

TERAPIA FOTODINÂMICA EM MELANOMA METASTÁTICO

GABRIELA KLEIN COUTO¹; VICTORIA MASCARENHAS BORBA¹; JOÃO CARLOS RODRIGUES JUNIOR¹; BRUNA SILVEIRA PACHECO¹; BERNARDO IGLESIAS²; TIAGO COLLARES¹

¹ Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Grupo de pesquisa em Oncologia Molecular e Celular (GPO), Universidade Federal de Pelotas –

gaby_kc@yahoo.com.br; victoriamborba2@hotmail.com; jcrodriguesjr@hotmail.com;
pacheco.sbruna@gmail.com; collares.t@gmail.com

² Laboratório de materiais bioinorgânicos e porfirinóides, Universidade Federal de Santa Maria –
bernardopgq@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é considerado o tipo de câncer de pele mais agressivo, devido, principalmente, ao seu diagnóstico tardio (BROUSSARD et al 2018). Pode ser curado quando diagnosticado nos estágios iniciais, no entanto, se este diagnóstico for tardio é muito provável que se desenvolvam metástases. O tratamento desta patologia se baseia no estadiamento do tumor. Os estágios avançados são muito difíceis de serem tratados com as terapias atualmente disponíveis. De acordo com o *World Cancer Research Fund*, essa neoplasia é o 19º câncer mais comum, sendo que em 2018, quase 300.000 novos casos foram diagnosticados (BRAY et al 2018). Segundo a *American Cancer Society*, estima-se que 96.480 novos casos sejam diagnosticados em 2019 e são esperadas 7.230 mortes por melanoma. No Brasil, para o biênio 2018/2019, estima-se 6.260 novos casos de câncer de pele do tipo melanoma (INCA 2018).

Dentro deste contexto, existe principalmente, três formas de tratar essa patologia: radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (INCA 2018). Neste sentido, a radioterapia e a quimioterapia passam a ser as alternativas com maior aplicação para o tratamento deste tipo de câncer. Sabemos que os fármacos utilizados nos tratamentos quimioterápicos são altamente danosos ao organismo dos pacientes acarretando em inúmeras reações adversas, diminuído ainda mais a qualidade de vida, e culminando - em determinados casos - na desistência do tratamento (INCA 2018).

A terapia fotodinâmica (TFD) demonstrou ser uma alternativa promissora nesse sentido. Sua ação é baseada no uso de sensibilizadores, moléculas de luz e oxigênio, para induzir danos celulares. Caracteriza-se por ser um método minimamente invasivo e seletivo para tumores, além de apresentar uma diminuição dos efeitos adversos ao paciente (BROWN et al 2014; SAINI et al 2013).

Atualmente, novas moléculas têm sido estudadas a fim de identificar propriedades ideais para serem usadas como fotossensibilizadores na TFD, características como: fotoestabilidade potencializada, boa solubilidade em meio fisiológico, seletividade e alta fototoxicidade, entre outras (CONNOR et al 2009). Um exemplo amplamente estudado são as porfirinas devido à sua estrutura na forma de um anel com 18 elétrons π conjugados, e é por isso que seus derivados de porfirina absorvem a luz, provando suas propriedades fotofísicas e sua capacidade de se acumular no tumor de maneira seletiva (RKEIN, OZOG 2014). Assim, o objetivo deste estudo foi analisar a ação antitumoral de porfirinas contendo complexos periféricos de platina (II) na linha celular de melanoma metastático (WM1366) utilizando terapia fotodinâmica.

2. METODOLOGIA

2.1 Porfirinas de Platina

As porfirinas de platina **3-PtTPyP** e **4-PtTPyP** foram sintetizadas pelo Laboratório de Materiais Bioinorgânicos e Porfirinóides da Universidade Federal de Santa Maria-RS.

2.2 Cultivo celular e terapia fotodinâmica

Linhagem celular WM1366 foi cedida pela Universidade de Ribeirão Preto/SP. Elas foram cultivadas e mantidas de acordo com as condições adequadas.

Grupos experimentais: Grupo claro (com luz) e escuro (sem luz). Cada grupo foi tratado com concentrações que variaram de 0,563 a 56,25 nM das porfirinas de platina. A ativação das porfirinas (grupo claro) foi realizada pela incidência da luz, por 30 min. O grupo claro foi exposto à luz branca (faixa de 400 a 800 nm), consistindo em um sistema de lâmpadas LED de 100 W. Após a exposição à luz por 30 min, as placas foram colocadas novamente na incubadora e os demais testes foram realizados 24 h após a exposição. O grupo escuro, em contrapartida, não recebeu este tratamento com a luz.

2.3 Proliferação celular

Para avaliação da proliferação foi utilizado o ensaio de MTT (sal de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]). As células foram semeadas a uma densidade de $2,0 \times 10^4$ / poço (200 μ L / poço). Após o período de incubação, o sal MTT foi adicionado a cada poço (5 mg de MTT / mL); 3h após a absorbância foi medida utilizando espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) (comprimento de onda de 492 nm).

2.4 Docking Molecular

Para avaliar a seletividade às células tumorais, análises de ancoragem molecular foram realizadas. Para a criação do receptor alvo, utilizamos a sequência APOB_HUMAN (P04114), obtida no site da UniProt e seus domínios foram analisados pela plataforma SMART objetivando obter a sequência de aminoácidos do domínio N-terminal (LPD_N). O receptor foi modelado por homologia usando CPH models-3.0 com seu score Z de 59,41. O modelo utilizado foi a estrutura molecular de lipovitelina refinada com proteína 1LSH com resolução de 1,9 Å, com seu valor E de $5e-05$ e convergência de 99% com a pesquisa de proteínas BLAST. O receptor foi preparado pelo Assistente de Preparação de Proteínas Schrödinger Maestro. A ancoragem molecular foi realizada usando o software GOLD.

2.7 Annexin V

A capacidade dos diferentes tratamentos para induzir apoptose foi avaliada por citometria de fluxo usando o kit Annexin V TM Museum & Dead Cell Assay Kit (EMD Millipore Corporation). As células foram coradas de acordo com as instruções do fabricante e analisadas com Muse Cell Analyzer (EMD Millipore Corporation).

2.8 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média e desvio padrão (DP). A proliferação celular foi avaliada por análise de variância bidirecional (ANOVA) com diferentes concentrações de compostos e condição claro / escuro como variáveis e o pós-teste utilizado foi Bonferroni. Para os demais ensaios, foi empregada a análise de variância unidirecional (ANOVA) e o pós-teste utilizado foi Tukey. Todas as

análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prisma e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados mostram que ambas as porfirinas inibiram a viabilidade das células de melanoma metastático quando expostas à luz e não alteraram a viabilidade no escuro (Figura 1). Ainda, células neoplásicas têm maior captação de LDL e, com isso, maior expressão desses receptores (FIRESTONE 1994). Somado a isso o acoplamento molecular demonstrou afinidade com porfirina de platina para a região N-terminal da APO B-100, receptor de LDL e, portanto, das células estudadas. Estes resultados demonstraram que nosso sistema fotodinâmico foi efetivo e que as porfirinas de platina podem ser uma boa opção como fotossensibilizadores. Nossos dados de acoplamento molecular corroboram essa sugestão, pois as porfirinas **3-PtTPyP** e **4-PtTPyP** demonstraram um perfil de ligação com o alvo.

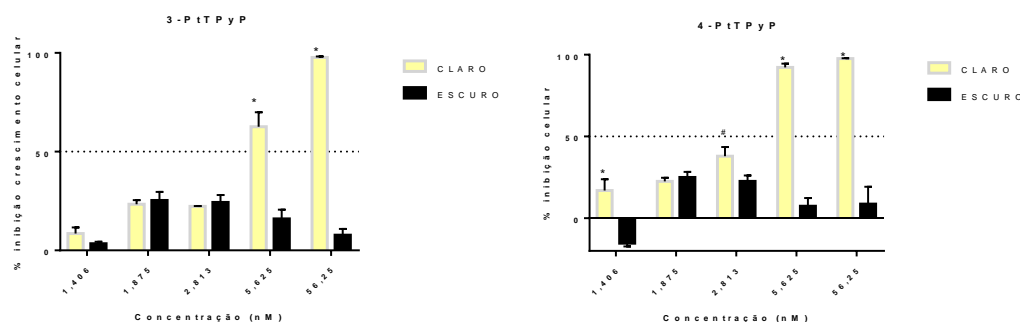


Figura 1. A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT. O gráfico mostra a comparação entre os grupos claro e escuro das porfirinas **3-PtTPyP** e **4-PtTPyP**.

Os dados são expressos como média \pm DP. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. (*) denota $p < 0,0001$ e (#) $p = 0,0079$ quando comparado ao grupo claro e escuro da mesma molécula.

Para entendermos o mecanismo de morte celular foi realizado o teste de annexin V e nossos resultados demonstraram que os tratamentos com ambas as porfirinas, após exposição à luz, houve um aumento do número total de células apoptóticas em 37,18% (porfirina **3-PtTPyP**) e 13,50% (porfirina **4-PtTPyP**) evidenciadas pela externalização da fosfatidilserina, quando comparadas ao grupo controle claro (5,10% - porfirina **3-PtTPyP** e 7,66 – porfirina **4-PtTPyP**) e aos grupos no escuro (5,29% - porfirina **3-PtTPyP** e 7,37% - porfirina **4-PtTPyP**). Esta evidência de externalização da fosfatidilserina, indica fortemente que as porfirinas **3-PtTPyP** e **4-PtTPyP** induzem apoptose em células de melanoma metastático *in vitro* após ativação da luz. Desregulações no processo apoptótico podem gerar distúrbios celulares relacionados a diversas patologias, como o câncer (PU et al 2017). Assim, a capacidade de modular esse mecanismo de morte celular apresenta grande potencial no desenvolvimento de novas terapias oncológicas.

4. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que ambas as porfirinas de platina (II) induziram apoptose e essa morte celular por apoptose foi confirmada pelo ensaio de annexin V. Além disso, o estudo *in silico* indicou que ambas as porfirinas de platina (II) são promissoras como fotossensibilizadores para terapia fotodinâmica uma vez que apresentaram afinidade com a região N-terminal do ApoB-100.

Serão realizados ensaios adicionais em diferentes linhas celulares, a fim de ampliar ainda mais o espectro de aplicação das porfirinas de platina. Também serão estudadas modificações na estrutura química dessas porfirinas, como diferentes centros metálicos e novos derivados de platina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BROUSSARD L., A. HOWLAND, S. RYU, K. SONG, D. NORRIS, C.A. ARMSTRONG, P.I. SONG, 543135 □, **Chonnam Med. J.**, 54 135–142, 2018.

BRAY F., J. FERLAY, I. SOERJOMATARAM, R.L. SIEGEL, L.A. TORRE, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, **CA. Cancer J. Clin.**, 2018.

Instituto Nacional do Câncer, Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de e Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância-Rio de Janeiro., INCA, 1–130, 2018.

BROWN S.B., E.A. BROWN, I. WALKER, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, **Lancet Oncol.**, 2004.

SAINI R., C.F. POH, Photodynamic therapy: A review and its prospective role in the management of oral potentially malignant disorders, **Oral Dis.**, v 19 440–451, 2013.

CONNOR A.E. O', W.M. GALLAGHER, A.T. BYRNE, Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, v85, 1053–1074, 2009.

RKEIN A.M., OZOG D.M., **Photodynamic therapy, Dermatol. Clin.**, v32, 415–425, 2014.

FIRESTONE R.A., Low-Density Lipoprotein as a Vehicle for Targeting Antitumor Compounds to Cancer Cells, **Bioconjug. Chem.**, v5, 105–113, 1994.

PU X., S.J. Storr, Y. Zhang, E.A. Rakha, A.R. Green, I.O. Ellis, S.G. Martin, Caspase-3 and caspase-8 expression in breast cancer: caspase-3 is associated with survival, **Apoptosis**, 2017.