] NxT Acoustic Focusing Cytometer flow cytometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cells that were negative for Annexin V and PI were considered viable, while those positive for Annexin V and negative for PI, as well as those positive for both dyes, were considered apoptotic. Data were analyzed using FlowJo 10.0.7 software (Treestar, Inc., Ashland, OR, USA) (LINS et al., 2024).

human Organotypic Skin Explant Culture (hOSEC)

Healthy skin explants were obtained from healthy abdominoplasty patients who signed the consent form prior to the procedure. The study protocol was approved by the research ethics committee of the University of Brasília prior to initiation (Protocol n. 30175020.0.0000.5558).

Skin was disinfected and the hypodermis removed. Then, it was sectioned with 6 mm-punches. The fragments were positioned on top of a sterile metal grid in 6-well plates, maintaining the dermis in contact with the culture medium (DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin) and the epidermis in contact with the air (Figure 2). The fragments were incubated at 37°C, 5% CO₂ (LEITE et al., 2021).

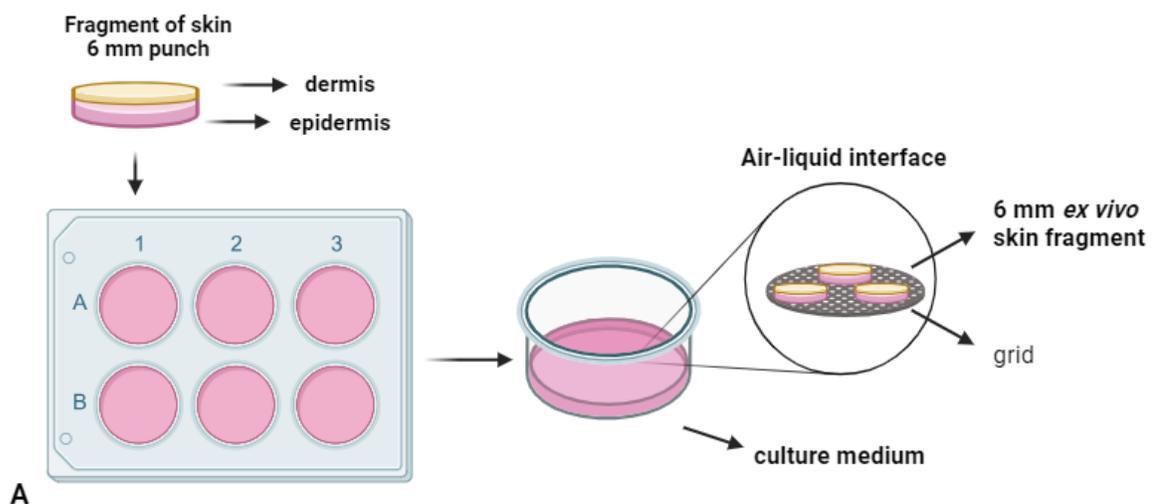


Figure 2: Human Organotypic Skin Explant Cultures. Skin fragments obtained from healthy donors were processed and cut into circular 6 mm-fragments. The explants were maintained in an air-liquid interface for up to 7 days.

Tissue viability assay

TTC metabolization assay

To evaluate the viability of hOSEC, a colorimetric method of 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC) metabolization was used. The assay serves as an indicator of the metabolic state of the tissue, used to distinguish between metabolically active and inactive parts [23]. To do so, skin preparation was carried out as previously described. The skin fragments were

then topically treated with 25 μL IBR at different concentrations and also treated with the addition of IBR to the medium (0, 10, 25, 50 and 100 μM). As a negative viability control, two experimental groups were added, consisting of skin fragments treated with 50% DMSO and 20% SDS. Treatments were maintained for 48 hours. After the incubation period, the fragments were transferred to a 24-well plate, with one fragment per well. Then, 1 mL of a 2% TTC solution diluted in DMEM without phenol red was added to each well and the plate was incubated again for 2 hours. After this step, the fragments were washed with PBS and then with a mixture of 70% ethanol and DMSO solution (1:1, v/v). The extraction was carried out overnight, at room temperature, on a plate shaker protected from light. Subsequently, 200 μL samples were taken from each well and transferred to a 96-well plate, where absorbance was measured at 485 nm.

Histological assessment of skin irritation

Histological alterations of hOSEC were observed after the skin fragments were topically treated with different concentrations of IBR (0, 10, 25, 50 and 100 μM). As positive irritation controls, the samples were treated with DMSO 50% or SDS 20%. After 48 hours, skin fragments were fixed in 10% formalin, and embedded in paraffin. They were dehydrated in ethanol baths of increasing grade and cleared with xylene before being included in paraffin, stained with Hematoxylin and Eosin, as well as Masson's Trichrome using standard protocols. Then, tissue sections were analyzed by a pathologist blind to the experimental groups. The results of histological analysis were conducted as described by Matarrese et al., 2021, under the supervision of a pathology specialist. All evaluations were carried out independently by a pathologist who was blinded to the experimental groups, guaranteeing impartiality in the analyses. The transverse sections were thoroughly examined, observing a variety of possible changes, classified on a scale of 0 to 4. Specific criteria were established for the controls to validate the results of the experiment, as follows: (1) The histological quality of the untreated controls should be good enough to allow detailed analysis. (2) Untreated controls should present similar histological results, with possible changes such as exocytosis with or without spongiosis, perinuclear edema, mainly attributable to preparation artifacts. However, such changes should not exceed grade 2 and/or compromise more serious interpretations. (3) Death-positive controls (treated with DMSO or SDS) should exhibit more severe changes than untreated, negative controls. (4) The severity of these changes should

be dose-dependent, and at the highest dose (100 μM), skin explants should present pre-necrotic or intense necrotic lesions.

These criteria were established to ensure the reliability and relevance of the results obtained in the histological analysis of skin irritation, thus providing a solid basis for the interpretation of the data [24] (Table 2).

Table 2: Final tolerance score of ex vivo histological irritation test.

Tolerance	Histological comparison between controls and IBR-treated samples
EXCELLENT	A single histological change (1)
VERY GOOD	Small histological changes A single structure with a higher rating (2) compared to control
GOOD	Histological changes At least 2 structures rated higher (2) compared to control
AVERAGE	Marked histological changes A single structure is classified as 3 or multiple structural changes classified as 2
BAD	Severe histological changes A single structure is classified as 4 or multiple structural changes classified as 3 or multiple structures that cannot be observed due to other changes

IBR skin permeation and dermatokinetic analyses

The skin preparation procedure was conducted as explained previously. Unlike previous experiments, the fragments were cut into circles with an area of approximately 2 cm² and stored at 4°C to be used later within 30 days. The concentration of IBR used in the experiment was 1 mg/mL (2.27 mM). The fragments were placed in Franz-type vertical diffusion cells, positioned between the donor and receptor compartments. The receptor compartment was filled with PBS, supplemented with 10% Tween80 to ensure sink conditions, while the donor compartment was filled with 500 µL IBR at 1 mg/mL. The system was maintained at 37°C using a thermal bath, with moderate agitation (300 rpm) for 12 and 24 hours.

At the completion of the experiment, the stratum corneum (SC) and the remaining skin (RS) were separated using the tape stripping technique. Briefly, the skin fragments were cleaned with water to remove the IBR solution and fixed on a foam support with the SC facing upwards. We used 15 adhesive tapes to remove the SC, fixing each tape over the tissue and removing it with a single movement. Then, the RS fragments were cut into small portions. Each layer was placed individually in amber bottles containing 5 mL methanol for drug extraction, maintaining moderate agitation (300 rpm) for 24 hours. The extracts were subsequently taken to HPLC analysis using a C₁₈ reversed-phase column (150 mm x 4.5 mm, 5 µm), with a mobile phase composed of acetonitrile and acidified water (0.01M phosphoric acid) in a ratio of 35:65 (v/v). The flow rate was 1.0 mL/min, the sample injection volume was 20 µL, the column oven was maintained at 35°C, and the drug was detected at 359 nm, with an average IBR retention time of 8.9 minutes. The Shimadzu LC software was used to acquire, analyze, and generate reports on the data obtained, previously validated by our group [25].

Data analysis

Histological analysis data were analyzed qualitatively. The other results were analyzed quantitatively. Data were presented as mean ± standard deviation (SD) or standard error. The differences between the amounts released or penetrated of the drug from each formulation were analyzed by ANOVA, followed by the Tukey test. The variables "toxicity", "migration" and "gene X expression" were tested for normality using the Lilliefors test. Variables that had a normal distribution were analyzed by ANOVA and Tukey or Bonferroni post hoc tests. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

RESULTS

Human primary skin cells present IBR target genes

We first determined whether human primary keratinocytes and fibroblasts present IBR target genes. Through qRT-PCR we have shown that both primary cell types present variable levels of transcript levels of the main IBR target genes, yet at a similar magnitude as the melanoma cell line SKMEL-28 (Figure 3A-E). Besides, trends towards higher *EGFR* expression in keratinocytes and *BTK* expression in fibroblasts were observed.

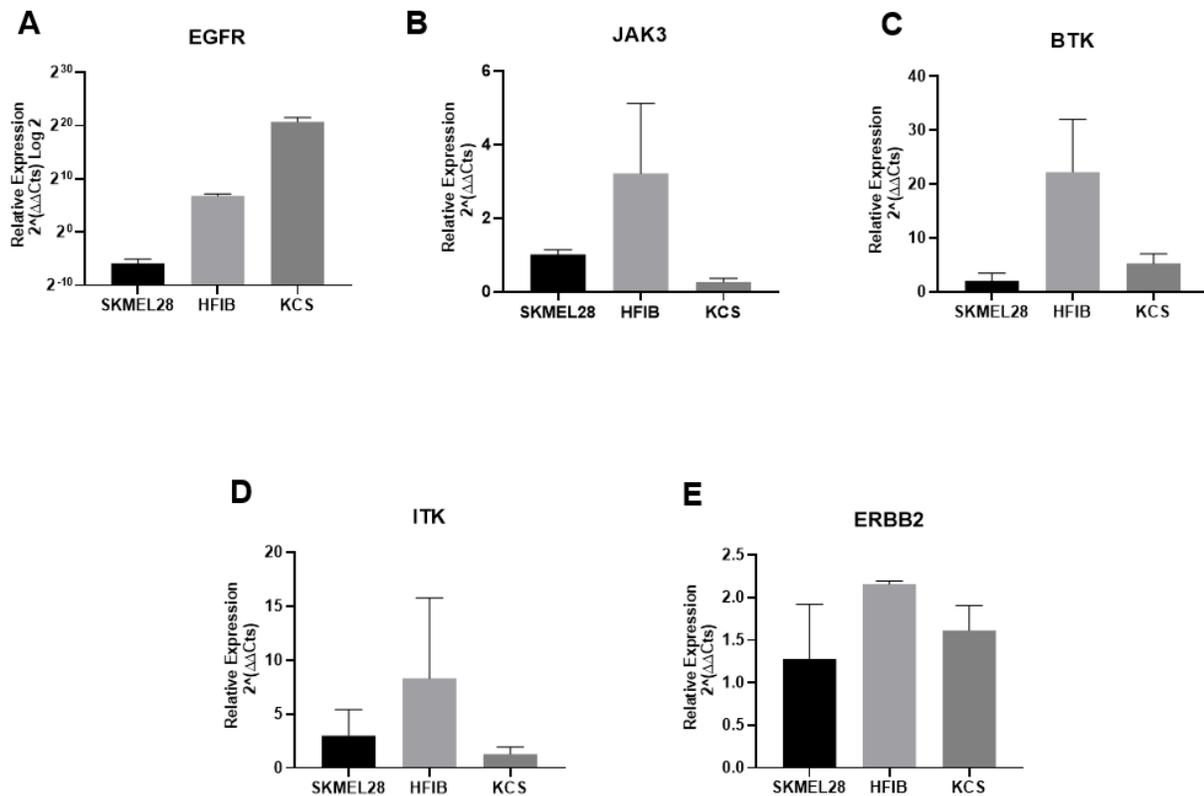


Figure 3: qRT-PCR of IBR target genes in primary cells from the skin. The mRNA levels of EGFR (A), JAK3 (B), BTK (C), ITK (D), and ERBB2 (E) were determined in human primary fibroblasts (HFIB) and keratinocytes (KCS). Data were normalized to SKMEL-28 mRNA levels and are represented with mean and standard error. Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons.

Human primary skin and melanoma cells present different sensitivity towards IBR

The MTT assay was used to evaluate the sensitivity of cells to IBR (Figure 4A-E). Fibroblasts presented lower sensitivity to the drug compared to the other cell types, while keratinocytes were more sensitive to IBR compared to both fibroblasts and the melanoma cell line SKMEL28. The drug significantly reduced fibroblast viability in concentrations of $>50 \mu\text{M}$ ($0 \times 50 \mu\text{M}$, $p = 0.0009$; $0 \times 100 \mu\text{M}$ $p < 0.0001$) (Figure 4A). The primary epidermal cells presented a significant decrease in viability when treated with $>25 \mu\text{M}$ IBR ($p = 0.02$) (Figure 4B). Cells from the melanoma cell line SKMEL28 showed a reduction in cell viability starting from $5 \mu\text{M}$ IBR ($p = 0.0001$) compared to the control (Figure 4C). The viability results were used to calculate the IC_{50} of IBR in each cell type, the IBR IC_{50} in fibroblasts being $31.54 \mu\text{M}$, versus $4.60 \mu\text{M}$ in keratinocytes and $8.22 \mu\text{M}$ in SKMEL28 cells (Figure 4D-E).

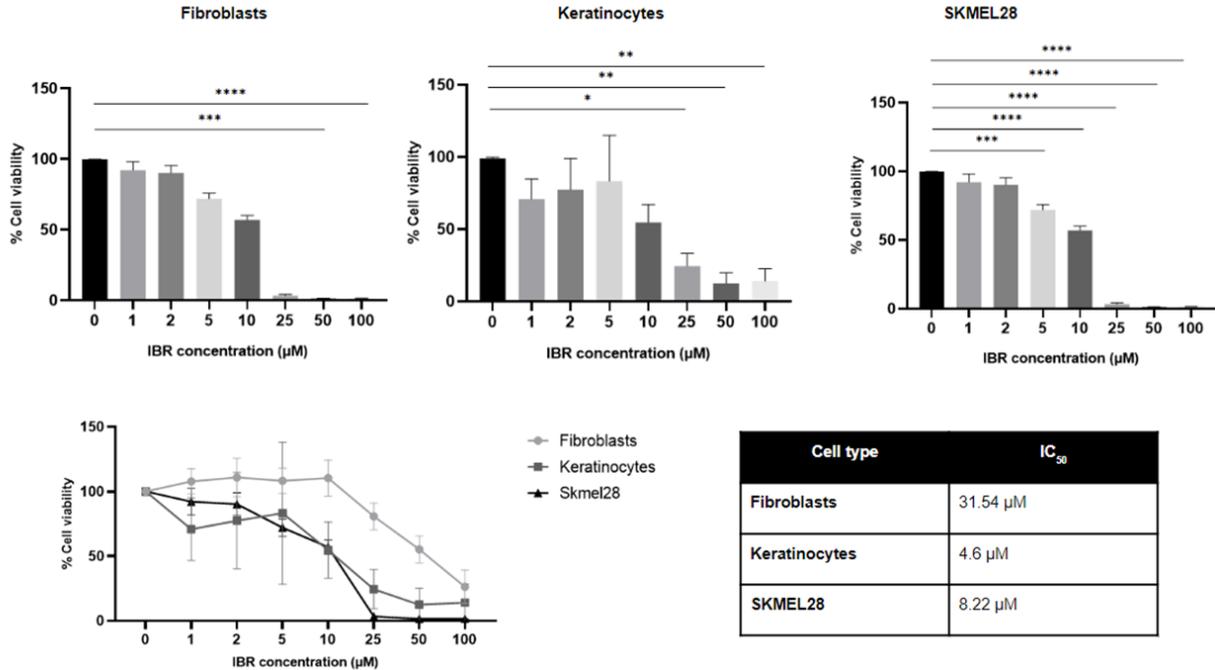


Figure 4: Cytotoxicity of IBR towards human primary skin cells. Human primary skin fibroblasts (A), keratinocytes (B), and SKMEL-28 cells (C) were treated with increasing doses of IBR for 48 h and had their viability assessed using the MTT assay. (D) Dose-response cytotoxicity of IBR to the different cell types tested. Data obtained from the MTT assay were used to determine the IC_{50} of IBR for each cell type (E). Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Previous results from our group indicated that IBR induces melanoma cell death through apoptosis induction [26]. Therefore, we also evaluated whether the treatment of cells with IC₅₀ IBR induced annexin V / PI staining. Our results showed that in fibroblasts there was a trend towards the increase in annexin V+ cells following the treatment with the IC₅₀, and a significant increase in total apoptotic cells upon treatment with 100 μM IBR (Figure 5). Such observations are compatible with apoptotic induction. In keratinocytes, apoptosis was not significantly induced. Considering that IBR inhibits EGFR signaling, and that EGFR inhibition promotes keratinocyte cornification, it is possible that the MTT reduction observed resulted from the inhibition of keratinocyte proliferation rather than apoptosis induction.

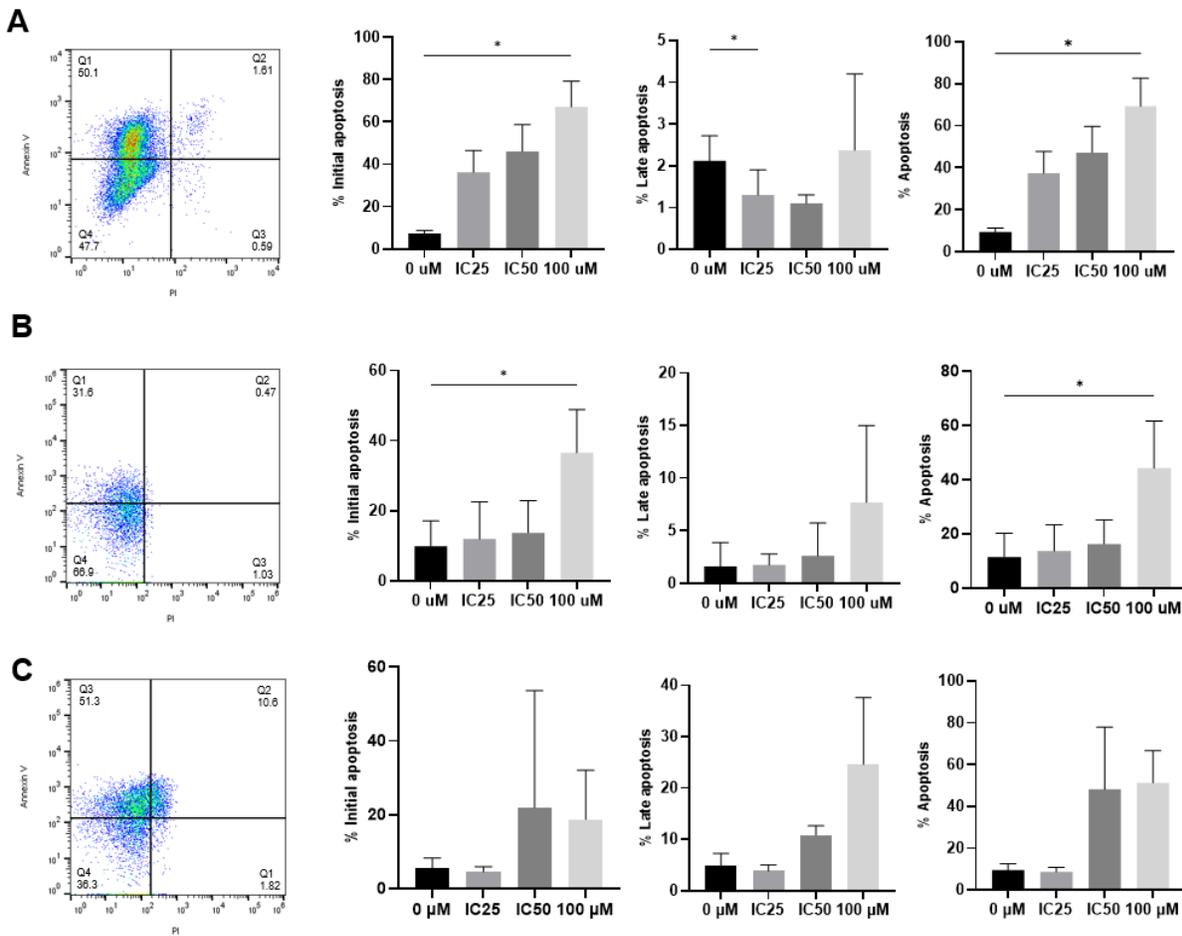


Figure 5: Apoptotic induction by IBR in human primary skin cells. Human primary skin fibroblasts (A), keratinocytes (B), and SKMEL28 cells (C) were treated with the IC₂₅, IC₅₀ as well as a high (100 μM) IBR doses for 48 h and had their viability assessed using the annexin V and PI staining. Representative dot plots are shown on the

left. Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

IBR toxicity to hOSEC is dependent on the administration route

The hOSEC viability test carried out using the TTC method, considered the best test for this type of evaluation [23]. When IBR was added in the tissue culture medium for 48 hours, the hOSEC models presented a significant loss of tissue viability at concentrations of 50 μM ($p < 0.05$) and 100 μM ($p < 0.001$), compared to untreated controls (Figure 6A). Both DMSO and SDS were used as positive toxicity/irritation controls, and while DMSO treatment did not affect tissue viability, SDS treatment resulted in a significant reduction in viability compared to control ($p < 0.0001$). Interestingly, when we repeated both assays applying IBR on top of hOSEC models mimicking a topical application, the drug toxicity was reduced. In the TTC assay, only SDS promoted significant tissue toxicity, while IBR was not toxic up to 100 μM (Figure 6B).

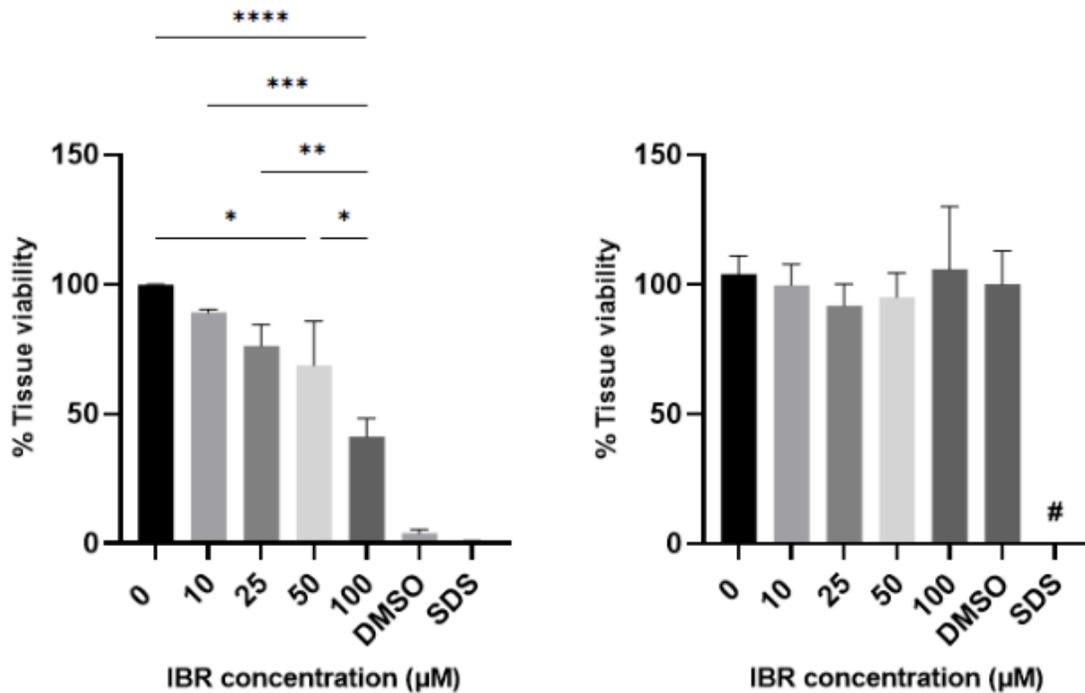


Figure 6: Irritation potential of IBR in hOSEC models. Human organotypic skin explant cultures were treated with increasing doses of IBR. The drug was either added in the tissue culture medium (A), or topically administered (B). After 48 h, tissue metabolic viability was assessed using the TTC assay. Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test for multiple comparisons. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; # $p < 0.0001$ compared to all other groups.

The histological assessment of skin irritation revealed that the hOSEC samples maintained normal structure in the observation periods of 48 hours, with rare structure alterations (Figure 7-8). Also as expected, the SDS-treated samples presented striking alterations regardless of the administration route (tissue culture medium or topical application), with intense intracellular edema, cellular lesion, and dermal-epidermal junction alterations being detected. While DMSO included in the tissue culture medium promoted mild tissue alterations, when topically applied, the drug presented a lower irritation score. The hOSEC samples presented progressive histological alterations with increasing IBR doses, nevertheless never reaching the degree of tissue irritation observed in the SDS-treated samples (Figure 7-8, Table 3).

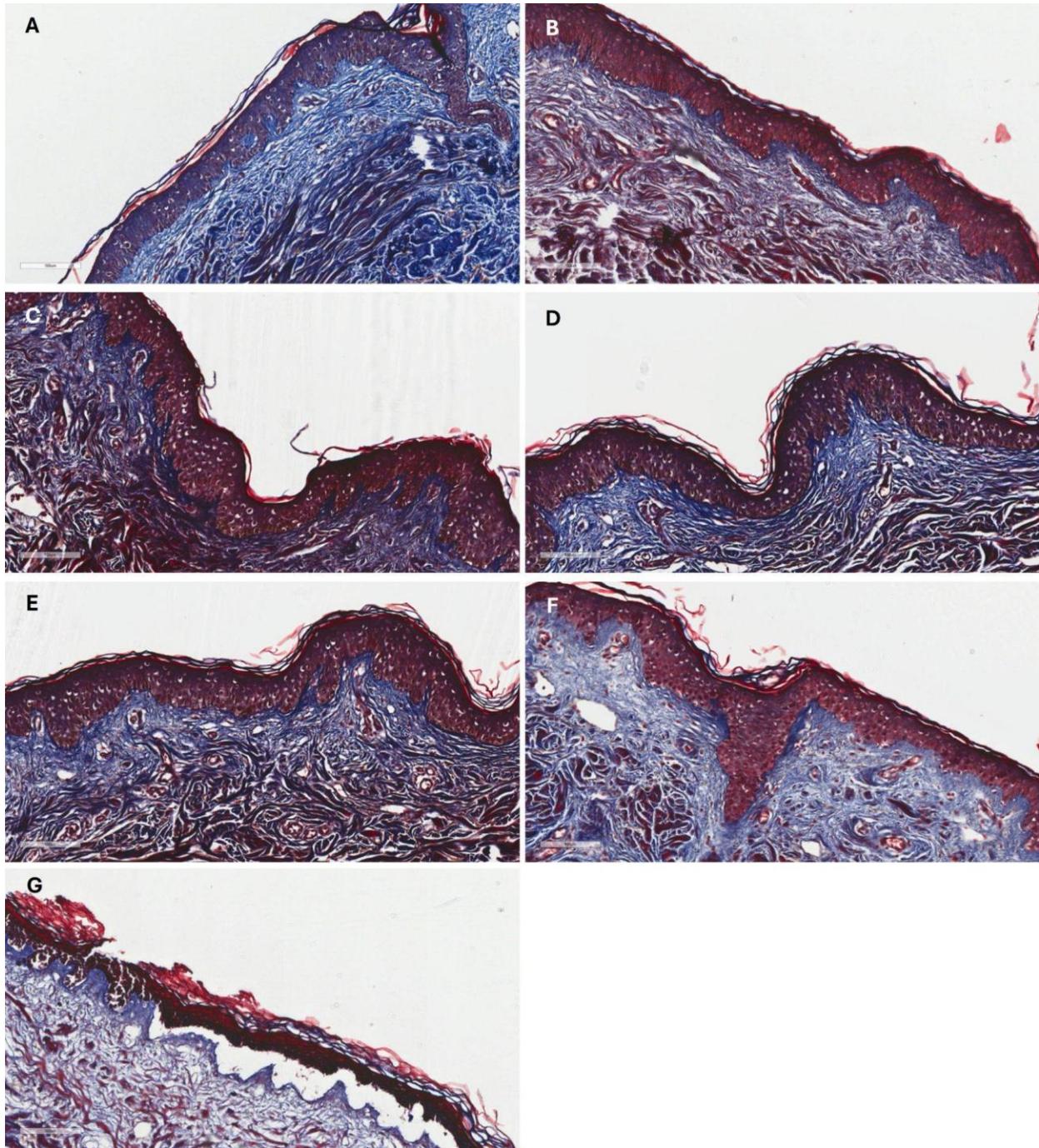


Figure 7: Histological observations of ex vivo skin samples treated with IBR added in the tissue culture medium. (A) Control group with few peri-nuclear oedema in the epidermis. (B) Group treated with 10 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (C) Group treated with 25 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (D) Group treated with 50 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (E) Group treated with 100 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (F) Group treated with DMSO presenting nuclear pyknosis. (G) Group treated with SDS presenting necrotic skin and dermal-epidermal junction separation. Scale bars: 100 μm . Masson's trichrome.

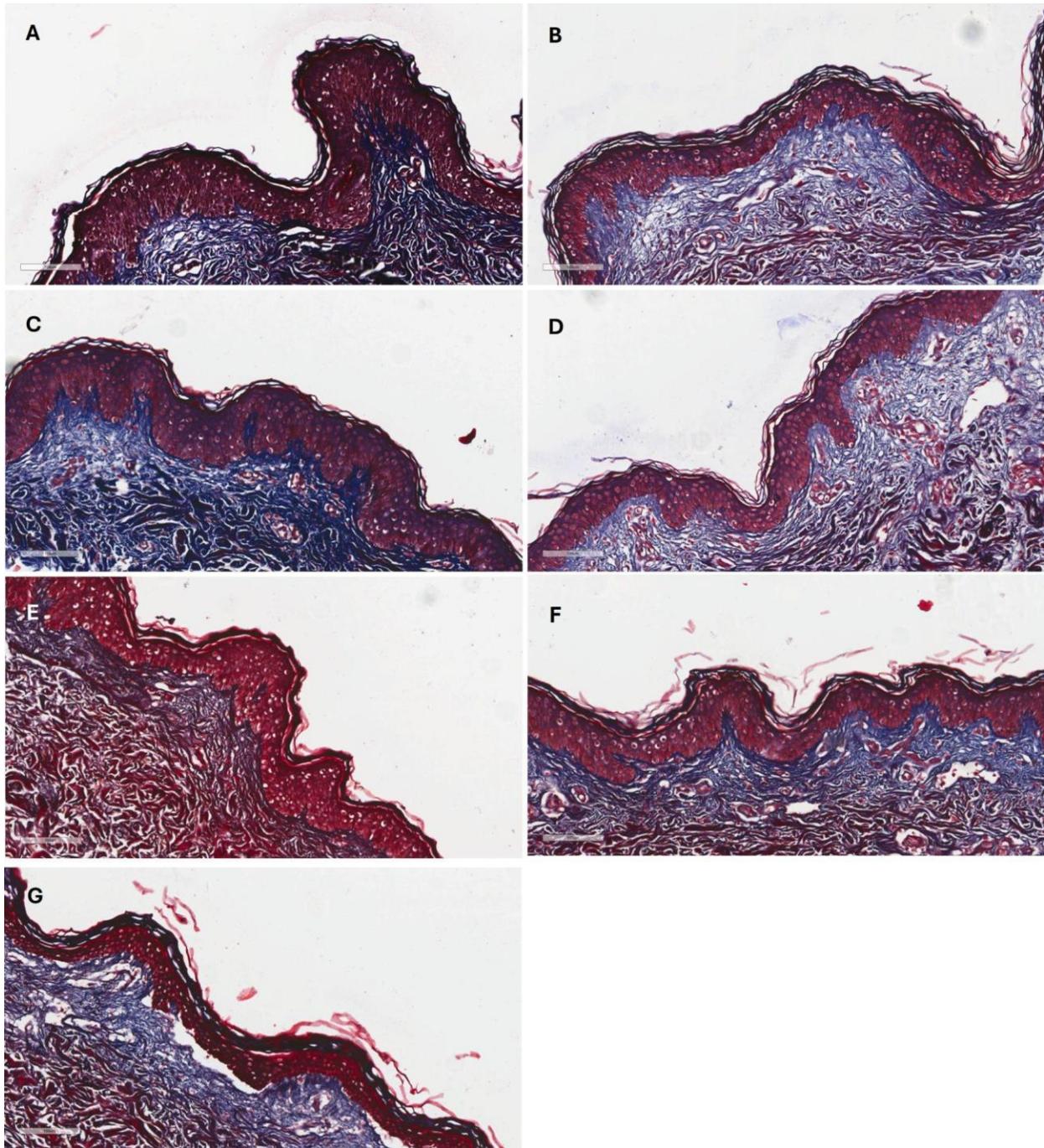


Figure 8: Histological observations of ex vivo skin samples treated with IBR added in the tissue culture medium.

(A) Control group with few peri-nuclear oedema in the epidermis. (B) Group treated with 10 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (C) Group treated with 25 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (D) Group treated with 50 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (E) Group treated with 100 μM IBR presenting mild peri-nuclear oedema in the epidermis. (F) Group treated with DMSO presenting nuclear pyknosis. (G) Group treated with SDS presenting necrotic skin and dermal-epidermal junction separation. Scale bars: 100 μm . Masson's trichrome.

Table 3: Classification of histological observations of ex vivo skin samples treated with IBR added in the tissue culture medium.

Treatment		Intracellular edema			Cellular injuries		Nuclear lesions			Dermal - epidermal injury	Inflammatory cells
	Irritation Score	Spongiosis	Acantholysis	Vesicles (keratinocyte separation)	Cytoplasmic edema	Necrosis of epidermal cells	Perinuclear edema (epidermis)	Intranuclear edema	Nuclear pyknosis	Dermal - epidermal junction separation	Exocytosis
Control	Very Good	0	0	0	0 - 1	0	2	0	0 - 2	0	0
10 µM	Good	0	0	0	0	0 - 1	2 - 3	0	2 - 3	0 - 2	0
25 µM	Average	0	0	0	0	0 - 2	3 - 4	0	2 - 3	0 - 2	0
50 µM	Average	0	0	0	0	0 - 1	3 - 4	0	2 - 3	0 - 2	0
100 µM	Average	0	0	0	0	0	3 - 4	0	2 - 3	0	0
SDS	Bad	2 - +4	2 - +4	0 - +4	0 - +4	+4 - 4	0 - +4	0 - +4	+4 - 4	+4 - 4	0 - +4
DMSO	Average	0 - 2	0	0	0 - 1	0	0	0	2 - 3	0	0

Table 4: Classification of histological observations of ex vivo skin samples treated with topically administered IBR.

Treatment		Intracellular edema	Cellular injuries	Nuclear lesions	Dermal - epidermal	Inflammatory cells
-----------	--	---------------------	-------------------	-----------------	--------------------	--------------------

										mal injury	
	Irritation Score	Spongiosis	Acantholysis	Vesicles (keratinocyte separation)	Cytoplasmic edema	Necrosis of epidermal cells	Perinuclear edema (epidermis)	Intranuclear edema	Nuclear pyknosis	Dermal - epidermal junction separation	Exocytosis
Control	Excellent	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
10 µM	Very good	0-1	0	0	0	0	2-3	0	0-1	0	0
25 µM	Very good	0	0	0	0	0-1	2-3	0	0-1	0	0
50 µM	Very good	0-1	0	0	0	0-1	2	0	1	0	0
100 µM	Average	0	0	0	0	0-1	1-3	0	0-1	0	0
SDS	Bad	0-1	2	2	0	3-4	0-2	0	3-4	3	0
DMSO	Good	0	0	0	0	0-1	1-2	0	1	0	0

IBR successfully permeates the stratum corneum

Skin permeation of IBR was analyzed at two different time intervals, 12 and 24 hours. Two skin layers were analyzed, the stratum corneum and the remaining skin. This method is considered as reliable since it was developed using skin and culture medium as matrices for IBR detection. We observed that IBR was capable of penetrating the stratum corneum after 12 hours, being detected both in the stratum corneum and the remaining skin (Figure 9). After 24 hours of incubation, the amount of drug that reached both skin layers increased, showing that drug penetration still occurred in this period of observation. The amount of drug observed in the remaining skin was superior to that detected at the stratum corneum after 12 ($p=0.0294$) and 24

hours ($p < 0.0001$). This suggests that IBR has the ability to reach different layers of the skin when topically administered.

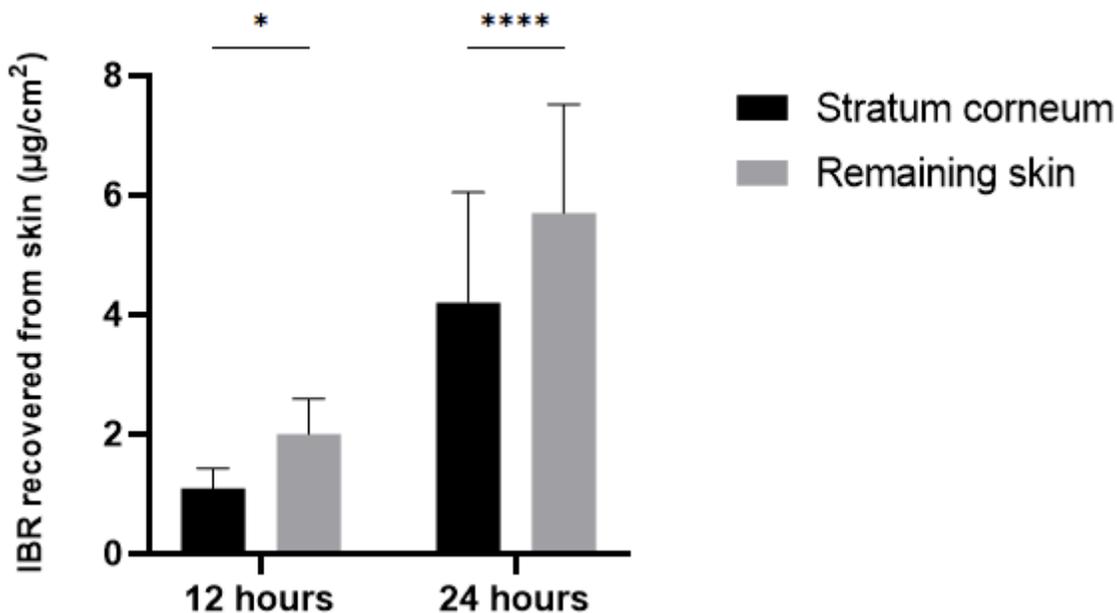


Figure 9: IBR dermatokinetics analysis in human skin. IBR was topically administered in human skin samples. The drug recovered from the stratum corneum and remaining skin after 12 and 24 h was determined using the HPLC method. Data were analyzed using Two-way ANOVA followed by Sidak's post-hoc test for multiple comparisons ; * $p < 0.05$; **** $p < 0.001$.

DISCUSSION

IBR has been originally conceived as a treatment strategy for malignant diseases of B cells, in which BTK is a crucial protein for cell survival and proliferation. Gradually, IBR was shown to be able to modulate at least ten other kinases, including some enzymes associated with solid tumors [27]. Such observations fostered the investigation of IBR as a possible treatment strategy for solid tumors, such as melanoma [26], [28].

The analysis of the safety and efficacy of IBR as a treatment option for melanoma is underway both at preclinical and clinical settings. In vitro, it has been consistently shown that IBR induces significant toxicity to leukemic B-cells at nanomolar ranges [29]. For skin cancers, IBR

has shown promising results, as an effective inducer of autophagy in carcinoma [28] and apoptosis in melanoma cell lines at micromolar ranges [26]. Further supporting the clinical potential of IBR for melanoma treatment, our group has recently shown that high expression of IBR-target genes is associated with the enrichment of apoptosis and necrosis pathways in clinical melanoma samples [26]. Nevertheless, IBR failed to promote clinical benefits when systemically administered in treatment-refractory distant metastatic cutaneous melanoma patients during a phase II trial [30]. In this study, the participants received higher doses of IBR than the FDA-approved dose, and while adverse effects (including skin reactions) affected half of the patient cohort, the general side effect profile of the drug was similar to previously published [31]. The low oral bioavailability of IBR [18], combined with the high doses required to effectively reach tumor cells, may have contributed to the occurrence of the reported side effects.

In this scenario, finding a safe and effective way to deliver the drug directly to melanoma cells might be an effective strategy to guarantee future clinical success. Therefore, in the present study, we hypothesized that the topical administration route might be useful to treat non-metastatic melanoma lesions with IBR. Before proposing such a route of administration, we set out to determine the skin toxicity, irritation and dermatokinetics profile of IBR using *ex vivo* skin models.

First, we evaluated whether primary skin cells express IBR-target genes, such as *EGFR*, *JAK3*, *BTK*, *ITK*, and *ERBB2* [15]. The expression of these genes was determined in skin fibroblasts and keratinocytes and compared to the mRNA levels found in the melanoma cell line SKMEL-28. A variable expression of the tested genes was observed, yet in the same range as the expression levels found in the melanoma cell line.

We conducted cell viability assays on fibroblasts, keratinocytes, and SKMEL-28 cells exposed to different IBR concentrations and observed a positive dose-response relationship in the reduction of cell viability in treated cells, in agreement with findings previously documented in the literature [26], [28]. In all cell types, IBR seems to reduce cell viability through apoptotic induction, similar to observations made by our group and others [26], [28]. Compared to the melanoma cell line SKMEL-28, keratinocytes presented similar sensitivity to the drug, while fibroblasts demonstrated higher resistance to IBR treatment.

Considering that the toxicity of topically administered drugs is heavily influenced by the capacity of penetrating the stratum corneum, we set out to investigate the toxicity of IBR in cultures of organotypic human skin explants, known as hOSEC. This experimental model represents an ex vivo approach that resembles human skin as closely as possible under in vitro conditions [32]. The adoption of explant models has been very attractive for studies in the dermatological area due to their easy obtention and their undisputable potential to mimic tissue and cellular responses, in addition to reducing dependence on animal testing [33]. The hOSEC model is capable of reproducing in vivo conditions, temporarily maintaining the skin tissue viability through a culture medium that provides energy and nutrients for cells to sustain their metabolism. Its main advantage lies in the preservation of the stratum corneum, as well as the presence of all skin cell types. Furthermore, the maintenance of hOSEC in air-liquid interface makes it possible to study topical and transdermal products. As limitations, hOSEC presents variability between patients, similar to all primary cultures, and its performance is strictly dependent on optimized cell culture conditions [22], [33], [34].

Here, we employed the hOSEC model to evaluate the toxicity and irritation potential of topically administered IBR. The results revealed that topical drug application did not induce toxicity up to a concentration of 100 μM , whereas application in the culture medium significantly compromised tissue metabolic activity starting at 50 μM . To evaluate the irritation potential of IBR, we assessed the hOSEC structure using histological analysis to identify structure alterations induced by IBR treatment following two routes of administration. Our results showed that IBR toxicity is mostly reduced upon topical administration. Even at the highest concentration tested, IBR presented an "Average" irritation score, which is consistent with non-irritant classification in patch tests performed on subjects [24].

Complementing our analysis, we have demonstrated that IBR permeates the stratum corneum and reaches the viable epidermis and dermis [20]. Considering that drug toxicity might be influenced by its dermatokinetics, we analyzed the IBR permeation profile at different time points. Our analysis showed that IBR continuously permeated the stratum corneum up to 24 h, which was the longest time point analyzed. Drug penetration into the remaining skin reached approximately 6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($\sim 13.6 \mu\text{M}$), which is in the same range as the IC_{50} concentration of the drug to the SKMEL-28 cell line.

Taken together, our results indicate that the topical administration of IBR might constitute a safe and feasible strategy for local melanoma treatment that deserves being further investigated, in order to replace systemic administration, and reducing or even eliminating many of the associated side effects.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.V.S.S, L.F.F.A, S.M.B., E.M.G., E.C.I.B., L.S.Q.: formal investigation, data analysis, and writing—original draft; E.C.B.D., J.N.B.: execution and supervision of histological assessment of skin irritation; J.L.C., G.M.G. and F.S.-A.: Article conceptualization, methodology, resources, writing—review and editing, and supervision. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This study was funded by the *Fundação de Amparo à Pesquisa do Distrito Federal* (FAPDF; Grant N. 00193-00000721/2021-04) and the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; Grant N. 302317/2022-8; N. 305312/2020-0; N. 310663/2023-7).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

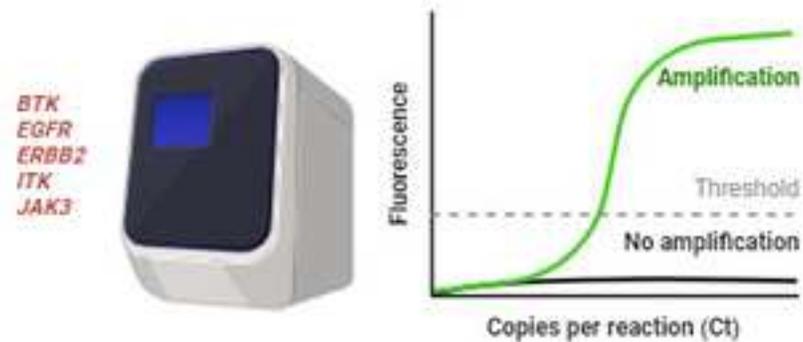
- [1] S. Honda, T. Matsuda, M. Fujimuro, and Y. Sekine, “Tyrosinase regulates the motility of human melanoma cell line A375 through its hydroxylase enzymatic activity,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 707, p. 149785, May 2024, doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149785.
- [2] Y. Zhan, Z. Yang, H. Zeng, J. Yu, X. Chen, and Y. Wu, “Extracellular vesicle-derived non-coding RNAs in remodeling melanoma,” *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 172, p. 116213, Mar. 2024, doi: 10.1016/j.biopha.2024.116213.
- [3] J. Zhao, N. Gao, J. Xu, X. Zhu, G. Ling, and P. Zhang, “Novel strategies in melanoma treatment using silver nanoparticles,” *Cancer Lett*, vol. 561, p. 216148, May 2023, doi: 10.1016/j.canlet.2023.216148.
- [4] G. V Long, S. M. Swetter, A. M. Menzies, J. E. Gershenwald, and R. A. Scolyer, “Cutaneous melanoma,” *The Lancet*, vol. 402, no. 10400, pp. 485–502, Aug. 2023, doi: 10.1016/S0140-6736(23)00821-8.
- [5] K. Saginala, A. Barsouk, J. S. Aluru, P. Rawla, and A. Barsouk, “Epidemiology of Melanoma,” *Medical Sciences*, vol. 9, no. 4, p. 63, Oct. 2021, doi: 10.3390/medsci9040063.
- [6] A. Villani, L. Potestio, G. Fabbrocini, G. Troncone, U. Malapelle, and M. Scalvenzi, “The Treatment of Advanced Melanoma: Therapeutic Update,” *Int J Mol Sci*, vol. 23, no. 12, p. 6388, Jun. 2022, doi: 10.3390/ijms23126388.
- [7] J. Read, K. A. W. Wadt, and N. K. Hayward, “Melanoma genetics,” *J Med Genet*, vol. 53, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2016, doi: 10.1136/jmedgenet-2015-103150.
- [8] A. H. Shain and B. C. Bastian, “From melanocytes to melanomas,” *Nat Rev Cancer*, vol. 16, no. 6, pp. 345–358, Jun. 2016, doi: 10.1038/nrc.2016.37.
- [9] I. Yeh and B. C. Bastian, “Melanoma pathology: new approaches and classification*,” *British Journal of Dermatology*, vol. 185, no. 2, pp. 282–293, Aug. 2021, doi: 10.1111/bjd.20427.
- [10] J. Moser and K. Grossman, “Adjuvant therapy for resected high-risk melanoma,” *Semin Cutan Med Surg*, vol. 37, no. 2, pp. 109–111, Jun. 2018, doi: 10.12788/j.sder.2018.022.
- [11] K. T. Flaherty *et al.*, “Improved Survival with MEK Inhibition in BRAF-Mutated Melanoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 367, no. 2, pp. 107–114, Jul. 2012, doi: 10.1056/NEJMoa1203421.
- [12] R. Roskoski, “Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2024 update,” *Pharmacol Res*, vol. 200, p. 107059, Feb. 2024, doi: 10.1016/j.phrs.2024.107059.
- [13] Z. Pan *et al.*, “Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for Bruton’s Tyrosine Kinase,” *ChemMedChem*, vol. 2, no. 1, pp. 58–61, Jan. 2007, doi: 10.1002/cmdc.200600221.
- [14] S. Paydas, “Management of adverse effects/toxicity of ibrutinib,” *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 136, pp. 56–63, Apr. 2019, doi: 10.1016/j.critrevonc.2019.02.001.

- [15] J. Singh, R. C. Petter, and A. F. Kluge, "Targeted covalent drugs of the kinase family," *Curr Opin Chem Biol*, vol. 14, no. 4, pp. 475–480, Aug. 2010, doi: 10.1016/j.cbpa.2010.06.168.
- [16] S. Nocco *et al.*, "Ibrutinib-associated dermatologic toxicities: A systematic review and meta-analysis," *Crit Rev Oncol Hematol*, vol. 174, p. 103696, Jun. 2022, doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103696.
- [17] V. Sibaud, M. Beylot-Barry, C. Protin, E. Vigarios, C. Recher, and L. Ysebaert, "Dermatological Toxicities of Bruton's Tyrosine Kinase Inhibitors," *Am J Clin Dermatol*, vol. 21, no. 6, pp. 799–812, Dec. 2020, doi: 10.1007/s40257-020-00535-x.
- [18] F. Shakeel, M. M. Salem-Bekhit, M. Iqbal, and N. Haq, "Solubility and thermodynamic function of a new anticancer drug ibrutinib in 2-(2-ethoxyethoxy)ethanol+water mixtures at different temperatures," *J Chem Thermodyn*, vol. 89, pp. 159–163, Oct. 2015, doi: 10.1016/j.jct.2015.04.014.
- [19] E. Csányi, M. Bakonyi, A. Kovács, M. Budai-Szűcs, I. Csóka, and S. Berkó, "Development of Topical Nanocarriers for Skin Cancer Treatment Using Quality by Design Approach," *Curr Med Chem*, vol. 26, no. 35, pp. 6440–6458, Dec. 2019, doi: 10.2174/0929867325666181116143713.
- [20] L. F. F. Albuquerque *et al.*, "Development and Validation of a Chromatographic Method for Ibrutinib Determination in Human and Porcine Skin," *Chemistry (Easton)*, vol. 6, no. 2, pp. 272–282, Feb. 2024, doi: 10.3390/chemistry6020014.
- [21] K. Buranaamnuay, "The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: a variety of the assay protocols," *Open Vet J*, vol. 11, no. 2, p. 251, 2021, doi: 10.5455/OVJ.2021.v11.i2.9.
- [22] M. N. Leite *et al.*, "Ex vivo model of human skin (hOSEC) for assessing the dermatokinetics of the anti-melanoma drug Dacarbazine," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 160, p. 105769, May 2021, doi: 10.1016/j.ejps.2021.105769.
- [23] J. Vostálová, M. Cukr, B. Zálešák, R. Lichnovská, J. Ulrichová, and A. Rajnochová Svobodová, "Comparison of various methods to analyse toxic effects in human skin explants: Rediscovery of TTC assay," *J Photochem Photobiol B*, vol. 178, pp. 530–536, Jan. 2018, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.12.011.
- [24] P. Matarrese, G. Beauchef, L. Peno-Mazzarino, E. Lati, R. Fitoussi, and K. Vié, "Assessment of an ex vivo irritation test performed on human skin explants and comparison of its results with those of a 24-/48-h human patch test for the evaluation of cosmetics," *Toxicology in Vitro*, vol. 70, p. 105030, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.tiv.2020.105030.
- [25] L. F. F. Albuquerque *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*, vol. 237, p. 113875, May 2024, doi: 10.1016/j.colsurfb.2024.113875.

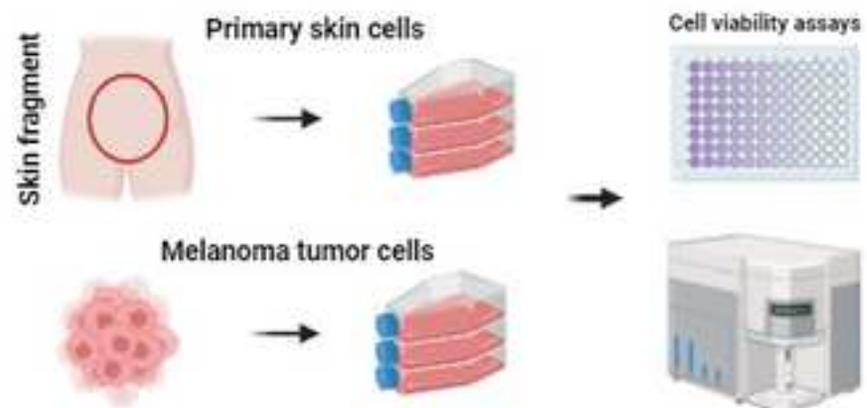
- [26] F. V. Lins *et al.*, “Ibrutinib Modulates Proliferation, Migration, Mitochondrial Homeostasis, and Apoptosis in Melanoma Cells,” *Biomedicines*, vol. 12, no. 5, p. 1012, May 2024, doi: 10.3390/biomedicines12051012.
- [27] J. K. Messex and G.-Y. Liou, “Targeting BTK Signaling in the Microenvironment of Solid Tumors as a Feasible Cancer Therapy Option,” *Cancers (Basel)*, vol. 13, no. 9, p. 2198, May 2021, doi: 10.3390/cancers13092198.
- [28] F.-D. Sun, P.-C. Wang, J. Shang, S.-H. Zou, and X. Du, “Ibrutinib presents antitumor activity in skin cancer and induces autophagy.,” *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, vol. 22, no. 2, pp. 561–566, Jan. 2018, doi: 10.26355/eurrev_201801_14210.
- [29] S. Sinha *et al.*, “Sensitivity of Ibrutinib Exposed Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cells to Inhibition of Axl Receptor Tyrosine Kinase,” *Blood*, vol. 128, no. 22, pp. 2020–2020, Dec. 2016, doi: 10.1182/blood.V128.22.2020.2020.
- [30] S. J. Moschos *et al.*, “Targeting the IL-2 inducible kinase in melanoma; a phase 2 study of ibrutinib in systemic treatment-refractory distant metastatic cutaneous melanoma: preclinical rationale, biology, and clinical activity (NCI9922),” *Melanoma Res*, vol. 31, no. 2, pp. 162–172, Apr. 2021, doi: 10.1097/CMR.0000000000000726.
- [31] C. Grommes *et al.*, “Phase 1b trial of an ibrutinib-based combination therapy in recurrent/refractory CNS lymphoma,” *Blood*, vol. 133, no. 5, pp. 436–445, Jan. 2019, doi: 10.1182/blood-2018-09-875732.
- [32] T. A. Andrade *et al.*, “Ex vivo Model of Human Skin (hOSEC) as Alternative to Animal use for Cosmetic Tests,” *Procedia Eng*, vol. 110, pp. 67–73, 2015, doi: 10.1016/j.proeng.2015.07.011.
- [33] D. S. Masson-Meyers *et al.*, “Experimental models and methods for cutaneous wound healing assessment,” *Int J Exp Pathol*, vol. 101, no. 1–2, pp. 21–37, Feb. 2020, doi: 10.1111/iep.12346.
- [34] M. A. C. Frade *et al.*, “Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC),” *An Bras Dermatol*, vol. 90, no. 3, pp. 347–350, Jun. 2015, doi: 10.1590/abd1806-4841.20153645.

Figure 1

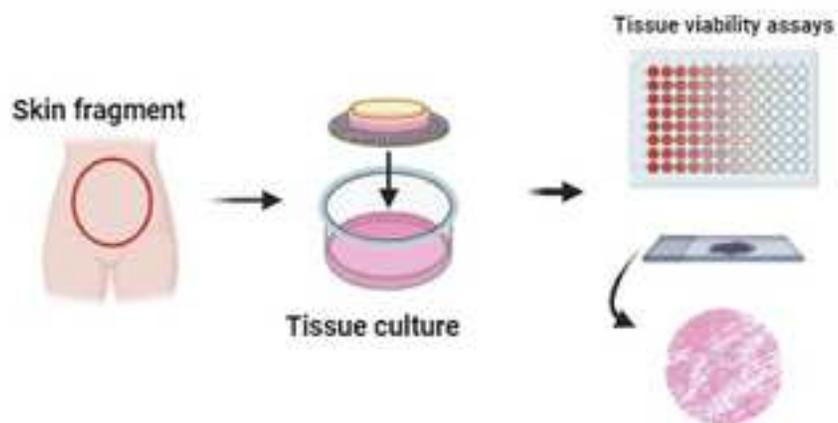
1 qPCR IBR target genes



2 Isolation of primary cells and culture of tumor cells



3 Tissue culture - hOSEC model



4 Assessment of IBR dermatokinetics

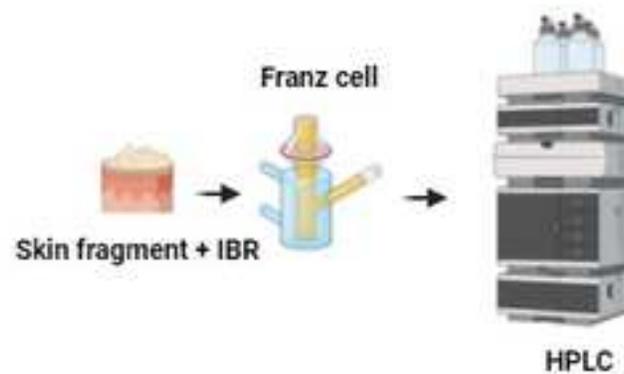


Figure 2

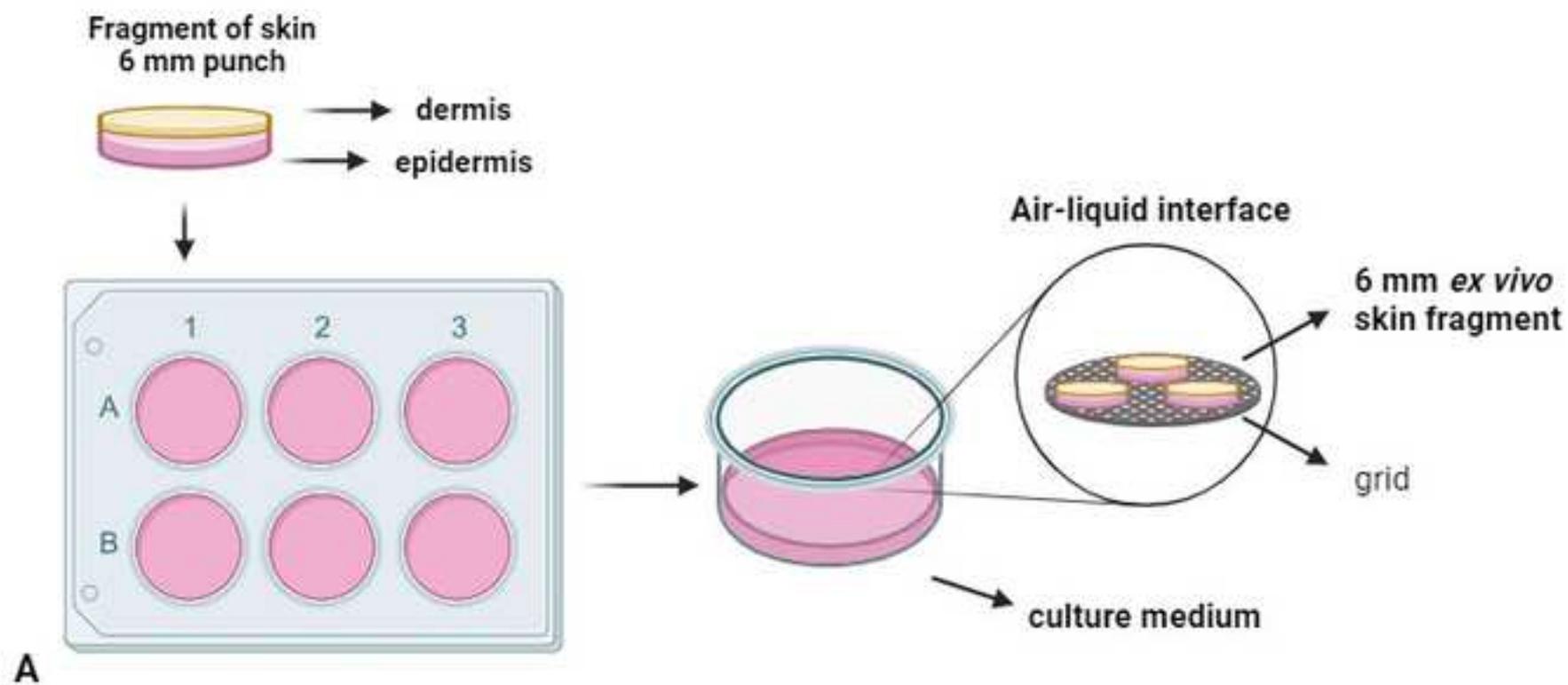


Figure 3

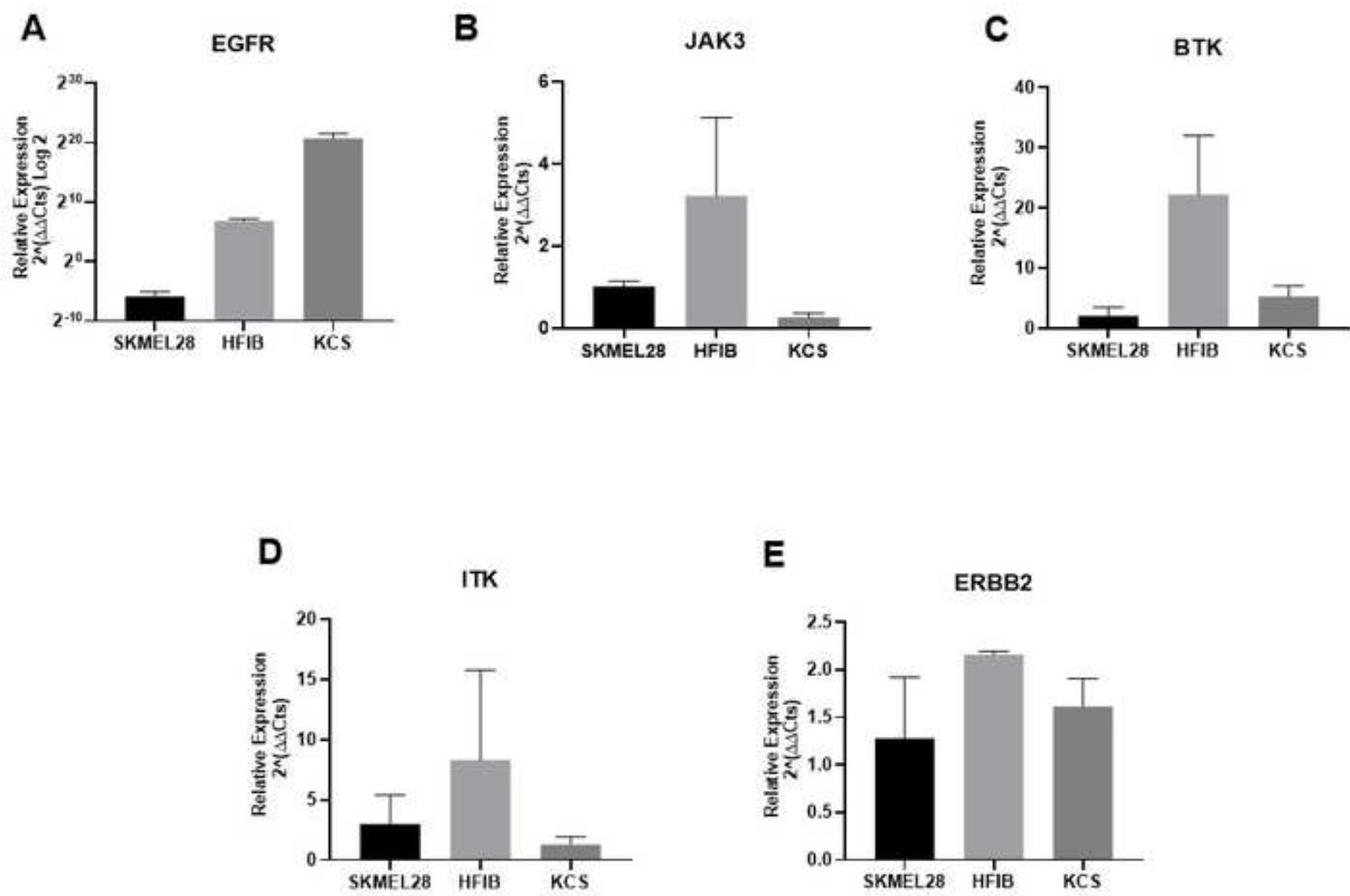
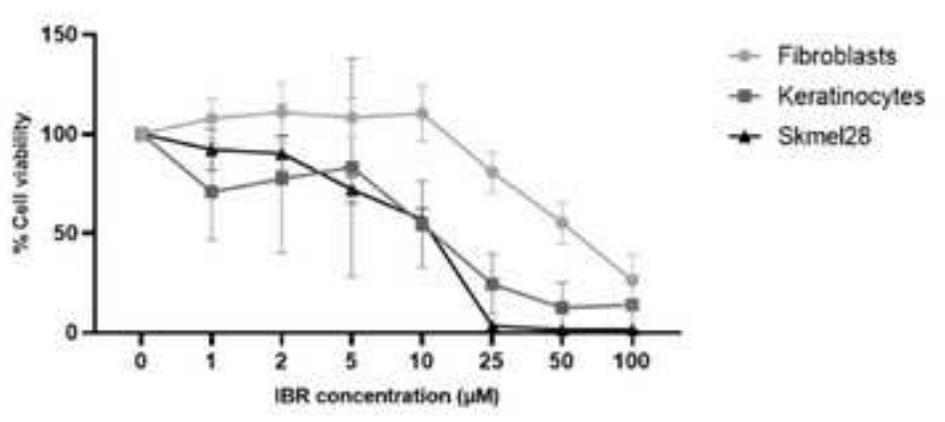
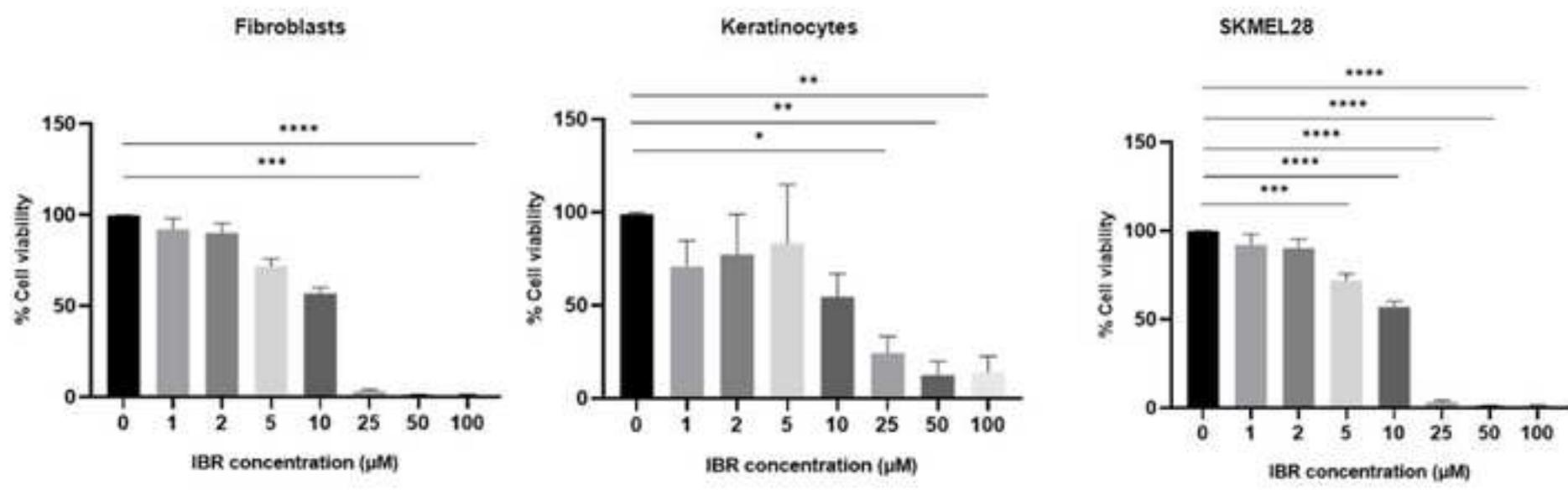


Figure 4



Cell type	IC ₅₀
Fibroblasts	31.54 µM
Keratinocytes	4.6 µM
SKMEL28	8.22 µM

Figure 5

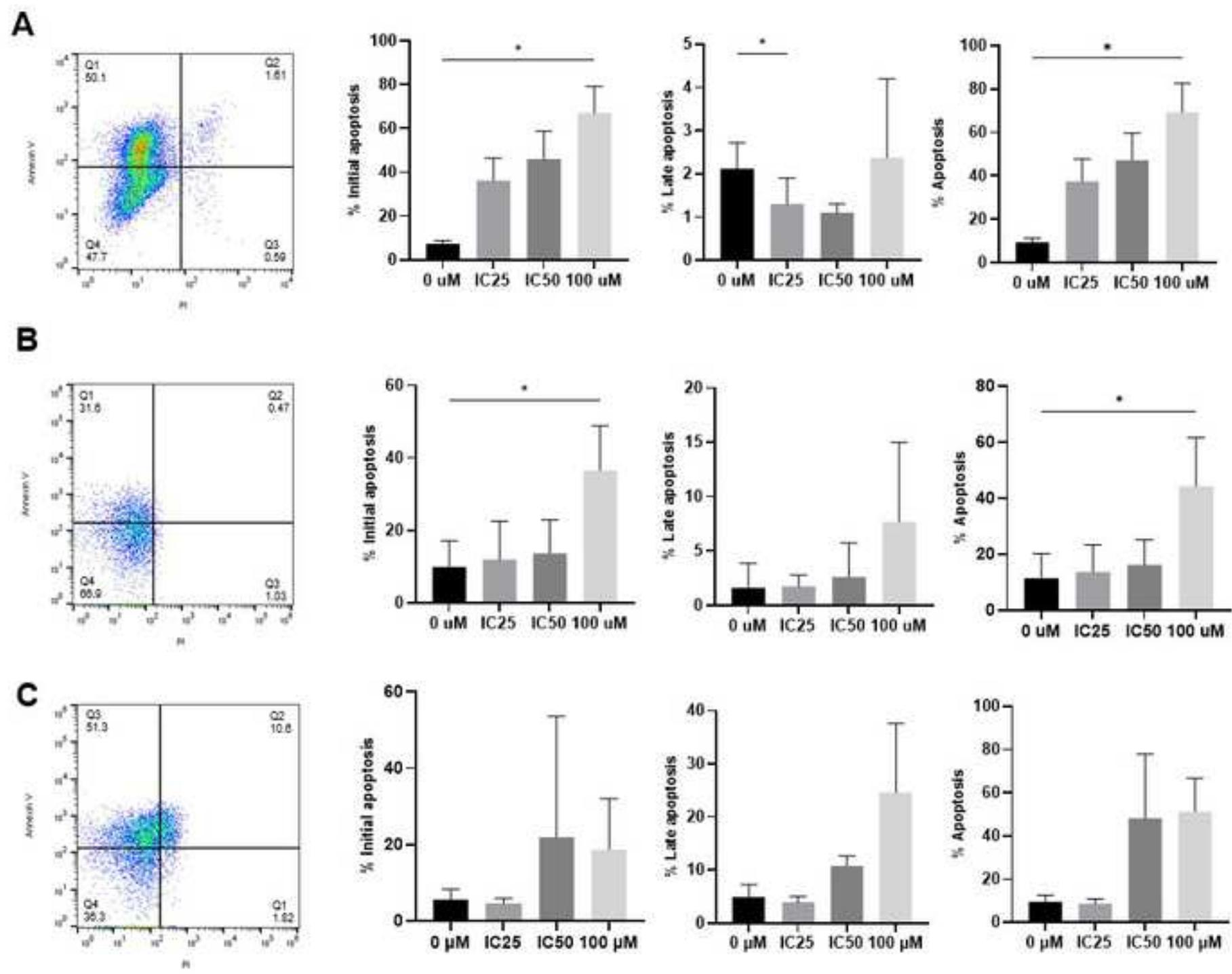


Figure 6

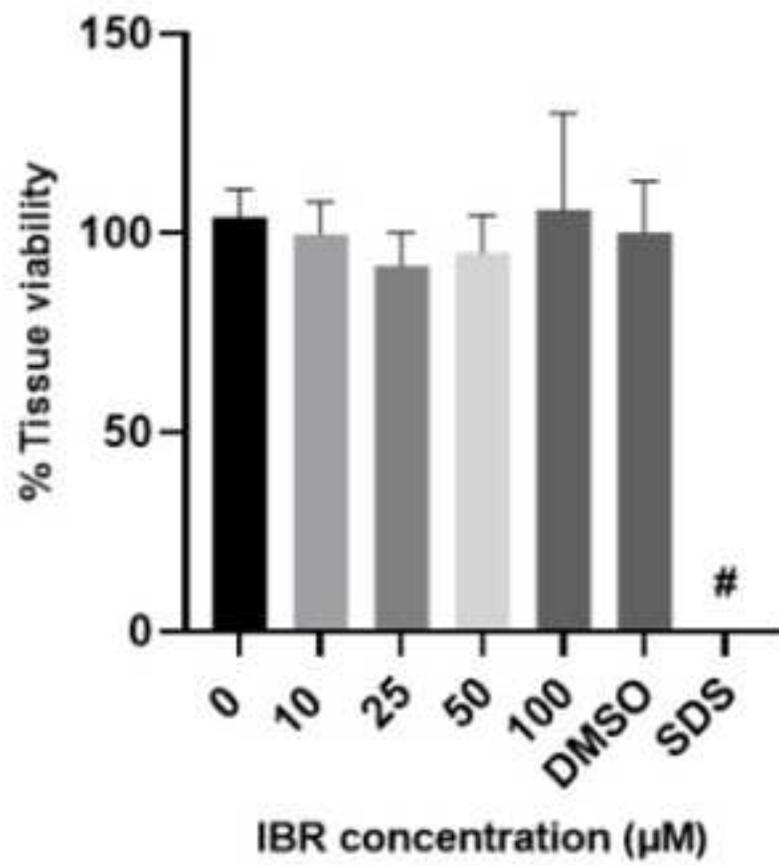
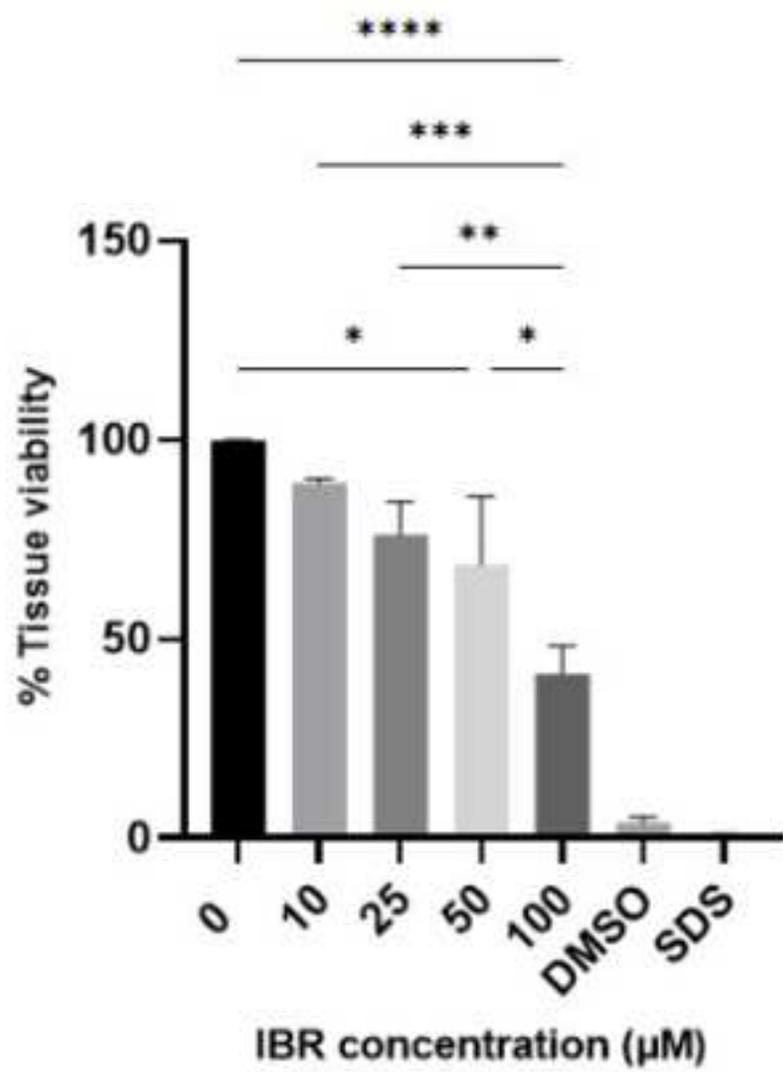


Figure 7

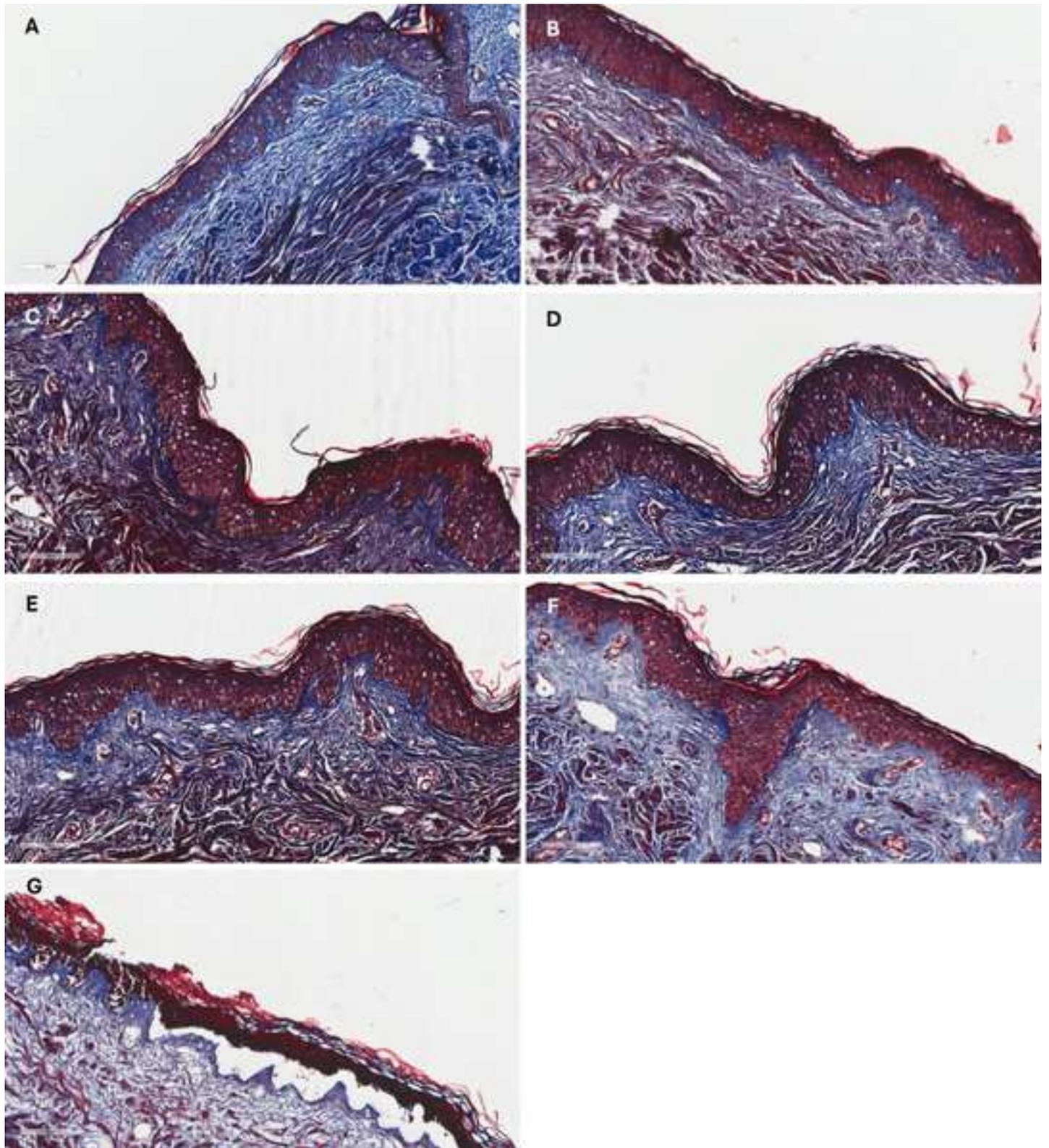


Figure 8

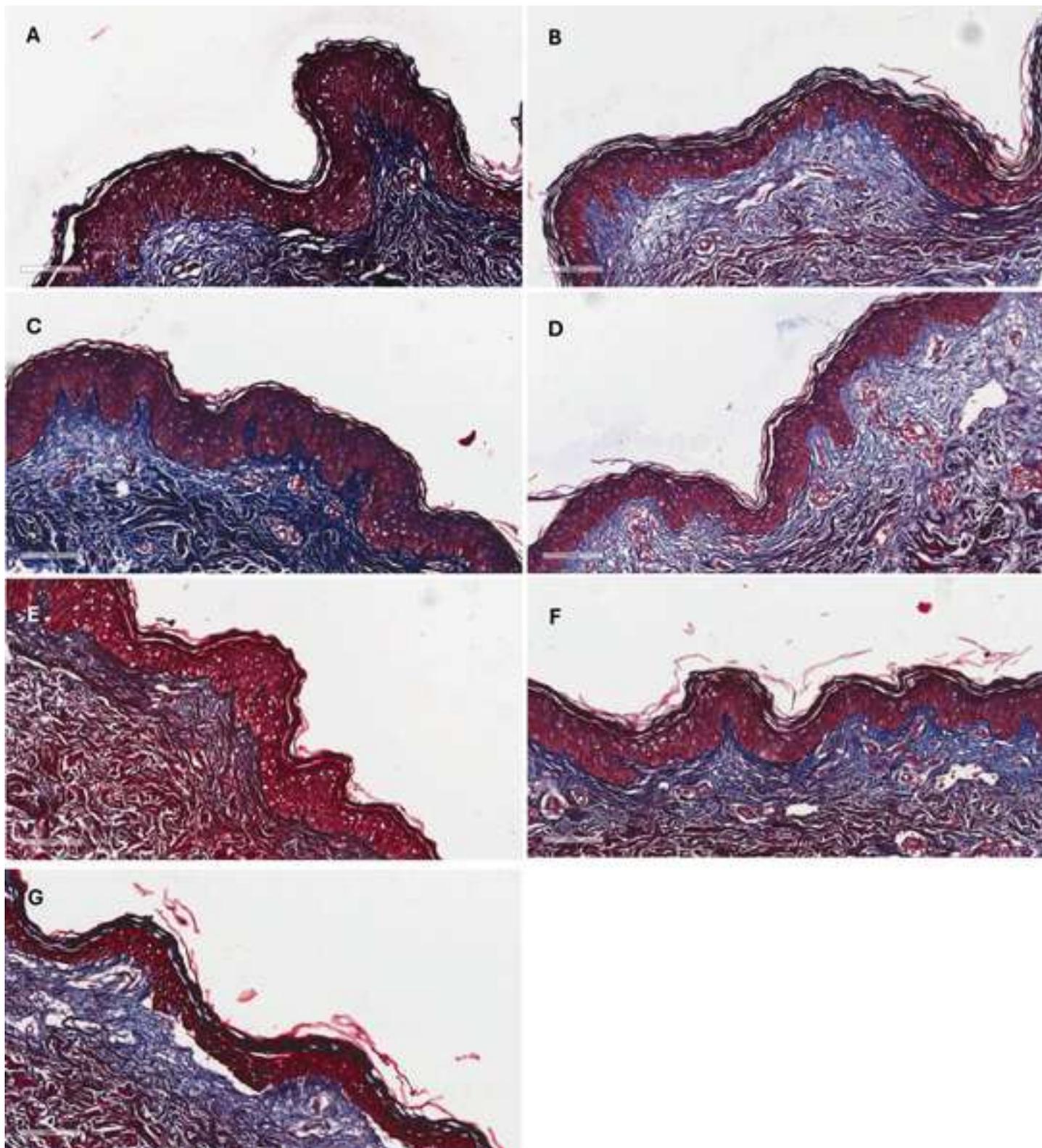


Figure 9

