

## ANÁLISE *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA DE BEXIGA HUMANO MEDIANTE TERAPIA FOTODINÂMICA COM PORFIRINAS DE PALÁDIO

VALENTINA GESSINGER FERREIRA<sup>1</sup>; BRUNA SILVEIRA PACHECO<sup>2</sup>;  
FERNANDA SEVERO SABEDRA SOUSA<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 – valentinagessinger@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – pachecosbruna@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – nandinha\_sousa4@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – dudaaehlert1@gmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Santa Maria – bernardopgg@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – tiago.collares@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer de bexiga (CB) é a forma mais frequente de câncer no sistema urinário e está entre os dez tipos de câncer mais prevalentes globalmente (BRAY et al., 2018). O CB pode ter origem no urotélio, que é o revestimento epitelial que recobre a superfície interna da bexiga. Essa forma de câncer é conhecida como carcinoma de bexiga e abrange cerca de 90% de todos os casos de câncer de bexiga (ASCO, 2020). Essa situação clínica requer vigilância ao longo da vida, tratamentos prolongados e está associada à resistência aos tratamentos quimioterápicos e imunoterapias disponíveis atualmente (SIEVERT et al., 2009).

Ademais, devido às taxas consideráveis de recorrência, o câncer de bexiga apresenta os maiores custos vitalícios de tratamento por paciente entre todos os tipos de câncer (MOSSANEN e GORE, 2014). Considerando esses fatores, torna-se crucial explorar novas abordagens terapêuticas capazes de atender eficazmente às demandas dos pacientes. Uma dessas abordagens, que têm recebido reconhecimento notável devido à sua abrangência e precisão, é a Terapia Fotodinâmica (PDT - do inglês *Photodynamic Therapy*).

Essa abordagem terapêutica tem sua base em três elementos centrais: a aplicação de sensibilizadores, a exposição à luz e a presença de moléculas de oxigênio. O mecanismo de ação é desencadeado pela ativação dos sensibilizadores através da luz, que transfere energia ao oxigênio, resultando na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas espécies danosas impactam os componentes celulares, levando, por fim, à morte das células (BROWN et al., 2004).

Dentre as moléculas capazes de atuarem como sensibilizadores em PDT, as porfirinas e seus derivados se destacam, sendo amplamente empregados nessa abordagem terapêutica (KEMPA et al., 2015). Além disso, visando aprimorar ainda mais essas estruturas, têm sido exploradas associações com compostos inorgânicos, como os complexos de paládio, que se revelam uma promissora via de amplificação da eficácia terapêutica (DENG et al., 2020).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos citotóxicos de porfirinas de paládio inéditas sob efeito da Terapia Fotodinâmica, em uma linhagem de carcinoma de bexiga humano. Ademais, também foi avaliada a expressão gênica para elucidar o possível mecanismo de ação destas moléculas no processo de morte celular.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1. Fotossensibilizadores Porfirínicos de Paládio

As Porfirinas de Paládio foram sintetizadas e caracterizadas pelo Laboratório de Bioinorgânica e Materiais Porfirínicos (LBMP) pertencente à Universidade Federal de Santa Maria. Os compostos com 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 neste estudo foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO).

## 2.2 Cultivo Celular

A linhagem celular de carcinoma de células de transição de bexiga classe II (5637) foi cultivada em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) obtido da *Vitrocell Embriolife* (Campinas, Brasil). As células foram mantidas em atmosfera controlada, com 37 °C em estufa umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.3. Grupos Experimentais e Ensaio Fotodinâmico

A metodologia para a realização do experimento foi seguida de acordo com a publicação prévia de nosso grupo de pesquisa (COUTO et al.,2020). Foram criados dois grupos experimentais: grupo com a presença de luz (claro) e grupo na ausência de luz (escuro). Sendo assim, após 24 horas do plaqueamento, cada grupo foi tratado com sete diferentes concentrações (200, 100, 50, 28, 14, 7 e 3,5 nM) das três porfirinas de paládio. 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, 24 horas depois, os testes subsequentes foram realizados.

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

Foi realizado um teste MTT, que se baseia na transformação 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, dependendo da atividade metabólica das células vivas. A porcentagem de células vivas foi determinada medindo a absorbância a 492 nm em um espectrofotômetro (Thermo Plate TP-Reader).

As células da linhagem 5637 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços, com  $2,0 \times 10^4$  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 e o percentual de inibição do crescimento foi calculado pela fórmula: %inibição (Absorbância das células tratadas / Absorbância das células de controle) x 100.

## 2.5. Extração de RNA, confecção de cDNA e PCR em tempo real

Para a extração do RNA, as células foram inicialmente semeadas em placas de 6 poços, com uma densidade de  $5 \times 10^5$  células por poço, e mantidas em uma estufa por 24 horas para promover o crescimento em uma monocamada. Em seguida, o tratamento com o composto 3-Pd(PPh<sub>3</sub>) foi realizado a uma concentração de 7,929 nM. Após 24 horas, o tratamento com luz foi aplicado.

As células foram desaderidas dos poços usando o reagente TRIzol® e o RNA foi quantificado e avaliado quanto à concentração e pureza por espectrometria UV no aparelho NanoVue. Com base nesses resultados, o cDNA foi preparado com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). A avaliação da expressão dos genes da catalase (CAT), superóxido

dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPX) e b-actina (gene normalizador), foi conduzida por meio da amplificação desses genes com primers específicos, utilizando a técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR).

## 2.6. Análise estatística

As análises comparativas foram realizadas com ANOVA de duas vias 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

### 3.1. Porfirinas de Paládio como promissoras opções para Fototerapia

Por meio do ensaio colorimétrico MTT, observou-se que as três porfirinas de paládio no grupo exposto à luz demonstraram alta atividade citotóxica. Como resultado, foram obtidos os valores de  $IC_{50}$  para esses compostos, conforme apresentado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de  $IC_{50}$  das moléculas 3-Pd(PPh<sub>3</sub>), 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PEPSI) após 24 horas de exposição à luz na linhagem 5637.

Porfirina	$IC_{50}$ (nM)
3-Pd (PPh <sub>3</sub> )	7,929
3-Pd (dppf)	15,79
3-Pd (PEPSI)	36,48

Ademais, é importante destacar que todas as concentrações das porfirinas de paládio do grupo não exposto à luz (escuro) apresentaram uma inibição de crescimento significativamente inferior a 50%. Isso evidencia a eficácia dos fotossensibilizadores na fototerapia. A fim de proteger futuras publicações do grupo, os dados completos serão apresentados somente durante o evento.

A distinção principal entre essas porfirinas de paládio reside no tipo de ligante que está coordenado ao íon de paládio em suas estruturas. No caso do 3-Pd(PPh<sub>3</sub>), a coordenação ocorre com átomos de fósforo, enquanto no 3-Pd(dppf), a coordenação envolve átomos de ferro. Por outro lado, o 3-Pd(PEPSI) não possui ligantes coordenados.

Como já mencionado, o teste MTT é utilizado para avaliar a proliferação celular, pois a taxa de conversão de MTT em formazan está diretamente ligada à atividade metabólica celular, uma vez que a conversão a formazan é realizada por enzimas mitocondriais. Portanto, o composto 3-Pd(PPh<sub>3</sub>), que demonstrou o menor  $IC_{50}$ , foi selecionado para avançar nas próximas etapas experimentais.

### 3.2. Porfirina 3-Pd(PPh<sub>3</sub>) promove a geração de estresse oxidativo intracelular.

Na análise de qRT-PCR, foi evidenciado um aumento significativo na expressão relativa dos genes CAT, SOD e GPX, como indicado na Tabela 2. Esses resultados estão em concordância com o mecanismo de ação da terapia fotodinâmica (PDT). Conforme discutido previamente por Brown et al. (2004), as espécies reativas de oxigênio (ROS) exercem um papel crucial como agentes citotóxicos, interagindo com os componentes celulares e provocando danos que, em última instância, resultam na morte das células e na destruição do tumor.

Além disso, o composto que apresenta a maior citotoxicidade possui átomos de fósforo ligados ao íon de paládio presente na porfirina. Isso apoia

estudos que mostram que a ligação de porfirinas ao fósforo pode amplificar seus efeitos antitumorais e citotóxicos (MATSUMOTO et al., 2017).

Sendo assim, a inédita porfirina de paládio sintetizada demonstra ser um fotossensibilizador promissor, com alta expressão das enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no grupo sujeito à luz, enquanto essa expressão permanece baixa no grupo não exposto à luz. Assim, indicando a ausência de atividade citotóxica significativa onde a luz não é aplicada e reforçando a ideia de que esse tratamento é altamente seletivo e direcionado para as células neoplásicas.

**Tabela 2.** Valores da expressão relativa dos genes envolvidos na rota de estresse oxidativo em células de carcinoma de bexiga humano (5637).

Gene	Expressão Relativa			
	Tratado		Controle	
	Clara	Escura	Clara	Escura
<b>Catalase</b>	2,57 <sup>c</sup>	0,08 <sup>b</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>Superóxido Dismutase</b>	2,37 <sup>b</sup>	0,915 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
<b>Glutaçiona Peroxidase</b>	3,7 <sup>b</sup>	0,4 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>

Diferentes letras sobreescritas indicam diferença estatística entre os diferentes grupos do mesmo gene.

#### 4. CONCLUSÕES

Neste estudo, analisamos a citotoxicidade e a expressão gênica relacionada ao estresse oxidativo intracelular em células de carcinoma de bexiga humano submetidas à terapia fotodinâmica com porfirinas de paládio. Este trabalho permitiu confirmar que estas porfirinas de paládio, ativam a rota de estresse oxidativo, mecanismo clássico de ação da PDT. Com isso, mais estudos são necessários a fim de elucidar possíveis outras rotas envolvidas. Além disso, nossos resultados podem contribuir para o avanço da pesquisa em Terapia Fotodinâmica como uma abordagem promissora no tratamento do câncer, devido à sua capacidade de ação localizada, que resulta da resposta específica à luz.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCO. Bladder Cancer: Introduction. Cancer.Net, Alexandria, dez. 2021 Acessado em 20 ago.2023. Online. Disponível em <https://www.cancer.net/cancer-types/bladder-cancer/introduction>.
- BRAY, F. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Atlanta, v.68, n.6, p.394-424, 2018.
- BROWN, S. B. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **The Lancet Oncology**, Londres, v.5, p.497-508, 2004.
- DENG, J.; WU, F.; LI, H.; Yang, M. Palladium Porphyrin Complexes for Photodynamic Cancer Therapy: Effect of Porphyrin Units and Metal. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, 2020.
- KEMPA, M.; KOZUB P.; RATUSZNA A. Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Amsterdã v.146, p.249-254, 2015.
- MOSSANEN, M; GORE, J. L. The burden of bladder cancer care: direct and indirect costs. **Current Opinion in Urology**, Filadélfia, v.24, n.5, p.487-491, 2014.
- SIEVERT K. D. Economic aspects of bladder cancer: what are the benefits and costs?. **World Journal of Urology**, Heidelberg, v.27, p.295-300, 2009.
- COUTO, G. K. Tetra-cationic platinum(II) porphyrins like a candidate photosensitizers to bind, selective and drug delivery for metastatic melanoma. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, Amsterdã, v.202, 2020.
- MATSUMOTO, J. Photodynamic therapy of human biliary cancer cell line using combination of phosphorus porphyrins and light emitting diode. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Amsterdã, v.25, p.6536-6541, 2017.