

TESTES PRÉ-CLÍNICOS DE ONCOFOTOSSENSIBILIZADORES INOVADORES EM CARCINOMA TRANSICIONAL DE BEXIGA HUMANO

VALENTINA GESSINGER FERREIRA¹; MARIA EDUARDA EHLERT²; BRUNA SILVEIRA PACHECO³; BERNARDO A. IGLESIAS⁴; TIAGO VEIRAS COLLARES⁵.

¹Universidade Federal de Pelotas – valentinagessinger@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – pachecosbruna@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – dudaaehlert1@gmail.com

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

⁵Universidade Federal de Pelotas – tiago.collares@ufpel.edu.br

1. DESCRIÇÃO DA INOVAÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT - do inglês *Photodynamic Therapy*) emerge como uma abordagem terapêutica altamente promissora no tratamento do câncer, despertando interesse em diversas áreas médicas, tais como dermatologia, oncologia e urologia (COUTO et al., 2020). Este interesse é justificado pela sua alta seletividade celular, limitada suscetibilidade à resistência a medicamentos e menor incidência de efeitos adversos em comparação com as formas convencionais de tratamento (WANG et al., 2023). Essa modalidade terapêutica tem sua base em três elementos centrais: a aplicação de fotosensibilizadores (PSs - do inglês *photosensitizer*), a exposição à luz e a presença de moléculas de oxigênio. O mecanismo de ação é desencadeado pela ativação dos PSs 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 à morte das células (TEEUWEN et al., 2022).

Dentre essas moléculas capazes de atuarem como PSs na PDT, as porfirinas se destacam, sendo amplamente empregadas nessa abordagem terapêutica (DENG et al., 2020). As porfirinas possuem características como baixa toxicidade, alta afinidade por células tumorais e fotoestabilidade. Ao absorverem luz na região específica do espectro eletromagnético, são capazes de gerar ROS, tornando-as altamente eficazes em terapias contra o câncer (TSOLEKILE et al., 2019). Além disso, com o objetivo de potencializar ainda mais essas características, têm-se explorado as metaloporfirinas, associações das porfirinas com íons metálicos em suas estruturas (MONTASERI et al., 2020). Essas metaloporfirinas, assim como as ligadas a complexos de paládio, emergem como uma via promissora para amplificar a sua eficácia terapêutica (DENG et al., 2020).

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi realizar as etapas iniciais dos testes pré-clínicos *in vitro* com protótipos inéditos de oncofotosensibilizadores, utilizando a Terapia Fotodinâmica (PDT) em uma linhagem celular de carcinoma transicional de bexiga humano (RT-4). Os oncofotosensibilizadores investigados são porfirinas de paládio (3-Pd(PPh₃), 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PEPSI)), sintetizados e caracterizados pelo Laboratório de Bioinorgânica e Materiais Porfirínicos da UFSM. A principal diferença entre essas porfirinas está no tipo de ligante coordenado ao íon paládio: no 3-Pd(PPh₃), a coordenação ocorre por átomos de fósforo, no 3-Pd(dppf), envolve átomos de ferro, enquanto no 3-Pd(PEPSI), não há a presença de ligantes.

2. ANÁLISE DE MERCADO

2.1. Mercado e Concorrência - Fotossensibilizadores

Os PSs clinicamente aprovados para a PDT são predominantemente compostos tetrapirróis cíclicos, como porfirinas, clorinas e bacterioclorinas (BASKARAN et al., 2018). Entre os PSs mais estudados, o Photofrin® (*Porfimer*

sodium; *Axcan Pharma, Inc*) foi um dos primeiros agentes de PDT aprovados para uso clínico. Apesar de seu uso extenso, o Photofrin® possui desvantagens, como baixa solubilidade em água e fototoxicidade no escuro (TEEUWEN et al., 2022). Em contraste, o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) tem ganhado destaque como uma alternativa preferencial na PDT devido à sua fotoestabilidade, solubilidade em água e não toxicidade. No entanto, o 5-ALA também enfrenta desafios, como o desenvolvimento de resistência pelas células tumorais, limitando sua eficácia a longo prazo (EBRAHIMI et al., 2024). Isso ressalta a necessidade de desenvolver novos PSs que superem as limitações dos agentes atuais.

O uso de complexos metálicos de transição tem se destacado na PDT devido ao seu potencial terapêutico (LI et al., 2020). Um exemplo são as bacterioclorinas contendo paládio, Tookad® e TOOKAD®Soluble (*Palladium bacteriopheophorbide*, *Negma Lerads/Steba Biotech*), que são PSs em fase III de testes clínicos para câncer de próstata, que exibem vantagens na PDT, comparados com seus análogos sem metais (PUCELIK et al., 2020). Portanto, a exploração de complexos metálicos, como os de paládio, pode abrir novas possibilidades terapêuticas, proporcionando alternativas promissoras para o desenvolvimento de oncofotossensibilizadores mais eficazes.

2.2. Câncer de Bexiga e Terapia Fotodinâmica

O câncer de bexiga (CB) é classificado como a décima neoplasia mais comum e a décima terceira causa de mortalidade por câncer globalmente (RICHTERS et al., 2019). No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer para o triênio 2023-2025 indicam uma taxa de 5,25 casos por 100 mil habitantes (INCA, 2023). Os carcinomas uroteliais representam o tipo histológico mais comum de CB, correspondendo a mais de 90% dos casos dessa neoplasia. O CB pode ser dividido em dois subtipos principais: não músculo invasivo (NMIBC) e músculo invasivo (MIBC) (ASCO, 2021). O MIBC é conhecido por ser mais agressivo e fatal em comparação ao NMIBC. No entanto, os pacientes com NMIBC enfrentam altas taxas de recorrência tumoral após o tratamento, afetando cerca de 70% dos indivíduos (KAUFMAN et al., 2009). Isso implica em desafios clínicos e financeiros, uma vez que o CB possui um dos maiores custos vitalícios de tratamento por paciente em comparação com outros tipos de câncer, totalizando 3,6 bilhões de euros nos EUA e 5 bilhões de euros na Europa por ano (MOSSANEN et al., 2014). Esse cenário é resultado das elevadas taxas de recorrência em pacientes com NMIBC, das estratégias rigorosas de vigilância e dos custos associados ao tratamento (RICHTERS et al., 2019).

A PDT tem mostrado ser uma opção promissora para o tratamento do câncer de bexiga, particularmente em casos de NMIBC (AEBISHE et al., 2024). Ensaios clínicos relataram taxas de resposta terapêutica variando entre 50% e 80% ao se utilizar diferentes PSs, como a hematoporfirina derivada (HpD), um precursor do Photofrin®, em carcinomas superficiais de bexiga (PROUT et al., 1987). Embora a recorrência da doença seja comum, a PDT tem demonstrado potencial significativo no manejo tanto do câncer de bexiga superficial quanto do carcinoma *in situ* (D'HALLEWIN et al., 1995). Além disso, estudos comparativos com o Bacilo Calmette-Guérin (BCG), atualmente padrão ouro para tratamento de NMIBC, sugerem que a PDT pode ser igualmente eficaz (AEBISHE et al., 2024).

3. ESTRATÉGIA DE DESENVOLVIMENTO E IMPLEMENTAÇÃO

No Brasil, em 2023, o Ministério da Saúde incorporou a Terapia Fotodinâmica no SUS, com o PS metil-ALA, para pacientes com câncer de pele basocelular superficial e nodular, o tipo de câncer mais comum no país. Com baixo custo e produção simples, essa incorporação foi recomendada pela

Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS (Conitec), que a destacou como uma alternativa segura e eficaz. Estudos avaliados pela Conitec mostraram que o tratamento foi eficaz a longo prazo, eliminando 85% dos tumores sem efeitos colaterais graves. Esses avanços foram derivados do projeto "Terapia Fotodinâmica Brasil" (TFD), iniciado em 2012 na USP que envolveu diversas instituições de pesquisa, empresas e hospitais, com o objetivo de tornar a técnica aplicável em larga escala. O financiamento veio de várias fontes, incluindo o BNDES e a FINEP, em parceria com o Ministério da Saúde. Esse projeto se tornou um case de sucesso ao ser a primeira tecnologia universitária incorporada ao SUS, um exemplo de inovação tecnológica no país (GOV, 2023).

No desenvolvimento de novos protótipos de oncofotossensibilizadores, como as porfirinas de paládio, o modelo de negócios integra pesquisa e desenvolvimento com parcerias na indústria farmacêutica, centros oncológicos e, o Ministério da Saúde por meio do projeto TFD. A colaboração do TFD e o SUS oferece uma base sólida para a implementação da nova tecnologia, aproveitando a estrutura já estabelecida no sistema público. Além disso, essas parcerias incentivam financeiramente a continuidade dos ensaios pré-clínicos, garantindo o avanço das pesquisas até fases mais avançadas de desenvolvimento.

Os estudos pré-clínicos desempenham um papel crucial no desenvolvimento da Terapia Fotodinâmica (PDT), pois fornecem a base para avaliar o potencial terapêutico de novos candidatos a fármacos, como os oncofotossensibilizadores, antes de avançar para ensaios clínicos. A caracterização *in vitro* desses compostos é essencial para entender seu mecanismo de captação pelas células, localização intracelular, citotoxicidade na ausência de luz e fototoxicidade induzida pela iluminação, além dos modos de morte celular envolvidos. Esses estudos ajudam a otimizar os protocolos de PDT, avaliar a eficácia de combinações com outros agentes terapêuticos, fornecer subsídios essenciais para a realização dos testes *in vivo* e, posteriormente, a realização de testes clínicos (WIEHE & SENGE, 2022).

Neste estudo, realizamos a primeira fase dos testes pré-clínicos, com experimentos *in vitro* utilizando células de carcinoma transicional de bexiga humano. Para tal experimento foi cultivada a linhagem celular de carcinoma de células transicionais de bexiga de baixo grau (RT-4) que foi cultivada em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino e mantidas em uma estufa umidificada com 5% de CO₂ à 37 °C. A divisão de grupos experimentais e ensaio fotodinâmico foi realizado de acordo com a publicação prévia de nosso grupo de pesquisa (COUTO et al., 2020). O experimento foi dividido em dois grupos: um exposto à luz e outro mantido na ausência de luz, utilizando sete concentrações (200, 100, 50, 28, 14, 7 e 3,5 nM) das três porfirinas de paládio. O grupo exposto à luz foi submetido a fototerapia, no qual houve irradiação com luz branca (400 a 800 nm) gerada por um sistema de lâmpada LED de 100 W. A intensidade da luz foi de 50 mW/cm², por 30 min, a uma distância de 15 cm da placa de cultivo.

Para avaliação da citotoxicidade foi realizado o teste MTT conforme RISS et al. (2016), as absorvâncias foram medidas e análises foram realizadas com ANOVA de uma via e para distinguir grupos, foi aplicado o pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. As análises estatísticas foram conduzidas usando o software GraphPad Prism 8, com um nível de significância estatística definido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS ESPERADOS E IMPACTO

Os resultados do teste MTT revelaram a inibição da proliferação celular na linhagem RT-4, permitindo a determinação dos valores de IC₅₀ para os compostos

analisados. As porfirinas de paládio 3-Pd(PPh₃), 3-Pd(dppf) e 3-Pd(PEPSI) apresentaram atividades distintas, influenciadas pela presença de luz e pela estrutura de cada composto. A coordenação do íon de paládio com diferentes ligantes foi crucial para a atividade antiproliferativa. A porfirina 3-Pd(dppf) se destacou como a mais eficaz, com IC₅₀ de 14,34 nM, seguida por 3-Pd(PPh₃) (IC₅₀ de 16,68 nM) e 3-Pd(PEPSI) (IC₅₀ de 57,62 nM), sugerindo que ligantes de ferro amplificam a geração de ROS sob luz, resultando em uma maior citotoxicidade. A dependência da luz foi evidente, com atividade mínima no escuro.

Essas descobertas não apenas validam o potencial antitumoral dos compostos, mas também abrem caminho para estudos pré-clínicos mais aprofundados. A continuidade dessas investigações permitirá a avaliação de parâmetros mais complexos, como a resposta imunológica e a biodistribuição dos oncofotossensibilizadores, fornecendo subsídios para que, futuramente, esse protótipo seja elegível para testes *in vivo* e, em etapas posteriores, para ensaios clínicos. Essa progressão é fundamental para comprovar a eficácia e segurança em modelos mais próximos da realidade clínica, possibilitando a tradução dos resultados laboratoriais para o tratamento em pacientes.

5. CONCLUSÕES

A fase inicial dos testes pré-clínicos com porfirinas de paládio inéditas como oncofotossensibilizadores para uma linhagem celular de carcinoma transicional de bexiga humano demonstra grande potencial como produto tecnológico. Os resultados *in vitro* indicam elevada citotoxicidade em células tumorais, com eficácia significativa sob exposição à luz, além da ausência de fototoxicidade no escuro, uma característica fundamental para oncofotossensibilizadores. Além disso, esses experimentos, em conjunto com iniciativas como o projeto "Terapia Fotodinâmica Brasil", abrem o caminho para um alinhamento com as estratégias de saúde pública e subsídios financeiros, destacando o impacto positivo que essa tecnologia pode alcançar. Esse estudo mostra, de forma inicial, uma possível nova opção promissora de oncofotossensibilizador, oferecendo uma alternativa acessível e eficaz para as próximas fases de testes pré-clínicos, testes *in vivo* e, posteriormente, ensaios clínicos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- COUTO, G. K. et al. Perspectives of photodynamic therapy in biotechnology. *J Photochem Photobiol B*. 2020 Dec;213:112051.
- WANG, Y. et al. Theranostics with photodynamic therapy for personalized medicine: to see and to treat. *Theranostics*. 2023
- TSOLEKILE N. et al. Porphyrin as Diagnostic and Therapeutic Agent. *Molecules*. 2019 Jul 23;24(14):2669.
- MONTASERI, H. et al. Recent Advances in Porphyrin-Based Inorganic Nanoparticles for Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2020
- DENG, J. ; et al. Palladium Porphyrin Complexes for Photodynamic Cancer Therapy: Effect of Porphyrin Units and Metal. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2020.
- ASCO. Bladder Cancer: Introduction. *Cancer.Net*, Alexandria, dez. 2021.
- KAUFMAN, D. S.; et al. Bladder Cancer. *The Lancet*, 2009, 374, 239–249.
- MOSSANEN, M; GORE, J. L. The burden of bladder cancer care: direct and indirect costs. *Current Opinion in Urology*, Filadélfia, 2014.
- RICHTERS, A. et al. The global burden of urinary bladder cancer: an update. *World J Urol*. 2020
- EBRAHIMI, S. et al. Enhancing 5-ALA-PDT efficacy against resistant tumor cells: Strategies and advances. *Life Sci*. 2024
- BASKARAN, R. et al. Clinical Development of Photodynamic Agents and Therapeutic Applications. *Biomater. Res*. 2018
- TEEUWEN, P.C.P. et al. Metal Coordination Effects on the Photophysics of Dipyrinato Photosensitizers. *Molecules*. 2022
- LI, J.; et al. Transition Metal Complexes as Photosensitizers for Integrated Cancer Theranostic Applications. *Coord. Chem. Rev*. 2020.
- PUCELIK, B.; et al. Bacteriochlorins and Their Metal Complexes as NIR-Absorbing Photosensitizers: Properties, Mechanisms, and Applications. *Coord. Chem. Rev*. 2020, 416, 213340
- AEBISHER D, et al. Advances in Medicine: Photodynamic Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024.
- PROUT, G.R., et al. Photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative in the treatment of superficial transitional-cell carcinoma of the bladder. *N. Engl. J. Med*. 1987, 317, 1251–1255.
- D'HALLEWIN, M.A.; et al. Long-term results of whole bladder wall photodynamic therapy for carcinoma in situ of the bladder. *Urology* 1995.
- Gov.br. **Usuários do SUS com câncer de pele basocelular serão tratados com inovação 100% nacional**. Disponível em: <<https://www.gov.br/conitec/pt-br/assuntos/noticias/2023/julho/usuarios-do-sus-com-cancer-de-pele-basocelular-serao-tratados-com-inovacao-100-nacional>>.
- INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil. 2023.
- RISS, T.L et al. Cell Viability Assays. 2013 May 1 [Updated 2016 Jul 1]. In: Markossian S, Grossman A, Arkin M, et al., editors. *Assay Guidance Manual [Internet]*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- WIEHE, A; SENGE, M.O. The Photosensitizer Temoporfin (mTHPC) - Chemical, Pre-clinical and Clinical Developments in the Last Decade. *Photochem Photobiol*. 2023