

TERAPIA FOTODINÂMICA E PORFIRINAS DE PALÁDIO: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MELANOMA HUMANO

MARIA EDUARDA EHLERT¹; VALENTINA GESSINGER FERREIRA²; BRUNA SILVEIRA PACHECO³; BERNARDO A. IGLESIAS⁴; FABIANA KOMMLING SEIXAS⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas – dudaaehlert1@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – valentinagessinger@gmail.co

³Universidade Federal de Pelotas – pachecosbruna@gmail.com

⁴Universidade Federal de Santa Maria - bernardopgq@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – seixas.fk@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o INCA (2022), estima-se que, entre 2023 e 2025, tenham 8.980 novos casos de câncer de pele melanoma anualmente. Embora o câncer de pele não melanoma seja mais comum, o melanoma, que se origina das células melanocíticas (LEE et al., 2023), apresenta uma mortalidade mais elevada, representando cerca de 79% das mortes por câncer de pele (BALDEA et al., 2017). Isso se deve principalmente à sua capacidade de metastatizar para locais distantes, tornando-se uma forma especialmente agressiva de câncer (BEZROOKOVE et al., 2024). Ainda, a região Sul do Brasil se destaca, por possuir a maior incidência de melanoma no país, em parte devido ao fato de que 72,6% da população se identifica como branca (IBGE, 2022), um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele (DZWIERZYNSKI et al., 2021).

As opções de tratamento convencionais atualmente aprovadas para o melanoma incluem remoção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, terapias-alvo e imunoterapia (MKHOBONGO, et. al. 2021), algumas delas, abordagens agressivas e com diversos efeitos colaterais ao paciente. Além disso, a baixa taxa de resposta às modalidades de tratamento disponíveis e a resistência inerente das células de melanoma a agentes quimioterápicos (Mishra et al., 2018) são um problema clínico e reduzem potencialmente a expectativa de vida de pacientes com melanoma avançado. Assim, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para melhorar e prolongar a vida dos pacientes oncológicos.

Nesse contexto, se apresenta a Terapia Fotodinâmica (PDT - do inglês *Photodynamic Therapy*), uma modalidade terapêutica baseada em três fatores: fotossensibilizadores, luz com um comprimento de onda específico e a presença de oxigênio, que combinados levam à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e consequentemente, a morte da célula tumoral (LEE et. al, 2020; CORREIA, et al. 2021). A PDT diminui a proliferação de células cancerígenas por três mecanismos principais: pela produção de ERO, induzindo apoptose e necrose diretamente nas células tumorais, danificando a vasculatura do tumor e causando hipóxia, e promovendo uma resposta inflamatória que ativa a imunidade contra as células tumorais (CORREIA, et al. 2021).

A eficácia da terapia fotodinâmica está diretamente relacionada às propriedades do fotossensibilizador utilizado, nesse contexto as porfirinas vem se destacando como uma abordagem promissora (COSTA et al., 2016). Sendo que sua estrutura, baseada no anel tetrapirrólico, é bastante utilizada como plataformas de receptores sintéticos, visto que, permite a formação de complexos com diversos íons metálicos, potencializando a sua eficácia no tratamento oncológico (MAHAJAN et al., 2018; PARK et al., 2021).

Desse modo, o objetivo desse estudo foi realizar a avaliação *in vitro* da citotoxicidade de porfirinas de paládio, submetidas a Terapia Fotodinâmica em linhagem de melanoma humano (A375).

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo celular e semeadura

A linhagem celular de melanoma humano - A375 - foi cultivada em meio Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram semeadas em placas de 96 poços em concentração de 2×10^4 células por poço. O cultivo celular foi mantido em incubadora umidificada em condições controladas de 37 °C e 5% de CO₂.

2.2. Fotossensibilizadores baseados em porfirinas de paládio

As porfirinas de paládio foram obtidas pelo Laboratório de Bioinorgânica e Materiais Porfirínicos (LBMP) da Universidade Federal de Santa Maria. Os compostos sintetizados possuem as fórmulas químicas $C_{184}H_{146}Cl_4N_8P_8Pd_4^{4+}$, $C_{176}H_{138}Cl_4Fe_4N_8P_8Pd_4^{4+}$ e $C_{168}H_{190}Cl_8N_{20}Pd_4^{4+}$ e foram intitulados respectivamente de 3-Pd(PPh₃), 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PEPSI), todos foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO).

2.3. Grupos experimentais e Ensaio Fotodinâmico

Após a aderência das células ao poço, foi feito o tratamento utilizando os fotossensibilizadores de porfirinas de paládio nas concentrações de 100, 50, 28, 14, 7, 3,5 e 1,7 nM de cada composto, assim como foram usados dois controles: o branco e o veículo de diluição dos compostos. Foram realizados dois grupos experimentais distintos, um com a exposição à luz (claro) e outro com a ausência da luz (escuro). Durante o ensaio fotodinâmico, o grupo claro foi exposto à luz branca, com comprimento de onda variando de 400 a 800 nm, emitida por um sistema de lâmpada LED de 100 W. A iluminação foi aplicada 24 horas após o contato das células com os compostos a serem avaliados, a uma intensidade de 50 mW/cm² por 30 minutos, com a fonte luminosa posicionada a 15 cm da placa de cultivo, resultando em uma dose total de 45 J/cm². Após, as placas foram novamente levadas à estufa umidificada por mais 24 horas.

2.4. Avaliação de citotoxicidade por ensaio colorimétrico de MTT

O ensaio MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um método colorimétrico inicialmente descrito por Mosmann (1983), utilizado para avaliar a viabilidade celular em função do número de células, com base na atividade metabólica. Esse teste baseia-se na conversão do sal de tetrazólio solúvel em água (MTT) em cristais de formazan de cor azul-púrpura, processo mediado por células metabolicamente ativas (BURANAAMNUAY, 2021).

O MTT foi solubilizado em uma concentração de 5 mg/mL, e adicionado aos poços da placa de 96 poços em uma proporção de 10% de MTT e 90% de meio de cultivo específico da linhagem. Após a incubação por 3 horas os cristais de formazan foram solubilizados com DMSO. A absorbância foi determinada utilizando um espectrofotômetro, e o percentual de inibição do crescimento celular foi calculado pela seguinte fórmula: % de inibição = (Absorbância das células tratadas / Absorbância das células controle) x 100.

2.5. Análise estatística

Todas as análises comparativas foram conduzidas por meio de análise one-way ANOVA, com o teste post hoc de Tukey utilizado para as comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, sendo considerado significativo um valor de $p < 0,05$. Os resultados são expressos como média e desvio padrão (DP).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos valores de IC_{50} (Tabela 1) revela que as porfirinas 3-Pd(PPh₃) e 3-Pd(dppf) apresentam alta citotoxicidade para a linhagem de melanoma humano (A375). Contudo, a porfirina 3-Pd(PEPSI) mostra desempenho inferior, pois não alcançou nem mesmo 50% de inibição celular nas mesmas concentrações. Em contraste, os grupos escuros em nenhuma das porfirinas demonstraram atividade superior a 25%, confirmando que a eficácia e a ativação do fotossensibilizador ocorrem apenas na presença de luz.

Porfirina	IC_{50} (nM)
3-Pd (PPh ₃)	26,16 ± 7,9
3-Pd (dppf)	23,74 ± 2,6
3-Pd (PEPSI)	-

Tabela 1. Valores de IC_{50} das moléculas 3-Pd(PPh₃), 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PEPSI) após terapia fotodinâmica na linhagem A375.

Tais diferenças nos valores de IC_{50} podem ser atribuídas às variações químicas nas estruturas das porfirinas de paládio, particularmente no tipo de ligante coordenado ao íon de paládio. A porfirina 3-Pd(PPh₃) possui fósforo como ligante coordenado, enquanto 3-Pd(dppf) apresenta ferro, e 3-Pd(PEPSI) não possui ligantes coordenados. Estudos de Matsumoto et al. (2017) ressaltam que o fósforo contribui significativamente para aumentar a citotoxicidade das porfirinas em células cancerígenas devido à intensa troca de elétrons. De maneira similar, o ferro tem se destacado como um alvo relevante para terapias anticâncer, devido ao seu papel crucial no incremento do estresse oxidativo (ZHOU et al., 2018).

As porfirinas são amplamente utilizadas como fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica (PDT) devido às suas propriedades vantajosas, como alta fotossensibilidade, biocompatibilidade, estabilidade e baixos efeitos colaterais (COSTA et al., 2016). Além disso, sua capacidade de se concentrar seletivamente em células com proliferação acelerada, como as cancerígenas, aumenta ainda mais sua eficácia terapêutica (ETHIRAJAN et al., 2021). Tal efeito é comprovado pela aprovação comercial, há mais de 30 anos, de fotossensibilizadores como Photofrin, Photogem e Photosan no tratamento de diversos tipos de câncer (DE OLIVEIRA et al., 2014).

De modo a se destacar, metaloporfirinas têm surgido como uma estratégia promissora para modificar as propriedades fotofísicas das porfirinas (WU et al., 2020). Estas combinações, de metais com porfirinas, podem resultar em uma atividade fisiológica aprimorada, desempenhando um papel importante no diagnóstico e tratamento de tumores superficiais. Estudos indicam que metais de transição possuem excelentes efeitos antitumorais (LUO, et. al., 2022), nessa lógica, a metalização com paládio demonstra amplificar ainda mais a produção de espécies reativas de oxigênio durante a terapia, aumentando assim o potencial terapêutico do composto (WU et al., 2020).

De modo a complementar, a combinação da PDT com outros tratamentos eficazes apresenta uma oportunidade promissora para melhorar a eficácia do tratamento do câncer (MOSADDAD et al., 2023), atuando de forma sinérgica para potencializar os efeitos anticancerígenos (OL'SHEVSKAYA et al., 2006). Além disso, a PDT como terapia combinada oferece várias vantagens, como baixa morbidade a longo prazo, efeitos sistêmicos mínimos, utilização de doses mais baixas de medicamentos e redução da citotoxicidade em tecidos saudáveis (MOSADDAD et al., 2023), tornando-a uma opção atraente para pacientes com diversas condições médicas ou impossibilitados de obter remoção cirúrgica.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que as porfirinas de paládio apresentam alta citotoxicidade para o melanoma humano quando expostas à luz. Isso as torna uma abordagem promissora para a terapia do câncer, caracterizando-se por baixos efeitos colaterais e por ser pouco invasiva, o que pode melhorar a qualidade de vida dos pacientes oncológicos. No entanto, mais estudos são necessários para compreender de maneira mais aprofundada o mecanismo de ação desses compostos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldea, I., Giurgiu, L., Teacoe, I. D., Olteanu, D. E., Olteanu, F. C., Clichici, S., & Filip, G. A. (2018). Photodynamic Therapy in Melanoma - Where do we Stand? **Current Medicinal Chemistry**, 25(40), 5540–5563. <https://doi.org/10.2174/0929867325666171226115626>
- Bezrookove, V., Kianian, S., McGeever, L., Jones, R., Caressi, C., Nosrati, M., Kim, K. B., Leong, S. P., Miller, J. R., 3rd, Desprez, P.-Y., & Kashani-Sabet, M. (2024). The molecular evolution of melanoma distant metastases. **The Journal of Investigative Dermatology**. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2024.03.029>
- Buranaamnuy, K. (2021). The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. **Open Veterinary Journal**, 11(2), 251–269. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i2.9>
- Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T., & Yang, Z. (2021). Photodynamic therapy review: Principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics**, 13(9), 1332. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091332>
- Costa, L. D., e Silva, J. de A., Fonseca, S. M., Arranja, C. T., Urbano, A. M., & Sobral, A. J. F. N. (2016). Photophysical characterization and in vitro phototoxicity evaluation of 5,10,15,20-tetra(quinolin-2-yl)porphyrin as a potential sensitizer for photodynamic therapy. **Molecules**, 21(4), 439. <https://doi.org/10.3390/molecules21040439>
- Dzwierzynski, W. W. (2021). Melanoma risk factors and prevention. **Clinics in Plastic Surgery**, 48(4), 543–550. <https://doi.org/10.1016/j.cps.2021.05.001>
- Lee, C.-N., Hsu, R., Chen, H., & Wong, T.-W. (2020). Daylight photodynamic therapy: An update. **Molecules**, 25(21), 5195. <https://doi.org/10.3390/molecules25215195>
- Lee, H., Chen, S. K., Gautam, N., Vine, S. M., He, M., Desai, R. J., Weinblatt, M. E., Glynn, R. J., & Kim, S. C. (2023). Risk of malignant melanoma and non-melanoma skin cancer in rheumatoid arthritis patients initiating methotrexate versus hydroxychloroquine: a cohort study. **Clinical and Experimental Rheumatology**, 41(1), 110–117. <https://doi.org/10.55563/clinexprheumatol/staplf>
- Luo, H., Yu, W., Chen, S., Wang, Z., Tian, Z., He, J., & Liu, Y. (2022). Application of metalloporphyrin sensitizers for the treatment or diagnosis of tumors. **Journal of Chemical Research**, 46(2), 174751982210909. <https://doi.org/10.1177/17475198221090914>
- Mahajan, P. G., Dige, N. C., Vanjare, B. D., Phull, A. R., Kim, S. J., Hong, S.-K., & Lee, K. H. (2018). Synthesis, photophysical properties and application of new porphyrin derivatives for use in photodynamic therapy and cell imaging. **Journal of Fluorescence**, 28(4), 871–882. <https://doi.org/10.1007/s10895-018-2264-x>
- Mkhobongo, B., Chandran, R., & Abrahamse, H. (2021). The role of Melanoma Cell-Derived Exosomes (MTEX) and Photodynamic Therapy (PDT) within a tumor microenvironment. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(18), 9726. <https://doi.org/10.3390/ijms22189726>
- Mosaddad, S. A., Mahootchi, P., Rastegar, Z., Abbasi, B., Alam, M., Abbasi, K., Fani-Hanifteh, S., Amookhteh, S., Sadeghi, S., Soufdoost, R. S., Yazdanparast, M., Heboyan, A., Tebyaniyan, H., & Fernandes, G. V. O. (2023). Photodynamic therapy in oral cancer: A narrative review. **Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery**, 41(6), 248–264. <https://doi.org/10.1089/photob.2023.0030>
- Ol'shevskaya, V. A., Zaitsev, A. V., Luzgina, V. N., Kondratieva, T. T., Ivanov, O. G., Kononova, E. G., Petrovskii, P. V., Mironov, A. F., Kalinin, V. N., Hofmann, J., & Shtil, A. A. (2006). Novel boronated derivatives of 5,10,15,20-tetraphenylporphyrin: synthesis and toxicity for drug-resistant tumor cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14(1), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2005.07.067>
- Park, J. M., Hong, K.-I., Lee, H., & Jang, W.-D. (2021). Bioinspired applications of porphyrin derivatives. **Accounts of Chemical Research**, 54(9), 2249–2260. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.1c00114>
- de Oliveira, K. T.; de Souza, J. M.; Gobo, N. R. S.; de Assis, F. F.; Brocksom, T. J. (2014). Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**.
- Zhou, B., Zhang, J.-Y., Liu, X.-S., Chen, H.-Z., Ai, Y.-L., Cheng, K., Sun, R.-Y., Zhou, D., Han, J., & Wu, Q. (2018). Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote melanoma cell pyroptosis. **Cell Research**, 28(12), 1171–1185. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0090-y>