

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANUELE CRISTINA ZUB

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NANOCOMPÓSITO DE OURO EM LINHAGENS DE
MELANOMA HUMANO: TESTES *IN VITRO* E MODELAGEM DE REDES BIOLÓGICAS

CURITIBA

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EMANUELE CRISTINA ZUB

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NANOCOMPÓSITO DE OURO EM LINHAGENS DE MELANOMA

HUMANO: TESTES *IN VITRO* E MODELAGEM DE REDES BIOLÓGICAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Vargas
Coorientadora: Profa. Dra. Carolina Camargo de Oliveira

CURITIBA
2025

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Zub, E. C.

Avaliação da atividade de nanocompósito de ouro em linhagens de melanoma humano: testes *in vitro* e modelagem de redes biológicas. /Emanuele Cristina Zub. – Curitiba, 2025.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Vargas.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Carolina Camargo de Oliveira.

1. Melanoma. 2. Ouro. 3. Goma arábica. 4. Estudos de viabilidade. 5. Biologia celular. 6. Migração celular. 7. Técnicas *in vitro*. 8. Nanopartículas. I. Vargas, José Eduardo. II. Oliveira, Carolina Camargo de, 1979-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de EMANUELE CRISTINA ZUB, intitulada: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE NANOCOMPÓSITO DE OURO EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO: TESTES *IN VITRO* E MODELAGEM DE REDES BIOLÓGICAS, sob orientação do Prof. Dr. JOSE EDUARDO VARGAS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Junho de 2025.

Assinatura Eletrônica

30/06/2025 13:06:55.0

JOSE EDUARDO VARGAS

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

01/07/2025 10:04:29.0

EDUARDO CHIELA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL)

Assinatura Eletrônica

02/07/2025 13:14:10.0

DANIEL DE LIMA BELLAN

Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE GENÉTICA)

RESUMO

O melanoma é uma forma agressiva de câncer de pele, originada dos melanócitos, que se destaca pela elevada plasticidade, capacidade invasiva e resistência a tratamentos tradicionais. Sua progressão envolve complexas adaptações metabólicas e alterações no microambiente tumoral, bem como a ativação de vias de sinalização como PI3K/AKT, MAPK/ERK e Wnt/ β -catenina. Diante da necessidade de abordagens terapêuticas inovadoras, nanopartículas de ouro têm sido estudadas e têm demonstrado potencial promissor na terapia para melanoma. Nanobastões de ouro estabilizados com goma arábica (GA-AuNRs), demonstraram potencial para modular respostas celulares sem apresentar citotoxicidade em modelo de melanoma murino. Neste estudo, investigou-se o efeito de GA-AuNRs em concentrações não citotóxicas sobre três linhagens de melanoma humano com distintas mutações: SK-MEL-28 (*BRAF*), MEWO (*NF1*) e SK-MEL-147 (*NRAS*) e em fibroblastos humanos não tumorais (CCD- 1059Sk). Os experimentos foram conduzidos *in vitro* para avaliar viabilidade, densidade celular, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), formação de colônias e migração. Em paralelo, análises *in silico*, por meio de redes de interação proteína-proteína, buscaram identificar alvos moleculares potencialmente modulados pelos GA-AuNRs. Os ensaios de viabilidade e densidade celular demonstraram que os fibroblastos mantiveram viabilidade e densidade em todas as concentrações testadas, confirmando a biocompatibilidade dos GA-AuNRs em células normais. Para o ensaio clonogênico obtivemos comportamentos distintos entre as linhagens, onde: SK-MEL-28, a área clonal diminuiu na presença de GA-AuNR na concentração de 1,8 mg·L⁻¹, enquanto MEWO apresentou colônias maiores na concentração de 0,18 mg·L⁻¹ em comparação ao grupo controle (GA 0,4%). Já SK-MEL-147 não apresentou variação significativa na formação de colônias em nenhuma das concentrações testadas. Em ensaios de migração celular, observou-se inibição significativa em SK-MEL-28 na concentração de 0,18 mg L⁻¹ de GA-AuNR, em MEWO 0,18 mg L⁻¹ de GA-AuNR apresentou maior velocidade de migração quando comparado ao controle Ga 0,4%. SK-MEL-147 não apresentou diferenças significativas. Tais achados sugerem que a eficácia dos GA-AuNRs varia conforme o contexto molecular de cada linhagem, onde para SK-MEL-28 afetou parâmetros de malignidade tumoral e na linhagem MEWO quando comparado ao controle houve aumento no tamanho das colônias e na velocidade de migração. As análises computacionais de redes proteína-proteína corroboraram as observações experimentais, destacando nós críticos em RHOA e RAC1, associados ao remodelamento do citoesqueleto e à migração celular, regulados por sinalizações downstream das vias MAPK/ERK e PI3K/AKT. Também foi identificado CTNNB1 (β -catenina) e TPT1 como reguladores da sobrevivência e proliferação celular. Esses elementos, que podem ter sido suscetíveis à modulação pelos GA-AuNRs, configuraram-se como pontos-chave no controle da migração e proliferação tumoral. Em conjunto, os dados demonstram que GA-AuNRs oferecem ação antitumoral seletiva, influenciada tanto pela concentração quanto pelo contexto genético do melanoma.

Palavras chave: Melanoma. Nanobastões de ouro (AuNRs). Goma arábica (GA). Viabilidade celular. Densidade celular. Ensaio clonogênico. Migração celular. *In vitro*. *In silico*.

ABSTRACT

Melanoma is an aggressive form of skin cancer originating from melanocytes, characterized by high plasticity, invasive capacity, and resistance to conventional treatments. Its progression involves complex metabolic adaptations and alterations in the tumor microenvironment, as well as the activation of signaling pathways such as PI3K/AKT, MAPK/ERK, and Wnt/ β -catenin. Given the need for innovative therapeutic approaches, gold nanoparticles have been studied and have shown promising potential in melanoma therapy. Gold nanorods stabilized with gum arabic (GA-AuNRs) have demonstrated the ability to modulate cellular responses without exhibiting cytotoxicity in a murine melanoma model. In this study, the effect of non-cytotoxic concentrations of GA-AuNRs was investigated on three human melanoma cell lines with distinct mutations: SK-MEL-28 (*BRAF*), MEWO (*NFI*), and SK-MEL-147 (*NRAS*), as well as on non-tumoral human fibroblasts (CCD-1059Sk). The experiments were conducted *in vitro* to assess cell viability, cell density, reactive oxygen species (ROS) production, colony formation, and migration. In parallel, *in silico* analyses using protein–protein interaction (PPI) networks aimed to identify potential molecular targets modulated by GA-AuNRs. Cell viability and density assays showed that fibroblasts maintained both viability and density across all tested concentrations, confirming the biocompatibility of GA-AuNRs in normal cells. The clonogenic assay revealed distinct behaviors among the melanoma cell lines: SK-MEL-28, clonal area decreased in the presence of GA-AuNR at $1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, while MEWO presented larger colonies at $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ compared to the control group (GA 0.4%). SK-MEL-147 showed no significant variation in colony formation at any tested concentration. In cell migration assays, SK-MEL-28 showed significant inhibition at $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA-AuNR, whereas MEWO at the same concentration exhibited a higher migration rate compared to the GA 0.4% control. SK-MEL-147 presented no significant differences. These findings suggest that GA-AuNR efficacy varies according to the molecular context of each cell line: in SK-MEL-28, they impacted tumor malignancy parameters, whereas in MEWO, compared to the control, they increased colony size and migration speed. Computational PPI network analyses supported the experimental observations, highlighting critical nodes in RHOA and RAC1, associated with cytoskeletal remodeling and cell migration, regulated downstream by MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways. CTNNB1 (β -catenin) and TPT1 were also identified as regulators of cell survival and proliferation. These elements, potentially susceptible to modulation by GA-AuNRs, emerge as key points in controlling tumor cell migration and proliferation. Taken together, the data demonstrate that GA-AuNRs exert selective antitumor activity, influenced by both concentration and the genetic context of melanoma.

Keywords: Melanoma. Gold nanorods (AuNRs). Gum arabic (GA). Cell viability. Cell density. Clonogenic assay. Cell migration. *In vitro*; *In silico*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha família e ao meu marido, Mateus, por todo o apoio, carinho e suporte incondicional. Vocês são a minha base.

Agradeço a todos os meus colegas do laboratório pela acolhida calorosa desde o meu primeiro dia, pela companhia, pelo auxílio nos experimentos e por todo o conhecimento compartilhado. Aprendi muito com cada um de vocês.

Às minhas amigas Beatris, Rhandria, Jéssica e Jacqueline, meu muito obrigada por tornarem os dias mais leves, felizes e divertidos. Agradeço pelos conselhos, pelo apoio, pelas nossas conversas e por sempre me ajudarem, em especial, à Jacqueline, que com tanta paciência e dedicação me ensinou o cultivo celular e me acompanhou nos meus primeiros experimentos. Você foi, sem dúvidas,, a minha melhor professora.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. José, obrigada por ter me aceitado mesmo sem nenhuma experiência prévia, por sempre ter me apoiado e dado todo o suporte, por sempre acreditar que daria certo e ter me guiado nesse caminho, sua calma, apoio e ensinamentos foram essenciais.

A Prof^ª. Dra. Carolina, obrigada por confiar a mim seu projeto, por acreditar no meu potencial e por estar presente em cada etapa deste processo. Sei que muitas vezes não foi fácil e mesmo assim, você me encorajou a nunca desistir e acreditar que eu conseguiria, que seria capaz de aprender e que errando também aprendemos muito. Com você aprendi muitas coisas, e de inúmeras formas.

Ao Centro de Tecnologias Avançadas em Fluorescência (CTAF), agradeço pela disponibilidade dos equipamentos e pelo suporte técnico durante os experimentos. Em especial, ao técnico Israel, pela valiosa colaboração neste projeto; à Vanessa por ter sido muito além de uma colega de trabalho e ter se tornado uma grande amiga e à Elaine, por sempre ter pelas palavras reconfortantes, sempre estar disposta a ajudar e por compartilhar suas experiências. A todos vocês, meu muito obrigada por toda a ajuda e por fazerem parte dessa jornada.

A fundação Araucária pela bolsa no programa Bolsa técnico, e ao CNPq e CAPES pelo financiamento desse projeto.

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	13
2.1	Complexidade Genética e Fatores de Suscetibilidade no Melanoma	13
2.2	Reprogramação Metabólica no Melanoma: Plasticidade Bioenergética e Implicações Terapêuticas.....	16
2.3	Estratégias Terapêuticas e Resistência	18
2.4	Nanopartículas de Ouro.....	21
2.5	Nanopartículas de ouro e goma arábica	23
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAIS, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
	EVALUATION OF GOLD-GUM ARABIC NANOCOMPOSITE ACTIVITY IN HUMAN MELANOMENA LINES: <i>IN VITRO</i> TESTS AND MODELING OF BIOLOGICAL NETWORKS	32
	ABSTRACT	33
1	INTRODUCTION	34
2	MATERIALS AND METHODS.....	36
2.1	GOLD NANORODS SYNTHESIS, FUNCTIONALIZATION, AND CHARACTERIZATION ...	36
2.2	CELL CULTURE	36
2.3	CELL VIABILITY AND DENSITY ASSAY	37
2.4	CLONOGENIC ASSAY.....	37
2.5	ANALYSIS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS).....	38
2.6	MIGRATION.....	38
2.7	STATISTICAL ANALYSIS.....	39
2.8	IN SILICO ANALYSIS.....	39
3.	RESULTS	40
3.1	VIABILITY AND CELL DENSITY TESTS	40
3.2	CLONOGENIC ASSAY.....	42
3.3	ANALYSIS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS).....	46
3.4	MIGRATION.....	48
3.5	TARGET AND FUNCTIONAL PATHWAY PREDICTION VIA SYSTEMS BIOLOGY	50
4.	DISCUSSION	53
5.	CONCLUSIONS.....	58
6.	REFERENCES.....	59

5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
6.	CONCLUSÕES	65
7.	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS.....	66
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

O melanoma é uma neoplasia que se origina nos melanócitos, células da camada basal da epiderme responsáveis pela produção de melanina. Nos estágios iniciais, pode permanecer restrito à epiderme, mas torna-se maligno ao invadir tecidos profundos e apresentar potencial metastático. Embora o melanoma cutâneo seja o mais frequente, essa neoplasia pode se manifestar em outras regiões do corpo, como olhos, meninges e mucosas (Atkins et al., 2020). Sua incidência tem aumentado progressivamente nas últimas décadas, especialmente em populações de pele clara, com taxas de crescimento anual entre 3% e 7%. Essa crescente prevalência, aliada à alta letalidade nos estágios avançados da doença, impõe sérios desafios aos sistemas de saúde e reforça a necessidade urgente de novas abordagens diagnósticas e terapêuticas (Aubuchon et al., 2017; IARC, 2023).

A complexidade do melanoma está diretamente relacionada ao comportamento invasivo das células tumorais, que apresentam alta plasticidade, capacidade migratória e adaptação ao microambiente tumoral (Arozarena; Wellbrock, 2017). Essas células reprogramam seu metabolismo para garantir a sobrevivência e proliferação, o que favorece a formação de metástases e a resistência a tratamentos convencionais (Ruocco et al., 2019).

A transformação maligna dos melanócitos ocorre de forma gradual e multifatorial, sendo impulsionada por alterações genéticas, epigenéticas e ambientais. (Romano et al., 2021). Dentre os eventos genéticos mais relevantes, destacam-se as mutações em genes como *BRAF*, *NRAS* e *NFI*, que levam à ativação constitutiva de vias oncogênicas, como a via MAPK (mitogen-activated protein kinase), essencial para a sobrevivência, proliferação e evasão do sistema imune pelas células tumorais (Castellani et al., 2023). A classificação molecular baseada nessas mutações permite a estratificação do melanoma em subtipos genéticos, cada um com comportamentos biológicos distintos e implicações terapêuticas diretas (Yang et al., 2023).

Além dessas alterações genéticas, o melanoma se destaca pela sua notável plasticidade metabólica, que desempenha um papel crucial na adaptação e progressão tumoral. Essa capacidade de reconfigurar o metabolismo celular é fundamental para sustentar a rápida divisão celular e a invasão tecidual, especialmente em microambientes hostis, marcados por escassez de nutrientes e baixa disponibilidade de oxigênio (Ruocco et al., 2019). As células de melanoma conseguem alternar entre diferentes estados fenotípicos como proliferação, dormência e invasão conforme as condições do microambiente (Arozarena & Wellbrock 2017). Tal adaptabilidade metabólica se manifesta, por exemplo, na alternância entre glicólise aeróbica e fosforilação oxidativa, favorecendo não apenas a progressão tumoral, mas também a metástase e a resistência terapêutica (Bhardwaj e He, 2020).

Por fim, o microambiente tumoral (TME) atua como um modulador chave do comportamento agressivo do melanoma. Composto por células imunes, fibroblastos, matriz extracelular e vasos sanguíneos, o TME influencia diretamente a biologia tumoral por meio de interações dinâmicas com as células de melanoma. Essas interações promovem a imunossupressão local, estimulam a angiogênese e favorecem a evasão da apoptose, frequentemente associada à perda de expressão de genes supressores tumorais como *TP53*, além do aumento de proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL (Malone et al., 2020). A comunicação cruzada entre as células tumorais e os componentes do TME modula diretamente a resposta ao tratamento e influencia a evolução clínica da doença (Falcone et al., 2020; Patel et al., 2021).

Diante dessa complexa rede de fatores genéticos, epigenéticos e microambientais que sustentam a progressão tumoral, o tratamento do melanoma é definido principalmente pelo estágio da doença. A cirurgia representa a abordagem padrão nos casos iniciais, com elevado potencial de sucesso. No entanto, à medida que o melanoma progride para formas localmente avançadas ou metastáticas, tornam-se necessárias intervenções sistêmicas mais complexas. As opções terapêuticas atuais incluem a quimioterapia, a terapia-alvo e a imunoterapia. Embora a dacarbazina tenha sido amplamente utilizada como quimioterápico de escolha, sua eficácia limitada reduziu seu uso nos protocolos modernos (Motwani & Eccles, 2021; Klee et al., 2022).

O avanço no conhecimento sobre a biologia tumoral permitiu a introdução de terapias mais específicas, como os inibidores de BRAF e MEK, indicados para pacientes com mutações ativadoras em *BRAF V600*. Esses fármacos bloqueiam vias de sinalização envolvidas na proliferação celular, promovendo respostas clínicas rápidas, embora muitas vezes temporárias (Kozar et al., 2019). Paralelamente, a imunoterapia com inibidores de checkpoint imunológico, como nivolumabe e pembrolizumabe, revolucionou o tratamento do melanoma metastático ao restaurar a capacidade do sistema imune em reconhecer e destruir células tumorais, proporcionando respostas duradouras em subgrupos de pacientes (Blank et al., 2024).

No entanto, apesar desses avanços, um dos maiores desafios clínicos atuais é a resistência às terapias disponíveis. No caso da terapia-alvo, mecanismos como mutações secundárias, reativação de vias alternativas e adaptação metabólica podem levar à recidiva tumoral em poucos meses (Kozar et al., 2019). Já a resistência à imunoterapia, seja primária ou adquirida, envolve tanto mecanismos intrínsecos às células tumorais quanto alterações no microambiente tumoral, incluindo a presença de células T reguladoras, expressão de ligantes imunossupressores e baixa infiltração de linfócitos efetores.

Esses fatores limitam a eficácia terapêutica em longo prazo e evidenciam a necessidade de estratégias mais inovadoras, combinadas e personalizadas para o manejo do melanoma avançado (Atefi et al., 2015; Huang & Zappasodi, 2022; Madonna et al., 2018).

Dentro desse contexto, as nanopartículas de ouro (AuNPs) emergem como uma alternativa promissora na terapia do câncer, devido às suas características únicas, as AuNPs têm se destacado por seu potencial em terapias oncológicas, especialmente nas abordagens de terapia fotodinâmica e fototérmica (Khan et al., 2021). De forma mais ampla, as AuNPs vêm sendo exploradas como agentes terapêuticos multifuncionais, atuando como sistemas de entrega direcionada incluindo vacinas, ácidos nucleicos, anticorpos e aplicações em estratégias teranósticas e na terapia fototérmica. Além de seu uso terapêutico, as AuNPs também têm contribuído significativamente no campo da imagem biomédica, sendo aplicadas em técnicas como radioterapia, angiografia por ressonância magnética e imagem fotoacústica (Jain et al., 2012).

Estudos recentes sugerem que AuNRs podem exibir efeitos anticâncer independentes de irradiação de luz, o que indica um potencial terapêutico promissor, mesmo sem o uso de estímulos externos (Gonçalves et al., 2020; Yoon et al., 2024). Em um trabalho prévio desenvolvido por nosso grupo, foi demonstrada a eficácia de nanobastões de ouro estabilizados com o polissacarídeo aniônico goma arábica (GA) como ferramenta terapêutica contra o melanoma em modelos murinos. In vitro, o nanocompósito (GA-AuNRs) apresentou atividade antitumoral e antimetastática, sem causar toxicidade significativa (Gonçalves et al., 2020). In vivo, o tratamento com GA-AuNRs reduziu o crescimento de tumores sólidos de melanoma em 45%, mostrando efeitos semelhantes ao tratamento com dacarbazina. Esse tratamento induziu alterações estruturais no tecido tumoral em camundongos, com redução das áreas de morte celular e da vascularização tumoral, indicando uma melhora no prognóstico. Esses achados indicam que GA-AuNRs podem modular vias celulares críticas à sobrevivência e disseminação do melanoma, mesmo sem induzir morte celular direta (Gonçalves et al., 2020). Portanto, o presente estudo buscou avaliar in vitro e in silico os efeitos do nanocompósito GA-AuNRs em concentrações não citotóxicas, através da análise de características celulares funcionais que são essenciais para a progressão tumoral. Com esse intuito utilizamos linhagens de melanoma humano com as três principais mutações (*BRAF*, *NRAS* e *NF1*).

A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas, especialmente em casos metastáticos e resistentes, nos quais a abordagem tradicional tem se mostrado insuficiente.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Complexidade Genética e Fatores de Suscetibilidade no Melanoma

O desenvolvimento do melanoma é um processo multifatorial e progressivo, impulsionado pela interação entre fatores genéticos, epigenéticos e ambientais. A radiação ultravioleta (UV) é reconhecida como um dos principais agentes ambientais relacionados ao desenvolvimento do melanoma, desempenhando um papel crucial na fase inicial da tumorigênese (Elder, 2016). Sua ação está associada à indução de mutações em genes essenciais para o controle celular, além de favorecer a ativação de oncogenes. Como consequência desse dano genético, surgem padrões mutacionais característicos, especialmente as transições do tipo C>T e CC>TT que são frequentemente identificadas em cerca de 70% dos casos da doença (Sample; He, 2018; McGrail et al., 2024).

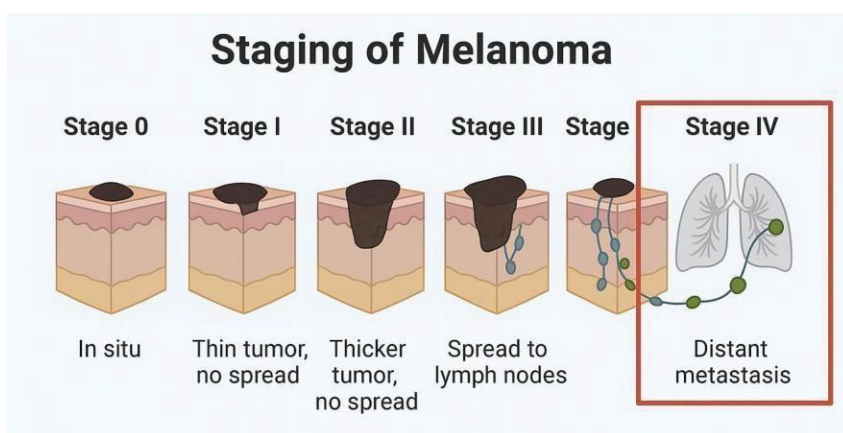
Embora fatores ambientais desempenhem papel predominante no melanoma, componentes hereditários também contribuem de maneira significativa, estando presentes em cerca de 10% dos casos diagnosticados. A interação entre essas influências externas e predisposições genéticas culmina na aquisição acumulativa de alterações moleculares que sustentam a transformação maligna (Testa; Castelli; Pelosi, 2017). As mutações iniciais frequentemente levam à formação de lesões benignas, que, em estágios precoces, podem ser controladas por mecanismos como a senescência celular. No entanto, a progressão tumoral requer alterações adicionais, incluindo a inativação de genes supressores tumorais e a ativação de vias de sinalização cruciais, destacando-se a via MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) como um dos principais eixos moleculares envolvidos (Motwani; Eccles, 2021).

Para a avaliação clínica e o planejamento terapêutico do melanoma, utiliza-se amplamente o sistema de estadiamento do American Joint Committee on Cancer (AJCC), baseado na classificação TNM. Esse sistema considera a espessura e características do tumor primário (T), o envolvimento linfonodal (N) e a presença de metástases à distância (M), permitindo a categorização do melanoma do estágio 0 (in situ, restrita à epiderme); estágios I e II (englobam tumores localizados com espessura variável e ausência de disseminação, sendo o estágio II associado a risco mais elevado); estágio III (caracterizado pelo comprometimento de linfonodos regionais), ao estágio IV (fase metastática da doença, com disseminação para órgãos

distantes) (Gershenwald et al., 2017; Papageorgiou et al., 2021).

Complementarmente, biomarcadores como a lactato desidrogenase (LDH) têm se mostrado relevantes na estratificação prognóstica, especialmente em estágios avançados, contribuindo para um manejo clínico mais preciso e personalizado (Gershenwald et al., 2017; Deckers et al., 2020). A representação esquemática dos estágios do melanoma, conforme ilustrado na Figura 1, destaca visualmente a progressão tumoral e enfatiza o estágio IV, caracterizado pela disseminação metastática, foco principal deste estudo.

Figura 1- Estadiamento do melanoma segundo a classificação TNM do AJCC, com destaque para o estágio IV (metastático).



Desenho esquemático dos estágios do melanoma. Figura elaborada com o BioRender. Disponível em: <https://www.biorender.com>

No entanto, além da avaliação anatômica e bioquímica, a compreensão das alterações genéticas que impulsionam a progressão tumoral é essencial para o direcionamento terapêutico. Entre essas alterações, destacam-se quatro subtipos moleculares principais baseados em mutações em oncogenes: *BRAF* mutado, *RAS* mutado, *NF1* mutado e o triplo negativo (Triple Wild-Type - TWT) (Cancer Genome Atlas Network, 2016). Tais mutações afetam predominantemente a via MAPK, composta pela cascata Ras/RAF/MEK/ERK, responsável por regular a proliferação e a sobrevivência celular (Akbani et al., 2015). A mutação *BRAF V600E*, presente em aproximadamente 50% dos melanomas cutâneos, promove a ativação constitutiva dessa via. Mutações em *NRAS* (cerca de 20% dos casos) e a perda de função de *NF1* (cerca de 10%) também resultam em ativação aberrante da via MAPK (Hayward et al., 2017; Fernandez; Choi; Sosman, 2023). Mesmo nos tumores classificados como TWT, observam-se alterações em genes como *KIT*, *CTNNB1* e *EZH2*, o que reforça a centralidade da via MAPK na biologia do melanoma (Yang et al., 2023).

Outro gene de destaque na tumorigênese do melanoma é o *TP53*, um dos principais supressores tumorais. A proteína p53, por ele codificada, é essencial para a manutenção da

integridade genômica, atuando na indução da parada do ciclo celular e apoptose. Mutações em *TP53* aceleram a progressão tumoral e estão associadas à maior agressividade e potencial metastático. Ainda que a mutação ativadora no gene *BRAF* que resulta na ativação constitutiva da proteína BRAF seja um evento central, a inativação concomitante de *TP53* parece ser necessária para o desenvolvimento completo da malignidade (Kastenhuber; Lowe, 2017; Celesia et al., 2023). Além disso, a perda de função do gene *PTEN*, outro importante supressor tumoral, é frequentemente observada em melanomas avançados. Essa alteração compromete a regulação negativa da via PI3K/AKT/mTOR impactando negativamente a resposta imunológica e sendo associada a menor sobrevida global e resistência às terapias baseadas em inibidores de checkpoint imunológico (Loureiro et al., 2024).

No espectro genético, os genes associados à suscetibilidade ao melanoma são classificados conforme sua penetrância. Genes de alta penetrância, como o *CDKN2A*, estão frequentemente relacionados a casos familiares e codificam proteínas como p16INK4A e p14ARF, que atuam no controle do ciclo celular. Genes de média penetrância dependem de interações entre variantes genéticas e fatores ambientais para manifestar seus efeitos, enquanto os de baixa penetrância são comuns na população geral e conferem risco moderado (Zheng; Sarin, 2024).

A síndrome do melanoma atípico familiar exemplifica a importância dos fatores hereditários na carcinogênese, caracterizando-se pela presença de múltiplos nevos atípicos e risco elevado de melanoma, frequentemente associada a mutações germinativas no *CDKN2A*, identificadas em 20 a 40% dos casos (Danishevich et al., 2023). Além disso, variantes poligênicas e mutações ainda não identificadas provavelmente contribuem para essa predisposição (Garreffa; Lee, 2024; Shaked et al. 2025).

Alterações em regiões não codificadoras também exercem papel fundamental no desenvolvimento tumoral. Um exemplo notável são as mutações no promotor do gene *TERT*, frequentemente observadas em melanomas cutâneos, as quais promovem aumento da expressão de *TERT*, elevação da atividade telomérica e extensão do comprimento dos telômeros, favorecendo a imortalização celular (Guo et al., 2022; Tornesello et al. 2023).

Além disso, RNAs não codificadores, como microRNAs (miRNAs) e longos RNAs não codificadores (lncRNAs), participam da regulação de vias celulares envolvidas na progressão do melanoma. Embora essas moléculas estejam envolvidas em diversos subtipos de melanoma, a maior parte das evidências concentra-se no melanoma cutâneo. MiRNAs modulam genes relacionados à proliferação e apoptose, atuando como oncogenes ou supressores tumorais, enquanto lncRNAs influenciam a expressão gênica, associando-se à metástase e resistência

terapêutica (Wozniak; Czyz, 2021 Jones; Nonaka 2024).

As modificações epigenéticas, como metilação do DNA e alterações nas histonas, também desempenham papel crucial na regulação gênica, contribuindo para a tumorigênese e progressão metastática, especialmente no melanoma cutâneo. Ademais, mutações em genes responsáveis pela remodelação da cromatina, como *ARID1A*, frequentemente causam perda de função e estão ligadas a diversos tipos de câncer (Gu et al., 2024; Mullen et al., 2021).

Subtipos menos comuns de melanoma, como os melanomas acrais, uveais e mucosos, apresentam perfis genéticos e biológicos distintos em relação ao melanoma cutâneo. Os melanomas acrais, localizados nas palmas das mãos, superfície planar dos pés e subungueal, são caracterizados por amplificações gênicas em *CCND1*, *CDK4*, *MDM2* e *TERT*, que favorecem a proliferação celular e a imortalidade replicativa (Wang et al., 2022; Johansson et al., 2020). Os melanomas uveais, originados na camada vascular do olho, frequentemente apresentam mutações nos genes *GNAQ* e *GNA11*, os quais ativam as vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT, promovendo a progressão tumoral (Coupland et al., 2019). Por sua vez, os melanomas mucosos, que acometem superfícies epiteliais de mucosas, são marcados por elevada instabilidade genômica e amplificações em *KIT*, *CCND1*, *CDK4* e *MDM2*, sendo associados a prognósticos desfavoráveis e baixa resposta às terapias convencionais (Wang et al., 2022).

2.2 Reprogramação Metabólica no Melanoma: Plasticidade Bioenergética e Implicações Terapêuticas

O melanoma, assim como outras neoplasias malignas, apresenta uma reprogramação metabólica, caracterizada pela capacidade de alternar entre diferentes vias de geração de energia de acordo com as exigências do microambiente tumoral (Fischer et al., 2019). Em condições normais, a principal via de produção de ATP é a fosforilação oxidativa mitocondrial, mediada pelo ciclo do ácido cítrico e pela cadeia de transporte de elétrons. No entanto, as células tumorais frequentemente adotam a glicólise aeróbica mesmo na presença de oxigênio em um processo conhecido como efeito Warburg, descrito por Otto Warburg na década de 1920 (Barba, Carrillo-Bosch & Seoane, 2024). Essa estratégia, embora energeticamente menos eficiente, permite uma produção acelerada de ATP e fornece intermediários metabólicos necessários para a biossíntese celular, favorecendo a rápida proliferação tumoral (Vaupel & Multhoff, 2021).

No melanoma, evidências crescentes indicam que há interação dinâmica entre a glicólise aeróbica e a fosforilação oxidativa, com alternância entre essas vias conforme a disponibilidade de oxigênio, nutrientes e os níveis de estresse oxidativo no microambiente tumoral (Fischer et

al., 2019; Ma et al., 2024). Essa elevada plasticidade metabólica permite que as células de melanoma se adaptem a condições hostis, como hipóxia ou escassez de nutrientes, sustentando não apenas a proliferação, mas também promovendo resistência a diferentes modalidades terapêuticas (Wang et al., 2024; Mishra & Banerjee, 2021).

Diversos mecanismos moleculares sustentam essa flexibilidade metabólica. Enzimas da via glicolítica, como LDHA, HK2, PFK e PK, encontram-se desreguladas no melanoma, favorecendo a conversão de glicose em lactato (Muhammad et al., 2024; Takaoka et al., 2019). Além disso, transportadores de metabólitos, como os monocarboxilatos (MCTs), piruvato (MPCs) e receptores como o GPR81, participam ativamente da manutenção da homeostase metabólica tumoral (Brown & Ganapathy, 2020). O fator de transcrição HIF-1, regulador chave em condições de hipóxia, também contribui para essa reprogramação, podendo ter sua expressão potencializada por precursores da melanina, como a L-tirosina (Malekan, Ebrahimzadeh & Sheida, 2021; Slominski et al., 2014).

No melanoma, essa dominância glicolítica confere vantagens adaptativas, permitindo uma resposta eficiente às flutuações do microambiente tumoral. Ainda assim, as células mantêm capacidade de alternância metabólica, utilizando a fosforilação oxidativa quando necessário, o que reforça sua agressividade e versatilidade fenotípica (Gurel et al., 2024).

As mitocôndrias tumorais também são fontes importantes de espécies reativas de oxigênio (ROS), subprodutos da respiração mitocondrial. Em níveis fisiológicos, as ROS exercem funções sinalizadoras. Contudo, sua produção exacerbada resulta em estresse oxidativo, comprometendo a integridade de proteínas, lipídios e DNA (Ma et al., 2018; Attique et al., 2025).

A produção de ROS é um elemento-chave no metabolismo do melanoma, influenciada por alterações genéticas e pelo microambiente tumoral (Bhardwaj e He, 2020). Mutações em *BRAF*, como a V600E, promovem ativação constitutiva da via MAPK e aumento da atividade mitocondrial, elevando a geração de ROS (Cesi et al 2017; Liu-Smith & Meyskens, 2016; Corazao-Rozas et al., 2013). Além disso, a perda de função de *TP53* compromete a resposta antioxidante celular, amplificando o estresse oxidativo (Kastenhuber & Lowe, 2017).

As ROS participam ativamente de diversos processos oncogênicos, incluindo proliferação celular, ativação de vias de sinalização, angiogênese, remodelação da matriz extracelular e aumento da capacidade invasiva (Chen et al., 2013; Attique et al., 2025). No entanto, seu acúmulo excessivo pode desencadear apoptose, tornando-as alvos atrativos para intervenções terapêuticas. Compostos como curcumina e partenolídeo demonstraram eficácia em induzir apoptose de células de melanoma via geração de ROS, além de inibir a progressão

do ciclo celular na fase G2/M por meio da regulação negativa de Cdc25c e ciclina A (Lee et al., 2024; Rozenblat et al., 2008; Hu et al., 2017).

Dados clínicos indicam que melanomas metastáticos apresentam níveis significativamente mais elevados de estresse oxidativo em comparação aos tumores primários, o que reflete um estado adaptativo das células tumorais (Zhang et al., 2024; Piskounova et al., 2015). Para sobreviverem em ambientes hostis e sob pressão terapêutica, essas células demonstram uma notável capacidade de modular dinamicamente sua homeostase redox, ativando sistemas antioxidantes como SOD2, GPX4 e PRDX1, que evitam danos irreversíveis ao DNA e às organelas. Essa regulação permite o uso controlado de ROS como moléculas sinalizadoras, promovendo a ativação de vias pró-oncogênicas, como a MAPK e a angiogênese, e favorecendo a proliferação, invasão e resistência tumoral (Arslanbaeva & Santoro, 2020).

Essa plasticidade redox é particularmente importante no contexto da resistência a terapias-alvo, como os inibidores de BRAF e MEK. Células que desenvolvem resistência frequentemente apresentam aumento da atividade mitocondrial, o que contribui para a manutenção da produção de ATP mesmo com a inibição da glicólise, ao custo de maior produção de ROS (Ruiz-Iglesias & Mañes, 2021). Essa dependência do metabolismo oxidativo cria uma vulnerabilidade explorável, visto que a indução excessiva de estresse oxidativo pode levar à morte celular por apoptose ou ferroptose (Becker e Indra, 2023; Wang et al., 2018).

Intervenções terapêuticas que perturbem a homeostase redox, seja por aumento do estresse oxidativo além da capacidade antioxidante do tumor ou pela inibição de seus sistemas de defesa mostram-se promissoras para potencializar a eficácia dos tratamentos convencionais (Avagliano et al., 2020). Nesse contexto, estratégias combinadas que visem simultaneamente a inibição da biogênese mitocondrial, o bloqueio das defesas antioxidantes e a modulação do metabolismo energético emergem como abordagens inovadoras para superar a resistência terapêutica e conter a progressão do melanoma (Arslanbaeva & Santoro, 2020).

2.3 Estratégias Terapêuticas e Resistência

O tratamento do melanoma avançado passou por uma revolução nas últimas décadas, com a introdução das terapias-alvo e da imunoterapia, transformando o manejo clínico e proporcionando aumento significativo na sobrevida dos pacientes. No entanto, a eficácia dessas abordagens é frequentemente limitada pelo desenvolvimento de resistência primária ou adquirida, o que representa um dos principais desafios terapêuticos atuais. A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à resistência é fundamental para a construção de estratégias terapêuticas mais eficazes e duradouras. (Huang; Zappasodi, 2022; Fateeva et al.,

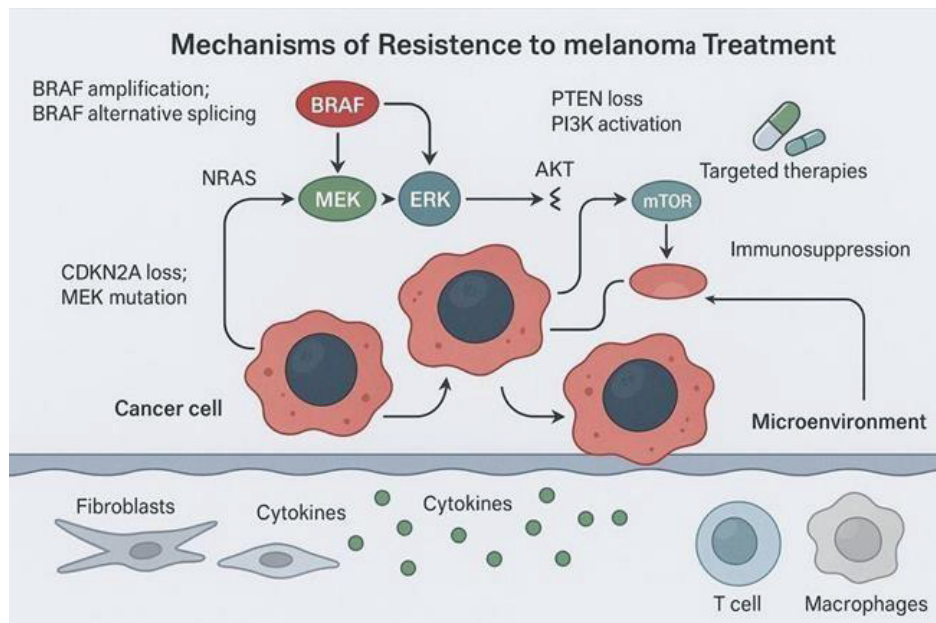
2024).

As terapias-alvo mais utilizadas no melanoma envolvem inibidores da via MAPK, particularmente aqueles que bloqueiam mutações ativadoras no gene *BRAF*, como os inibidores de BRAF (vemurafenibe, dabrafenibe) e de MEK (trametinibe, cobimetinibe). A combinação dessas duas classes demonstrou eficácia superior à monoterapia, aumentando as taxas de resposta e a sobrevida livre de progressão (Lee et al., 2023). No entanto, a maioria dos pacientes desenvolve resistência após 6 a 12 meses de tratamento (Falcone et al., 2020). Os mecanismos incluem a reativação da via MAPK, mutações em *NRAS*, amplificação de *BRAF*, ativação de vias alternativas como PI3K/AKT/mTOR e alterações epigenéticas que promovem fenótipos invasivos e indiferenciados (Shirley, 2018).

A imunoterapia, especialmente com inibidores de checkpoints imunológicos como anti-PD-1 (nivolumabe, pembrolizumabe) e anti-CTLA-4 (ipilimumabe), também revolucionou o tratamento do melanoma. Esses agentes atuam restaurando a função dos linfócitos T exauridos, permitindo a destruição das células tumorais (Wei; Duffy; Allison, 2018). Apesar das respostas duradouras em alguns pacientes, muitos não respondem inicialmente ao tratamento ou desenvolvem resistência ao longo do tempo. Entre os mecanismos implicados estão a ausência de infiltração de linfócitos T, expressão aumentada de moléculas imunossupressoras, deficiência na apresentação de antígenos e o recrutamento de células reguladoras e mieloides supressoras no microambiente tumoral (Huang & Zappasodi, 2022; Madonna et al., 2018).

Outra abordagem emergente é a reprogramação metabólica do microambiente tumoral, uma vez que a adaptação metabólica das células tumorais e imunes influencia diretamente a eficácia das terapias. A alta taxa glicolítica das células tumorais compete com os linfócitos T por nutrientes essenciais, como glicose e glutamina, reduzindo a atividade citotóxica e favorecendo o escape imune (Bhardwaj; Ele, 2020). Além disso, a acidose e a hipóxia do microambiente comprometem a função imune e promovem fenótipo resistente (Kopecka et al., 2021). Esses mecanismos de resistência são representados de forma integrada na Figura 2, a qual resume as principais alterações moleculares, celulares e do microambiente tumoral que contribuem para o escape terapêutico no melanoma.

Figura 2 – Mecanismos de resistência às terapias no melanoma.



Desenho esquemático dos mecanismos de resistência ao tratamento do melanoma. Alterações genéticas como mutações em *BRAF*, *NRAS*, perda de *PTEN* e ativação das vias PI3K/AKT/mTOR, associadas à modulação do microambiente tumoral, contribuem para o escape terapêutico e imunossupressão. Figura Elaborada com o BioRender. Disponível em: <https://www.biorender.com>

A compreensão detalhada desses mecanismos tem impulsionado o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas combinadas, com o objetivo de contornar a resistência e potencializar as respostas clínicas. Terapias que integram inibidores de checkpoint com agentes anti-BRAF/MEK, antiangiogênicos, moduladores do metabolismo ou vacinas tumorais têm mostrado resultados promissores em estudos recentes (Kalaora et al., 2022 Wei et al., 2024).

Avanços terapêuticos recentes têm se concentrado na intensificação das estratégias combinadas e no desenvolvimento de terapias personalizadas. A combinação de imunoterapia com terapias-alvo tem demonstrado resultados promissores, como evidenciado no ensaio clínico randomizado de fase III que avaliou a eficácia do spartalizumabe (anti-PD-1) em associação com dabrafenibe e trametinibe em pacientes com melanoma metastático ou irressecável com mutação *BRAF V600*, mostrando aumento nas taxas de resposta objetiva e sobrevida livre de progressão (Dummer et al., 2022; Subbiah et al., 2023). Além disso, a identificação de biomarcadores como a expressão de PD-L1, carga mutacional tumoral (TMB) e perfis de expressão gênica tem permitido maior personalização do tratamento, otimizando a escolha terapêutica (Knight et al., 2023).

Estratégias inovadoras como vacinas terapêuticas baseadas em RNA mensageiro têm ganhado destaque como uma alternativa inovadora. O estudo de fase 2b KEYNOTE-942 revelou que a combinação da vacina personalizada mRNA-4157 (V940) com o anticorpo anti-PD-1 pembrolizumabe resultou em redução significativa do risco de recorrência (49%) e de metástases à distância (62%) em pacientes com melanoma em estágio III/IV de alto risco após ressecção completa, quando comparado ao uso isolado de pembrolizumabe (Moderna; Merck, 2023).

As terapias celulares, como o uso de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs), também têm se mostrado promissoras em ensaios clínicos com pacientes refratários (Borgers et al., 2025). Paralelamente, o uso de biópsias líquidas tem se consolidado como ferramenta de monitoramento dinâmico da resposta ao tratamento (Ricciardi et al., 2023), enquanto abordagens que integram dados ômicos com inteligência artificial estão ajudando a prever resistência a fármacos e guiar intervenções mais precisas (Mao et al., 2025).

Estratégias emergentes incluem o uso de vacinas personalizadas baseadas em neoantígenos, terapia com células T modificadas (como TILs e CAR-T) e inibidores de vias metabólicas que visam reverter o estado imunossupressor do microambiente tumoral. Esses avanços refletem a transição para uma abordagem mais integrada, na qual o perfil molecular e imunológico do paciente guia intervenções terapêuticas específicas, com o objetivo de superar a resistência e alcançar respostas mais duradouras (Borgers et al., 2025; Righi et al., 2023).

Portanto, o futuro do tratamento do melanoma reside na personalização terapêutica baseada na integração de dados moleculares, imunológicos e metabólicos. A superação da resistência requer a compreensão profunda da biologia tumoral e do microambiente, bem como o uso racional de combinações terapêuticas que visem simultaneamente múltiplas vulnerabilidades do tumor (Falcone et al., 2020).

2.4 Nanopartículas de Ouro

Nas últimas décadas, os nanomateriais têm despertado crescente interesse no campo biomédico, particularmente devido às suas propriedades únicas e à versatilidade de aplicação. Entre os diversos nanomateriais estudados, as nanopartículas de ouro (AuNPs) têm se destacado como plataformas promissoras para aplicações terapêuticas e diagnósticas, especialmente no contexto oncológico, em razão de sua elevada biocompatibilidade, facilidade de funcionalização e propriedades ópticas e físico-químicas singulares (Zhu et al., 2014; Vines et al., 2019).

As AuNPs podem ser obtidas em diferentes formatos, como esferas, conchas, estrelas e bastões, sendo que a variação de forma e tamanho influencia diretamente suas propriedades ópticas, distribuição biológica e mecanismos de interação celular. Dentre esses formatos, os nanobastões de ouro (AuNRs) têm recebido atenção crescente devido à sua forte absorção no infravermelho próximo (NIR), decorrente do fenômeno de ressonância plasmônica localizada na longitudinal do bastão, o que os torna particularmente úteis em aplicações como terapia fototérmica e imagem biomédica (Tiwari et al., 2011; Deinafzadeh et al., 2024).

No tratamento do melanoma, as AuNPs têm sido exploradas em diversas abordagens terapêuticas, com destaque para a terapia fototérmica, a radiosensibilização e a entrega de fármacos. A literatura atual tem demonstrado que os AuNRs, especialmente aqueles com razão de aspecto (comprimento/diâmetro) entre 3 e 5, apresentam desempenho superior na conversão de energia luminosa em calor, sendo eficazes na indução de hipertermia localizada em células tumorais (Deinafzadeh et al., 2024). Essa propriedade é explorada na terapia fototérmica, na qual a irradiação infravermelha próxima (NIR) 808 nm e 1064 nm provoca aumento localizado da temperatura, levando à morte celular por necrose ou apoptose. Essa abordagem tem se mostrado seletiva, com baixa toxicidade para os tecidos adjacentes, e pode ser combinada a outras modalidades terapêuticas (Kesharwani et al., 2023; Lopes et al., 2025; Chuang et al., 2022).

Além da aplicação fototérmica, os AuNRs também têm sido investigados como radiosensibilizadores. Sua elevada densidade atômica permite a amplificação local da dose de radiação ionizante, intensificando os danos ao DNA tumoral e permitindo a redução da dose total de radiação necessária, o que pode mitigar os efeitos adversos associados à radioterapia convencional (Kumar e Lim., 2021; Rosa et al. 2017; Zhang et al., 2019).

Outra frente de aplicação relevante é o uso dos AuNRs como sistemas de entrega de fármacos. A funcionalização da superfície dessas nanopartículas com quimioterápicos, ácidos nucleicos, anticorpos ou peptídeos permite a liberação controlada e dirigida dos agentes terapêuticos no microambiente tumoral. Estratégias como o revestimento com vesículas extracelulares ou polímeros visam aumentar a estabilidade em meio biológico, prolongar a circulação sistêmica e evitar a depuração precoce pelo sistema imune (Wang et al., 2023; Dastgheib et al., 2024; Carreón González et al., 2023).

No diagnóstico oncológico, AuNRs também vêm sendo utilizados como agentes de contraste em técnicas como tomografia por coerência óptica, fluorescência e espectroscopia Raman, proporcionando imagens com maior resolução e sensibilidade, o que favorece a detecção precoce e o monitoramento de resposta ao tratamento (Qiu et al., 2023).

Em termos de mecanismos moleculares, estudos têm demonstrado que AuNRs podem ser internalizados por células de melanoma, induzindo estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e ativação de vias pró-apoptóticas. Além disso, há evidências de que essas partículas possam modular vias de sinalização relacionadas à proliferação e inflamação, impactando diretamente o comportamento tumoral (Wang et al., 2023; Zhang et al., 2024).

Recentemente, abordagens combinadas com imunoterapia têm sido investigadas, nas quais os AuNRs são utilizados para aumentar a imunogenicidade do tumor, promovendo a ativação de células T e potencializando os efeitos de inibidores de checkpoints imunológicos. Essa sinergia representa uma estratégia inovadora, especialmente relevante em casos refratários ou metastáticos (He et al., 2021; Aggarwal et al., 2025; Wang et al., 2023).

Apesar do avanço significativo nas pesquisas pré-clínicas, ainda persistem desafios para a translação clínica das AuNPs. Entre os principais obstáculos estão o controle preciso da morfologia em algumas abordagens de síntese, a estabilidade em meio fisiológico, a produção em escala e a avaliação rigorosa da correlação a longo prazo (Moni et al., 2025). No entanto, os resultados experimentais obtidos até o momento indicam que os nanobastões de ouro possuem um papel promissor na oncologia de precisão, especialmente quando integrados a terapias-alvo e imunoterapias inovadoras (He et al., 2021).

2.5 Nanopartículas de ouro e goma arábica

A síntese de AuNPs em meio aquoso apresenta vantagens significativas, especialmente em aplicações biomédicas. Além de dispensar o uso de solventes orgânicos potencialmente tóxicos, o ambiente aquoso proporciona um processo mais biocompatível, preservando a viabilidade celular e facilitando o uso *in vivo*. Outro aspecto relevante está nos diferentes métodos que têm permitido avanços significativos na obtenção de AuNPs com formatos variados, como esferas, prismas e bastões (Thambiraj; Hema; Ravi Shankaran, 2018; Li; Lane, 2019). Essa versatilidade estrutural amplia consideravelmente suas aplicações, que incluem diagnóstico molecular, terapia dirigida, liberação controlada de fármacos e imunomodulação. (Zeng al., 2023).

Em particular, o revestimento superficial das nanopartículas de ouro em formato de bastões (AuNRs) exerce influência decisiva sobre a captação celular, estabilidade coloidal e eficácia terapêutica. O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), frequentemente empregado na síntese de AuNRs para garantir sua morfologia e estabilidade, apresenta alta toxicidade celular, restringindo seu uso em contextos clínicos. Como consequência, há um esforço

crescente na substituição do CTAB por revestimentos alternativos mais biocompatíveis, a fim de reduzir os riscos associados e otimizar a segurança das aplicações terapêuticas (Zhu et al., 2014; Huang et al., 2021).

A superfície funcionalizável das AuNPs permite a conjugação com diferentes biomoléculas incluindo anticorpos, peptídeos, ácidos nucleicos e agentes terapêuticos, aumentando significativamente seu desempenho em aplicações diagnósticas e terapêuticas (Kumar et al., 2021). Nesse contexto, a goma arábica (GA) tem ganhado destaque devido à sua combinação singular de propriedades físico-químicas e biológicas. Trata-se de um heteropolissacarídeo complexo, extraído das exsudações de Acácia senegal e Acácia seyal, amplamente utilizado nas indústrias alimentícia e farmacêutica em virtude de sua alta biocompatibilidade, baixa toxicidade, boa solubilidade em água. (Nayak; Pal, 2018; Al-Jubori et al., 2023).

Essa interação molecular confere elevada estabilidade coloidal ao sistema, evitando a agregação e sedimentação das nanopartículas, características essenciais para aplicações em encapsulamento e liberação controlada de fármacos. Além de suas propriedades físico-químicas, a GA é biodegradável, de origem natural e ambientalmente sustentável, aspectos que a tornam particularmente atrativa para o desenvolvimento de sistemas terapêuticos aplicáveis à área da saúde (Prasad et al., 2022; Xiaojing et al., 2022; Ai et al., 2023).

Estudos demonstram que a estrutura ramificada da GA, composta por polissacarídeos e proteína, confere baixa afinidade por proteínas plasmáticas, o que contribui para a redução da formação da chamada “coroa proteica” um fenômeno amplamente relacionado à agregação e à perda de funcionalidade de nanopartículas em ambientes biológicos (Ai et al., 2023).

Essa menor interação com proteínas séricas resulta em maior estabilidade *in vivo* e favorece a entrega mais direcionada de agentes terapêuticos às células-alvo, otimizando os mecanismos de internalização celular (Mohamed et al., 2025; Kattumuri et al., 2007).

Outro fator que reforça a eficácia da GA como agente estabilizante é a presença de arabinogalactana-proteína, que proporciona maior repulsão estérica em comparação a outras biomoléculas estabilizantes. Essa propriedade preserva as características físico-químicas das AuNPs, assegurando sua integridade funcional ao longo do tempo (Ai et al., 2023; Xiaojing et al., 2022). A alta solubilidade da GA em meio aquoso complementa esse perfil, viabilizando sua aplicação em formulações coloidais em escala nanométrica com elevado grau de dispersibilidade e estabilidade (Mohamed et al., 2025).

Paralelamente às suas propriedades estabilizantes e funcionalizantes, a GA também vem sendo investigada por seus efeitos terapêuticos diretos em modelos oncológicos. Trata-se de um polissacarídeo bioativo com reconhecidas ações antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomodulatórias (Siednamohammeddeen et al., 2022; Avelino et al., 2022). Dentre os principais mecanismos atribuídos à sua bioatividade, destaca-se a neutralização de ROS, contribuindo para a redução do estresse oxidativo, condição frequentemente associada à progressão tumoral e à resistência a quimioterápicos, além disso, a GA tem a capacidade de modular vias inflamatórias relevantes, como NF- κ B e TNF- α , promovendo um microambiente menos permissivo à proliferação neoplásica (Ali et al., 2013; Ahmed et al., 2022).

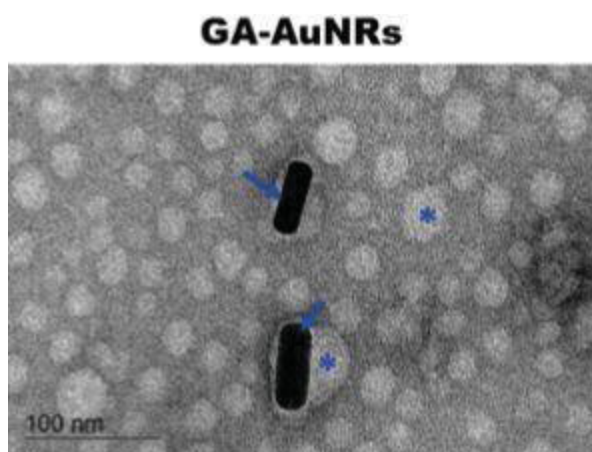
A composição estrutural da GA, composto majoritariamente por polissacarídeos, dentre os quais se destaca a arabinogalactana (AG) rica em resíduos de açúcar como arabinose e galactose, também permite sua interação com receptores do tipo lectina, como DC-SIGN e Dectin-1, expressos em células apresentadoras de antígenos, como macrófagos e células dendríticas (Peters et al., 2016). Essas interações modulam a sinalização inflamatória e aumentam a capacidade dessas células de processar e apresentar antígenos, influenciando positivamente a ativação de linfócitos T na resposta adaptativa, conferindo à GA um papel imunomodulador relevante. Combinada à sua biocompatibilidade e capacidade de funcionalização, a GA se destaca como um elemento promissor em estratégias terapêuticas baseadas em nanobiotecnologia (Ahmed et al., 2022; Baien et al., 2020; Xiaojing et al., 2022). Diversas evidências indicam que a GA é uma excelente candidata para o revestimento de AuNPs em aplicações biomédicas, devido à sua capacidade de conferir estabilidade prolongada, biocompatibilidade e eficácia terapêutica (Xiaojing et al., 2022; Ai et al., 2023; Prasad et al., 2022).

Estudos prévios demonstraram que a GA pode atuar como estabilizante de AuNPs em diferentes formatos, como no caso dos AuNRs. Barros et al. (2016) mostraram que a funcionalização pós-síntese de AuNRs com GA ocorre por meio de interações eletrostáticas entre os grupos aniônicos da GA e os AuNPs. Com o objetivo de avaliar a interação espacial e morfológica entre a GA e AuNRs, Gonçalves (2020) realizou experimentos utilizando a técnica de contrastação negativa, seguida de análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

As imagens obtidas por MET permitiram a visualização direta das estruturas da GA, que se apresentaram como partículas arredondadas de tamanhos variados, consistentes com

observações anteriores descritas na literatura (Gashua; Williams; Baldwin, 2016). Nos GA-AuNRs, foi possível observar que as partículas de GA se dispõem de forma envolvente ao redor de cada AuNR, evidenciando uma associação estreita entre o polímero e a nanopartícula. Essa organização sugere uma funcionalização eficiente, com potencial para conferir estabilidade coloidal e influenciar o comportamento biológico do sistema (Gonçalves, 2020).

Figura 3 – Interação Espacial entre GA e AuNRs



Fonte: Gonçalves (2020).

Legenda: Imagem de MET com contrastação negativa usando acetato de uranila. Flechas = nanopartículas de ouro, asterisco (*) = goma arábica.

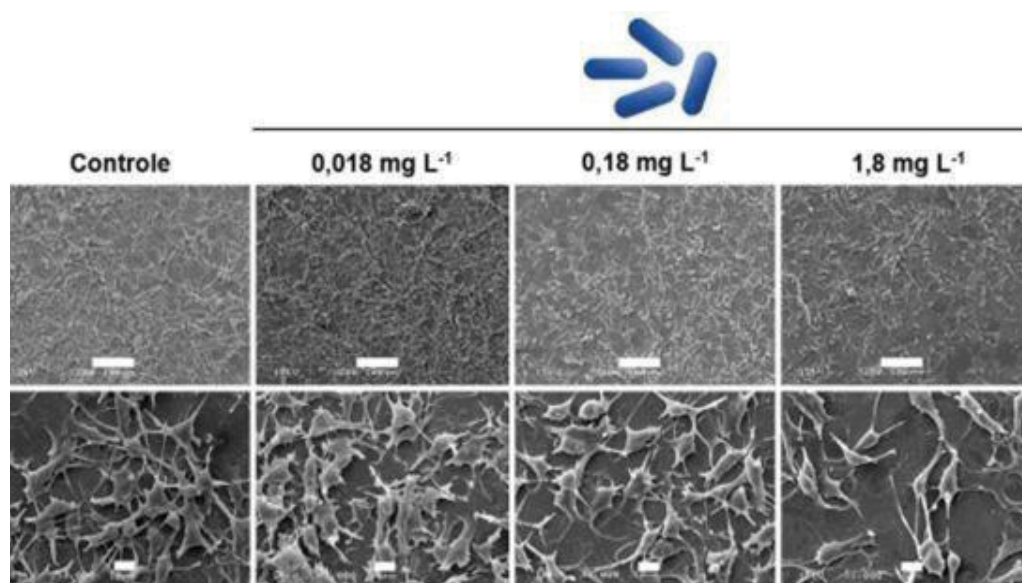
Os diferentes padrões de organização observados entre GA e nanopartículas de ouro decorrem das distintas formas de interação entre os componentes. Para AuNPs, utilizados no estudo, a funcionalização ocorre após a síntese química das nanopartículas, por meio da interação eletrostática entre os grupamentos carboxílicos da GA e a bicamada formada pelo surfactante CTAB na superfície dos AuNRs. Essa bicamada resulta das propriedades anfífilas do CTAB, permitindo que uma face interaja com o ouro e a outra com a GA. Esse tipo de interação possibilita que um único AuNR se associe a múltiplas partículas de GA, o que justifica a disposição da goma ao redor das nanopartículas observada nas imagens de MET (Barros et al., 2016b; Gonçalves, 2020).

Essa organização estrutural observada entre GA e as AuNRs é relevante não apenas do ponto de vista morfológico, mas também funcional, uma vez que pode influenciar diretamente a estabilidade coloidal e o comportamento biológico das nanopartículas (Gonçalves, 2020).

Nesse contexto, a eficácia dos AuNRs com goma arábica (GA-AuNRs) foi avaliada por Gonçalves (2020) utilizando modelos celulares de melanoma (B16-F10) e fibroblastos não

tumorais (Balb/3T3). Os resultados demonstraram que as GA-AuNRs permaneceram estáveis por até sete dias e que as concentrações de 0,018; 0,18 e 1,8 mg L⁻¹ não apresentaram citotoxicidade após 96 horas de exposição. A análise morfológica revelou ausência de alterações significativas nas células tumorais, sendo observada apenas uma leve redução da densidade celular em regiões de alta confluência, de forma dependente da concentração, o que reforça a segurança das doses selecionadas.

Figura 4 – Morfologia de células de melanoma após exposição a concentrações não citotóxicas de GA-AuNRs.



Fonte: Gonçalves (2020).

Legenda: Células B16-F10 (melanoma murino) foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de GA-AuNRs (0,018 a 1,8 mg L⁻¹) ou GA 0,4% (controle) por 96 horas. As células foram então fixadas e processadas para MEV. As imagens apresentadas são representativas de 2 experimentos independentes realizados em duplicata técnica. Barras de escala: imagens superiores = 100 μm, imagens inferiores = 10 μm.

A partir dessa avaliação inicial de biocompatibilidade, investigou-se também a capacidade de internalização das GA-AuNRs pelas células tumorais e sua possível relação com os efeitos citotóxicos que foram observados em concentrações mais elevadas.

Diante disso, a internalização celular das GA-AuNRs e sua relação com a citotoxicidade foi avaliada por Gonçalves (2020), que demonstrou sua interação eficiente com células de melanoma.

A toxicidade e a interação das AuNPs com tecidos biológicos são influenciadas por parâmetros como tamanho, forma, superfície e a massa de ouro internalizada (Kus et al., 2021). No caso das GA-AuNRs, foi observada uma internalização eficiente pelas células

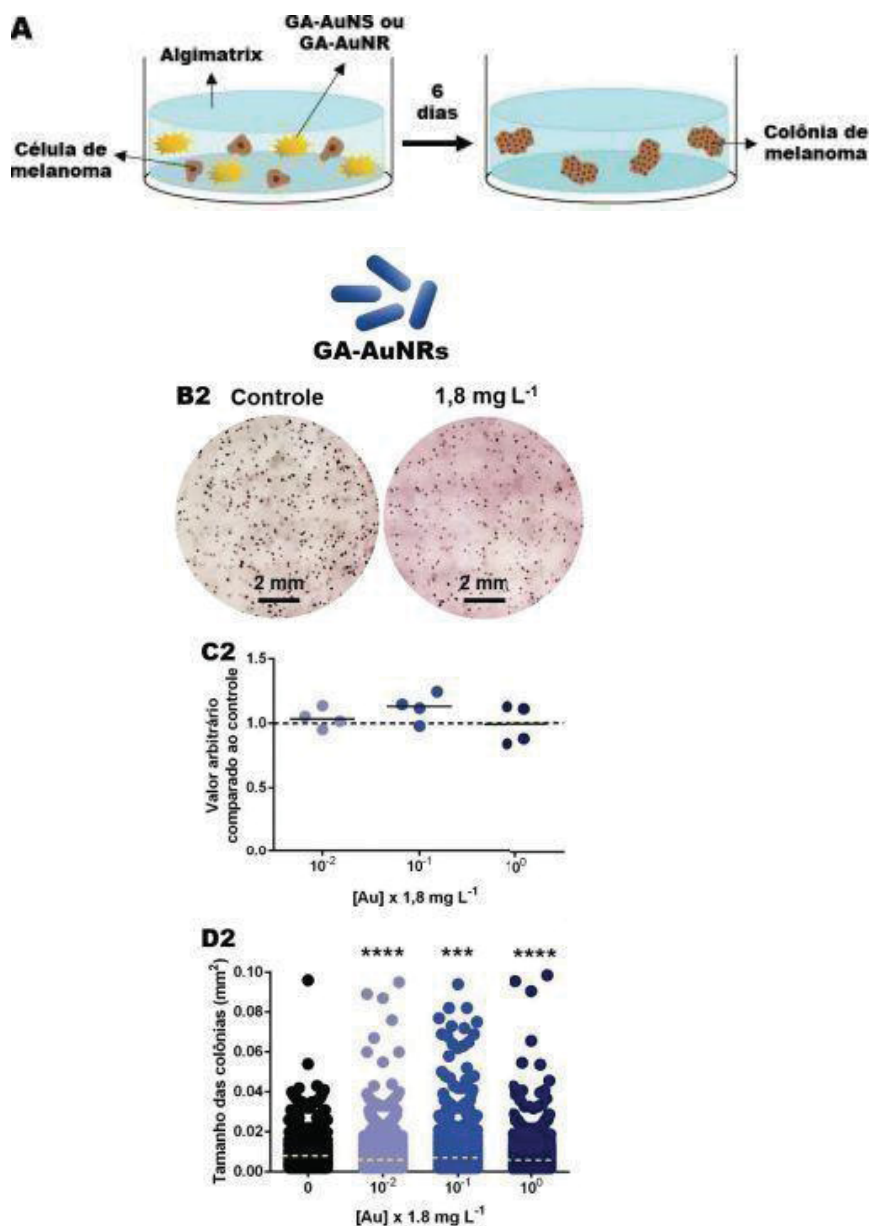
tumorais, com distribuição intracelular compatível com mecanismos endocíticos, evidenciada por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e fluorescência (Gonçalves, 2020). A análise quantitativa da internalização, realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), revelou que o processo é dependente da concentração. À medida que a concentração das nanopartículas aumentava, também aumentava a massa de ouro internalizada pelas células (Gonçalves, 2020).

Esse resultado reforça a hipótese de que a massa de ouro internalizada, e não necessariamente o número de partículas ou sua área superficial, é o fator mais determinante para os efeitos citotóxicos. Além disso, os dados sugerem que a GA atua não apenas como estabilizante, mas também como um agente carreador ativo, facilitando a entrega das AuNRs ao interior celular, o que potencializa seus efeitos biológicos (Gonçalves, 2020). Esse comportamento está de acordo com evidências da literatura que relacionam forma e superfície das nanopartículas à eficiência de internalização celular (Chithrani; Ghazani; Chan, 2006).

Dada essa influência intracelular das GA-AuNRs, o estudo investigou se os efeitos observados poderiam impactar funções fenotípicas associadas ao comportamento tumoral. Considerando que a capacidade invasiva das células tumorais é um dos primeiros eventos associados ao processo metastático, também foi avaliado se as GA-AuNRs poderiam interferir nessa característica funcional. Por meio de ensaios de invasão celular em sistema transwell, observou-se que, após 72 horas de exposição à concentração intermediária ($0,18 \text{ mg L}^{-1}$), apresentou uma redução de 12,9% na capacidade invasiva das células de melanoma (Gonçalves et al., 2020).

Esses resultados demonstram que os GA-AuNRs podem modular a capacidade invasiva das células tumorais, o que representa um passo inicial crucial no processo metastático. Dando continuidade à investigação dos efeitos desses nanomateriais sobre características funcionais associadas à malignidade, avaliou-se também se GA-AuNRs seriam capazes de interferir na capacidade das células de melanoma formarem colônias, para tal, foi realizado um ensaio em matriz tridimensional de alginato. Embora as diferentes concentrações testadas ($0,018$; $0,18$ e $1,8 \text{ mg L}^{-1}$) não tenham alterado significativamente a quantidade de colônias formadas, observou-se uma redução no tamanho das colônias em 25%, 12,5% e 25%, respectivamente (figura 5). Dessa forma os dados indicam que os GA-AuNRs, mesmo em concentrações não citotóxicas, são capazes de impactar negativamente a proliferação tumoral tridimensional, reforçando seu potencial antitumoral (Gonçalves, 2020).

Figura 5 – Capacidade de formação de colônias de células de melanoma após exposição a concentrações não citotóxicas de GA-AuNRs



Fonte: Gonçalves (2020).

Legenda: A) Células de melanoma B16-F10 foram plaqueadas na presença de GA-AuNSs ou GAAuNRs em placas AlgiMatrix™ 3D Culture System e incubadas por 6 dias. As colônias formadas foram fixadas e coradas com cristal violeta. Os hidrogéis de alginato foram fotografados sobre placas de Petri com fundo quadriculado (grades de 2mm, B1 e B2) e as colônias contadas (normalizando pela área analisada de cada hidrogel, C1 e C2) e medidas (D1 e D2) usando o programa Fiji.

Os valores de cada amostra foram comparados aos valores do respectivo controle (GA 0,4%, representado pela linha tracejada nos gráficos C1 e C2). As linhas tracejadas em D1 e

D2 representam a mediana de tamanho das colônias de cada grupo. Foram realizados pelo menos 4 experimentos independentes em duplicata técnica. Teste t pareado (C1 e C2) ou Mann-Whitney (D1 e D2). *** $p < 0,0001$.

Com o intuito de validar os achados *in vitro* em um modelo *in vivo*, o estudo prosseguiu com a inoculação subcutânea e modelo de metástase experimental por inoculação na veia caudal com células de melanoma em camundongos, seguida do tratamento com GA-AuNRs. Os resultados revelaram redução de 45% no crescimento do tumor primário, acompanhada de alterações histológicas compatíveis com um melhor prognóstico. Além disso, foi observada uma diminuição na profundidade das metástases pulmonares superficiais e na incidência de metástases intrapulmonares (Gonçalves, 2020).

Dessa forma, os dados apresentados reforçam o potencial das GA-AuNRs como agentes terapêuticos inovadores no tratamento do melanoma. No entanto, embora os tratamentos com GA-AuNRs em modelos murinos tenham demonstrado efeitos antitumorais significativos, com modulação do comportamento celular e ausência de toxicidade sistêmica aparente, ainda são limitados os dados sobre sua eficácia em modelos de melanoma humano. Essa lacuna ressalta a necessidade de estudos translacionais que validem esses resultados em linhagens humanas. A combinação entre a biocompatibilidade conferida pela goma arábica e o potencial terapêutico dos nanobastões de ouro posiciona essa abordagem como uma estratégia promissora frente às limitações das terapias convencionais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos do tratamento com Ga-AuNRs em linhagens de melanoma humano com diferentes perfis mutacionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a viabilidade celular após 96 horas de exposição a concentrações crescentes de GA-AuNRs ($0,0018$ a $18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) em linhagens de melanoma humano com diferentes perfis mutacionais (Sk-Mel-28 *BRAF*, Sk-Mel-147 *NRAS*, MeWo *NF1*) e em fibroblastos humanos (CCD-1059Sk);
2. Determinar a densidade celular nas mesmas condições experimentais de tempo e concentração, nas linhagens mencionadas;
3. Quantificar a produção ROS após a exposição aos Ga-AuNRs

4. Avaliar a capacidade clonogênica das células tumorais após a exposição aos Ga- AuNRs
5. Investigar a capacidade migratória das células frente a exposição aos Ga-AuNRs
6. Identificar as vias de sinalização celular moduladas pelo tratamento com os nanocompósitos, por meio de abordagens de biologia de sistemas.

4 MATERIAIS, MÉTODOS, RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão da dissertação será apresentada em formato de artigo, gerado a partir dos resultados obtidos com trabalho desenvolvido durante o período do doutorado, conforme permitido no regimento interno do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, Seção X, Art. 47, § Único.

**EVALUATION OF GOLD-GUM ARABIC NANOCOMPOSITE ACTIVITY IN
HUMAN MELANOMENA LINES: *IN VITRO* TESTS AND MODELING OF
BIOLOGICAL NETWORKS**

ABSTRACT

Melanoma is an aggressive form of skin cancer originating from melanocytes, characterized by high plasticity, invasive capacity, and resistance to conventional treatments. Its progression involves complex metabolic adaptations and alterations in the tumor microenvironment, as well as the activation of signaling pathways such as PI3K/AKT, MAPK/ERK, and Wnt/ β -catenin. Given the need for innovative therapeutic approaches, gold nanoparticles have been studied and have shown promising potential in melanoma therapy. Gold nanorods stabilized with gum arabic (GA-AuNRs) have demonstrated the ability to modulate cellular responses without exhibiting cytotoxicity in a murine melanoma model. In this study, the effect of non-cytotoxic concentrations of GA-AuNRs was investigated on three human melanoma cell lines with distinct mutations: SK-MEL-28 (*BRAF*), MEWO (*NFI*), and SK-MEL-147 (*NRAS*), as well as on non-tumoral human fibroblasts (CCD-1059Sk). The experiments were conducted *in vitro* to assess cell viability, cell density, reactive oxygen species (ROS) production, colony formation, and migration. In parallel, *in silico* analyses using protein–protein interaction (PPI) networks aimed to identify potential molecular targets modulated by GA-AuNRs. Cell viability and density assays showed that fibroblasts maintained both viability and density across all tested concentrations, confirming the biocompatibility of GA-AuNRs in normal cells. The clonogenic assay revealed distinct behaviors among the melanoma cell lines: SK-MEL-28, clonal area decreased in the presence of GA-AuNR at $1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, while MEWO presented larger colonies at $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ compared to the control group (GA 0.4%). SK-MEL-147 showed no significant variation in colony formation at any tested concentration. In cell migration assays, SK-MEL-28 showed significant inhibition at $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ GA-AuNR, whereas MEWO at the same concentration exhibited a higher migration rate compared to the GA 0.4% control. SK-MEL-147 presented no significant differences. These findings suggest that GA-AuNR efficacy varies according to the molecular context of each cell line: in SK-MEL-28, they impacted tumor malignancy parameters, whereas in MEWO, compared to the control, they increased colony size and migration speed. Computational PPI network analyses supported the experimental observations, highlighting critical nodes in RHOA and RAC1, associated with cytoskeletal remodeling and cell migration, regulated downstream by MAPK/ERK and PI3K/AKT pathways. CTNNB1 (β -catenin) and TPT1 were also identified as regulators of cell survival and proliferation. These elements, potentially susceptible to modulation by GA-AuNRs, emerge as key points in controlling tumor cell migration and proliferation. Taken together, the data demonstrate that GA-AuNRs exert selective antitumor activity, influenced by both concentration and the genetic context of melanoma.

Keywords: Melanoma; Gold nanorods (AuNRs). Gum arabic (GA). Cell viability; Cell density. Clonogenic assay. Cell migration. *In vitro*. *In silico*.

1 INTRODUCTION

Melanoma is a malignant neoplasm originating from melanocytes, the pigment-producing cells located in the basal layer of the epidermis. Although cutaneous melanoma is the most prevalent form, it can also arise in other anatomical sites, such as the eyes, meninges, and mucosal surfaces (1). This malignancy is characterized by the dysregulated proliferation of melanocytes, and its oncogenic transformation occurs progressively, driven by genetic, epigenetic, and environmental factors (2). The continuous increase in melanoma incidence, particularly among fair-skinned populations, has raised public health concerns, with annual growth rates ranging from 3% to 7%. This trend, combined with the low survival rates in advanced stages, poses significant challenges to healthcare systems (3,4).

The high incidence and biological complexity of melanoma are closely linked to the invasive nature of melanoma cells, which exhibit pronounced plasticity, migratory capacity, and adaptability to the tumor microenvironment. These cells undergo metabolic reprogramming to sustain proliferation and facilitate metastasis formation, contributing to resistance against conventional therapies (5). This metabolic flexibility is essential for sustaining rapid cell division and tissue invasion, especially in tumor niches characterized by nutrient deprivation and high oxygen tension. In this context, reactive oxygen species (ROS) play a crucial role by influencing several signaling pathways involved in cell migration (6). The increased production of ROS can activate the PI3K/Akt pathway, promoting cell survival and migration, as well as interacting with the MAPK/ERK pathway, which regulates cytoskeletal dynamics and facilitates cell invasion. Studies also indicate that ROS can modulate the Wnt/ β -catenin pathway, which is essential for epithelial-mesenchymal transition (EMT), a key process in melanoma invasion and metastasis (7). Furthermore, ROS influence the activation of proteins such as Rac1, which regulate lamellipodia formation and cell motility. These interactions between ROS and signaling pathways directly contribute to the ability of tumor cells to migrate and invade adjacent tissues, facilitating melanoma progression (8, 9).

In this context, the identification and characterization of key genetic mutations in melanoma, such as mutations in *BRAF*, *NRAS*, and *NFI*, have been essential for guiding the development of targeted therapies. These mutations lead to the constitutive activation of oncogenic signaling pathways, such as the MAPK cascade, contributing not only to tumor progression but also to increased production of ROS, which in turn promote genomic instability, cell proliferation, and treatment resistance (10, 11).

A deeper understanding of the molecular pathways and signaling networks that regulate melanoma progression and metastasis is critical for the advancement of targeted and personalized treatment approaches (12). Although significant progress has been achieved with therapies targeting RAF/MEK pathways and immune checkpoint inhibitors such as pembrolizumab and nivolumab, resistance to treatment and the intrinsic genetic heterogeneity of melanoma continue to represent major therapeutic obstacles. Furthermore, conventional chemotherapy, while still employed in metastatic cases, often demonstrates limited efficacy, highlighting the urgent need for novel treatment strategies and the continued pursuit of personalized medicine to optimize therapeutic outcomes (13, 14).

In this context, gold nanoparticles (AuNPs) have emerged as promising candidates in cancer therapy due to their unique physicochemical properties. At non-cytotoxic concentrations, AuNPs have been shown to exert antitumor effects by modulating the phenotypes of tumor cells (15). Among them, gold nanorods (AuNRs) have been extensively investigated for melanoma treatment, with various therapeutic applications. In addition to their photothermal application, AuNRs function as radiosensitizers, amplifying the dose of ionizing radiation in the tumor and allowing for a reduction in the total dose required, minimizing the adverse effects of conventional radiotherapy (16, 17, 18). As drug delivery systems, their surface functionalized with chemotherapy drugs or antibodies enables the controlled release of therapeutic agents into the tumor microenvironment, increasing stability and systemic circulation (19, 20).

In diagnostics, they are used as contrast agents in techniques such as optical coherence tomography and Raman spectroscopy, favoring early detection and treatment monitoring (21,22). At the molecular level, AuNRs induce oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and activate pro-apoptotic pathways, as well as influence proliferation and inflammation pathways, directly impacting tumor behavior (2,23). Combined approaches with immunotherapy are being explored, with AuNRs increasing tumor immunogenicity and enhancing the effects of immune checkpoint inhibitors, representing a promising strategy, especially for refractory or metastatic cases (23,24,18). Notably, recent studies indicate that AuNRs may also exert anticancer activity independent of light activation, suggesting a broader therapeutic potential.

Our research group has previously demonstrated the therapeutic efficacy of gold nanorods stabilized with the anionic polysaccharide gum arabic (GA) against melanoma. In vitro studies revealed that this nanocomposite (GA-AuNRs) exhibited significant antitumor and antimetastatic effects without inducing notable cytotoxicity in a murine melanoma model (25).

In vivo, treatment with GA-AuNRs led to a 45% reduction in solid melanoma tumor growth, with outcomes comparable to dacarbazine therapy. Moreover, the treatment induced structural alterations in tumor tissue, including reduced areas of necrosis and vascularization, pointing toward an overall improvement in tumor prognosis (25).

Therefore, the present study aimed to evaluate, both in vitro and in silico, the effects of GA-AuNRs at non-cytotoxic concentrations, with a focus on their potential to modulate key cellular functions involved in melanoma progression. Human melanoma cell lines harboring distinct oncogenic mutations were utilized for the in vitro experiments. For the *in silico* analyses, protein interaction network databases were employed to predict potential molecular disruptions occurring during the metastatic phase of melanoma. Elucidating these interactions is essential for advancing precision oncology, as it enables the development of more targeted and effective therapeutic strategies for metastatic melanoma.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 GOLD NANORODS SYNTHESIS, FUNCTIONALIZATION, AND CHARACTERIZATION

Gold nanoparticles were chemically synthesized, according to the seed-mediated method and as described in Silva (2013). The nanorods arrived in a solution containing cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), and were functionalized with gum arabic (GA) under sterile conditions (26). Briefly, the suspension was centrifuged at 11,200 rpm for 20 minutes and washed once with ultrapure water (also by centrifugation), and the pellet was resuspended in sterile 0.4% GA solution. The gold concentration was determined by ICP-OES. The GA-AuNRs characterization used in this study was based on protocols previously described by Barros et al. (2016) (27) and was performed by UV-visible spectroscopy.

2.2 CELL CULTURE

In this study, three human melanoma cell lines were used: Sk-Mel-28 (ATCC® HTB-72), MeWo (ATCC® HTB-65) and Sk-Mel-147 (ATCC® CRL-9446TM). These cell lines represent different genetic profiles of melanoma, with mutations in *BRAF*, *NF1* and *NRAS* genes, respectively. In addition, the human fibroblast cell line CCD-1059Sk was included as a comparative control. The cells were cultured in specific media following the protocols of the American Type Culture Collection (ATCC).

The melanoma cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 1 µg/mL penicillin and 1 µg/mL streptomycin. The culture was carried out in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂ with subculture according to the ATCC protocols.

Nanorod suspensions were prepared by serial dilutions (1:10) in 0.4% GA solution. For *in vitro* cell exposure, the nanorods were added to culture medium at a proportion of 20% of the respective assay final liquid volume. The 0.4% GA solution was used as a control in all experimental conditions.

2.3 CELL VIABILITY AND DENSITY ASSAY

Cell viability was assessed using the neutral red (NR) dye retention assay, which is based on the ability of viable cells to absorb and retain the dye within lysosomes, reflecting the integrity of endomembranes. The principle of the method involves the passive diffusion of the uncharged form of the dye across the plasma membrane of viable cells. Once inside acidic organelles such as lysosomes, the dye becomes protonated and charged, which prevents its exit and leads to its accumulation within these structures.

For viability and cell density assays, Sk-Mel-28 (2,500 cells/well), MeWo and Sk-Mel-147 (2,000 cells/well) and CCD-1059Sk (4,000 cells/well) cell lines were seeded in 96-well plates. Six hours after plating, they were treated with five concentrations of Ga-AuNRs (0.0018; 0.018; 0.18; 1.8; and 18 mg L⁻¹) for 96 hours. The control group received only 0.4% GA.

After the exposure period, to assess viability, the cells were incubated for 3 hours with neutral red solution 0.04 mg/mL, after which they were incubated with an extraction solution composed of ethanol, ultrapure water, and acetic acid (50:49:1, v/v). The plate was shaken for homogenization and absorbance was measured in a microplate spectrophotometer (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA) at 540 nm. Cell density was quantified using the crystal violet staining assay, which stains the nucleic acids of adherent cells at the end of the treatment. The dye, which is cationic in nature, binds to negatively charged cellular components such as DNA and proteins, allowing for the estimation of the number of viable cells based on the intensity of the retained staining. After the extraction solution removal, the cells were stained with 0.25 mg/mL crystal violet for 20 minutes. Then, the dye was removed and eluted with 33% acetic acid in ultrapure water. Absorbance was determined in a microplate reader (BioTek® Instruments, Inc., Winooski, USA) at 570 nm.

2.4 CLONOGENIC ASSAY

This assay was performed as described by Franken et al. (2006), with adaptations. Sk-Mel-147 (500 cells/well), Sk-Mel-28, and MeWo (400 cells/well) melanoma cell lines were seeded into 6-well plates. After 24 hours, treatment with 0.18 or 1.8 mg L⁻¹ GA-AuNRs was applied. The control group received 0.4% GA. Cells were then incubated for 6 days. At the end of the incubation period, the supernatant was discarded, and cells were fixed with a solution of

50% ethanol and 2% glacial acetic acid in ultrapure water for 20 minutes, followed by one wash with ultrapure water. Colonies were stained with 0.25 mg/mL crystal violet solution for 20 minutes.

The parameters considered for analysis were: total area, representing the culture plate extent occupied by cell colonies, reflecting the ability of cells to proliferate and expand on a substrate; area covered by cells, referring to the total area fraction effectively occupied by viable cells, indicating cells density within the formed colonies; density, defined as the ratio between the cells number and the area occupied by colonies, reflecting cells compactness degree; and finally, colonies number, which represents the count of cells groups formed after the incubation period and serves as an indicator of cells clonogenic efficiency.

The formed colonies were photographed using a stereomicroscope and counted using the ImageJ Fiji software.

2.5 ANALYSIS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)

Oxidative metabolism was assessed by quantifying ROS production. For this purpose, 150×10^3 cells/well were seeded in 6-well plates. The cells were treated with 0.18 or 1.8 mg L⁻¹ GA-AuNRs for 24 hours. The control group received only 0.4% GA, while the positive control was treated with 5 µL of 33% H₂O₂ for 15 minutes.

ROS production was determined using 10 µM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) for 30 minutes. DCFH-DA diffuses passively into cells, where it is hydrolyzed by esterases to 2',7'-dichlorofluorescein (DCFH), a non-fluorescent compound that is impermeable to the cell membrane. DCFH reacts with ROS, especially hydrogen peroxide, and is oxidized to dichlorofluorescein (DCF), a highly fluorescent compound. Fluorescence was analyzed by flow cytometry on a FACS Melody (BD Biosciences) instrument.

2.6 MIGRATION

To evaluate the migratory capacity of melanoma cells exposed or not to the nanocomposite, the wound healing assay described by Liang et al. (2007) was used. Cells were seeded in a 4-compartment CELL view cell culture plate at a density of 6,000 cells per well. After 24 hours of plating, cells were treated with 0.18 or 1.8 mg L⁻¹ of GA-AuNR. The control group received 0.4% GA. After 72 hours, cells were exposed to 20 µg/mL of mitomycin C for 2 hours to prevent cell proliferation from interfering with the assay. After the incubation period with mitomycin C, a scratch was performed with a 10 µL tip on the cell monolayer. Subsequently, the wells were washed, and 500 µl of Dmem without fetal bovine serum was added.. The cells were then taken to the Confocal A1R MP+ Nikon where images were captured

for 23 h, with captures every 30 minutes. The images obtained were analyzed in ImageJ (NIH, Washington, USA). To analyze the migration speed, the formula described by Jonkman et al. (2014) was used. First, the linear regression (linear equation = $y = \alpha + \beta x$) of the graph of the decay of the opening area rate over time was calculated, where α represents the intercept and β represents the slope of the line. The migration speed was calculated using the following formula:

$$\text{Speed } (\mu\text{m/h}) = \frac{|\text{slope of the line}|}{2 \times \text{image width}}$$

2.7 STATISTICAL ANALYSIS

All experiments were performed at least three times for statistical analysis. Statistical analysis was performed in GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software) and statistical tests: Kruskal-Wallis test with Dun test. Data are presented as mean $\pm$ standard error.

2.8 IN SILICO ANALYSIS

The gene expression data analyzed in this study were obtained from the GSE255256 dataset available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>. From this dataset, expression profiles corresponding to MeWo and Skmel-28 melanoma cell lines were extracted. Constitutive gene expression was evaluated using the RankProduct method (28), which ranks genes based on their consistency of differential expression across replicate experiments. Data preprocessing was performed within the R/Bioconductor (29). For each sample, the average signal intensity of identical probes was calculated and applied to normalized gene expression data using the limma package. All expression values were subsequently log2-transformed to satisfy the assumptions of the RankProduct algorithm. The analysis was conducted with 1,000 permutations, and differentially expressed genes were selected based on a p-value threshold of ≤ 0.01 , this more stringent cutoff was adopted to reduce the false-positive rate resulting from multiple testing in gene expression analysis and to enhance the statistical robustness of the results. Resulting gene lists were stratified into positive and negative categories, corresponding to upregulated and downregulated genes, respectively. Genes with a q-value ≤ 0.05 were considered statistically significant.

Subsequent analyses employed the constitutive gene expression profiles of each cell line to predict a chemical–protein–protein interaction (CPPI) network, simulating potential interactions resulting from *in vitro* treatments involving gold in combination with major components of arabic gum (*arabinose*, *galactose*, *rhamnose*, and *glucuronic acid*). Network construction was performed using the STITCH 5.5 metasearch platform (30), incorporating

evidence from *text mining*, *experimental data*, *biological databases*, and *coexpression*. A confidence score threshold of 0.4 was applied, and disconnected nodes were excluded from further analysis.

To characterize the topological properties of the resulting CPPI networks, degree and betweenness centrality metrics were computed using the CentiScaPe 2.2 plugin in Cytoscape (31). *Degree centrality* reflects the number of direct connections of a given node, and in this study, the average degree was calculated as the sum of all degree values divided by the total number of nodes in the network. *Betweenness centrality*, defined as the number of shortest paths passing through a given node, was also calculated. The average betweenness value was similarly determined as the ratio between the total betweenness scores and the number of nodes. The mathematical formulations of these centrality metrics are described in detail in a previous publication by our group (32).

Finally, to assess the overlap between candidate nodes modulated by gold and/or Arabic gum compounds and genes associated with cell proliferation and migration, Venn diagram analyses were performed. Diagrams were generated using the online tool available at <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. All molecular entities related to migration and proliferation were considered, based on Gene Ontology (GO) terms obtained from the Molecular Signatures Database (MSigDB) (33).

3. RESULTS

3.1 VIABILITY AND CELL DENSITY TESTS

Thus, we evaluated whether GA- AuNRs alter cell viability or density. Tumor cells SK-MEL-28 (BRAF), MEWO (NF1) and SK-MEL-147 (NRAS), in addition to non-tumorigenic fibroblasts (CCD-1059Sk), were exposed to concentrations of GA-AuNRs (0.0018 up to 18 mg L⁻¹ for 96 hours (Figure 6). For fibroblasts, there was no statistical difference in any parameter analyzed, and for tumor lines, only MEWO showed a significant reduction ($p = 0.01$) in neutral red retention at a concentration of 18 mg L⁻¹. For cell density, only the Sk-Mel-28 line showed a significant reduction ($p = 0.01$) at a concentration of 18 mg L⁻¹.

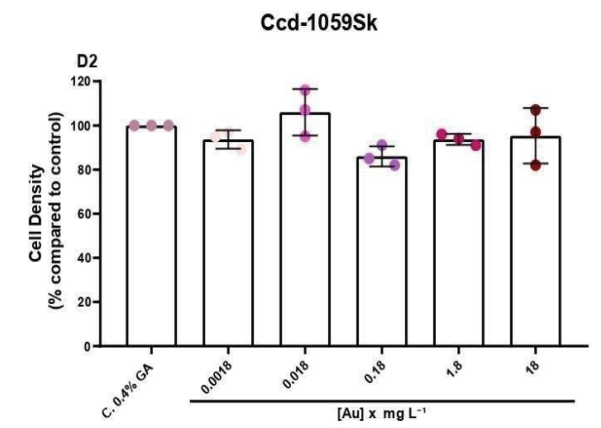
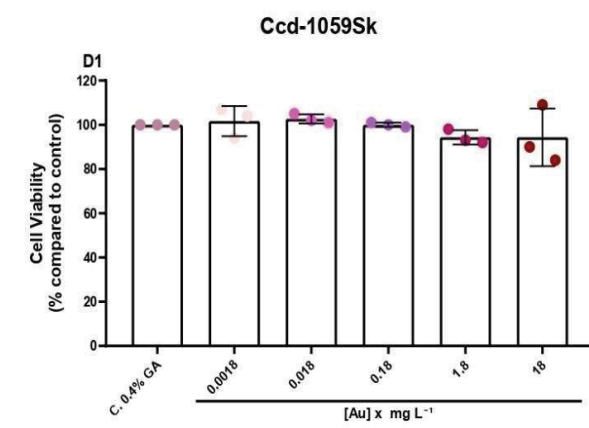
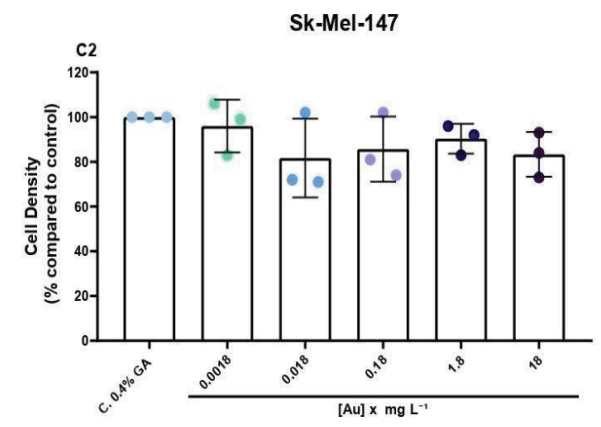
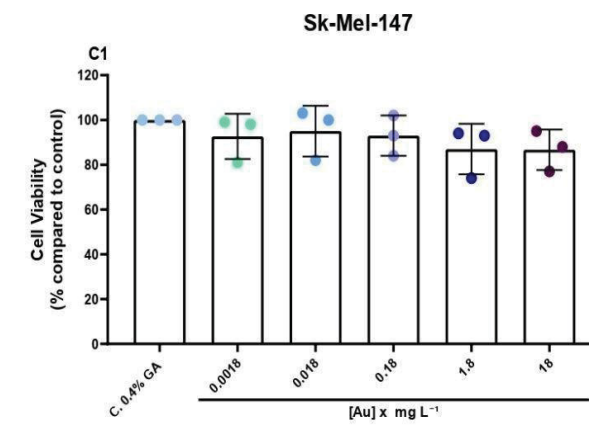
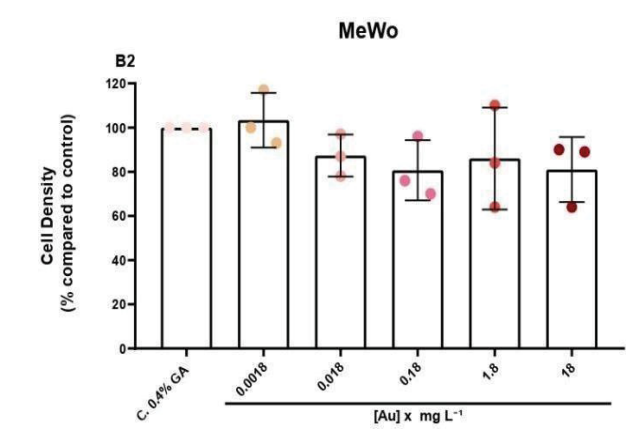
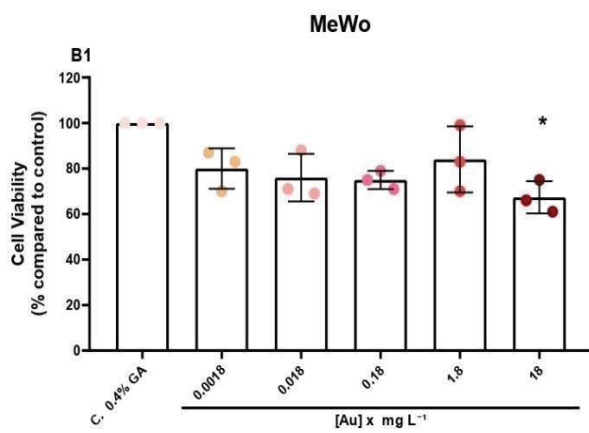
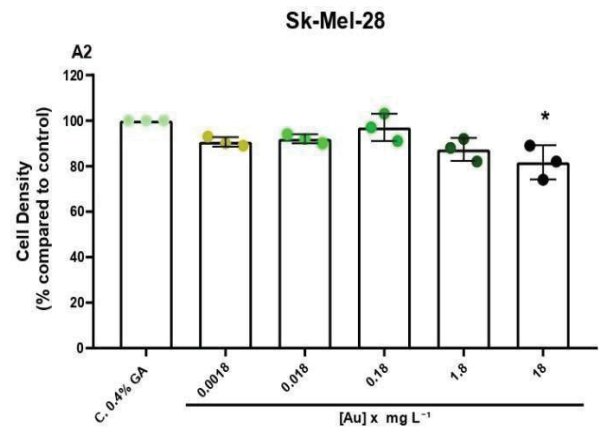
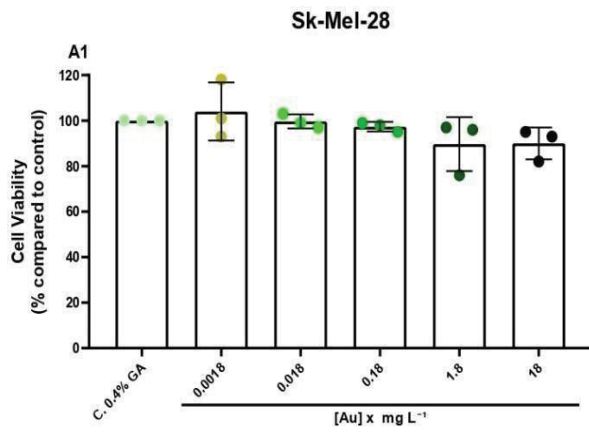


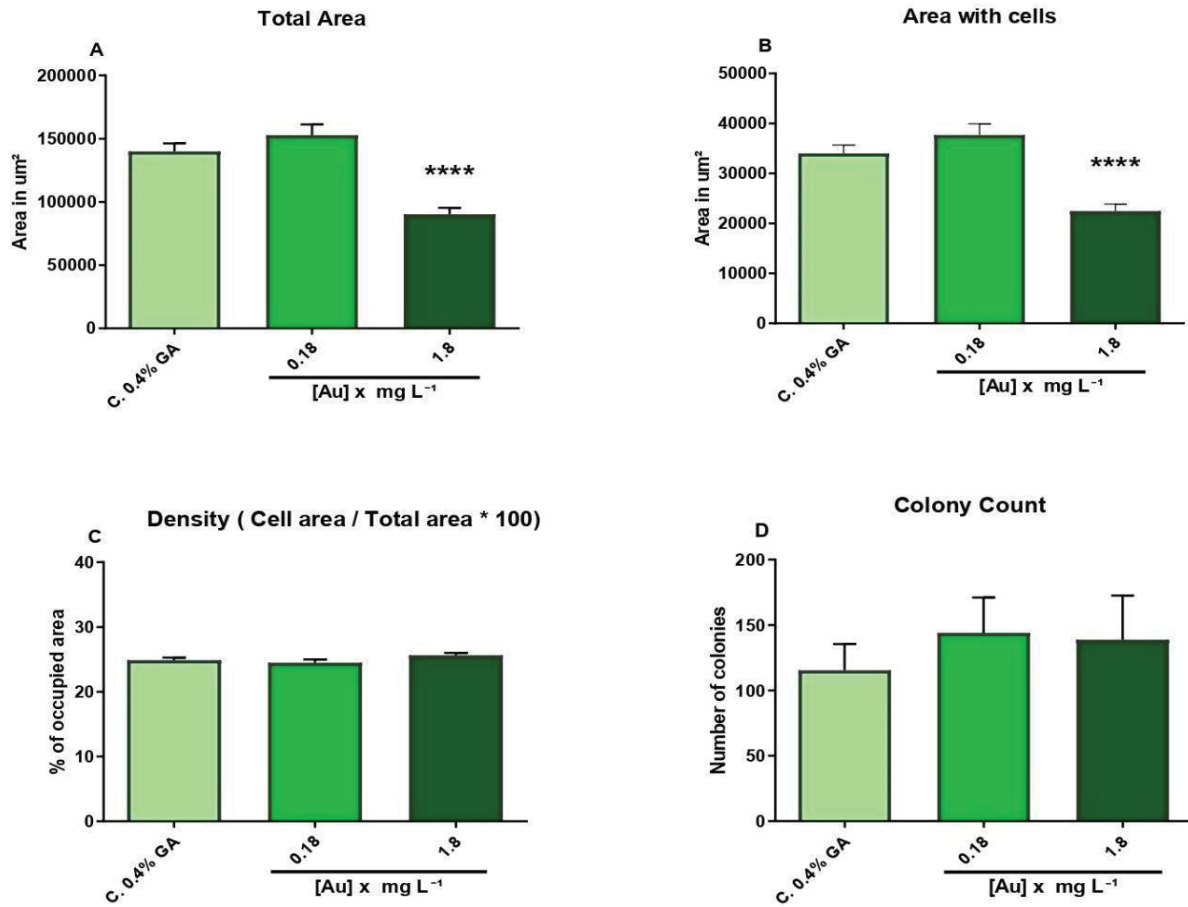
Figure 6. Effect of GA-AuNRs on cell viability and density. MeWo, SK-MEL-28, SK-MEL-147, and CCD-1059Sk cell lines were cultured in the presence of increasing concentrations of GA-AuNRs (0.0018 mg L⁻¹ to 18 mg L⁻¹) for 96 hours. Cell viability was assessed using the neutral red uptake assay (figure A1, B1, C1, and D1), while cell density was determined by crystal violet (CV) staining (figure A2, B2, C2, and D2). Absorbance values obtained from the NR and CV assays were normalized to the 0.4% GA control. Cells treated with the nanocomposites were compared to their respective controls in each experiment. Data are presented as mean $\pm$ standard deviation (SD) from three independent experiments performed in technical triplicates. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc correction ($p < 0.05$).

3.2 CLONOGENIC ASSAY

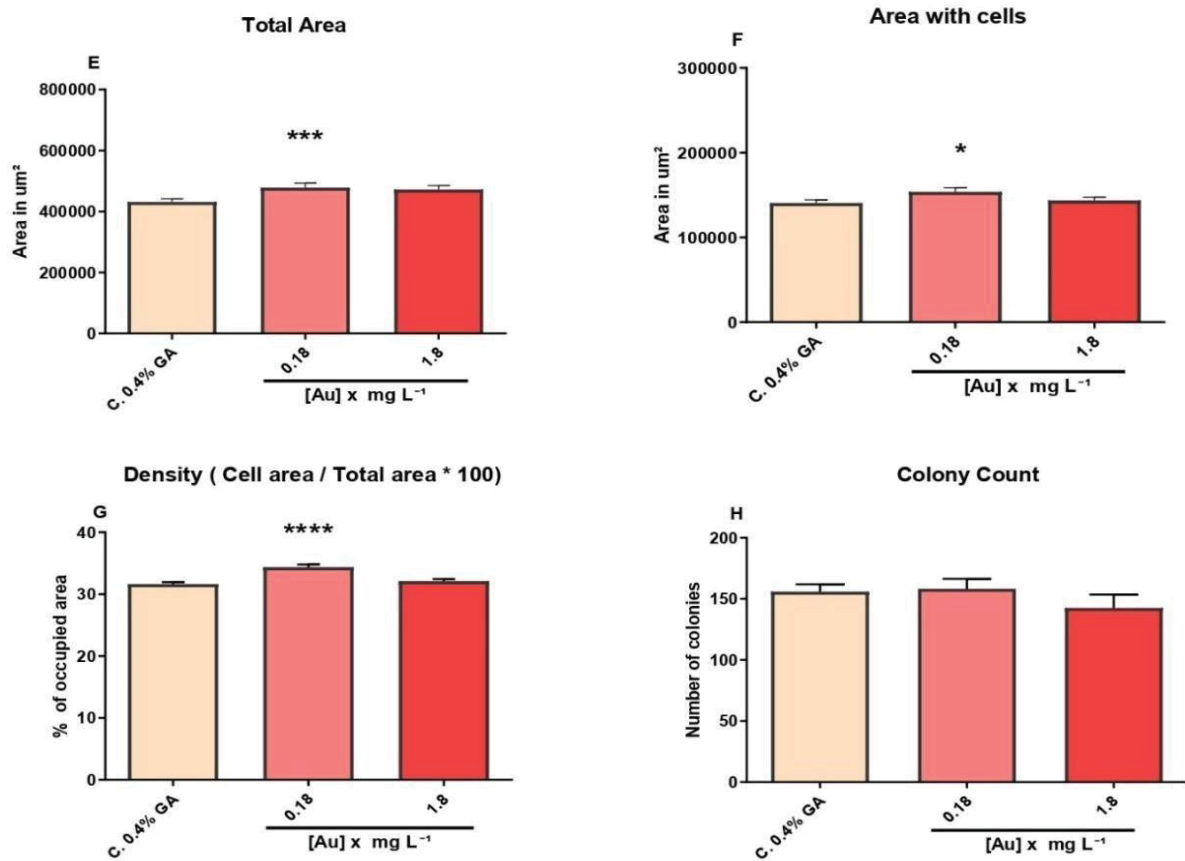
For the Sk-Mel-28 cell line, a statistically significant reduction in colony formation capacity was observed, evidenced by the decrease in the total area and the area occupied by cells at the highest non-cytotoxic concentration tested (1.8 mg L⁻¹), compared to the 0.4% Ga control group (Figure 7 A, B).

In the MeWo cell line, there was a significant increase in the total area and area occupied by cells and in cell density at a concentration of 0.18 mg L⁻¹ compared to the 0.4% Ga control (where the group treated with the 0.18 mg L⁻¹ concentration exhibited larger colonies) (Figure 7 E, F, G). On the other hand, in the Sk-Mel-147 line, no statistically significant differences were observed in colony formation, regardless of the variable analyzed (total area, area with cells, number of colonies and density), in relation to the Ga 0.4% control group (Figure 7 I, J, K, L). The representative photographic images of each lineage (Figure 8) demonstrate the reduction in the area of the colonies.

Sk-Mel-28



MeWo



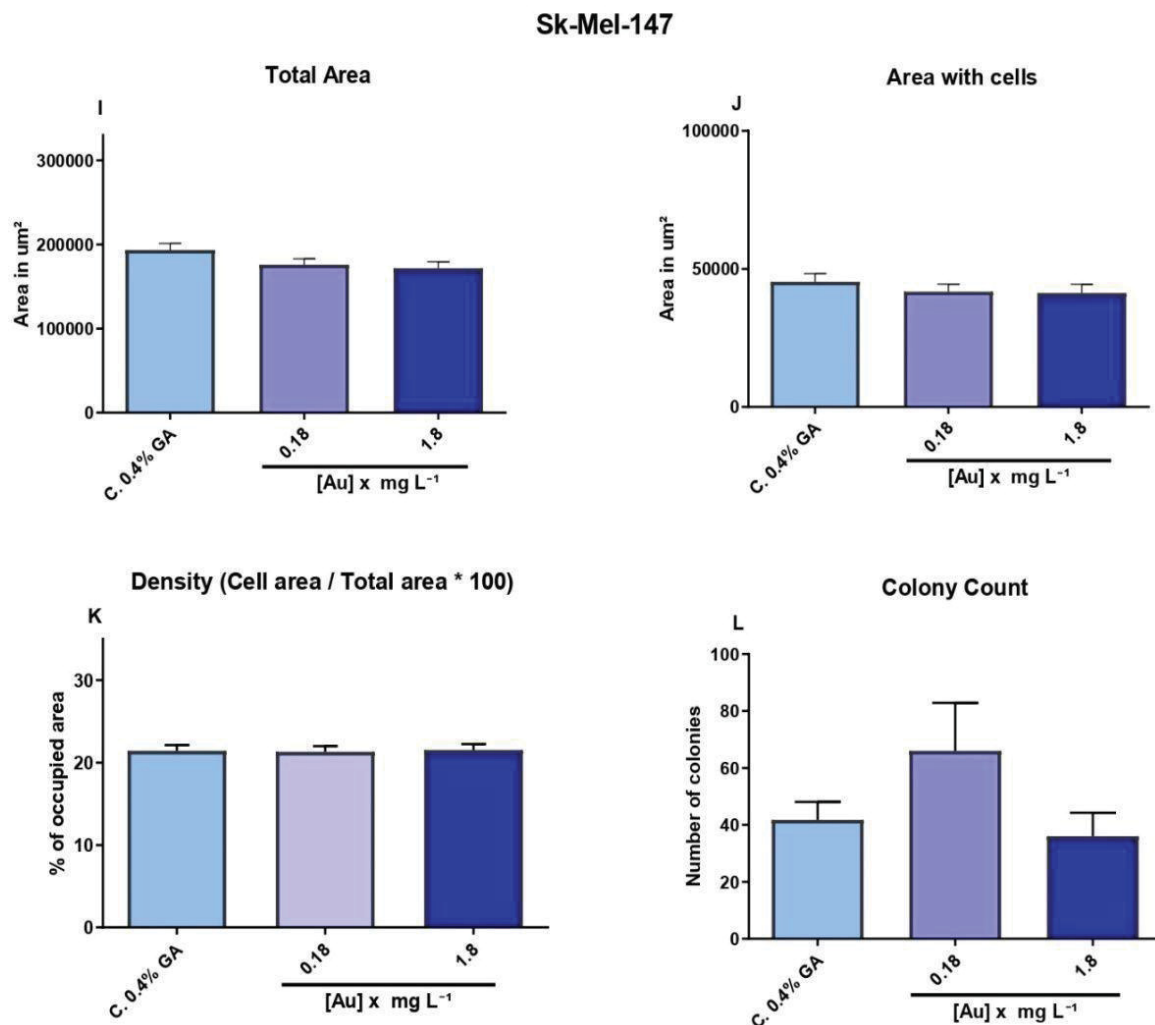


Figure 7. Assessment of colony formation in human melanoma cell lines treated with GA- AuNRs. SK-MEL-28, MeWo, and SK-MEL-147 cells were cultured in the presence of GA-AuNRs (0.18 mg L⁻¹ and 1.8 mg L⁻¹) for 6 days. Cells exposed to the nanocomposites were compared to the corresponding controls (GA 0.4%). The graphs above show representative wells from each group. For the three cell lines: panels (A, E, I) display the total area (μm²) occupied by the colonies; panels (B, F, J) indicate the cell-covered area (μm²); panels (C, G, K) show cell density; and panels (D, H, L) present the number of colonies formed. Data represent the mean ± standard error of the mean (SEM) from three independent experiments. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc correction ($p < 0.05$).

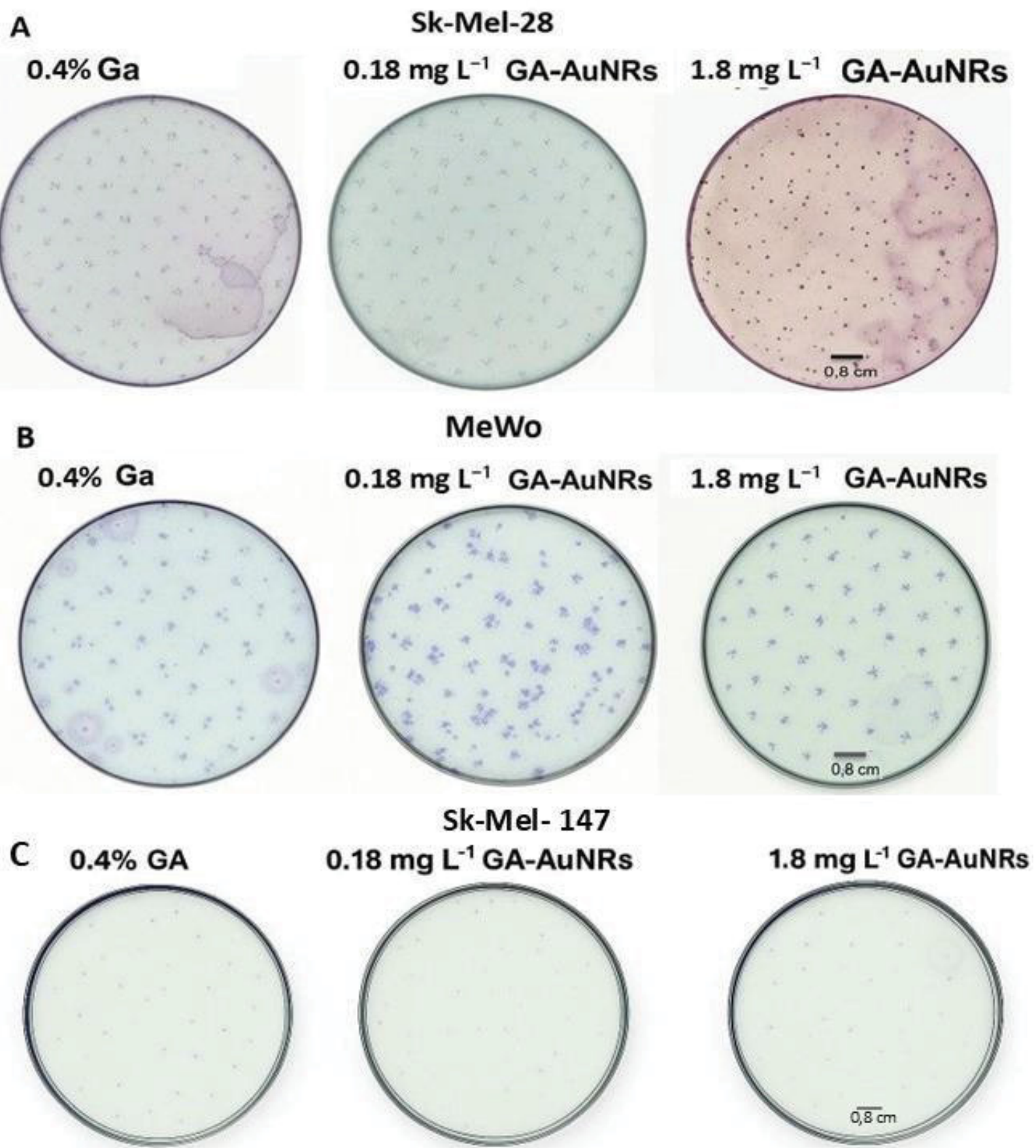


Figure 8. Photos of the evaluation of colony formation in human melanoma cell lines treated with GA-AuNRs. SK-MEL-28, MeWo, and SK-MEL-147 cells were cultured in the presence of GA-AuNRs (0.18 mg L⁻¹ or 1.8 mg L⁻¹) for 6 days. Cells exposed to the nanocomposites were compared to the corresponding controls (GA 0.4%).

3.3 ANALYSIS OF REACTIVE OXYGEN SPECIES (ROS)

The assessment of oxidative stress, through ROS quantification, did not reveal statistically significant differences between the groups treated with GA-AuNRs and the 0.4% GA control (Figure 9). It is possible to observe the results overlayed in Figure 10.

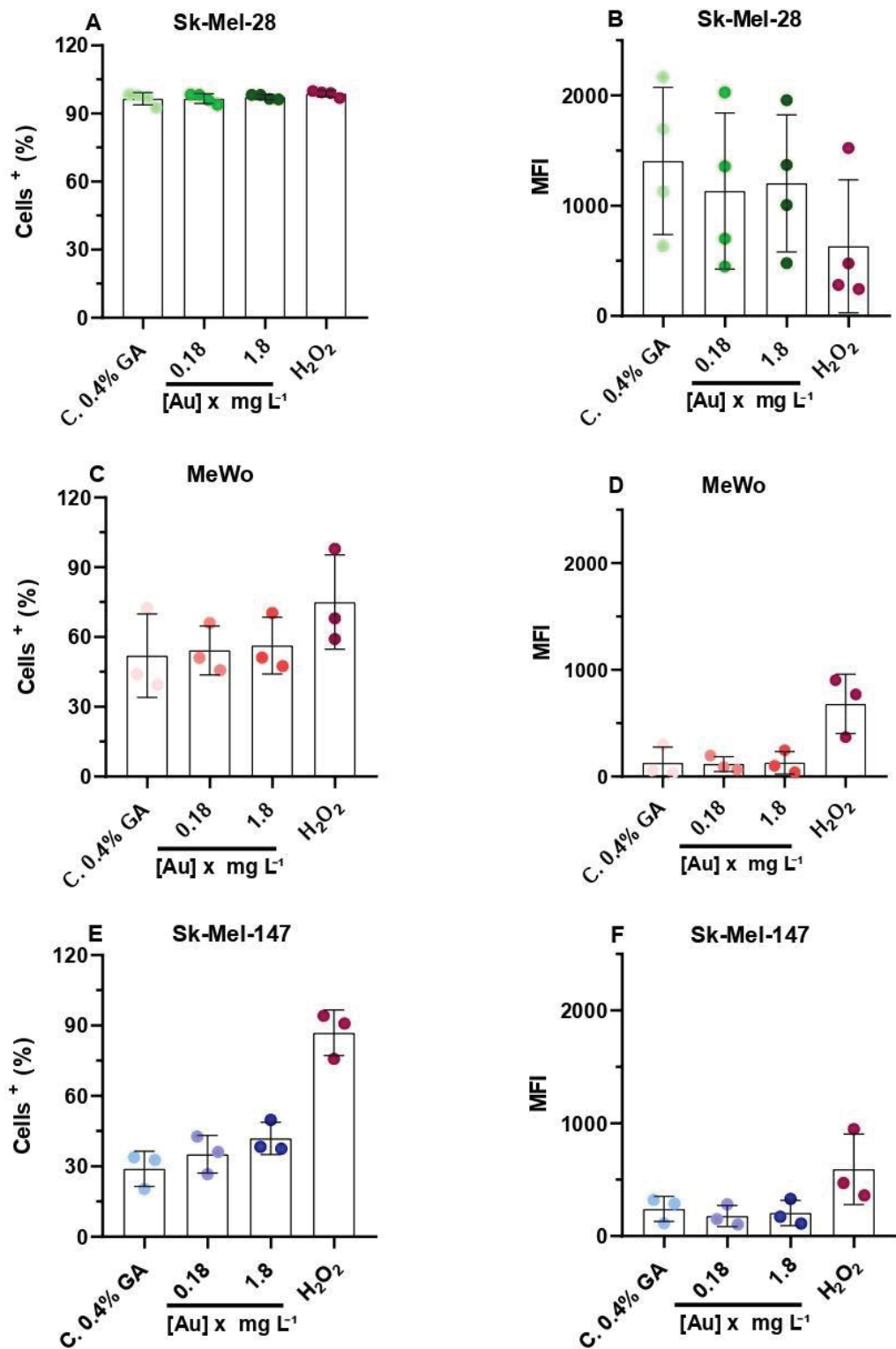


Figure 9. Evaluation of reactive oxygen species (ROS) generation in human melanoma cell lines treated with GA-AuNRs. SK-MEL-28, MeWo, and SK-MEL-147 cells were treated with two concentrations of GA-AuNRs (0.18 or 1.8 mg L⁻¹) for 24 hours. ROS levels were analyzed by flow cytometry. Graphs represent the mean $\pm$ standard deviation of at least three independent experiments. Panels (A), (C), and (E) show the percentage of ROS-positive cells, while panels (B), (D), and (F) display the quantification of mean fluorescence intensity (MFI), reflecting intracellular ROS levels. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc correction ($p < 0.05$).

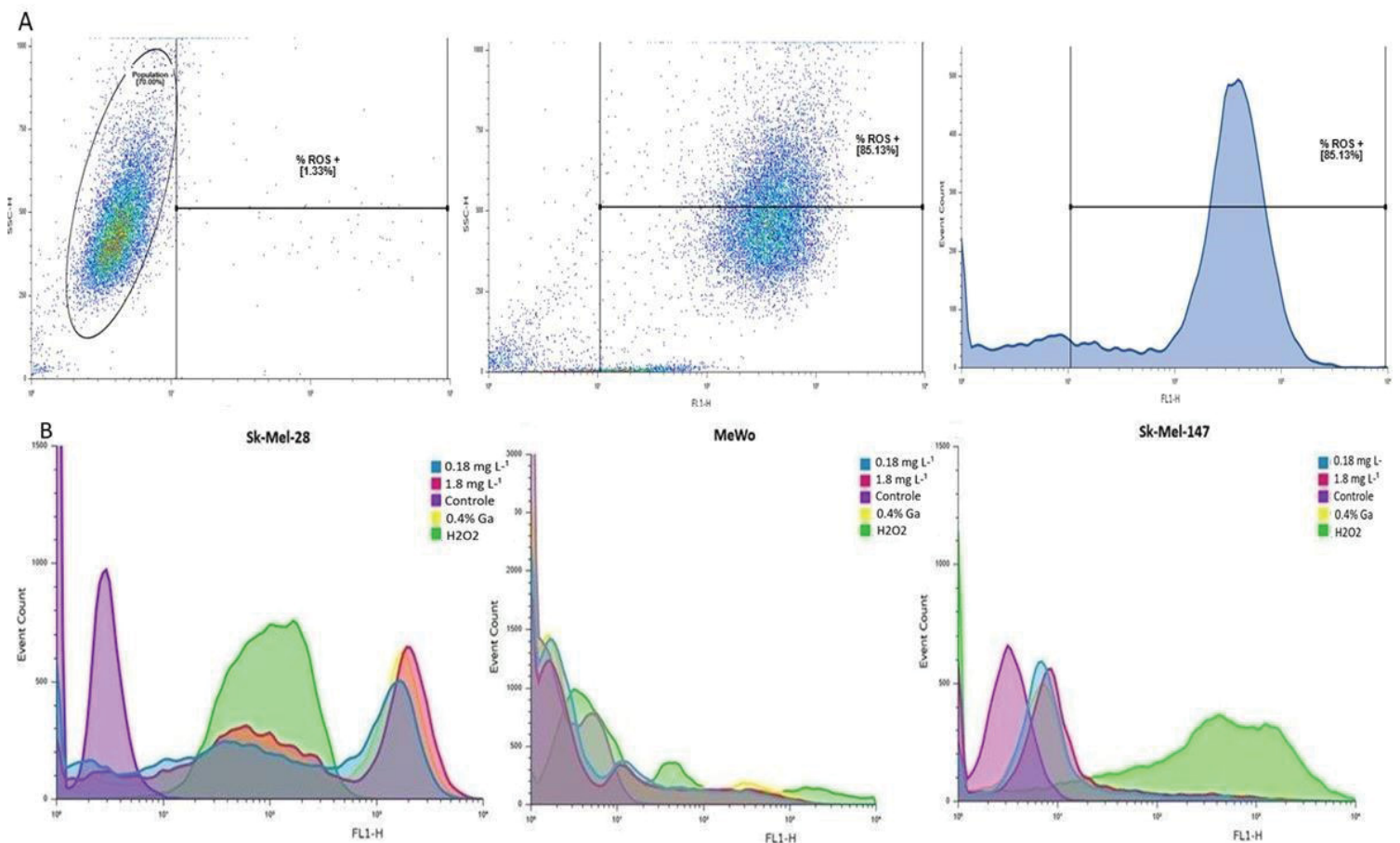


Figure 10. Gating strategy for reactive oxygen species (ROS) analysis and fluorescence histogram (FL1-H) representing the production ROS. A The population of interest was initially delimited by excluding debris. Next, the fluorescence threshold in the FL1-H channel was defined from the control sample, allowing the distinction between ROS-negative and -positive cells. Finally, the fluorescence distribution of the selected population was plotted, indicating the percentage of ROS+ cells (figure A). The peak on the left (channel 10⁰–10¹) represents non-fluorescent cells (untreated control), while the shift to the right reflects increased ROS levels. Each curve represents the fluorescence distribution under different treatment conditions (figure B).

3.4 MIGRATION

To assess migratory capacity and speed, SK-MEL-28, MeWo, and SK-MEL-147 tumor cells were exposed to 1.8 mg L^{-1} or 0.18 mg L^{-1} GA-AuNRs for 24 hours (Figure 11). In the SK-MEL-28 cell line, a statistically significant reduction in migration speed was observed at the $0.18 \mu\text{g/mL}$ concentration compared to the Ga 0.4% control group (Figure 11). In the MeWo cell line, this reduction was significant when comparing the treatment at a concentration of 1.8 mg L^{-1} with the Ga 0.4% control (where the treated group showed a higher migration rate compared to the control) (Figure 11B). On the other hand, in the SK-MEL-147 cell line, no statistically significant differences were observed compared to the Ga 0.4% control group (Figure 11C). The representative images of a test are shown in (Figure 12), where A represents the initial moment, time 0 and in B the final moment after 22 hours.

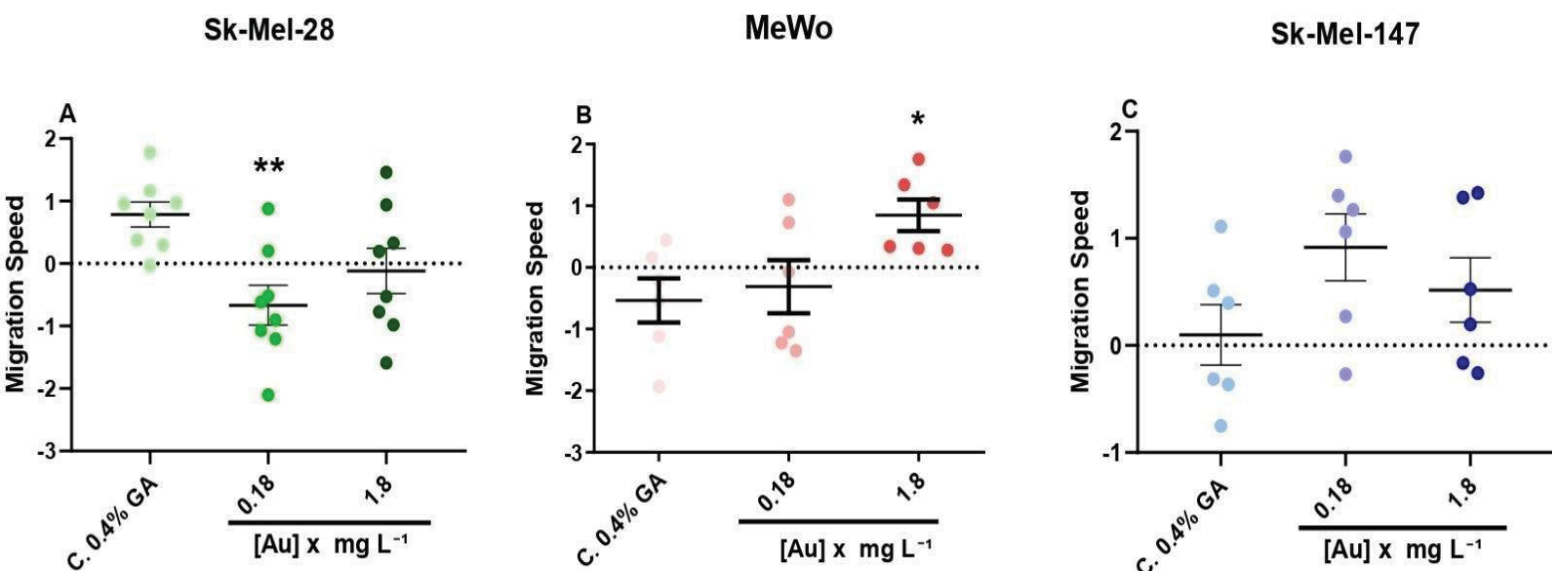
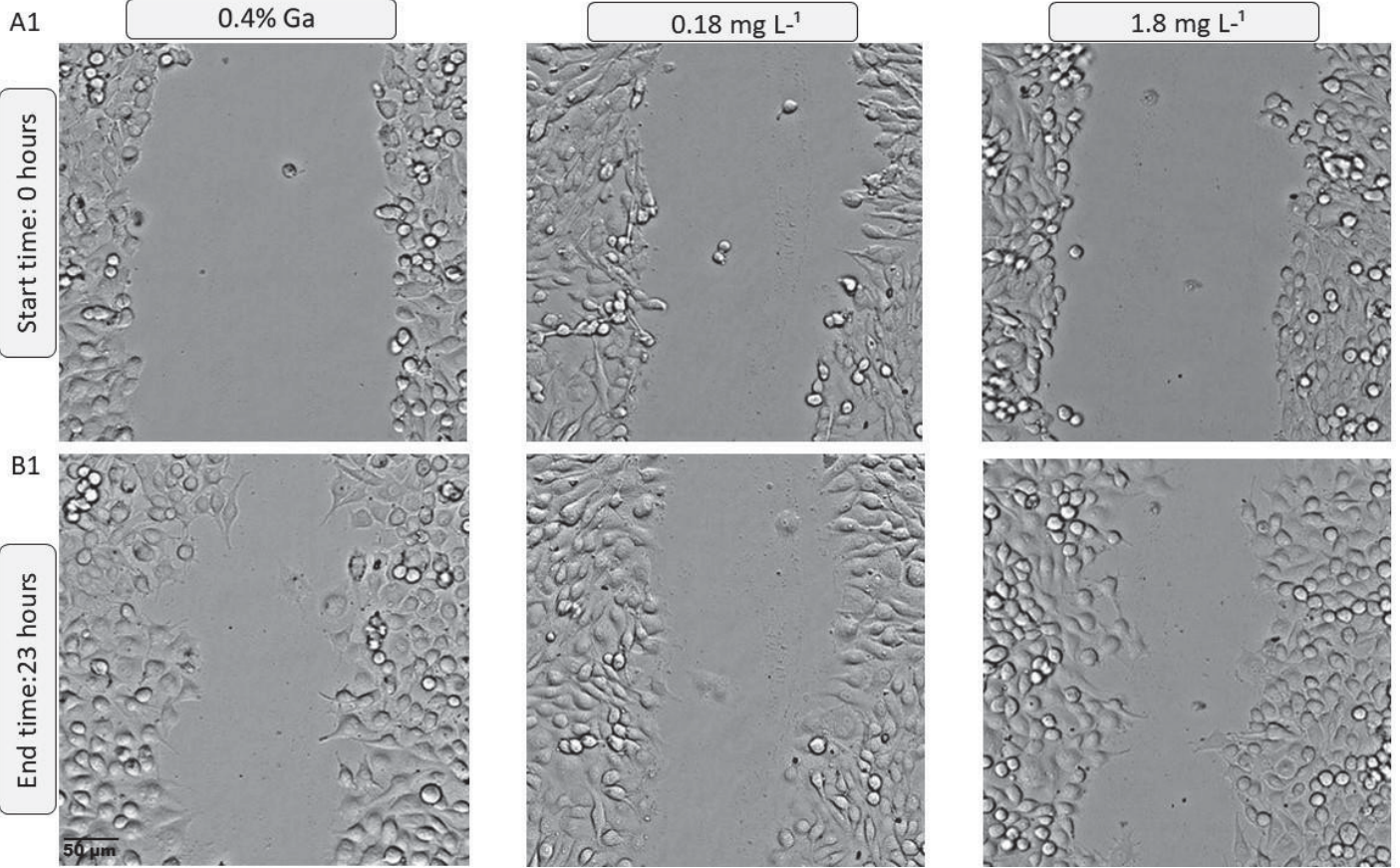
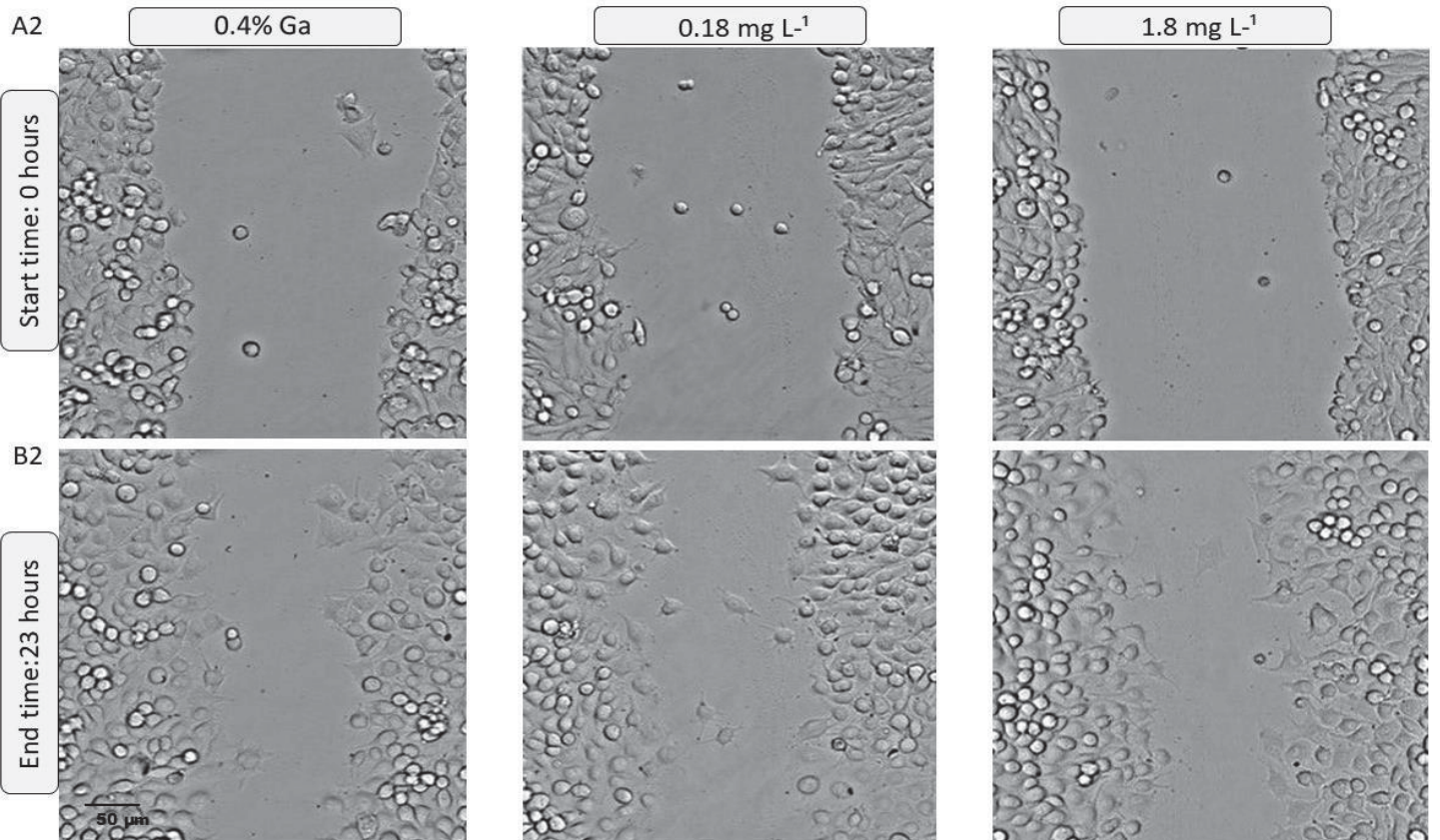


Figure 11. Migration speed assessment in human melanoma cell lines treated with GA-AuNRs. SK-MEL-28, MeWo, and SK-MEL-147 cells were treated with two concentrations of GA-AuNRs (0.18 mg L^{-1} or 1.8 mg L^{-1}) for 24 hours and subsequently the cell monolayer was scratched. The cells were then taken to the confocal microscope where time-lapse capture was performed (20x objective) for 22 hours. Data represent the mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) from three independent experiments. Statistical analysis was performed using the nonparametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc correction ($p < 0.05$).

Sk-Mel-28



MeWo



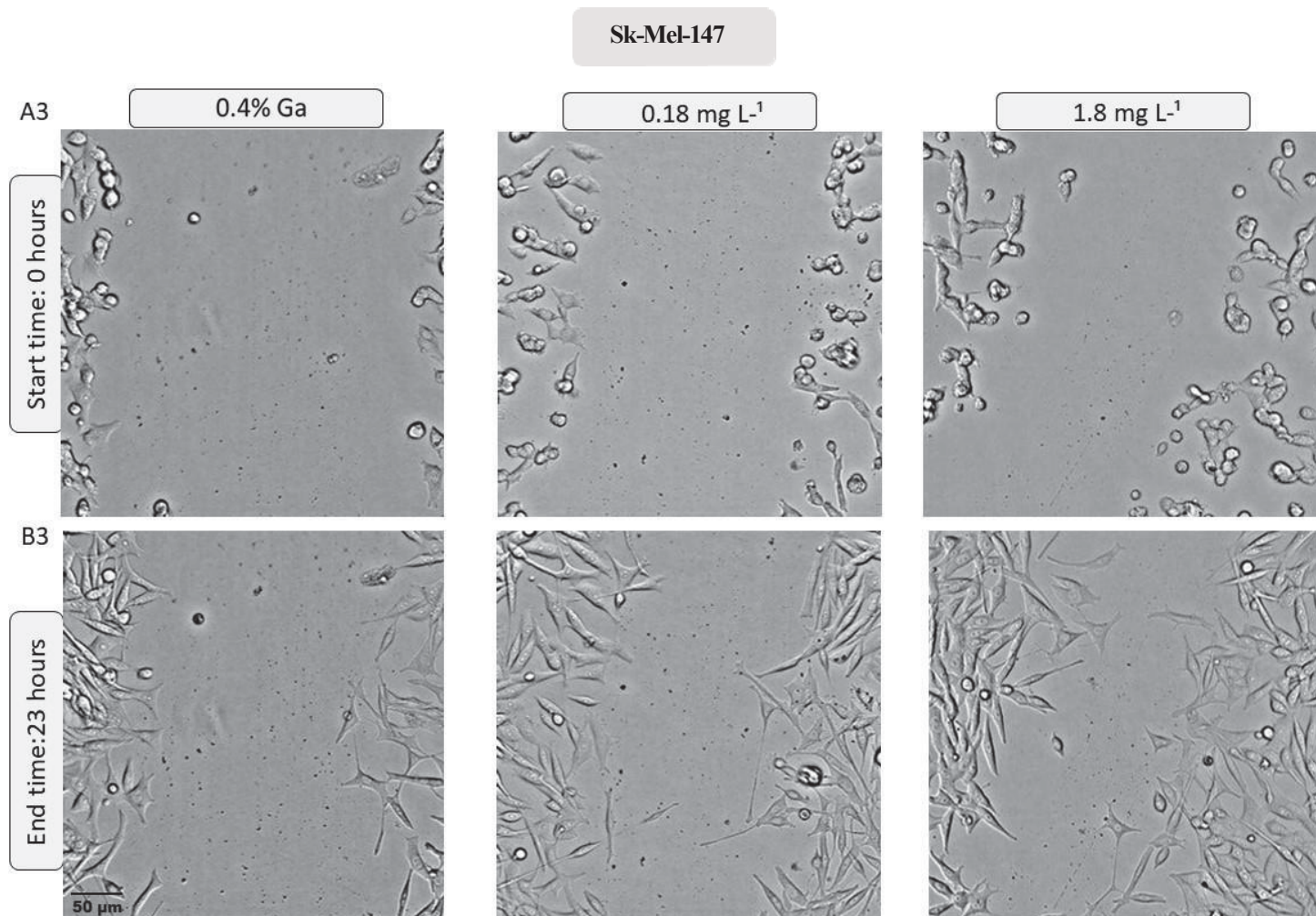


Figure 12. Migration speed assessment in human melanoma cell lines treated with GA-AuNRs

Figure 12. Assessment of migration speed in human melanoma cell lines treated with GA-AuNRs

SK-MEL-28, MeWo, and SK-MEL-147 cells were treated with two concentrations of GA-AuNRs (0.18 mg L^{-1} or 1.8 mg L^{-1}) for 24 hours. The cells were then placed under a confocal microscope, where time-lapse images (20x objective) were obtained for 22 hours. (Figures A1, A2, and A3) represent the initial time point and (B1, B2, and B3) the final time point. Representative photo of an experiment.

3.5 TARGET AND FUNCTIONAL PATHWAY PREDICTION VIA SYSTEMS BIOLOGY

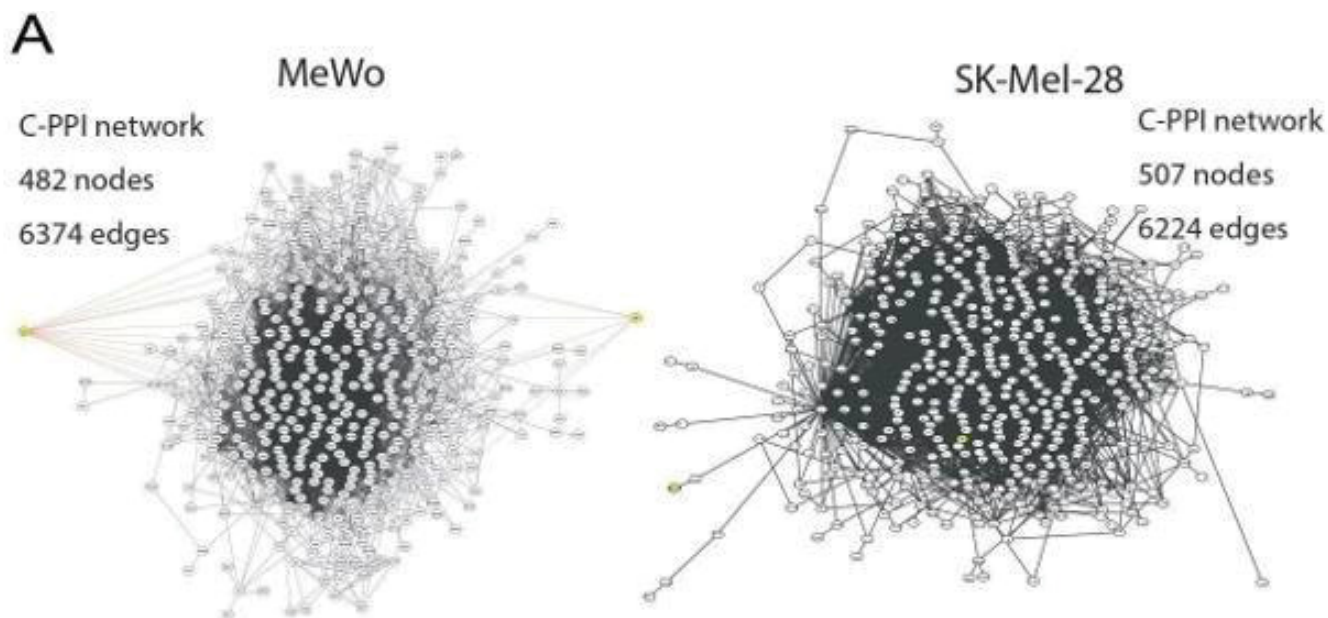
C-PPI networks were constructed for the MeWo and Sk-Mel-28 cell lines, integrating Arabic gum-derived compounds and gold with known protein–protein interaction data (Figure 12-A). The resulting networks contained 482 and 507 nodes, and 6,374 and 6,224 edges for MeWo and Sk-Mel-28, respectively, indicating a high degree of connectivity and topological complexity. To confirm the intricate connectivity, Centrality analysis was performed. Based on this analysis, is possible to identify the most prominent hub–bottleneck (H-B) nodes in each network, considering degree and betweenness values (Figure 12-B).

These nodes represent central elements in the functional architecture of the networks and may serve as key regulatory points in the cellular response to the tested compounds.

The overlap between H-B nodes and genes/proteins associated with proliferation and migration is shown in a Venn diagram (Figure 12-C). Shared targets between both cell lines are highlighted in white, suggesting conserved mechanisms of biological response induced by the compounds.

In the MeWo network, two H-B nodes (*RHOA*, *CTNNB1*) were simultaneously associated with both migration and proliferation. Additionally, eight H-B nodes were exclusive to the proliferation (mitosis) category, and one (*RAC1*) was exclusive to migration. In the SK-MEL-28 network, four H-B nodes (*RHOA*, *CTNNB1*, *TGFB1*, *APP*) were involved in both migration and proliferation. One node (*TPT1*) was specific to proliferation, and five nodes (*RAC1*, *FNI*, *CALR*, *STAT1*, *NOS3*) were associated only with migration.

Collectively, these data reveal a partially conserved molecular profile between the two melanoma cell lines. Notably, the genes *RHOA*, *CTNNB1*, *TPT1* and *RAC1* were consistently identified as central H-B nodes across both networks and were functionally linked to key tumorigenic processes. These shared targets likely represent core regulatory elements modulated by the tested compounds.



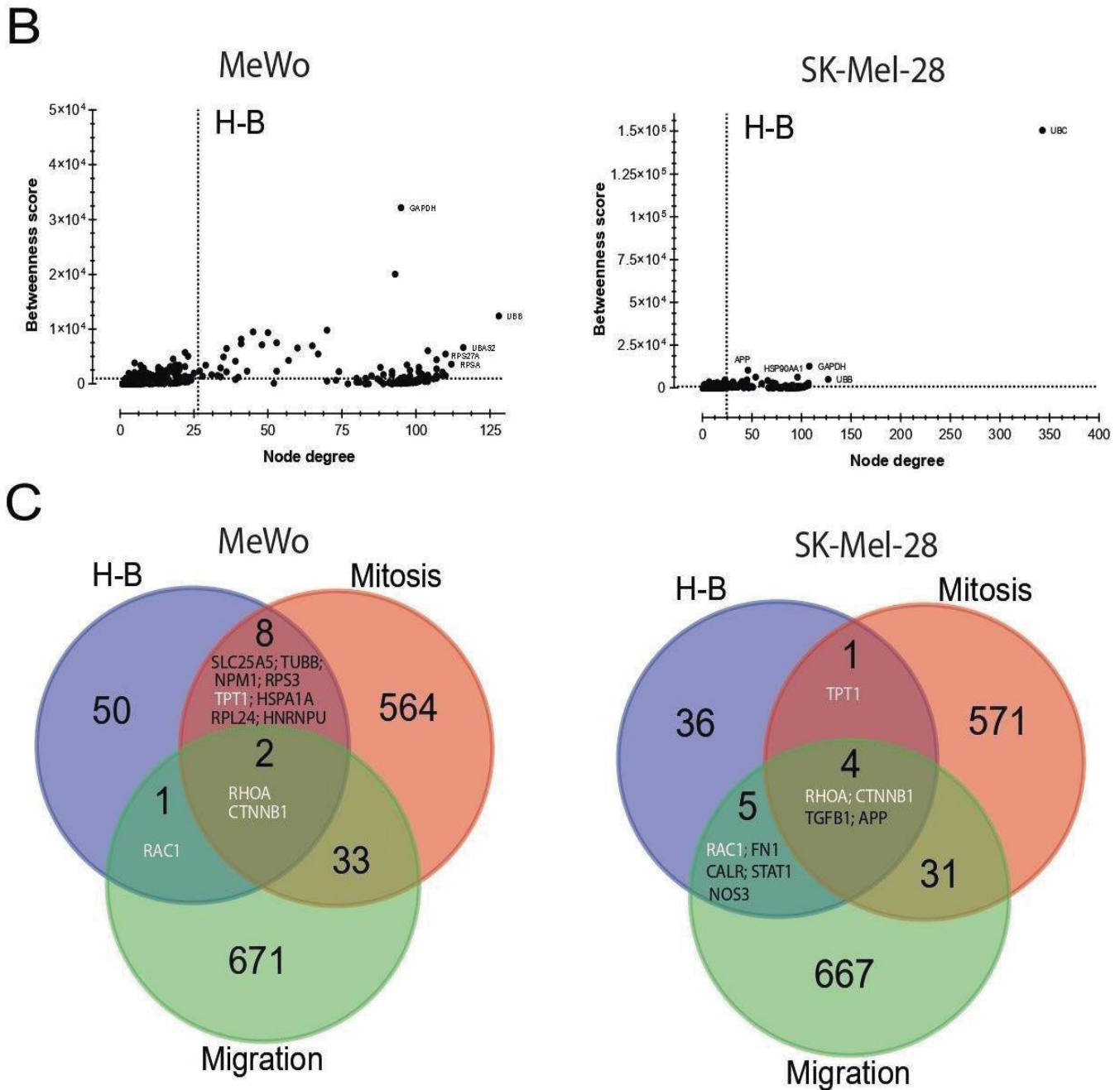


Figure 13. Systems biology-based predictions. A. Compound–protein–protein interaction (C-PPI) networks for MeWo and SK-MEL-28 cell lines. Yellow nodes denote Arabic gum-derived compounds or gold, while red edges indicate their predicted interactions with other proteins in the network. **B. Topological centrality analysis of each C-PPI network.** Dashed lines represent threshold values for degree and betweenness centralities. The ten most prominent hub-bottleneck (H-B) nodes are annotated in each graph. **C. Venn diagram depicting the overlap between H-B nodes and proliferation- or migration- associated genes/proteins, as identified from Gene Ontology (GO) annotations.**

Nodes corresponding to genes/proteins common to both cell lines are represented in white.

4. DISCUSSION

The assessment of cell viability and density is fundamental in the development of safer and more effective antitumor therapies. The search for alternatives to traditional cytotoxic agents has favored the use of compounds and nanomaterials with selective cytotoxicity, capable of minimizing systemic side effects without compromising therapeutic efficacy. In this context, gold nanoparticles (AuNPs) have been widely investigated for their antitumor potential (34).

Previous studies, such as that by Gonçalves (2020), demonstrated that GA-AuNRs significantly reduced cell density in a murine melanoma cell line, with evidence of concentration-dependent cytotoxicity. Expanding this analysis to human cell lines in the present study revealed that, in the tumor lines evaluated, the effects were variable and dependent on both concentration and the specific genetic context of each cell line. Significant reductions were detected only at higher concentrations, in the MEWO (neutral red retention) and SK-MEL-28 (cell density) lines (Figure 2). Unlike what was observed in murine models, there was no increase in VN dye uptake, suggesting a mechanism of action more related to the direct induction of cytostatic or cytotoxic effects (35).

Regarding non-tumoral fibroblasts (CCD-1059Sk), these maintained stable viability and cell density after exposure to all tested concentrations (0.0018 to 18 mg·L⁻¹). Shahhoseini et al. (2021) reported that non-irradiated gold nanoparticles did not compromise the viability of normal fibroblasts, even after prolonged exposure and at high concentrations of up to 4 mM. In the present study, the highest concentration used (18 mg·L⁻¹) corresponds to approximately 91.37 mM more than 22 times higher than that reported without causing toxic effects in fibroblasts, further reinforcing the safety profile of GA-AuNRs. In the same study, the human melanoma cell line MM418-C1 also showed resistance to the direct toxicity of AuNPs, with no significant reduction in cell viability (36).

Among the tumor cell lines, only MEWO, which carries a mutation in the *NFI* gene, showed a significant reduction in neutral red retention at the highest concentration (18 mg·L⁻¹). This greater sensitivity may be associated with the functional loss of neurofibromin 1, the protein encoded by *NFI*, which acts as a tumor suppressor and negative regulator of the RAS/MAPK pathway. The absence of this regulation can lead to uncontrolled activation of the pathway, making cells more dependent on this axis for survival. Thus, the greater vulnerability observed in MEWO cells may result from the combination of RAS/MAPK pathway dysregulation with the interference of GA-AuNRs in critical signaling cascades, contributing to

redox imbalance and induction of cell death (37,38,39,40).

On the other hand, the significant reduction in cell density observed exclusively in the SK-MEL-28 cell line, which carries a mutation in the *BRAF* gene, seems to be related to an adverse effect of treatment, possibly due to the induction of nonspecific cellular stress caused by high nanoparticle concentrations. This result may be associated with resistance mechanisms mediated by MAPK pathway activation, typical of this line, which can be overcome by high nanoparticle concentrations, as suggested by previous studies (41,42).

The analysis of clonogenic capacity revealed differential effects of GA-AuNRs on the evaluated cell lines. Since the clonogenic assay particularly evaluates the activity of cancer stem cells (CSCs), changes in this parameter directly reflect the impact of treatments on the most aggressive and resistant subpopulation of melanoma cells (43).

The SK-MEL-28 cell line, harboring the *BRAF* V600E mutation, showed a significant reduction in both total colony area and colony-occupied area only at the highest non-cytotoxic concentration tested ($1.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Although the crystal violet density assay did not detect relevant changes in overall proliferation at this concentration, the clonogenic assay revealed a specific effect on the sustained proliferative capacity of CSCs, reflected in the formation of smaller colonies (Figure 3). This profile, restricted to high concentrations, is consistent with mechanisms already described in the literature for CSC resistance, such as the activation of alternative signaling pathways and the overexpression of proteins associated with therapeutic resistance, such as ABCB5, which can be partially overcome by high concentrations of antitumor agents (44,45,46).

The effects observed in clonogenic assays with GA-AuNRs are consistent with previous reports that also used AuNPs to evaluate clonogenic capacity in tumor cells. For example, spherical PEG-coated nanoparticles (1.9 to 20 nm) reduced the clonogenicity of MDA-MB-231 cells after prolonged incubation for two weeks, especially when combined with radiation (47). In A549 lung cells, spherical nanoparticles conjugated with doxorubicin (12 nm) significantly reduced the number of colonies after 7 days of treatment ($10 \text{ } \mu\text{g/mL}$) (48).

Conversely, the MeWo line, showed an increase in colony area and density after treatment with GA-AuNRs at $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, compared to the control group (GA 0.4%) (Figure 3). This finding suggests that, at low concentrations, GA-AuNRs may have triggered adaptive proliferative responses in this cell line, possibly mediated by constitutive hyperactivation of the RAS/MAPK pathways. Such behavior is consistent with the high phenotypic plasticity reported for CSC subpopulations, whose ability to adapt to environmental stimuli favors clonal expansion under sublethal stress conditions. Furthermore, the paradoxical effect of proliferation

induced by low doses of stress-inducing agents a phenomenon previously described in several tumor models may have contributed to the clonal expansion observed in this context (37,49).

In contrast, the SK-MEL-147 cell line (*NRAS* mutation) showed no significant changes (Figure 3), indicating CSC resistance to GA-AuNRs, possibly due to the constitutive activation of survival pathways or tumor evasion mechanisms already described for this line (50,51).

Supporting these findings, Huai et al. (2019) demonstrated that spherical gold nanoparticles with an average diameter of about 20 nm inhibit the proliferation of various tumor cell lines through the modulation of pathways related to the cell cycle, oxidative stress, and apoptosis, without necessarily inducing direct cell death (52).

The assessment of oxidative stress in this study, performed by quantifying reactive oxygen species (ROS), did not reveal statistically significant differences between the groups treated with GA-AuNRs and the control group containing only 0.4% gum arabic (GA) (Figure 4). Although this result indicates that GA-AuNRs did not induce detectable changes in oxidative stress under the experimental conditions used, it is important to note that several studies have already demonstrated that AuNPs can modulate ROS levels in tumor cells, often promoting an increase in the production of these species and generating oxidative stress (53).

For example, in HCT-116 colorectal cancer cells, exposure to spherical AuNPs resulted in a significant increase in ROS production at concentrations of 25 and 50 $\mu\text{g/mL}$, accompanied by a reduction in the activity of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX), indicating an imbalance in the cellular redox system and contributing to the induction of apoptosis (54).

It has also been demonstrated that gold nanoparticles can induce oxidative stress independently of irradiation or external excitation. Tang et al. (2015) reported that, in A549 lung cancer cells, gold nanorods (AuNRs) with lengths of 42–52 nm and widths of 22.5–27.5 nm, applied at concentrations of 10 and 15 $\mu\text{g/mL}$, were efficiently internalized, localizing predominantly in lysosomes, membranous vesicles, and the cytoplasm. Under these conditions, a significant increase in ROS production, mitochondrial swelling, an increase in the number of lysosomes, and a reduction in cell viability were observed (55).

However, it is essential to consider that the ability of AuNPs to induce oxidative stress may depend on several factors, including cell type, the physicochemical characteristics of the nanoparticles (such as size, shape, and surface functionalization), and the specific experimental conditions (56).

Several studies also demonstrate that AuNPs, especially when functionalized, can modulate fundamental processes involved in tumor progression, such as cell migration, which

is directly related to the invasive and metastatic potential of cancer cells (57).

In this study, the assessment of migration showed that GA-AuNRs exert distinct effects on cell motility, depending on the cell line and the concentration used. In the SK-MEL-28 line, a statistically significant reduction in migration speed was observed at the non-cytotoxic concentration of $0.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, compared to the control with 0.4% GA (Figure 3A). These findings indicate that GA-AuNRs may directly interfere with regulatory processes involved in cell motility, possibly through alterations in cytoskeletal dynamics and the expression of adhesion-related proteins, such as integrins and cadherins (58,59). Interestingly, the lowest concentration of GA-AuNRs ($0.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) was more effective in reducing cell migration than the higher concentration ($1.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). This non-linear response phenomenon, compatible with a bell-shaped dose–response curve, may be related to the selective modulation of cellular pathways such as PI3K/Akt and cytoskeletal reorganization at moderate concentrations, whereas higher doses may induce nonspecific or compensatory cellular responses, reducing the efficacy of the nanoparticles (60).

Similar results were reported by Shahhoseini et al. (2021), who observed reduced cell migration in human melanoma (MM418-C1, *BRAF* V600E mutant) and colorectal adenocarcinoma (SW48) cell lines after exposure to 15 nm AuNPs, without impact on cell viability. The authors suggested that these effects may be related to actin cytoskeleton reorganization and modulation of adhesion proteins (36).

Interestingly, in the MeWo line, the group treated with GA-AuNRs at $1.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ showed a higher cell migration rate than the control group (0.4% GA). This result suggests that, at higher concentrations, GA-AuNRs may exert a stimulatory effect on cell migration. Considering that the MeWo line carries a mutation in the *NF1* gene, leading to hyperactivation of the RAS/MAPK pathway, it is possible that interaction with nanorods at high concentrations may have potentiated pathways associated with cytoskeletal reorganization and cell motility, including changes in actin dynamics, integrin expression, or activation of small GTPases (Rho, Rac, Cdc42). Grzincic and Murphy (2015) reported that gold nanorods incorporated into collagen matrices promoted a progressive increase in the spontaneous migration of breast cancer cells in a concentration-dependent and cell internalization-independent manner, indicating that nanoparticle-induced modifications to the extracellular matrix may also contribute to cell motility (61).

In the SK-MEL-147 line, no significant differences in cell migration were observed at any of the concentrations tested. This resistance may be attributed to intrinsic characteristics of the line. Studies show that this line exhibits constitutive activation of the Rho/MRTF-A

pathway, resulting in the spontaneous formation of actin stress fibers (F-actin) and nuclear translocation of MRTF-A, even in the absence of external stimuli. This activation leads to the overexpression of genes associated with cell motility and invasiveness, such as MYL9, CYR61, and CTGF, contributing to a highly migratory phenotype resistant to interventions aimed at inhibiting migration (62,63).

Several studies support these findings, highlighting that AuNPs can significantly interfere with cell migration without inducing direct cytotoxic effects. Liu et al. (2021) observed reduced migration in papillary thyroid carcinoma cells treated with spherical AuNPs (7.73 nm) at 50 $\mu\text{g/mL}$, accompanied by decreased expression of the metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 (64). Ali et al. (2013) and Saha et al. (2016) also described similar inhibitory effects on cell migration in ovarian and pancreatic cancer, respectively, suggesting that AuNRs and AuNSs may exert multiple actions, such as increasing nuclear stiffness and modulating intercellular communication (59,65).

The identification of RHOA, RAC1, CTNNB1, and TPT1 as central nodes in protein–protein interaction (PPI) networks associated with cell proliferation and migration provides a molecular basis for interpreting the observed effects of GA-AuNR treatment in human melanoma cell lines. The results indicated that, while SK-MEL-28 showed a significant reduction in migration and colony area, the MeWo line exhibited opposite responses, with increased migration and clonal growth in the groups treated with GA-AuNRs compared to the GA control group. In the case of SK-MEL-28, the observed inhibitory effects may be related to the functional suppression of RHOA and RAC1, members of the Rho GTPase family that control actin cytoskeleton dynamics and the formation of cellular protrusions required for migration and invasion (66). Negative modulation of these nodes may have resulted in the inhibition of cytoskeletal reorganization and the reduced motility observed in the migration assays (67).

The reduction in clonogenic colony size may also be explained by interference with the Wnt/ β -catenin signaling pathway, in which CTNNB1 (β -catenin) acts as a key mediator in the transcription of genes related to proliferation, EMT, and maintenance of pluripotency (68). Inhibition of β -catenin nuclear translocation or interference with its regulatory phosphorylation, possibly induced by GA-AuNRs, may have impaired the activation of proliferative genes, resulting in reduced colony-forming capacity (69).

In addition, translationally controlled tumor protein (TPT1) plays a crucial role in cell survival, stress response, and protein synthesis in tumor contexts. Studies show that TPT1 overexpression is associated with tumor progression, promoting cell proliferation, inhibiting

apoptosis, and contributing to resistance to antineoplastic therapies (70). Suppression of TPT1 can increase the sensitivity of tumor cells to oxidative stress, leading to reduced long-term proliferative capacity. Thus, negative regulation of TPT1 in cells exposed to GA-AuNRs may have contributed to the observed reduction in clonogenicity, making cells more susceptible to nanoparticle-induced stress (71).

On the other hand, the distinct response of the MeWo line which showed larger colonies and increased migration in groups treated with GA-AuNRs may reflect a differentiated molecular profile, possibly related to a mutation in the *NF1* gene, resulting in constitutive activation of the PI3K/Akt pathway (72). In this scenario, GA-AuNRs may have induced pro-survival compensatory responses or even indirectly activated the RAC1 and TPT1 signaling nodes, resulting in more aggressive phenotypes (73).

Collectively, the data suggest that GA-AuNRs modulate critical signaling pathways involved in migration and clonogenicity through the regulation of RHOA, RAC1, CTNNB1, and TPT1. However, phenotypic effects are strongly influenced by the molecular profile of each melanoma cell line, reinforcing the need for personalized approaches in the development of nanotherapies and highlighting the potential of GA-AuNRs as selective tools for therapeutic intervention, provided that the tumor's molecular context is characterized in advance.

5. CONCLUSIONS

This study demonstrated that GA-AuNRs exhibit selective antitumor activity, with distinct effects on different human melanoma cell lines. The SK-MEL-28 cell line, harboring a *BRAF* mutation, showed sensitivity to treatment, with a significant reduction in migration and clonogenic capacity, possibly associated with the modulation of pathways involving RHOA, RAC1, CTNNB1, and TPT1, as identified in the *in silico* analyses. In contrast, the MeWo cell line, mutated in *NF1*, exhibited increased proliferation and migration, indicating an adaptive response. Finally, the SK-MEL-147 cell line showed no effect upon exposure to GA-AuNRs. The absence of cytotoxicity in normal fibroblasts further reinforces the biocompatibility profile of GA-AuNRs. These findings highlight the potential of these nanoparticles in personalized therapeutic strategies and underscore the importance of the tumor's molecular profile in determining responses to nanomaterials. Further investigations are recommended to deepen the understanding of the molecular mechanisms involved and to optimize the use of GA-AuNRs as therapeutic tools for the treatment of metastatic melanoma.

6. REFERENCES

1. ATKINS, M. B. *et al.* The state of melanoma: emergent challenges and opportunities. *Clinical Cancer Research*, v. 27, p. 2678–2697, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-4092>.
2. ZHANG, J.; YE, Z. W.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Redox pathways in melanoma. *Advances in Cancer Research*, v. 162, p. 125–143, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2024.06.002>.
3. AUBUCHON, M. M. F. *et al.* Epidemiology, management and survival outcomes of primary cutaneous melanoma: a ten-year overview. *Acta Belgica Chirurgica*, v. 117, n. 1, p. 29–35, 2017.
4. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Global Cancer Observatory. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 20 out. 2023.
5. RUOCCO, M. R. *et al.* Metabolic flexibility in melanoma: a potential therapeutic target. *Seminars in Cancer Biology*, v. 59, p. 187–207, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.016>.
6. HAMBRIGHT, H. G. *et al.* Inhibition of PI3K/AKT/mTOR axis disrupts oxidative stress-mediated survival of melanoma cells. *Oncotarget*, v. 6, p. 7195–7208, 2015. Retrieved from <https://www.oncotarget.com/article/3131/text/>
7. ZHANG, X.; LI, H.; LIU, C.; YUAN, X. Role of ROS-mediated autophagy in melanoma (Review). *Molecular Medicine Reports*, v. 26, 303, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12819>.
8. MA, N. *et al.* Rac1: a regulator of cell migration and a potential target for cancer therapy. *Molecules*, v. 28, 2976, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28072976>.
9. ESCOBAR MORENO, J. D. *et al.* miRNAs involvement in modulating signalling pathways involved in ROS-mediated oxidative stress in melanoma. *Antioxidants*, v. 13, n. 11, p. 1326, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox13111326>.
10. PATEL, M. *et al.* Resistance to molecularly targeted therapies in melanoma. *Cancers (Basel)*, v. 13, 1115, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13051115>.
11. YUAN, L.; MISHRA, R.; PATEL, H.; ALANAZI, S.; WEI, X.; MA, Z.; GARRETT, J. T. BRAF mutant melanoma adjusts to BRAF/MEK inhibitors via dependence on increased antioxidant SOD2 and increased reactive oxygen species levels. *Cancers*, v. 12, 1661, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers12061661>.
12. YANG, T. T. *et al.* The genomic landscape of melanoma and its therapeutic implications. *Genes (Basel)*, v. 14, n. 5, 2023.
13. KOZAR, I.; MARGUE, C.; ROTHENGATTER, S.; HAAN, C.; KREIS, S. Many ways to resistance: how melanoma cells evade targeted therapies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, v. 1871, n. 2, p. 313–322, 2019.
14. FATEEVA, A.; EDDY, K.; CHEN, S. Current state of melanoma therapy and next steps: battling therapeutic resistance. *Cancers*, v. 16, 1571, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers16081571>.
15. KUMMAR, P. P. P.; LIM, D. K. Gold-polymer nanocomposites for future therapeutic and tissue engineering applications. *Pharmaceutics*, v. 14, n. 1, p. 70, 2021. DOI: [10.3390/pharmaceutics14010070](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010070).

16. ROSA, S.; CONNOLLY, C.; SCHETTINO, G. *et al.* Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization. *Cancer Nano*, v. 8, 2, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12645-017-0026-0>.
17. ZHANG, Y. *et al.* Enhanced radiosensitization by gold nanoparticles with acid-triggered aggregation in cancer radiotherapy. *Advanced Science*, v. 6, n. 8, p. 1970050, 2019. DOI: 10.1002/advs.201801806. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S434582>.
18. WANG, J. *et al.* Nanocarrier-mediated immunogenic cell death for melanoma treatment. *International Journal of Nanomedicine*, v. 18, p. 7149–7172, 2023. DOI: 10.2147/IJN.S434582.: <https://doi.org/10.2147/IJN.S434582>.
19. DASTGHEIB, Z. S. *et al.* Gold nanoparticles as promising photothermal agents for cancer therapy: recent advances and future perspectives. *Heliyon*, v. 10, n. 5, e28062, 2024. DOI: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844024116866>.
20. CARREÓN GONZÁLEZ, J. L.; GARCÍA CASILLAS, P. E.; CHAPA GONZÁLEZ, C. Gold nanoparticles as drug carriers: the role of silica and PEG as surface coatings in optimizing drug loading. *Micromachines*, v. 14, 451, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/mi14020451>.
21. SINGH, R.; YADAV, V.; DHILLON, A. K.; SHARMA, A.; AHUJA, T.; SIDDHANTA, S. Emergence of Raman spectroscopy as a probing tool for theranostics. *Nanotheranostics*, v. 7, n. 3, p. 216–235, 2023. DOI: 10.7150/ntno.81936.
22. QIU, X. *et al.* Raman spectroscopy combined with deep learning for rapid detection of melanoma at the single cell level. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 286, p. 122029, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.122029>.
23. HE, J. *et al.* The application of and strategy for gold nanoparticles in cancer immunotherapy. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.687399>.
24. AGGARWAL, R.; SHEIKH, A.; AKHTAR, M. *et al.* Understanding gold nanoparticles and their attributes in ovarian cancer therapy. *Molecular Cancer*, v. 24, 88, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-025-02280-3>.
25. GONÇALVES, P. J.; FRAGA DA CRUZ, A.; RIBEIRO DE BARROS, H. *et al.* Beyond gold. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 157, p. 221–232, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.10.019>.
26. DA SILVA, M. G. A.; NUNES, Á. M.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R. New aspects of gold nanorod formation via seed-mediated method. *Comptes Rendus Chimie*, v. 16, n. 7, p. 640–650, 2013. DOI: 10.1016/j.crci.2013.01.013.
27. BARROS, H. R. DE; *et al.* Stability of gum arabic-gold nanoparticles in physiological simulated pHs and their selective effect on cell lines. *RSC Advances*, v. 6, n. 12, p. 9411–9420, 2016.
28. BREITLING, R.; ARMENGAUD, P.; AMTMANN, A.; HERZYK, P. Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Letters*, v. 573, n. 1–3, p. 83–92, 2004. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.07.055.
29. HUBER, W. *et al.* Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*, v. 12, n. 2, p. 115–121, 2015. DOI: 10.1038/nmeth.3252.

30. SZKLARCZYK, D. *et al.* STITCH 5: augmenting protein–chemical interaction networks with tissue and affinity data. *Nucleic Acids Research*, v. 44, D1, p. D380–D384, 2016.
31. SHANNON, P. *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, v. 13, n. 11, p. 2498–2504, 2003. DOI: 10.1101/gr.1239303.
32. VAZ DA LUZ, K. T. *et al.* Molecular weight-dependent antitumor effects of prunes-derived type I arabinogalactan on human and murine triple wild-type melanomas. *Carbohydrate Research*, v. 535, p. 108986, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2023.108986>.
33. LIBERZON, A. *et al.* The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Systems*, v. 1, n. 6, p. 417–425, 2015. DOI: 10.1016/j.cels.2015.12.004.
34. VAN DER MEEL, R. *et al.* Smart cancer nanomedicine. *Nature Nanotechnology*, v. 14, n. 2, p. 100–108, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0567-y>.
35. GONÇALVES, Jenifer Pendiuk. Gold and silica in nanomedicine: promising materials for the development of new cancer treatments. 2020. Thesis (Doctorate in Sciences – Cellular and Molecular Biology) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020. Available at: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/68978>.
36. SHAHHOSEINI, E.; NAKAYAMA, M.; PIVA, T.; GESO, M. Differential effects of gold nanoparticles and ionizing radiation on cell motility between primary human colonic and melanocytic cells and their cancerous counterparts. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 1418, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms22031418>.
37. KIURU, M.; BUSAM, K. The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory Investigation*, v. 97, p. 146–157, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.142>.
38. ELECHALAWAR, C. K. *et al.* Gold nanoparticles inhibit macropinocytosis by decreasing KRAS activation. *ACS Nano*, v. 17, n. 10, p. 9326–9337, 2023. DOI: 10.1021/acsnano.3c00920.
39. ZHANG, Y. *et al.* Disabling partners in crime: Gold nanoparticles disrupt multicellular communications within the tumor microenvironment to inhibit ovarian tumor aggressiveness. *Materials Today*, v. 56, p. 79–95, 2022. DOI: 10.1016/j.mattod.2022.01.025.
40. MAHMOUD, N. N. *et al.* Gold nanocomplex strongly modulates the PI3K/Akt pathway and other pathways in MCF-7 breast cancer cell line. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 9, p. 3320, 2020. DOI: 10.3390/ijms21093320.
41. SANTOS, L. K. B. *et al.* Assessment of in vitro anti-melanoma potential of *Ephedranthus pisocarpus* R.E.Fr. *Anticancer Research*, v. 40, n. 9, p. 5015–5024, 2020. DOI: 10.21873/anticancer.14504.
42. PRADO-SOUZA, L. F. L. *et al.* Exploiting paradoxical activation of oncogenic MAPK signaling by targeting mitochondria to sensitize NRAS mutant-melanoma to vemurafenib. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, p. 2675, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms26062675>.
43. YIN, Q. *et al.* Effect of melanoma stem cells on melanoma metastasis. *Oncology Letters*,

- v. 22, n. 1, p. 566, 2021. DOI: 10.3892/ol.2021.12827.
44. LEE, N.; BARTHEL, S. R.; SCHATTON, T. Melanoma stem cells and metastasis: mimicking hematopoietic cell trafficking? *Laboratory Investigation*, v. 94, n. 1, p. 13–30, jan. 2014. DOI: 10.1038/labinvest.2013.116.
 45. WILSON, B. J. *et al.* ABCB5 maintains melanoma-initiating cells through a proinflammatory cytokine signaling circuit. *Cancer Research*, v. 74, n. 15, p. 4196–4207, 2014. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0582.
 46. XIAO, J. *et al.* Differential expression of ABCB5 in BRAF inhibitor-resistant melanoma cell lines. *BMC Cancer*, v. 18, n. 1, p. 675, 2018. DOI: 10.1186/s12885-018-4583-3.
 47. LOSCERTALES, E. *et al.* Impact of gold nanoparticle size and coating on radiosensitization and generation of reactive oxygen species in cancer therapy. *Nanoscale Advances*, v. 7, n. 4, p. 1204–1214, 2025. DOI: 10.1039/D4NA00773E.: <http://dx.doi.org/10.1039/D4NA00773E>.
 48. RAMALINGAM, V. *et al.* Target delivery of doxorubicin tethered with PVP stabilized gold nanoparticles for effective treatment of lung cancer. *Scientific Reports*, v. 8, p. 3815, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-22172-5.
 49. CALABRESE, E. J. *et al.* Hormesis and its impact on medicine and public health. *Human and Experimental Toxicology*, v. 32, n. 2, p. 120–152, 2013. DOI: 10.1177/0960327112455069.
 50. LYON, A. *et al.* ABL1/2 and DDR1 drive MEKi resistance in NRAS-mutant melanomas by stabilizing RAF/MYC/ETS1 and promoting RAF homodimerization. *Cancers*, v. 15, n. 3, p. 954, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers15030954>.
 51. APPLETON, K. M. *et al.* Inhibition of the myocardin-related transcription factor pathway increases efficacy of trametinib in NRAS-mutant melanoma cell lines. *Cancers*, v. 13, p. 2012, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers13092012>.
 52. HUAI, Y. *et al.* Gold nanoparticles sensitize pancreatic cancer cells to gemcitabine. *Cell Stress*, v. 3, n. 8, p. 267–279, 2019. DOI: 10.15698/cst2019.08.195.
 53. TABATABAIE, F. *et al.* Oxidative damage to mitochondria enhanced by ionising radiation and gold nanoparticles in cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 13, p. 6887, 2022. DOI: 10.3390/ijms23136887.
 54. MADDA, A. *et al.* Oxidative stress induction by gold nanoparticles in HCT-116 colon cancer cells. *Comprehensive Health and Biomedical Studies*, v. 2, n. 1, p. e145183, 2024. DOI: <https://doi.org/10.5812/chbs-145183>.
 55. TANG, Y. *et al.* In vitro cytotoxicity of gold nanorods in A549 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 39, n. 2, p. 871–878, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.003>.
 56. DAEI, S. *et al.* Effects of gold nanoparticles on oxidative stress status in bladder cancer 5637 cells. *Folia Medica*, v. 64, n. 4, p. 641–648, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3897/folmed.64.e66784>.
 57. KESHARWANI, P. *et al.* Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy. *Molecular Cancer*, v. 22, p. 98, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01798-8>.
 58. XU, X. *et al.* Citoesqueleto perturbador por nanomateriais projetados para terapias

- aprimoradas contra o câncer. *Bioactive Materials*, v. 29, p. 50–71, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.06.016>.
59. ALI, M. R. K. *et al.* Nuclear membrane-targeted gold nanoparticles inhibit cancer cell migration and invasion. *ACS Nano*, v. 11, n. 4, p. 3716–3726, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08345>.
 60. WANG, R. *et al.* Important roles of PI3K/AKT signaling pathway and relevant inhibitors in prostate cancer progression. *Cancer Medicine*, v. 13, n. 21, p. e70354, 2024. DOI: 10.1002/cam4.70354.
 61. GRZINCIC, E. M.; MURPHY, C. J. Gold nanorods indirectly promote migration of metastatic human breast cancer cells in three-dimensional cultures. *ACS Nano*, v. 9, n. 7, p. 6801–6816, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.5b03362>.
 62. HAAK, A. J. *et al.* Pharmacological inhibition of myocardin-related transcription factor pathway blocks lung metastases of RhoC-overexpressing melanoma. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 16, n. 1, p. 193–204, 2017. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0482.
 63. JIANG, L. *et al.* Inactivating p53 is essential for nerve growth factor receptor to promote melanoma-initiating cell-stemmed tumorigenesis. *Cell Death & Disease*, v. 11, n. 7, p. 550, 2020. DOI: 10.1038/s41419-020-02758-6.
 64. LIU, F. *et al.* Gold nanoparticles suppressed proliferation, migration, and invasion in papillary thyroid carcinoma cells via downregulation of CCT3. *Journal of Nanomaterials*, 2019. DOI: 10.1155/2019/1687340. <https://www.hindawi.com/journals/jnm/2019/1687340/>.
 65. SAHA, S. *et al.* Gold nanoparticle reprograms pancreatic tumor microenvironment and inhibits tumor growth. *ACS Nano*, v. 10, n. 12, p. 10636–10651, 2016. DOI: 10.1021/acsnano.6b02231.
 66. HAGA, R. B.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases: regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases*, v. 7, n. 4, p. 207–221, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/21541248.2016.1232583>.
 67. CROSAS-MOLIST, E. *et al.* Rho GTPase signaling in cancer progression and dissemination. *Physiological Reviews*, v. 102, n. 1, p. 455–510, 2022. DOI: 10.1152/physrev.00045.2020.
 68. SAMRA, Y. *et al.* Safranin-loaded gold nanoparticles alleviate hepatocellular carcinoma via targeting the Wnt/ β -catenin pathway. *Discover Oncology*, v. 16, 2025. DOI: 10.1007/s12672-025-02447-w.
 69. MOHAPATRA, P.; CHANDRASEKARAN, N. Wnt/ β -catenin targeting in liver carcinoma through nanotechnology-based drug repurposing: a review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 155, p. 113713, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113713>.
 70. MIAO, G. *et al.* The multifaceted potential of TPT1 as biomarker and therapeutic target. *Heliyon*, v. 10, n. 19, e38819, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38819>.
 71. LIU, AB., Liu, J., Wang, S. *et al.* Biological role and expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) in tumorigenesis and development and its potential for targeted tumor therapy. *Cancer Cell Int* 24, 198 (2024). <https://doi.org/10.1186/s12935-024-03355-9>.

72. MAERTENS, O. *et al.* Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discovery*, v. 3, n. 3, p. 338–349, 2013. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0313.
73. LIU, R. *et al.* PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell Death & Disease*, v. 11, p. 797, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02998-6>.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço das terapias antitumorais demanda alternativas que aliem eficácia à segurança, superando as limitações impostas pelos agentes citotóxicos tradicionais. Nesse contexto, os nanomateriais, como os GA-AuNRs, surgem como ferramentas promissoras, capazes de modular processos celulares de forma seletiva. Este estudo buscou aprofundar a compreensão sobre os efeitos dos GA-AuNRs em diferentes linhagens de melanoma humano, com foco na viabilidade, densidade, capacidade clonogênica, estresse oxidativo e migração celular.

Os resultados obtidos demonstraram que os GA-AuNRs foram eficazes em interferir na capacidade proliferativa e clonogênica de células tumorais, especialmente em linhagens com perfis genéticos específicos, como observado na Sk-Mel-28. Este achado está em consonância com estudos anteriores, que evidenciam a capacidade das AuNPs de limitar a expansão tumoral sem, necessariamente, induzir citotoxicidade direta. A redução do tamanho das colônias, mesmo em concentrações subcitotóxicas, reforça a ideia de que esses nanomateriais atuam como moduladores do crescimento celular, comportamento desejável em terapias que buscam controlar a progressão tumoral com menor impacto sistêmico.

A diferença observada entre os efeitos das concentrações de GA-AuNRs nos ensaios de migração e formação de colônias pode ser atribuída à natureza distinta dos processos celulares avaliados. Enquanto a migração celular está fortemente associada à dinâmica do citoesqueleto, adesão e sinalização motora, a formação de colônias depende da capacidade de proliferação e sobrevivência celular a longo prazo. Neste estudo, a menor concentração de GA-AuNRs (0.18 mg L⁻¹) mostrou-se eficaz na inibição da migração para a linhagem Sk-Mel-28, sem comprometer drasticamente outras funções celulares. Por outro lado, no ensaio de clonogenicidade, a maior concentração (1.8 mg L⁻¹) resultou em colônias menores, o que sugere um efeito acumulativo sobre a capacidade proliferativa das células, mesmo na ausência de citotoxicidade.

Entretanto, diferentemente de algumas descrições na literatura que apontam a indução de estresse oxidativo como um dos mecanismos de ação das AuNPs, no presente estudo não foram observadas alterações significativas na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Este resultado sugere que, sob as condições avaliadas, os GA- AuNRs não desencadearam estresse oxidativo detectável, indicando uma atuação mais direcionada à inibição da proliferação do que à indução de dano oxidativo. Essa divergência em relação a outros modelos pode ser explicada pelas características físico-químicas específicas das nanopartículas utilizadas, pelo tipo celular ou pela ausência de estímulos adicionais, como radiação, frequentemente associados ao aumento de ROS.

Refletindo sobre o conjunto dos resultados, este estudo reforça que o potencial terapêutico dos GA-AuNRs reside na sua capacidade de atuar de forma seletiva sobre a proliferação tumoral e a motilidade celular. A ausência de efeitos colaterais relacionados ao estresse oxidativo pode ser interpretada como um indicativo de segurança adicional, evitando danos colaterais frequentemente associados a terapias agressivas.

Contudo, a variabilidade observada entre as respostas das diferentes linhagens evidencia um dos desafios centrais da oncologia: a determinação da eficácia terapêutica pelo perfil genético e molecular tumoral. A presença de mutações específicas pode desencadear mecanismos de resistência, o que reforça, a necessidade de abordagens terapêuticas personalizadas, alinhadas às particularidades biológicas de cada neoplasia.

6. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que GA-AuNRs exibem atividade antitumoral seletiva, com efeitos distintos em diferentes linhagens celulares de melanoma humano. A linhagem celular SK-MEL-28, portadora de mutação *BRAF*, apresentou sensibilidade ao tratamento, com redução significativa na capacidade de migração e clonogenicidade, possivelmente associada à modulação de vias envolvendo RHOA, RAC1, CTNNB1 e TPT1 que foram identificadas nas análises *in silico*. Em contraste, a linhagem celular MeWo, mutada em *NF1*, exibiu aumento na proliferação e migração, indicando uma resposta adaptativa. Por fim a linhagem SK-MEL-147, não apresentou nenhum efeito mediante a exposição aos GA-AuNRs. A ausência de citotoxicidade em fibroblastos normais reforça ainda mais o perfil de biocompatibilidade de GA-AuNRs. Esses achados destacam o potencial dessas nanopartículas em estratégias terapêuticas personalizadas e reforçam a importância do perfil molecular do tumor na determinação das respostas aos nanomateriais. Novas investigações são recomendadas para aprofundar a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos e otimizar o uso de GA-AuNRs como ferramentas terapêuticas no tratamento do melanoma metastático.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser consideradas. A análise realizada concentrou-se nos efeitos agudos do tratamento, sendo necessário, em investigações futuras, avaliar as consequências a longo prazo da exposição ao complexo GA-AuNRs. Além disso, embora tenham sido utilizados modelos preditivos para identificar possíveis alvos moleculares modulados pelo tratamento, ainda se faz necessária a validação experimental desses alvos, tanto em nível de expressão gênica (RNA) quanto proteica.

A simulação computacional da goma arábica como polímero foi realizada, porém o complexo completo com os nanobastões de ouro não foi representado neste trabalho. Assim, propõe-se como perspectiva futura a aplicação de abordagens de biologia estrutural para modelar esse complexo e avaliar com maior precisão seu impacto biológico nas linhagens celulares estudadas. Essas estratégias permitirão uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos de ação envolvidos e poderão contribuir para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais eficazes.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, Rishabh *et al.* **Understanding gold nanoparticles and their attributes in ovarian cancer therapy.** *Molecular Cancer* BioMed Central Ltd, , 1 dez. 2025.
- AHMED, Noha *et al.* Arabic Gum Could Alleviate the Aflatoxin B1-provoked Hepatic Injury in Rat: The Involvement of Oxidative Stress, Inflammatory, and Apoptotic Pathways. *Toxins*, v. 14, n. 9, 1 set. 2022.
- AI, Chao *et al.* Gum arabic as a sole wall material for constructing nanoparticle to enhance the stability and bioavailability of curcumin. *Food Chemistry: X*, v. 18, 2023.
- AKBANI, Rehan *et al.* Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, v. 161, n. 7, p. 1681–1696, 20 jun. 2015.
- ALI, Badreldin H. *et al.* Effect of Gum Arabic on Oxidative Stress and Inflammation in Adenine-Induced Chronic Renal Failure in Rats. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, 2013.
- AL-JUBORI, Yamamh *et al.* **The Efficacy of Gum Arabic in Managing Diseases: A Systematic Review of Evidence-Based Clinical Trials.** *Biomolecules* MDPI, , 1 jan. 2023.
- AROZARENA, Imanol; WELLBROCK, Claudia. **Targeting invasive properties of melanoma cells.** *FEBS Journal*, 2017.
- ARSLANBAEVA, Liaisan R.; SANTORO, Massimo M. **Adaptive redox homeostasis in cutaneous melanoma.** *Redox Biology*, 2020.
- ATEFI, Mohammad *et al.* Combination of pan-RAF and MEK inhibitors in NRAS mutant melanoma. *Molecular Cancer*, v. 14, n. 1, 2015.
- ATKINS, Michael B. *et al.* The state of Melanoma: Emergent challenges and opportunities. *Clinical Cancer Research*, v. 27, n. 10, p. 2678–2697, 1 maio 2021.
- ATTIQUE, Iqra *et al.* **Reactive Oxygen Species: From Tumorigenesis to Therapeutic Strategies in Cancer.** *Cancer Medicine* John Wiley and Sons Inc, , 1 maio 2025.
- AUBUCHON, M. M. F. *et al.* Epidemiology, management and survival outcomes of primary cutaneous melanoma: A ten-year overview. *Acta Chirurgica Belgica*, v. 117, n. 1, 2017.
- AVAGLIANO, Angelica *et al.* **Metabolic Plasticity of Melanoma Cells and Their Crosstalk With Tumor Microenvironment.** *Frontiers in Oncology*, 2020.
- AVELINO, André Luís Nunes *et al.* Antioxidant and Antigenotoxic Actions of Gum Arabic on the Intestinal Mucosa, Liver and Bone Marrow of Swiss Mice Submitted to Colorectal Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer*, v. 74, n. 3, 2022.
- BAIEN, Shima Hassan *et al.* Antimicrobial and Immunomodulatory Effect of Gum Arabic on Human and Bovine Granulocytes Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Frontiers in Immunology*, v. 10, 2020.
- BARBA, Ignasi; CARRILLO-BOSCH, Laura; SEOANE, Joan. **Targeting the Warburg Effect in Cancer: Where Do We Stand?** *International Journal of Molecular Sciences*, 2024.
- BARROS, Heloíse Ribeiro *et al.* Surface interactions of gold nanorods and polysaccharides: From clusters to individual nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 152, 2016.

BECKER, Alyssa L.; INDRA, Arup K. **Oxidative Stress in Melanoma: Beneficial Antioxidant and Pro-Oxidant Therapeutic Strategies.** *Cancers*, 2023.

BHARDWAJ, Vikas; HE, Jun. **Reactive oxygen species, metabolic plasticity, and drug resistance in cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2020.

BLANK, Lucas, M. W. *et al.* **Neoadjuvant Nivolumab and Ipilimumab in Resectable Stage III Melanoma.** *New England Journal of Medicine*, 2024.

BORGERS, Jessica S. W. *et al.* Personalized, autologous neoantigen-specific T cell therapy in metastatic melanoma: a phase 1 trial. *Nature Medicine*, v. 31, n. 3, p. 881–893, 1 mar. 2025.

BROWN, Timothy P.; GANAPATHY, Vadivel. **Lactate/GPR81 signaling and proton motive force in cancer: Role in angiogenesis, immune escape, nutrition, and Warburg phenomenon.** *Pharmacology and Therapeutics*, 2020.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. **Genomic classification of cutaneous melanoma.** *Cell*, v. 161, n. 7, p. 2016.

CARREÓN GONZÁLEZ, José Luis; GARCÍA CASILLAS, Perla Elvia; CHAPA GONZÁLEZ, Christian. Gold Nanoparticles as Drug Carriers: The Role of Silica and PEG as Surface Coatings in Optimizing Drug Loading. *Micromachines*, v. 14, n. 2, 2023.

CASTELLANI, Giorgia *et al.* **BRAF Mutations in Melanoma: Biological Aspects, Therapeutic Implications, and Circulating Biomarkers.** *Cancers*, 2023.

CELESIA, Adriana *et al.* Oncogenic BRAF and p53 Interplay in Melanoma Cells and the Effects of the HDAC Inhibitor ITF2357 (Givinostat). *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 11, 2023.

CESI, Giulia *et al.* ROS production induced by BRAF inhibitor treatment rewires metabolic processes affecting cell growth of melanoma cells. *Molecular Cancer*, v. 16, n. 1, 8 jun. 2017.

CHEN, Chung Yu *et al.* DC-81-enediynes induce apoptosis of human melanoma A375 cells: Involvement of the ROS, p38 MAPK, and AP-1 signaling pathways. *Cell Biology and Toxicology*, v. 29, n. 2, 2013.

CHITHRANI, B. Devika; GHAZANI, Arezou A.; CHAN, Warren C. W. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells. *Nano Letters*, v. 6, n. 4, 2006.

CHUANG, Yao-Chen *et al.* Recent Advances in Gold Nanomaterials for Photothermal Therapy. *Journal of Nanotheranostics*, v. 3, n. 2, 2022.

CORAZAO-ROZAS, Paola *et al.* Mitochondrial oxidative stress is the achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget*, v. 4, n. 11, 2013.

COUPLAND, S. E. *et al.* Molecular pathology of uveal melanoma. *In*: 2013.

DANISHEVICH, Anastasiia *et al.* CDKN2A Gene Mutations: Implications for Hereditary Cancer Syndromes. *Biomedicines*, v. 11, n. 12, 2023.

DASTGHEIB, Z. S. *et al.* Gold nanoparticles as promising photothermal agents for cancer therapy: **Recent advances and future perspectives.** *Heliyon*, v. 10, n. 5, e28062, 2024.

DECKERS, E. A. *et al.* The association between active tumor volume, total lesion glycolysis and levels of S-100B and LDH in stage IV melanoma patients. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 46, n. 11, 2020.

DEINAVIZADEH, Maryam *et al.* An Overview of the Application of Gold Nanorods in Photothermal Cancer Therapy. **Materials Chemistry Horizons**, v. 3, n. 4, p. 1–20, 1 dez. 2024.

DUMMER, Reinhard *et al.* Randomized Phase III Trial Evaluating Spaltalizumab Plus Dabrafenib and Trametinib for BRAF V600-Mutant Unresectable or Metastatic Melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 40, n. 13, 2022.

ELDER, David E. Melanoma progression. **Pathology**, v. 48, n. 2, p. 147–154, 2016.

FALCONE, Italia *et al.* **Tumor microenvironment: Implications in melanoma resistance to targeted therapy and immunotherapy.** **Cancers**, 2020.

FATEEVA, Anna; EDDY, Kevinn; CHEN, Suzie. **Current State of Melanoma Therapy and Next Steps: Battling Therapeutic Resistance.** **Cancers** Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 abr. 2024.

FERNANDEZ, Manuel Felipe; CHOI, Jacob; SOSMAN, Jeffrey. **New Approaches to Targeted Therapy in Melanoma.** **Cancers**, 2023.

FISCHER, Grant M. *et al.* Molecular profiling reveals unique immune and metabolic features of melanoma brain metastases. **Cancer Discovery**, v. 9, n. 5, 2019.

GARREFFA, Emanuele; LEE, Rachel. **Hereditary and familial cancer.** **Surgery (United Kingdom)**, 2024.

GASHUA, I. B.; WILLIAMS, P. A.; BALDWIN, T. C. Molecular characteristics, association and interfacial properties of gum Arabic harvested from both Acacia senegal and Acacia seyal. **Food Hydrocolloids**, v. 61, 2016.

GERSHENWALD, Jeffrey E. *et al.* Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 6, 2017.

GONÇALVES, Jenifer Pendiuk. *Gold and silica in nanomedicine: promising materials for the development of new cancer treatments.* 2020. 153 f. Tese (Doutorado em Ciências – Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/xmlui/handle/1884/67875>. Acesso em: 26 ago. 2025.

GU, Minzhi *et al.* **Epigenetic regulation in cancer.** **MedComm** John Wiley and Sons Inc, , 1 fev. 2024.

GUO, Yuchen *et al.* **TERT Promoter Mutations and Telomerase in Melanoma.** **Journal of Oncology**, 2022.

GUREL, Zafer *et al.* Metabolic modulation of melanoma enhances the therapeutic potential of immune checkpoint inhibitors. **Frontiers in Oncology**, v. 14, 2024.

HAYWARD, Nicholas K. *et al.* Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. **Nature**, v. 545, n. 7653, 2017.

HE, Jia Shuai *et al.* **The Application of and Strategy for Gold Nanoparticles in Cancer**

Immunotherapy. Frontiers in PharmacologyFrontiers Media S.A., , 7 jun. 2021.

HU, An *et al.* Curcumin induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis of head and neck squamous cell carcinoma in vitro and in vivo through ATM/Chk2/p53-dependent pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, 2017.

HUANG, Alexander C.; ZAPPASODI, Roberta. **A decade of checkpoint blockade immunotherapy in melanoma: understanding the molecular basis for immune sensitivity and resistance.** *Nature Immunology*, 2022.

HUANG, Junfeng *et al.* Metal organic framework-coated gold nanorod as an on-demand drug delivery platform for chemo-photothermal cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, 1 dez. 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. **Global Cancer Observatory.** Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 20 out. 2023.

JAIN, Suneil; HIRST, D. G.; O'SULLIVAN, J. M. **Gold nanoparticles as novel agents for cancer therapy.** *British Journal of Radiology*, 2012.

JOHANSSON, Peter A. *et al.* Whole genome landscapes of uveal melanoma show an ultraviolet radiation signature in iris tumours. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

JONES, Nicholas; NONAKA, Taichiro. **Circulating miRNAs as biomarkers for the diagnosis in patients with melanoma: systematic review and meta-analysis.** *Frontiers in Genetics*, 2024.

AL-JUBORI Y, Ahmed NTB, et al., **The Efficacy of Gum Arabic in Managing Diseases: A Systematic Review of Evidence-Based Clinical Trials.** *Biomolecules* 2023.

KALAORA, Shelly *et al.* **Mechanisms of immune activation and regulation: lessons from melanoma.** *Nature Reviews Cancer*, 2022.

KASTENHUBER, Edward R.; LOWE, Scott W. **Putting p53 in Context.** *Cell*, 2017.

KATTUMURI, Vijaya *et al.* Gum arabic as a phytochemical construct for the stabilization of gold nanoparticles: In vivo pharmacokinetics and X-ray-contrast-imaging studies. **Small**, v. 3, n. 2, 2007.

KESHARWANI, Prashant *et al.* **Gold nanoparticles and gold nanorods in the landscape of cancer therapy.** *Molecular Cancer*, 2023.

KHAN, Naseer Ullah *et al.* **Synthesis of gold nanorods and their performance in the field of cancer cell imaging and photothermal therapy.** *Cancer Nanotechnology*, 2021.

KLEE, Gina *et al.* Dacarbazine in the management of metastatic melanoma in the era of immune checkpoint therapy: A valid option or obsolete? **Melanoma Research**, v. 32, n. 5, 2022.

KNIGHT, Andrew; KARAPETYAN, Lilit; KIRKWOOD, John M. **Immunotherapy in Melanoma: Recent Advances and Future Directions.** *Cancers*, 2023.

KOPECKA, Joanna *et al.* **Hypoxia as a driver of resistance to immunotherapy.** *Drug Resistance Updates*, 2021.

KOZAR, Ines *et al.* **Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies.** *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*, 2019.

KUMAR, Panangattukara Prabhakaran Praveen; LIM, Dong Kwon. **Gold-Polymer Nanocomposites for Future Therapeutic and Tissue Engineering Applications**. *Pharmaceutics*, 2022.

KUS-LIŚKIEWICZ, Małgorzata; FICKERS, Patrick; BEN TAHAR, Imen. **Biocompatibility and cytotoxicity of gold nanoparticles: Recent advances in methodologies and regulations**. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.

LEE, Jae Hyeop *et al.* A Lucknolide Derivative Induces Mitochondrial ROS-Mediated G2/M Arrest and Apoptotic Cell Death in B16F10 Mouse Melanoma Cells. *Marine Drugs*, v. 22, n. 12, 1 dez. 2024.

LEE, Joanna *et al.* BRAF inhibitor cessation prior to disease progression in metastatic melanoma: Long-term outcomes. *European Journal of Cancer*, v. 179, 2023.

LI, Bin; LANE, Lucas A. Probing the biological obstacles of nanomedicine with gold nanoparticles. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 11, n. 3, 2019.

LIU-SMITH, Feng; MEYSKENS, Frank L. **Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma**. *Molecular nutrition & food research*, 2016.

LOPES, Joana *et al.* Combination of gold nanoparticles with near-infrared light as an alternative approach for melanoma management. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 668, 5 jan. 2025.

LOUREIRO, Joana B. *et al.* Targeting p53 for melanoma treatment: Counteracting tumour proliferation, dissemination and therapeutic resistance. *Cancers*, v. 13, n. 7, 2021.

MA, Lin *et al.* Breast cancer-associated mitochondrial DNA haplogroup promotes neoplastic growth via ROS-mediated AKT activation. *International Journal of Cancer*, v. 142, n. 9, 2018.

MA, Weijie *et al.* The Expression and Prognostic Value of Multiple Glucose Transporters in Cutaneous Melanoma. *Anticancer Research*, v. 44, n. 9, p. 3747–3756, 1 set. 2024.

MADONNA, Gabriele *et al.* PD-L1 expression with immune-infiltrate evaluation and outcome prediction in melanoma patients treated with ipilimumab. *OncoImmunology*, v. 7, n. 12, 2018.

MALEKAN, Mohammad; EBRAHIMZADEH, Mohammad Ali; SHEIDA, Fateme. **The role of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and its signaling in melanoma**. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2021.

MALONE, Eoghan R. *et al.* **Molecular profiling for precision cancer therapies**. *Genome Medicine*, 2020.

MAO, Yuan *et al.* **Emerging artificial intelligence-driven precision therapies in tumor drug resistance: recent advances, opportunities, and challenges**. *Molecular CancerBioMed Central Ltd*, 1 dez. 2025.

MCGRAIL, Kimberley *et al.* Loss of Lkb1 cooperates with BrafV600E and ultraviolet radiation, increasing melanoma multiplicity and neural-like dedifferentiation. *Molecular Oncology*, v. 19, n. 2, p. 329–343, 1 fev. 2025.

MISHRA, Deepshikha; BANERJEE, Debabrata. Metabolic Interactions Between Tumor and Stromal Cells in the Tumor Microenvironment. *In: Advances in Experimental Medicine and Biology*. [S.l.: S.n.]. v. 1350.

MODERNA; MERCK. *Moderna and Merck Announce mRNA-4157 (V940) in Combination with KEYTRUDA® (pembrolizumab) Demonstrated Continued Improvement in Recurrence-Free Survival and Distant Metastasis-Free Survival in Patients with High-Risk Stage III/IV Melanoma Following Complete Resection Versus KEYTRUDA At Three Years.* 2023. Disponível em: <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2023/Moderna-AndMerck-Announce-mRNA-4157-V940-In-Combination-with-KeytrudaR-PembrolizumabDemonstrated-Continued-Improvement-in-Recurrence-Free-Survival-and-Distant-MetastasisFree-Survival-in-Patients-with-High-Risk-Stage-IIIIV-Melanoma-Following-Comple/default.aspx>. Acesso em: 21 mar. 2025

MOHAMED, Shaymaa A. *et al.* **Gum Arabic: A Commodity with Versatile Formulations and Applications.** *Nanomaterials* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 fev. 2025.

MONI, Sivakumar S. *et al.* **Advances in Materials Science for Precision Melanoma Therapy: Nanotechnology-Enhanced Drug Delivery Systems.** *Pharmaceutics* Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2025.

MOTWANI, Jyoti; ECCLES, Michael R. **Genetic and genomic pathways of melanoma development, invasion and metastasis.** *Genes*, 2021.

MUHAMMAD, Siti Nur Hasyila *et al.* **Terpenoids: Unlocking Their Potential on Cancer Glucose Metabolism.** *Phytotherapy Research* John Wiley and Sons Ltd, , 1 dez. 2024.

MULLEN, Jaren *et al.* **Targeting ARID1A mutations in cancer.** *Cancer Treatment Reviews*, 2021.

NAYAK, Amit Kumar; PAL, Dilipkumar. Functionalization of Tamarind Gum for Drug Delivery. *In: [S.l.: S.n.]*.

PAPAGEORGIOU, Chryssoula *et al.* **Melanoma: Staging and Follow-Up.** *Dermatology Practical & Conceptual*, 2021.

PATEL, Meet *et al.* **Resistance to molecularly targeted therapies in melanoma.** *Cancers*, 2021.

PETERS, Marcus *et al.* Allergy-Protective Arabinogalactan Modulates Human Dendritic Cells via C-Type Lectins and Inhibition of NF- κ B. *The Journal of Immunology*, v. 196, n. 4, 2016.

PISKOUNOVA, Elena *et al.* Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*, v. 527, n. 7577, 2015.

PRASAD, Niranjan *et al.* **Gum arabic – A versatile natural gum: A review on production, processing, properties and applications.** *Industrial Crops and Products*, 2022.

QIU, Xun *et al.* Raman spectroscopy combined with deep learning for rapid detection of melanoma at the single cell level. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 286, 2023.

RICCIARDI, Elena *et al.* **Metastatic Melanoma: Liquid Biopsy as a New Precision Medicine Approach.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2023.

RIGHI, Matteo *et al.* Enhancing CAR T-cell Therapy Using Fab-Based Constitutively Heterodimeric Cytokine Receptors. *Cancer Immunology Research*, v. 11, n. 9, 2023.

ROMANO, Veronica *et al.* **Influence of tumor microenvironment and fibroblast population plasticity on melanoma growth, therapy resistance and immunoescape.** *International Journal of Molecular Sciences*, 2021.

ROSA, Soraia *et al.* **Biological mechanisms of gold nanoparticle radiosensitization.** *Cancer Nanotechnology*, 2017.

ROZENBLAT, Sharon *et al.* Induction of G2/M arrest and apoptosis by sesquiterpene lactones in human melanoma cell lines. *Biochemical Pharmacology*, v. 75, n. 2, 2008.

RUIZ-IGLESIAS, Ainhoa; MAÑES, Santos. **The importance of mitochondrial pyruvate carrier in cancer cell metabolism and tumorigenesis.** *Cancers*, 2021.

RUOCCO, Maria Rosaria *et al.* **Metabolic flexibility in melanoma: A potential therapeutic target.** *Seminars in Cancer Biology*, 2019.

SAMPLE, Ashley; HE, Yu Ying. **Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma.** *Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2018.

SHAKED, Yaelle; SWEARINGEN, Alyssa; LIEBMAN, Tracey N. **CDKN2A Mutation: A Patient's and Physician's Experience.** *Dermatology and Therapy* Adis, , 1 fev. 2025.

SHIRLEY, Matt. Encorafenib and Binimetinib: First Global Approvals. *Drugs*, v. 78, n. 12, 2018.

SIEDNAMOHAMMEDDEEN, Nagat *et al.* The effect of gum Arabic supplementation on cathelicidin expression in monocyte derived macrophages in mice. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, v. 22, n. 1, 2022.

SLOMINSKI, A. *et al.* The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: Melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 α expression and HIF-dependent attendant pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 563, 2014.

SUBBIAH, Vivek *et al.* Dabrafenib plus trametinib in BRAFV600E-mutated rare cancers: the phase 2 ROAR trial. *Nature Medicine*, v. 29, n. 5, 2023.

TAKAOKA, Yuji *et al.* Mitochondrial pyruvate carrier 1 expression controls cancer epithelial-mesenchymal transition and radioresistance. *Cancer Science*, v. 110, n. 4, 2019.

TESTA, Ugo; CASTELLI, Germana; PELOSI, Elvira. **Melanoma: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Clonal Evolution and Tumor Initiating Cells.** *Medical sciences (Basel, Switzerland)*, 2017.

THAMBIRAJ, S.; HEMA, S.; RAVI SHANKARAN, D. Functionalized gold nanoparticles for drug delivery applications. *In*: 2018.

TIWARI, Pooja M. *et al.* **Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications.** *Nanomaterials*, 2011.

TORNESELLO, Maria Lina *et al.* **Reactivation of telomerase reverse transcriptase expression in cancer: the role of TERT promoter mutations.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2023.

VAUPEL, Peter; MULTHOFF, Gabriele. **Revisiting the Warburg effect: historical dogma versus current understanding.** *Journal of Physiology*, 2021.

VINES, Jeremy B. *et al.* **Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy.** *Frontiers in Chemistry* Frontiers Media S.A., , 2019.

WANG, Jiandong *et al.* **Nanocarrier-Mediated Immunogenic Cell Death for Melanoma Treatment.** *International Journal of Nanomedicine*, 2023.

WANG, Liqin *et al.* An Acquired Vulnerability of Drug-Resistant Melanoma with Therapeutic Potential. *Cell*, v. 173, n. 6, 2018.

WANG, Meng *et al.* Integrated genomic analyses of acral and mucosal melanomas nominate novel driver genes. *Genome Medicine*, v. 14, n. 1, 2022.

WANG, Ruilong *et al.* **Unraveling lipid metabolism reprogramming for overcoming drug resistance in melanoma.** *Biochemical Pharmacology*, 2024.

WEI, Jing *et al.* **Current trends in sensitizing immune checkpoint inhibitors for cancer treatment.** *Molecular CancerBioMed Central Ltd*, , 1 dez. 2024.

WEI, Spencer C.; DUFFY, Colm R.; ALLISON, James P. **Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy.** *Cancer Discovery*, 2018.

WOZNIAK, Michal; CZYZ, Malgorzata. **The functional role of long non-coding rnas in melanoma.** *Cancers*, 2021.

XIAO, Jing Lin, et al. Green synthesis, chemical characterization of gold nanoparticles decorated on biodegradable arabic gum modified magnetic nanoparticles for the treatment of leukemia. *Inorganic Chemistry Communications*, v. 146, p. 110171, 2022.

YANG, Ting Ting *et al.* **The Genomic Landscape of Melanoma and Its Therapeutic Implications.** *Genes*, 2023.

YOON, S., Hwang, B.H. **Selective cytotoxicity of citrate-stabilized gold nanorods against aggressive cancer cells and their potential in the melanoma treatment.** *Biotechnol Bioproc E* 2024

ZENG, Leli *et al.* **Advancements in nanoparticle-based treatment approaches for skin cancer therapy.** *Molecular Cancer*, 2023.

ZHANG, Jie *et al.* Redox pathways in melanoma. *Advances in Cancer Research*, v. 162, p. 125–143, 1 jan. 2024.

ZHANG, Yumin *et al.* Enhanced Radiosensitization by Gold Nanoparticles with Acid-Triggered Aggregation in Cancer Radiotherapy. *Advanced Science*, v. 6, n. 8, 17 abr. 2019.

ZHENG C, Sarin KY. **Unveiling the genetic landscape of hereditary melanoma: From susceptibility to surveillance.** *Cancer Treat Res Commun*, 2024.

ZHU, Xiao Ming *et al.* Cellular uptake behaviour, photothermal therapy performance, and cytotoxicity of gold nanorods with various coatings. *Nanoscale*, v. 6, n. 19, 2014.



Assinatura da discente

Documento assinado digitalmente
 JOSE EDUARDO VARGAS
Data: 17/06/2025 09:51:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura do orientador

