

## ANÁLISE *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE DE PORFIRINAS DE PALÁDIO EM MELANOMA ORAL CANINO SOB TERAPIA FOTODINÂMICA

JOÃO VICTOR FERNANDES MARCOS<sup>1</sup>; BRUNA SILVEIRA PACHECO<sup>2</sup>;  
VALENTINA GESSINGER FERREIRA<sup>3</sup>; MARIA EDUARDA EHLERT<sup>4</sup>;  
BERNARDO A. IGLESIAS<sup>5</sup>; TIAGO VEIRAS COLLARES<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade federal de pelotas – marcosvictorjoao5@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade federal de pelotas – pacheco.sbruna@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade federal de pelotas – valentinagessinger@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade federal de pelotas – dudaaehlert1@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade federal de pelotas – bernardopgq@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade federal de pelotas – tiago.collares@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença de incidência global e surge por meio de fatores genéticos e ambientais, alguns indivíduos são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores em função de alterações no seu Ácido Desoxirribonucleico (DNA) (ALEXANDROV et al., 2018). O cenário da doença é crescente para os anos de 2023, 2024 e 2025 de acordo com Instituto Nacional de Câncer (INCA), com 8.980 novos casos de melanoma por ano. De forma análoga aos seres humanos, o câncer é uma das principais causas de morte entre os cães (ADAMS et al., 2010). O melanoma maligno oral (MMO) é um tumor agressivo que tem origem nos melanócitos, células produtoras de melanina. O melanoma oral canino é frequente entre cães adultos e idosos, representando cerca de 35% das malignidades orais caninas. A letalidade da doença é evidenciada pelo alto potencial metastático, se espalhando para outros órgãos, como pulmões e linfonodos, prejudicando funções vitais, levando ao comprometimento da qualidade de vida e eventual morte do animal (SMITH et al., 2002).

Atualmente, as opções de tratamento do MMO incluem: cirurgia, quimioterapia, radioterapia, imunoterapia e terapia-alvo. Esse tipo de câncer é identificado através da observação clínica de manchas ou pintas escuras localizadas em várias regiões da boca, incluindo mucosa labial, gengiva, palato ou língua. Além disso, o diagnóstico é complementado por biópsia da lesão para análise histopatológica. Dessa forma, a pesquisa de novas estratégias de tratamento é interessante tanto para melhorar o prognóstico dos cães acometidos pela doença, como, também, para fornecer pistas acerca dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento da doença em humanos (GILLARD et al., 2013).

Neste sentido, a terapia fotodinâmica (TFD) representa uma abordagem moderna, pouco invasiva e mais seletiva no tratamento de neoplasias malignas. O processo se baseia na administração de fotossensibilizadores, que ao serem estimulados pela luz, em comprimento de onda específico, exibem atividade contra células cancerígenas. Os danos causados advêm da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS), capazes de comprometer proteínas, lipídeos e outras moléculas importantes presentes no citoplasma (KESSEI et al., 2010).

Os EROS são os causadores do estresse oxidativo, possibilitado pela ação de compostos, como as porfirinas. Além disso, as espécies reativas são capazes de interagir com diferentes componentes celulares. Estudos demonstram que a modificação das porfirinas com metais de transição intensificam o estresse oxidativo na célula tumoral (WU et al., 2020). As porfirinas, compõe processos biológicos vitais, como o transporte de oxigênio no sangue. Ao longo dos anos, diversos candidatos a fotossensibilizadores vem sendo avaliados no tratamento

do câncer, na década de 70 já haviam pesquisas com hematoporfirinas derivadas das porfirinas. Em 1995, Dr. Thomas Dougherty e seu grupo obtiveram pela primeira vez a aprovação do Food And Drug Administration (FDA) para o uso do PHOTOFRIN® no tratamento de alguns cânceres, como o de pulmão e esôfago. Diferentes íons metálicos podem ser associados a estrutura química tetrapirrólica das porfirinas, levando a combinações que exibem resultados antitumorais promissores (LUO et al., 2022).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi a avaliação *in vitro* da ação citotoxicidade de três porfirinas associadas ao metal paládio (Pd) em uma linhagem celular de melanoma oral canino (CMDG5), no qual a avaliação da citotoxicidade dos compostos foi realizada através do ensaio de viabilidade celular.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1. Fotossensibilizadores Porfirínicos de Paládio

O Laboratório de Bioinorgânica e Materiais Porfirínicos (LBMP), pertencente à Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), foi responsável pela síntese e caracterização das Porfirinas de Paládio. Os compostos de fórmula química  $C_{184}H_{146}Cl_4N_8P_8Pd_4^{4+}$ ,  $C_{176}H_{138}Cl_4Fe_4N_8P_8Pd_4^{4+}$  e  $C_{168}H_{190}Cl_8N_{20}Pd_4^{4+}$  foram nomeados como 3-Pd(PPh<sub>3</sub>), 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PEPSI), respectivamente. As porfirinas avaliadas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO).

### 2.2. Cultivo Celular

A linhagem celular de melanoma oral canino (CMDG5) foi cultivada em meio Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). O cultivo celular foi mantido em incubadora umidificada em condições controladas de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### 2.3. Grupos Experimentais e Ensaio Fotodinâmica

Para este estudo foram criados dois grupos experimentais: grupo com a presença de luz (claro) e grupo com ausência de luz (escuro). Dessa forma, após 24 horas do plaqueamento das células, cada grupo foi tratado com sete diferentes concentrações das três porfirinas de paládio (100, 50, 28, 14, 7, 3,75 e 1,7nM). Os fotossensibilizadores são ativados pela luz, assim, o grupo de exposição à luz passou por uma sessão de fototerapia. Nessa terapia, as porfirinas foram submetidas à luz branca com comprimento de onda entre 400 e 800 nm, proveniente de um sistema de lâmpada LED de 100 W a uma taxa de 50 mW/cm<sup>2</sup>, durante os 30 minutos a uma distância de 15 cm da placa de cultivo (totalizando uma dose de luz de 45 J/cm<sup>2</sup>). Após essa exposição à luz, as placas foram recolocadas na incubadora e em 24 horas depois a avaliação de citotoxicidade foi realizada.

### 2.4. Ensaio colorimétrico de MTT (Ensaio de Proliferação Celular)

O Ensaio de MTT se baseia na conversão do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio de cor amarela em cristais de formazan de cor azul-púrpura a depender da atividade metabólica das mitocôndrias de células viáveis. Através da medição da absorbância a 492 nm por espectrofotometria foi possível identificar a porcentagem de células vivas após o tratamento.

As células da linhagem CMDG5 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, com  $1,0 \times 10^4$  células por poço, usando diferentes concentrações dos compostos. Controles incluíram meio de cultura como controle negativo e meio de cultura com DMSO na maior concentração dos compostos (com concentração <0,5%) por poço como controle do veículo. Após 24 horas de ativação das substâncias por fototerapia, o sal MTT foi adicionado a cada poço na

concentração de 5 mg/mL. A absorbância foi medida com um espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader) e o percentual de inibição do crescimento foi calculado pela fórmula: %inibição (Absorbância das células tratadas / Absorbância das células de controle) x 100.

## 2.6. Análise estatística

As análises foram realizadas com ANOVA de uma via e para distinguir grupos, foi aplicado o pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. Todas as análises estatísticas foram conduzidas usando o software GraphPad Prism 8, com um nível de significância estatística definido em  $p < 0,05$ .

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os valores de  $IC_{50}$  obtidos a partir dos grupos (Tabela 1) pode-se inferir que as porfirinas mais promissoras foram 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PPh<sub>3</sub>), respectivamente, apresentando alta citotoxicidade nas células testadas. Em comparação, a porfirina 3-Pd(PEPSI) apresentou resultados menos eficazes, sendo necessária uma dose maior do composto para inibir a proliferação celular em 50%. Valores distintos podem ocorrer devido à constituição das porfirinas de paládio, que varia em um aspecto: o ligante coordenado ao paládio. Sendo assim, a porfirina 3-Pd(PPh<sub>3</sub>) apresenta o elemento fósforo como ligante coordenado, 3-Pd(dppf) possui ferro e 3-Pd(PEPSI) não apresenta nenhum ligante. A escolha do metal associado é importante, pois diferentes íons vem demonstrando resultados promissores, como o ferro (Fe) que desempenha um papel notório no aumento do estresse oxidativo (ZHOU et al., 2018).

Porfirina	$IC_{50}$ (nM)
3-Pd (PPh <sub>3</sub> )	19,92 ± 3,17
3-Pd (dppf)	19,03 ± 5,285
3-Pd (PEPSI)	48,85 ± 14,41

**Tabela 1.** Valores de  $IC_{50}$  dos compostos 3-Pd(PPh<sub>3</sub>), 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PEPSI) após terapia fotodinâmica na linhagem CMDG5.

Com base nos valores das absorbâncias, o percentual de inibição da proliferação celular pela ação dos compostos foi representado nos grupos claro e escuro. Os resultados gerados exibem valores de inibição para cada uma das sete concentrações testadas neste estudo. Resultados obtidos a partir dos grupos não expostos à luz (escuro) demonstraram valores de inibição abaixo de 20% em todos os compostos, indicando que a inibição verificada no grupo claro ocorre devido à ativação das porfirinas aplicadas como fotossensibilizadores na linhagem de melanoma oral canino. Assim, as porfirinas submetidas a fototerapia demonstram potencial antitumoral e seletividade por células neoplásicas (FIGGE et al, 1948). As porfirinas se ligam às células cancerígenas, sua capacidade de se acumular seletivamente em células tumorais, interagir com DNA e proteínas as tornam bons candidatos a fotossensibilizadores na terapia fotodinâmica (NISHIDA et al., 2021).

Diversas pesquisas sugerem que a terapia fotodinâmica é eficaz na redução da inflamação periodontal, no tratamento de feridas infectadas e na melhora da osseointegração em cães, com estudos também indicando seu potencial em oncologia veterinária (GUIMARÃES et al., 2022), a escolha do fotossensibilizador

deve levar em consideração características, como alta produção de EROS na presença de luz, boa absorção de luz no espectro terapêutico, seletividade e baixa toxicidade na ausência de luz, como foi verificado no grupo escuro do presente estudo. Além disso, as formas de aplicação do composto mais comuns em cães e gatos incluem: via intravenosa e administração oral. Abordagens como o uso tópico podem apresentar contraindicação dependendo do caráter hidrofílico ou hidrofóbico do medicamento. Dessa forma, a porfirina de paládio sintetizada, 3-Pd(dppf), demonstra ser um fotossensibilizador promissor para futuras análises complementares.

#### 4. CONCLUSÕES

Com isso, o presente estudo conclui a análise *in vitro* da citotoxicidade de porfirinas de paládio em células de melanoma oral canino. O composto 3-Pd(dppf) representa um potencial candidato a fotossensibilizador para a terapia do câncer em cães acometidos pelo melanoma maligno oral. Futuras pesquisas relacionadas ao mecanismo de ação exato são necessárias para complementar a avaliação da eficácia do tratamento e abrir portas para disponibilização de mais uma alternativa aos fotossensibilizadores convencionais utilizados na terapia fotodinâmica.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDROV, L. et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature*, v. 578, pp. 94-101, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1943-3>.
- SOCIEDADE BRASILEIRA DE CIRURGIA ONCOLÓGICA. O que é melanoma e como identificar uma suspeita de melanoma?. Acessado em: 24 conjuntos. 2024. ADAMS, VJ et al. Métodos e resultados de mortalidade de uma pesquisa de saúde de cães de raça pura no Reino Unido. *The Journal of Small Animal Practice*, v. 10, pp. 512-524, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00974.x>.
- SMITH, S. H.; GOLDSCHMIDT, M. H.; McMANUS, P. M. A comparative review of melanocytic neoplasms. *Veterinary Pathology*, v. 39, n. 6, p. 651-678, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1354/vp.39-6-651>.
- GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 27, n. 1, p. 90-102, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12170>
- KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Photodynamic therapy and cell death pathways. *Methods in Molecular Biology*, v. 27, n. 1, p. 90-102, 2014. 635, p. 35- 46, 2010. DOI: 10.1007/978-1-60761-697-9\_3.
- LUO, H. et al. Application of metalloporphyrin sensitizers for tumor treatment or diagnosis. *Journal of Chemical Research*, v. 46, n. 2, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1177/17475198221090914>.
- ZHOU, B. et al. Tom20 senses iron-activated ROS signaling to promote pyroptosis of melanoma cells. *Cell Research*, v. 28, n. 12, p. 1171-1185, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0090>.
- FIGGE, F. H.; MANGANIELLO, L. O. Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 68, n. 3, p. 640, 1948. DOI: <https://doi.org/10.3181/00379727-68-16580>.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE. Melanoma skin. Accessed on: September 24, 2024.
- GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derived. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 1 Supl 2, p. 993-1026, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170811>.
- NISHIDA, K. et al. Evaluation of the correlation between porphyrin accumulation in cancer cells and functional positions for application as a drug carrier. *Scientific reports*, v. 11, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81725-3>.
- LARANJO, M. et al. Photodynamic therapy for canine and feline cancer treatment: a focus on photosensitizers. *Applied Sciences*, v. 12, n. 23, p. 12276, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/app122312276>.