

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Sophia Iwersen Faria

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE
PORFIRINAS DE BASE LIVRE E METALOPORFIRINAS DE Zn (II)**

Santa Maria, RS, Brasil

2023

This study was financed in part by the Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)
- Finance Code 001

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a).
Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central.
Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, SOPHIA FARIA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Sophia Iwersen Faria

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE PORFIRINAS DE
BASE LIVRE E METALOPORFIRINAS DE Zn (II)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Bioquímica Toxicológica**.

Aprovado em 06 de setembro de 2023:

Prof.º Dr.º André Passaglia Schuch presidente/orientador

Profª Drª Ana Lúcia Anversa Segatto (UFSM)

Profº Drº Bruno Stefanello Vizzoto (UFN)

Santa Maria

2023

AGRADECIMENTOS

Quando penso nesse projeto, não sou capaz de desassociá-lo de todos os momentos que vivi ao longo desses dois anos de mestrado. Desde o início da minha carreira acadêmica, ouvi que ninguém faz ciência sozinho. É pensando nisso que faço meus agradecimentos aqui, sem essas pessoas não seria capaz de realizar esse projeto de pesquisa, nem qualquer outra coisa.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a minha família. Minha mãe e meu pai, por terem criado a cientista que sou hoje, me acompanharem e ajudarem a chegar até aqui. A minha vó Silvia e meu vô Rubens, por sempre torcerem por mim. Vocês são a base que precisei para estar onde estou. A minha irmã, por estar sempre do meu lado, por me apoiar incondicionalmente, me defender quando achava necessário, por ser a pessoa que comemorava as minhas vitórias, meu ombro para chorar nas derrotas, e minha confidente nos momentos de angústia. Eu te amo tanto, Sassá.

Obrigada a todos os amigos que carrego da graduação até hoje. Por todos os momentos que passei com vocês e todas as trocas que tivemos. Fico muito feliz por vocês terem entrado na minha vida.

Preciso também agradecer muito a duas amigas que verdadeiramente se tornaram a minha família aqui. Não consigo me lembrar de como era minha vida antes de vocês estarem nela, Gabi e Ruth. Vocês me acolheram e se tornaram meu ponto de apoio e segurança. Não sei se consigo expressar o quanto sou grata a vocês e a tudo que a nossa amizade me proporcionou. Por me ouvirem falar dos meus experimentos, mesmo sem entender nada, me tirarem de casa quando não sabia que precisava, por me escutarem sem julgamento, por se preocuparem e se importarem comigo mesmo de longe. Vocês são, realmente, o Elemento X que eu precisava.

Ao Laboratório de Fotobiologia, que me proporcionou o melhor ambiente de trabalho que poderia imaginar, e a todos que passaram por ele nesses seis anos que estou lá. Tenho certeza que esse trabalho tem um pouco de cada um de vocês. Entre eles, Luana, minha parceirinha de porfirinas, com quem compartilhei vários dos perrengues que aconteceram

nesse tempo. Espero que saiba o quanto foi importante ter com quem dividir esses momentos. Ao Cassi e a Bruna, que passaram de colegas de laboratório a grandes amigos, todo carinho e cuidado que tiveram comigo nesses anos foi fundamental. Ao prof. André, que viu potencial e acreditou em mim muito antes que eu mesma. Muito obrigada pela atenção e cuidados dedicados ao meu trabalho, e pela confiança depositada em mim. Espero um dia ser um pouco da cientista que você é.

A minha psicóloga Amanda, pelo cuidado com a minha saúde mental durante esse período desafiador que é a pós-graduação.

“[...] Everything you lose is a step you take

So make the friendship bracelets

Take the moment and taste it

You've got no reason to be afraid [..]”

You're on Your Own, Kid

de Taylor Swift

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DE PORFIRINAS DE BASE LIVRE E METALOPORFIRINAS DE Zn (II)

AUTORA: Sophia Iwersen Faria

ORIENTADOR: Prof.º Dr.º André Passaglia Schuch

A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento com diversos benefícios, como poucos efeitos colaterais, facilidade de aplicação e possível combinação com outros tratamentos. Baseia-se na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por um fotossensibilizador (FS) após ser irradiado. Devido às suas muitas características desejáveis, as porfirinas são frequentemente usadas como FS em TFD. Alguns de seus atributos podem variar, influenciando sua interação com biomoléculas de interesse. Neste trabalho, quatro compostos foram estudados: TMePyP⁺, TPPS⁻, ZnTMe⁺ e ZnTTP⁻. Suas interações com o DNA foram avaliadas através de genotoxicidade, produção de EROs e citotoxicidade. Os resultados mostraram que as porfirinas catiônicas foram muito mais eficazes na indução de danos ao DNA, geração de EROs e redução da viabilidade celular do que as aniônicas. A adição de zinco teve pouco efeito sobre esses aspectos, mas fez com que a porfirina se tornasse mais seletiva para células tumorais. Assim, este estudo fornece informações sobre o papel que a carga e a adição de metal desempenham na interação com o DNA, e também demonstra que TMePyP⁺ e ZnTMe⁺ são candidatos promissores para uso como PS na TFD.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, porfirinas catiônicas, porfirinas aniônicas, Zn(II), dano ao DNA, melanoma.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF GENOTOXIC POTENTIAL OF FREE BASE PORPHYRINS AND Zn (II) METALLOPORPHYRINS

AUTHOR: Sophia Iwersen Faria

ADVISOR: Prof. Phd. André Passaglia Schuch

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment with several benefits, such as few side effects, ease of application and possible combination with other treatments. It is based on the production of reactive oxygen species (ROS) by a Photosensitizer (PS) upon irradiation. Due to their many desirable characteristics, porphyrins are often used as PS in PDT. Some of their attributes can vary, influencing its interaction with biomolecules of interest. In this work, four compounds were studied: TMePyP⁺, TPPS⁻, ZnTMe⁺ and ZnTTP⁻. Their interactions with DNA were evaluated through genotoxicity, ROS production and cytotoxicity. Results showed that cationic porphyrins were way more effective in inducing DNA damage, generating ROS and reducing cell viability than anionic ones. The zinc addition had little effect on those aspects, but caused the porphyrin to be selective towards tumours cells. Thus, this study provides insight on the role that charge and metal addition play in the interaction with DNA, and also that TMePyP⁺ and ZnTMe⁺ are promising candidates for use as PS in PDT.

Key words: Photodynamic therapy, cationic porphyrins, anionic porphyrins, Zn(II), DNA damage, melanoma.

LISTA DE ABREVIACOES

DNA- cido desoxiribonucleico

DSB- Quebra de fita dupla (Double strand breaks)

Endo III- Endonuclease III

EROs- Espécies reativas de oxigênio

Fe- Ferro

FI- DNA plasmidial na forma I, superenovelado

FII- DNA plasmidial na forma II, circular relaxado

Fpg- Formamidopirimidina-DNA glicosilase

FS- Fotossensibilizador

HpD- Derivado de hematoporfirina

Kpb- 1000 pares de base (1000 base pairs)

Mg- Magnésio

pCMUT- DNA plasmidial (~1,7 kbp) de E. Coli, C – resistência a cloranfenicol; MUT – gene *supF*, alvo para estudos de mutagnese

SSB- Quebra de fita simples (single strand breaks)

TFD- Terapia fotodinâmica

Zn- Zinco

SUMÁRIO

1.	Introdução	11
2.	Objetivos	
	2.1. Geral	15
	2.2. Especificos	15
3.	Materiais e Métodos	15
4.	Artigo	18
5.	Conclusão	34
6.	Perspectivas	34
	Referências	

1. Introdução

O uso da luz no tratamento de doenças se originou há séculos atrás. Há registros dos gregos usando o sol como agente terapêutico há 3000 anos, no que chamavam de helioterapia (O'Connor *et al*, 2009). A terapia fotodinâmica (TFD), como é usada atualmente, teve início em 1900. Em seus experimentos, Oscar Raab observou que, na exposição combinada do alaranjado de acridina e luz, suas culturas de *Paramecium caudatum* morriam. Entretanto, nenhum deles isoladamente gerava dano. Em 1094, von Tappeiner e Jodblauer fizeram mais experimentos, tratando culturas de *Paramecium* com anilina. Com isso, puderam observar reações que consumiam oxigênio. A partir desses experimentos, eles cunharam o termo “efeito fotodinâmico”. Um ano depois, Jesionek e von Tappeiner apresentaram resultados bem-sucedidos usando eosina 5% irradiada com luz artificial. O tratamento foi eficaz para algumas doenças, como câncer de pele não melanômico e lupus vulgaris. Com base nos resultados obtidos até o momento, os pesquisadores assumiram que a eosina, assim como o alaranjado de acridina, era absorvido pela célula e, após a irradiação e na presença de oxigênio, gerava uma cadeia de reações citotóxicas (Gold, 2016).

Atualmente a definição dada pelos pesquisadores segue sendo válida, com a TFD se baseando no uso de três elementos: a luz, um fotossensibilizador (FS) e oxigênio. Estes elementos combinados geram a morte celular através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). O FS é uma molécula sensível à luz, que desencadeia essa sequência de reações que levam a morte da célula. O processo, ilustrado na Figura 1, se inicia quando o FS, no seu estado fundamental singlete, é irradiado e recebe a energia de um fóton. Com isso, o FS passa do estado fundamental para um estado singlete excitado. Nessa configuração o FS é instável, por isso passa pelo cruzamento intersistêmico, atingindo um estado tripleto, mais estável e com uma meia vida um pouco maior. A partir desse ponto, há duas possíveis vias de reação que podem ocorrer. Na via do Tipo I, os elétrons são transferidos numa série de reações até chegar no O₂, gerando EROs. Na via de Tipo II, o FS transfere apenas energia para o O₂, por meio de colisões, e forma oxigênio singlete ¹O₂ (Abrahamse & Hamblin, 2016).

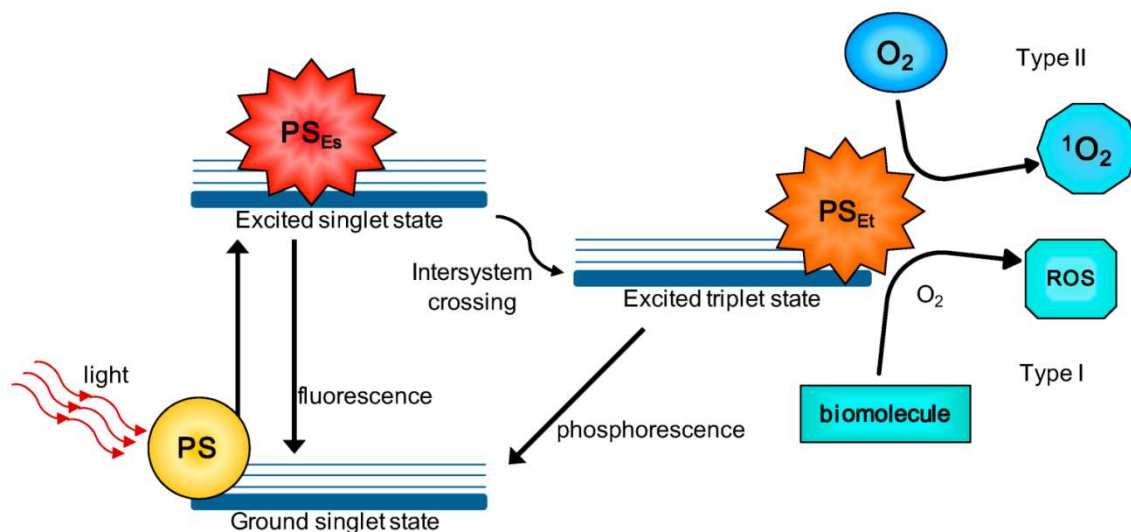


Figura 1- Diagrama de Jablonski ilustrando o mecanismo de ação da TFD. O fotossensibilizador (PS), inicialmente no seu estado fundamental, é irradiado e atinge a sua configuração singlete excitada. Ocorre então um cruzamento intersistêmico, e o PS passa para seu estado tripleto excitado. Neste ponto, há duas vias de reação possíveis: Na via tipo I, os elétrons são transferidos numa série de reações até chegar no O₂, gerando espécies reativas de oxigênio. Já na via do tipo II ocorre apenas à transferência de energia, gerando oxigênio singleto (¹O₂). (Calixto *et al*, 2016).

Usadas como FS desde os primórdios do estudo da TFD, as porfirinas são uma classe de moléculas que possuem sua estrutura composta por um macrociclo, formado por quatro anéis pirrólicos, ligados de forma coplanar por ligações metálicas (Figura 2). Essa estrutura causa a conjugação de 18 elétrons p, que conferem a aromaticidade da molécula. Além disso, as porfirinas também possuem um centro que comporta metais catiônicos. Elas ocorrem naturalmente e têm imensa importância tanto para manutenção da vida na Terra, como é o caso da clorofila, quanto dos seres humanos, pela hemoglobina. Novos compostos porfirínicos também vêm sendo sintetizados para diversos usos na área médica, como ressonância magnética, TFD e entrega de fármacos (Imran *et al*, 2018).

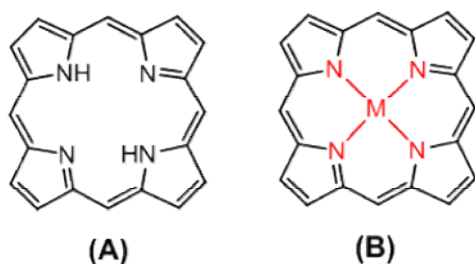


Figura 2- Estrutura básica de uma porfirina (A) e metaloporfirina (B).

Ao longo dos anos, diversos esforços foram feitos visando à melhoria dos FS. Alterações com o objetivo de torná-los mais seletivos para células tumorais ou fazendo-os mais eficazes na geração de ROS podem ser observadas, resultando em três gerações de FS com características distintas. A hematoporfirina e seus derivados foram amplamente utilizados no início da TFD e marcam a primeira geração de FS. O Photofrin, primeiro FS clinicamente aprovado, também pertence à primeira geração. Apesar de serem eficazes em alguns tipos de câncer, características como baixa absorção de luz na faixa terapêutica (630 nm), baixa solubilidade e, principalmente, fotossensibilidade prolongada nos pacientes tornaram seu uso menos atrativo. A segunda geração de FS foi desenvolvida a partir desse ponto, levando mais em conta fatores que influenciam na indução de danos, como a capacidade de geração de ROS (especialmente o 1O_2) e os níveis mínimos de energia para atingir a citotoxicidade. Eles também tendem a ser excitados em comprimentos de onda maiores, permitindo maior penetrância da luz e uma maior eficiência no tratamento. Os FS de segunda geração são, na maior parte, porfirinas, como as benzoporfirinas, texafirinas e a protoporfirina IX (PpIX). Atualmente, a terceira geração de FS é marcada pela combinação de FS e nanotecnologia para a entrega do composto. Esse é o caso, por exemplo, da Clorina e6 que foi incorporada a íons que aumentam sua absorção em células tumorais. (Kouet *al*, 2017; Gomes *et al*, 2018)

A eficácia da TFD é muito dependente do FS que será usado. Diversas características de um composto devem ser levadas em consideração para considerá-lo um bom FS. O composto precisa, por exemplo, ter sua síntese bem conhecida e feita de forma eficaz, além de ser um composto estável. Isso irá garantir que o FS seja mais acessível, já que pode ser produzido, transportado e armazenado facilmente. É de extrema importância, também, que o FS tenha uma acumulação seletiva em células doentes, seja facilmente eliminado dos tecidos saudáveis e tenha uma baixa toxicidade no escuro. Assim, pode causar o máximo de morte celular em células doentes, gerando o menor efeito colateral possível. Outro aspecto desejável é que ele não impeça o uso de outros tratamentos, como a quimioterapia, radioterapia e cirurgia, para que o paciente tenha uma ampla gama de recursos terapêuticos à sua disposição e receba o melhor tratamento possível (Allison & Sibata 2016).

Devido a sua grande importância na célula, o DNA é uma das biomoléculas de maior interesse para agentes terapêuticos. O esqueleto açúcar-fosfato confere ao DNA uma carga negativa, e a helicidade gera a existência de sulcos maior e menor. Essas estruturas proporcionam diversos sítios sensíveis a dano (Pages, 2015). A carga negativa do DNA explica o motivo de as porfirinas catiônicas terem ganhado maior atenção no ramo da TFD (Pratviel, 2016).

Características da molécula, tais como a carga, presença ou não de grupamentos externos, metais no centro e solubilidade precisam ser levadas em consideração ao definir seus usos, já que influenciam sua interação com biomoléculas (Pavani *et al*, 2009). Além da carga, a associação com metais é uma ferramenta amplamente utilizada para conferir diferentes características. Essa alteração pode gerar diversos benefícios, como maior estabilidade da pró-droga, uma meia vida de fluorescência maior ou mais precisão na localização intracelular. (McGhie & Aldrich-Wright, 2022). Além das propriedades dos grupamentos, sua posição na estrutura da porfirina também deve ser considerada. A forma como a porfirina é estruturada e a posição dos componentes afeta sua ação. Grupamentos externos, por exemplo, tem maior facilidade de interação do que o centro da porfirina. Assim, dois compostos contendo os mesmos metais em posições diferentes podem ter comportamentos distintos dentro da célula (Dąbrowski *et al*, 2016). A adição de metais no centro da porfirina também pode direcionar a geração de EROs, formando uma das espécies em maior quantidade. Há evidência de que a adição de Zn (II) ou Pd (II) ao centro de uma porfirina aumentou a produção do radical hidroxil. Em outro composto, a adição de Zn (II), Ni (II) ou Cu (II) diminuiu consideravelmente sua habilidade de clivar o DNA (Davids, 2013). Há indícios, também, de que o Zn torna a porfirina mais estável, e favorece a reação do tipo II na TFD (Araki, 2000). Além desses benefícios, o Zn é um metal facilmente encontrado na terra, e torna-se uma opção mais barata quando comparada com outros metais tipicamente usados na TFD e tratamentos para câncer (como a platina ou o rutênio) (Giannoudis *et al*, 2020). Ele também possui uma interação com o DNA já conhecida, pois é abundante na célula e está presente em estruturas associadas ao seu metabolismo (Deo *et al*, 2016).

A terapia fotodinâmica é minimamente invasiva, com resultados promissores em usos clínicos, além de apresentar poucos efeitos colaterais. Isso a torna um tratamento extremamente relevante, com diversas possibilidades de aplicações, isolada ou associada a outras terapias (Agostinis *et al.*, 2011). Estudos com foco investigativo, analisando os mecanismos de interação e indução de danos de DNA das porfirinas proporcionam uma base para aumentar a gama de fotossensibilizadores usados na TFD, além de torná-los cada vez mais acessíveis. Neste estudo, comparamos porfirinas com diferentes cargas e associadas ou não a metais, comparando o impacto que cada uma dessas alterações pode causar na interação das moléculas com o DNA, sua habilidade de gerar ROS, sua genotoxicidade e citotoxicidade.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar as características fotoquímicas e fotobiológicas das porfirinas TMePyP⁺, TPPS⁻, ZnTMe⁺ e ZnTTP⁻.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o perfil de indução de danos das porfirinas ao DNA.

Avaliar a citotoxicidade das porfirinas e seu potencial uso como FS na TFD.

3. Materiais e métodos

3.1. Porphirinas

Foram usadas duas porfirinas base livre, sendo uma tetra-catiônica e uma tetra-aniônica, ambas solúveis em meio aquoso. A partir delas, também foram sintetizadas metaloporfirinas aquo-solúveis tetra-catiônicas e tetra-aniônicas contendo íons Zn(II).

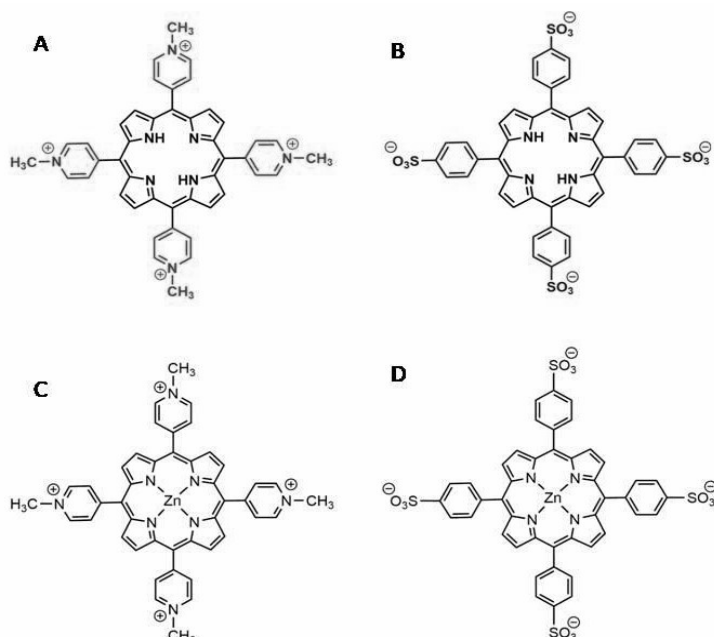


Fig. 3: Representação estrutural das porfirinas tetra-catiônica de base livre (A); tetra-aniônica de base livre (B); tetra-catiônica com centro de Zn (C); e tetra-aniônica com centro de Zn (D).

3.2. Eletroforese e detecção de danos oxidativos no DNA

Para detectar e quantificar os danos de DNA causados pelas porfirinas foi usado como modelo o plasmídeo pCMUT. Esse DNA foi exposto a concentrações de 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM e 5 μM das porfirinas, na presença de luz branca ou no escuro por 90 minutos. A exposição foi feita usando o sistema de dosímetro de DNA. Após a exposição, o DNA foi incubado a 37° C por 1 h com as enzimas Fpg, que reconhece e cliva bases oxidadas, principalmente purinas e Endo III, que reconhece e cliva pirimidinas oxidadas. Além disso, foi incubado também o DNA sem a presença de enzimas, a fim de visualizar quebras de fita simples (SSB) ou de fita dupla (DSB). Para isso, essas amostras foram submetidas à eletroforese em gel de Agarose 0,8%. A documentação desse gel foi realizada através do fotodocumentador Amersham Imager 600 (General Eletronic). No gel, pode ocorrer a formação de duas bandas de DNA. Não havendo geração de danos, o plasmídeo permanece na forma superenovelado (FI), formando a banda inferior. Caso haja formação de danos, o DNA fica em sua forma circular, mais relaxada (FII), formando a banda superior. A quantificação

dos danos foi feita por densitometria das bandas, pelo programa Image Quant 300 (GE Healthcare, USA) (Schuch *et al.*, 2010).

3.3. Taxa de inativação plasmidial

A taxa de inativação foi definida como a capacidade de crescimento das bactérias depois de serem transformadas com DNA tratado com as porfirinas. O DNA plasmidial pCMUT foi tratado (nas mesmas condições citadas anteriormente) e transfectado para bactérias *E. Coli* MBL50 eletrocompetentes. A cultura de bactérias foi disseminada em placas de Petri contendo meio LB suplementado com cloranfenicol 34 mg/ml. Na presença do plasmídeo íntegro, as bactérias foram capazes de expressar o gene de resistência ao antibiótico, formando colônias bacterianas pela placa. Caso o DNA esteja danificado, não é possível que as bactérias adquiram resistência ao cloranfenicol, portanto não há crescimento bacteriano. As colônias foram contadas após 24 h de crescimento a 37° C. A fórmula abaixo foi utilizada para calcular o valor do fator de redução (reduction factor, RF) (Schuch *et al.*, 2010):

$$\text{FR de inativação do DNA} = \frac{\text{UFC/mL da amostra não tratada}}{\text{UFC/mL da amostra tratada}}$$

3.4. Detecção de ROS por DCFH-DA

2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), normalmente administrada na forma diacetato (DCFH-DA) é oxidado e passa para sua forma fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF) por diversas espécies reativas de oxigênio. A produção de ROS foi quantificada em 25 ng de pCMUT exposto às porfirinas, a leitura foi feita no SpectraMax® i3x – Molecular Devices com comprimentos de emissão de 525 nm e excitação de 488 nm. O DCF foi expresso em intensidade de fluorescência (Viana *et al.*, 2022; Murphy *et al.* 2022).

3.5. Cultura celular

As linhagens celulares de melanoma maligno A375 (ATCC® CRL-1619) e queratinócito humano HaCat (ATCC® PCS-200-011TN™) foram compradas do banco de células do Rio de Janeiro, e cultivadas em meio Eagle modificado, suplementado com 10% de

soro fetal bovino e 1% dos antibióticos: penicilina (5000 IU)/estreptomicina (5 mg/ml). As garrafas foram mantidas em uma estufa de CO₂ e os experimentos foram feitos após elas atingirem 80% de confluência.

3.6. Viabilidade celular

Depois de 90 min de incubação com as porfirinas, o tratamento foi removido e 200 µl de meio de cultura foram adicionados, com mais 20 µl de solução MTT (5 mg/ml). O sobrenadante foi removido depois de 4 h de incubação em estufa de CO₂ a 37° C, e os cristais de formazan foram solubilizados com 100 µl de DMSO. A leitura do experimento foi realizada no SpectraMax® i3x – Molecular Devices em 570 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao controle negativo (Viana *et al.*, 2023).

3.7. Ensaio clonogênico

No ensaio de formação de colônias, 500 células por poço foram plaqueadas em uma placa de 12 poços. Depois de 24h, as porfirinas foram adicionadas às células e foram expostas por 90 min no claro e no escuro. Na sequência, elas foram retiradas e um novo meio foi adicionado. Finalmente, depois de 7 dias, os poços foram corados com cristal violeta (2%) e as colônias foram quantificadas usando o ImageJ (Wang *et al.*, 2020).

3.8. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram feitos em triplicata, repetidos pelo menos três vezes de forma independente, os resultados foram analisados no GraphPad Prism (8.0.2), usando one-way ANOVA, seguido de teste Tukey, com $p < 0,05$.

4. Artigo

Está anexado, a seguir, o artigo científico resultante deste trabalho. Nele, estão contidos os resultados obtidos, bem como suas discussões e conclusões. O mesmo está em processo de final de redação e revisão, para posterior submissão.

Evaluation of DNA Damage and Cytotoxicity of Free Base Porphyrins and Zn Metalloporphyrins

Sophia I. Faria^a, Luana B. Trentin^a; Altevir R. Viana^a; Bernardo A. Iglesias^b, André P. Schuch^{a*}

^a Laboratory of Photobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria – UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Laboratory of Bioinorganic and Porphyrinoid Materials, Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria – UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author: Av. Roraima, 1000, P.O. Box 5021, room 3010, Camobi, Santa Maria, RS 97110-970, Brazil. E-mail address: andre.schuch@ufsm.br (A.P. Schuch).

Abstract:

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment with several benefits, such as few side effects, ease of application and possible combination with other treatments. It is based on the production of reactive oxygen species (ROS) by a Photosensitizer (PS) upon irradiation. Due to their many desirable characteristics, porphyrins are often used as PS in PDT. Some of their attributes can vary, influencing its interaction with biomolecules of interest. In this work, four compounds were studied: TMePyP⁺, TPPS⁻, ZnTMe⁺ and ZnTTP⁻. Their interactions with DNA were evaluated through genotoxicity, ROS production and cytotoxicity. Results showed that cationic porphyrins were way more effective in inducing DNA damage, generating ROS and reducing cell viability than anionic ones. The zinc addition had little effect on those aspects, but caused the porphyrin to be selective to tumours cells. Thus, this study provides insight on the role that charge and metal addition play in the interaction with DNA, and also that TMePyP⁺ and ZnTMe⁺ are promising candidates for PS.

Key words: Photodynamic therapy, cationic porphyrins, anionic porphyrins, Zn(II), DNA damage, melanoma.

1. Introduction

The studies of photodynamic therapy (PDT) began in 1904, when researchers Raab and von Tappeiner observed that certain dyes could kill microorganisms after being exposed to light. They named the photodynamic effect, and since then, a lot of studies in the area have been

made (Kessel, 2019). Characterized by the conjoint action of light, molecular oxygen and a photosensitizer (PS), PDT is an alternative treatment, especially for benign tumours or microorganism inactivation (Agostinis *et al*, 2011). Molecularly, a chain reaction takes place, transferring energy from the PS to the O₂. A photon excites the PS, making it go from a low energy and stable form to an excited and unstable form. Once it reaches what is called a triplet state, the PS proceeds to transfer energy. There are two ways this can happen: the type one pathway, where an electron is transferred until reactive oxygen species (ROS) are generated; and the type two pathway, in which the PS transmit only its energy, forming mainly ¹O₂. The ROS produced by either pathway will cause severe damage to biomolecules, leading to cell death (Abrahamse *et al*, 2016).

The PS used in PDT will affect the outcome of the treatment, since their qualities can vary greatly, depending on charge, size, polarity and other characteristics of the molecules. Those differences signify many possible pathways to cell damage and death (Pavani *et al*, 2009). Being used since the beginning of the PDT's development, porphyrins are a class of abundant molecules, on which our lives and the life of the planet depends on. They are known by their aromatic behaviour, but can also acquire vastly diverse characteristics depending on the substituent associated with. That is also why porphyrins can have such different qualities (Imran *et al*, 2018).

Porphyrins have even been used in studies focused on understanding interactions between DNA and proteins or drugs. That is possible because they interact with DNA through a few specific modes, such as intercalation, staking or outside binding (Kwak *et al*, 2018). DNA is a frequent and important target for therapeutic purposes, mainly because of its major role in the cell's metabolism. DNA's structure also creates plenty possible damaging sites (Pages *et al*, 2015).

Adding metals to the porphyrins is frequently used to modify its behaviour. Some benefits come from this alteration, like a more stable prodrug, longer fluorescent lifetime, or more precise localization in the cell (McGhie & Aldrich-Wright, 2022). Pt or Ru are some of the most known metals used in PDT and cancer treatment in general, but they can be expensive. On the other hand, Zn is one example of a metal easily found on earth, therefore a cheaper alternative (Giannoudis *et al*, 2020). Besides that, it is abundant in the cell, and its interaction

with DNA is somewhat known, because it is present in cell structures related to DNA metabolism (Deo *et al*, 2016).

This study aims to investigate and compare four porphyrins, being two of them containing Zn(II) while the other two are free base porphyrins, to evaluate their interactions with DNA, ROS production, genotoxicity and cytotoxicity.

2. Materials and Methods

2.1. Porphyrins used

Two free base porphyrins were used, a tetra-cationic (TMePyP⁺) and a tetra-anionic (TPPS⁻) one, both being water soluble. From them, two other porphyrins containing Zn(II) were synthesized, ZnTMe⁺ and ZnTTP⁻.

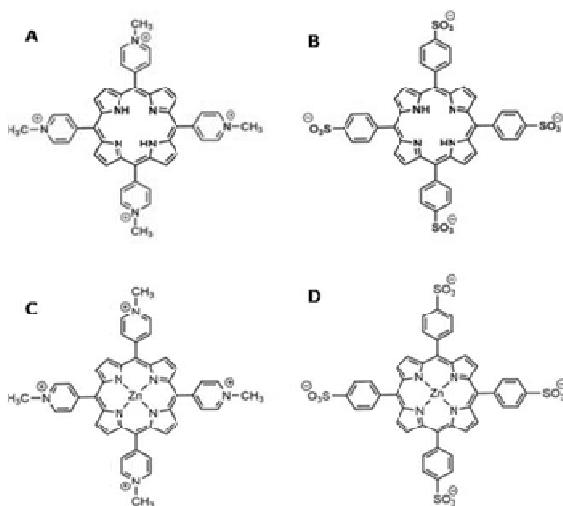


Figure 1: Representative structure of the TMePyP⁺ (A) and TPPS⁻ (B) free-base porphyrins, and the metalloporphyrins ZnTMe⁺ (C) and ZnTTP⁻ (D).

2.2. Detection and quantification of DNA damage

The pCMUT plasmid (1762 bp, C – chloramphenicol resistance, and MUT –*supF* mutation target gene) was treated with four different concentrations of each porphyrin (0.1 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M and 5 μ M) in the presence of a white light or in the dark for 90 minutes. A negative control was also made, exposing only a DNA sample in the absence of porphyrins. The exposure was done using the DNA dosimeter system. After exposure, the samples were

incubated at 37° C for 1 hour with enzymes that recognize and cleave oxidised DNA bases. 0.8 U of E. coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg protein, New England Biolabs, USA) were used to recognize oxidized purines, and Endonuclease III (New England Biolabs, USA) to recognize oxidized pyrimidines. In addition, a DNA sample with no enzyme was incubated to evaluate single strand breaks (SSB). The recognition and subsequent cleavage of these bases cause the plasmid to go from its supercoiled form (FI) to its relaxed form (FII). This results in two visible bands in the gel, that were quantified through densitometry analysis (Amersham™ Imager 600 system along with ImageQuant™ TL software, GE Healthcare®, USA) and the number of breaks (enzyme sensible sites and SSB) per Kbp was calculated using a formula adapted to this technique (Schuch et al, 2009).

2.3. Plasmid inactivation rate

The inactivation rate was defined as the bacteria's growth capacity after being transformed with porphyrin treaded plasmid DNA sample. The pCMUT plasmid treated with each porphyrin (in same concentrations and conditions as described above) was transfected to an electrocompetent E. Coli MBL50 strain. The culture was then disseminated in Petri dishes containing LB medium supplemented with chloramphenicol (34 mg/mL). The colonies were counted after 24 hours of growth at 37° C. The following formula was used to determine the reduction factor (RF) (Schuch et al, 2010):

$$\text{DNA inactivation RF} = \frac{\text{CFU/mL of untreated sample}}{\text{CFU/mL of treated sample}}$$

2.4. ROS detection through DCFH-DA

2',7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH), usually administered in its diacetate (DCFH-DA), is oxidized to the fluorescent product 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) by several ROS. ROS production was quantified in 25 ng of pCMUT exposed to porphyrins. The reading was performed in SpectraMax® i3x – Molecular Devices at 525 nm emission and 488 nm excitation wavelengths. DCF was expressed in fluorescence intensity (Murphy *et al.* 2022).

2.5. Cell culture

The human malignant melanoma A375 (ATCC® CRL-1619) and human keratinocyte HaCat (ATCC® PCS-200-011TN™) cell lines were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank and cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics: penicillin (5000 IU)/streptomycin (5 mg/ml). The polystyrene bottles were kept in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C and the experiments were carried out when cells were at 80% confluence.

2.6. Cell viability

After 1:30h of incubation with the porphyrins, the cells were washed and 200 µl of culture medium with 20 µl of MTT solution (5 mg/ml) was added to the cells. The supernatant was removed after 4 h of incubation in a 5% CO₂ at 37°C and the formazan crystals solubilized with 100 µl of DMSO. The reading of the experiment was performed in SpectraMax® i3x – Molecular Devices at 570 nm. The results were expressed in percentage of viability in relation to the negative control (Viana *et al.*, 2023).

2.7. Clonogenic assay

In the colony formation assay, 500 cells per well were plated in 12-well plates. After 24 hours, the porphyrins were added to the cells and then exposed for 1:30h to light or dark conditions. Subsequently, the cells were washed and a new culture medium was added. Finally, after 7 days, the wells were stained with crystal violet (2%) and the colonies quantified using Image J (Wang *et al.*, 2020).

2.8. Statistical analysis

All experiments were done in triplicate, repeating the tests at least three times independently. The results were analysed on GraphPad Prism (8.0.2), through one-way ANOVA, followed by a Tukey's test, with $p < 0.05$.

3. Results

Figure 2 demonstrates that the anionic porphyrins (TPPS⁻ and ZnTTP⁻) did not oxidise or break the plasmid DNA samples, neither in the dark nor after light exposure. Contrarily, the cationic ones (TMePyP⁺ and ZnTMe⁺) were able to damage DNA in light condition, but

not in the dark treatment, as presented in Figure 3. For both, the number of breaks/kbp increases with concentration. This correlation was more accentuated for TMePyP⁺, causing the complete degradation of DNA at the highest concentration of 5 μM. For all four porphyrins, the incubation of DNA samples with the Fpg enzyme showed more breaks/kbp, indicating a higher induction of oxidised purines by porphyrins.

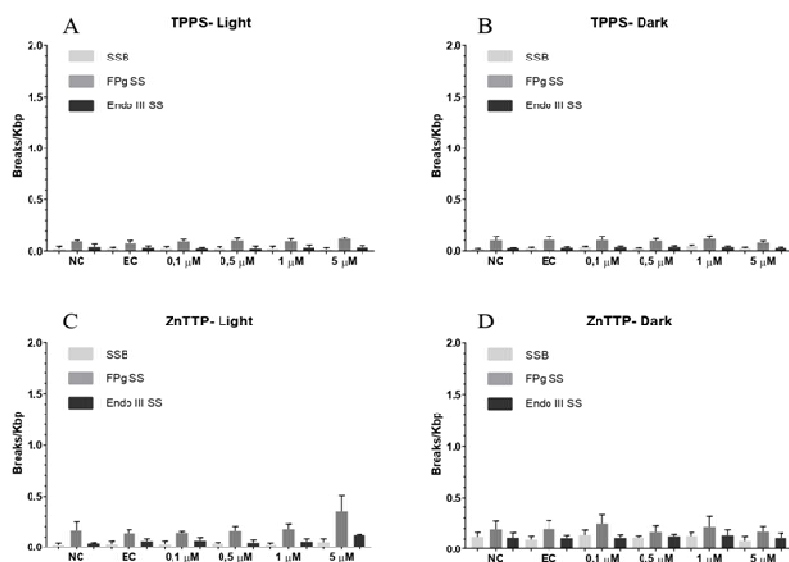


Figure 2: Quantification of DNA lesions generated by TPPS⁻ in light (A) and dark (B) exposure and ZnTTP⁻ in the light (C) and dark (D) conditions. NC: negative control. EC: experimental control. SSB: single strand break. FPG-SS: FPG sensible sites. ENDO III-SS: Endo III sensible sites. Average and standard deviation of three independent experiments.

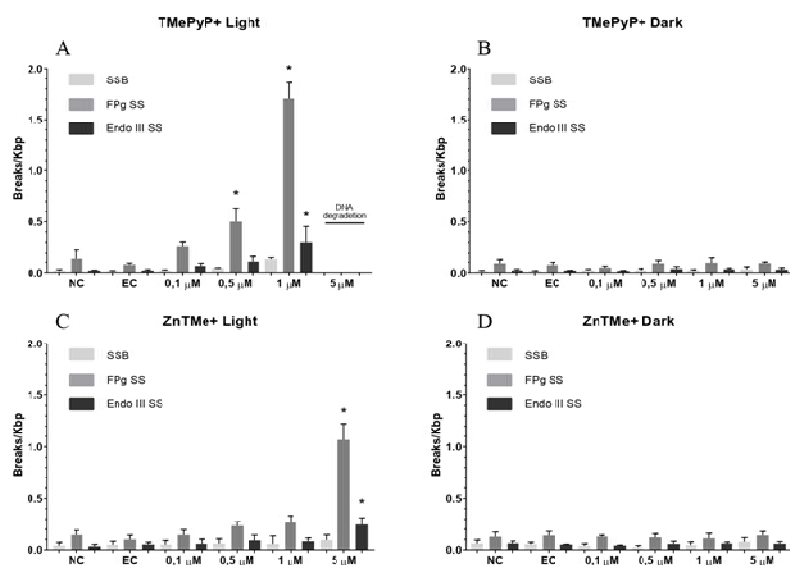


Figure 3: Quantification of DNA lesions generated by TMePyP⁺ in light (A) and dark (B) exposure and ZnTMe⁺ in the light (C) and dark (D) conditions. NC: negative control. EC: experimental control. SSB: single strand break. FPG-SS: FPg sensitive sites. ENDO III-SS: Endo III sensitive sites. Average and standard deviation of three independent experiments.

Because cationic porphyrins showed better DNA damage activity, they were both tested for quantify ROS generation, as presented in Figure 4. The highest concentration of both porphyrins showed significant difference from the control group after light exposure. None of them generated oxygen species in the dark. It was also observed that the free base porphyrin oxidised the DNA more than the Zn(II) metalloporphyrin.

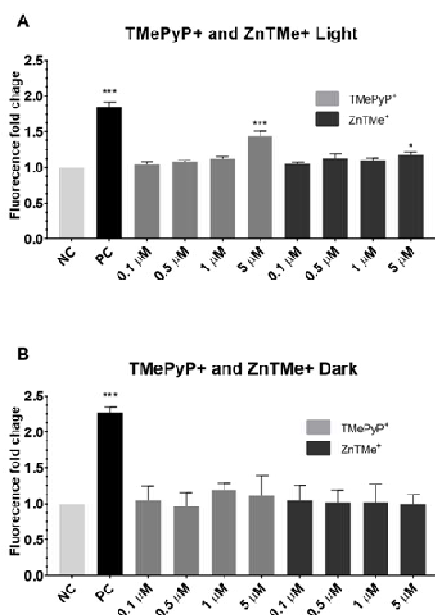


Figure 4: Fold change of fluorescence emission of DCF after light exposure (A) and dark treatment (B) of TMePyP⁺ and ZnTMe⁺ porphyrins. NC: negative control. PC: positive control. ***p < .0001.

Then, all of four porphyrins were tested for the inactivation of the plasmid DNA (Figure 5). The same pattern of high activity after light exposure and no damage in the dark was repeated for TMePyP⁺ and ZnTMe⁺. The free base porphyrin showed a significantly high inactivation rate at 1 and 5 μM. Its equivalent metalloporphyrin exhibited a significant inactivation rate at 5 μM. Regarding the photoactivity, all compounds demonstrated at least some reduction of bacterial growth. A small inactivation rate was observed at 0.5 μM of ZnTTP⁻ and at 0.5 and 1 μM of TPPS⁻. There was a considerable increase of the RF for the ZnTMe⁺ at 5 μM. The highest inactivation rate was caused by the TMePyP⁺ at 1 and 5 μM.

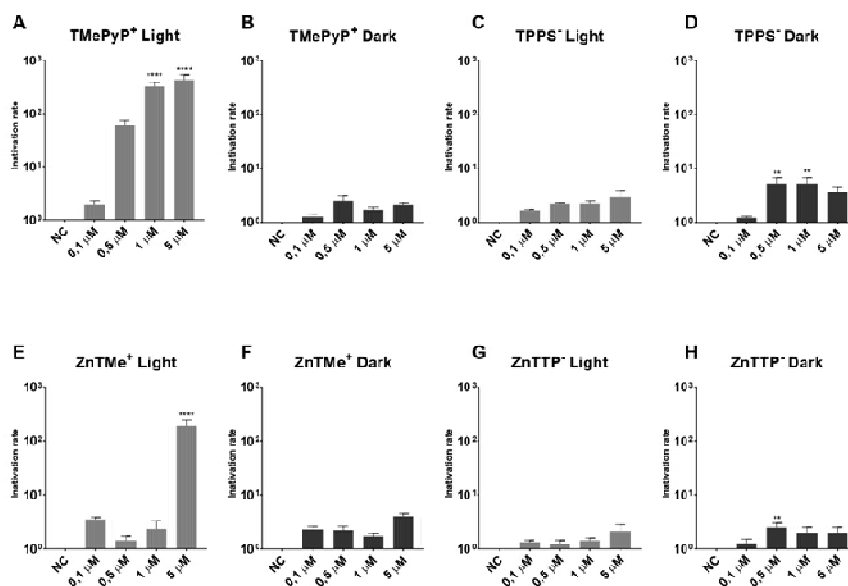


Figure 5: Inactivation rate of the pCMUT in *E. Coli* MBL50 strain after exposure to TMePyP⁺ (A and B), TPPS⁻ (C and D), ZnTMe⁺ (E and F) and ZnTTP⁻ (G and H). NC: negative control.

In the MTT assay (Figure 6), there was a reduction in cell viability of malignant melanoma cells, especially in the treatment using TMePyP⁺. In contrast, ZnTMe⁺ caused cytotoxicity only at the two highest concentrations (1 μM and 5 μM). The same treatments did not show cytotoxicity when incubated protected from light. In the human keratinocyte lineage HaCat, the reduction in the number of cells also occurred in treatments exposed to light, but in a lower percentage than in the tumour cells A375. No significant difference was observed between the negative control and cells kept in the dark.

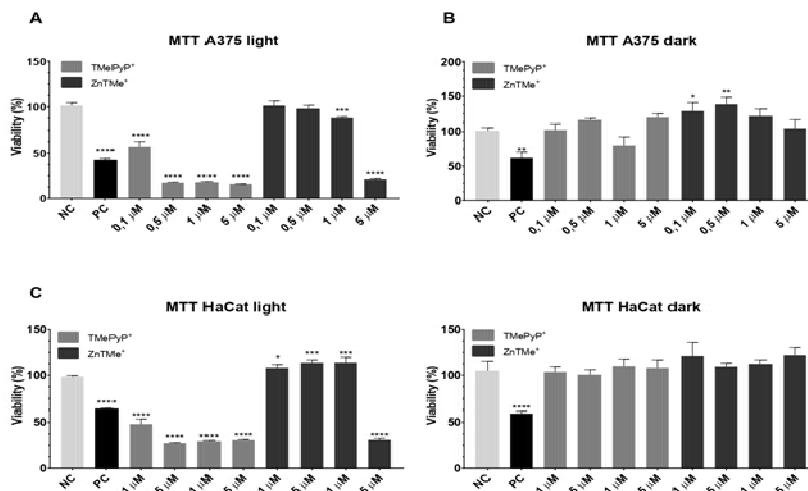


Figure 6: Malignant melanoma (A735) (A and B) and human keratinocyte (HaCat) (C and D) cell viability (%) after incubation with TMePyP⁺ or ZnTMe⁺. NC: negative control. PC: positive control. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments performed in triplicate.

In the clonogenic assay (Figure 7), all treatments exposed to light caused a decrease in the number of cell colonies of the tumour cell line A375. This effect was much less pronounced when the cells were incubated in the dark. Similar data were observed in keratinocytes, showing concentration-dependence in the attenuation of colonies formation.

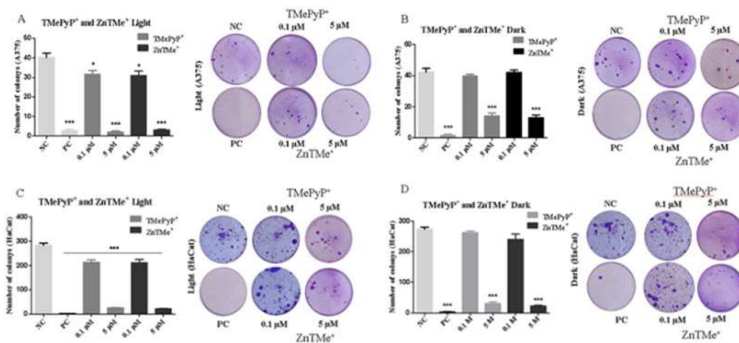


Figure 7: Number of colonies after incubation of malignant melanoma (A735) and human keratinocyte (HaCat) cells with TMePyP⁺ (A and B) or ZnTMe⁺ (C and D). NC: negative control. PC: positive control. Error bars represent the standard deviation of three independent experiments performed in triplicate.

4. Discussion

Positively charged porphyrins are constantly studied in PDT researches, especially because of its interaction with DNA (Caminos & Durantini, 2008; Jensen, *et al* 2013). As expected, our results indicate that the cationic porphyrins caused more damage to the DNA (Figures 2 and 3). These results also show mainly oxidised purines, since Fpg sensitive sites were most detected. This probably happened because singlet oxygen reacts preferably with guanines (Cadet, *et al* 2010; Hirakawa *et al*, 2013), which suggest that type II pathway may be mainly mechanism for ROS generation. The DCF test supports the mainly oxidative nature of the DNA damage caused by the porphyrins (Figure 4). This assay showed minimal activity of the compounds in the dark, and a high generation of ROS after light exposure.

In the plasmid inactivation rates, we observed that the cationic porphyrins, both the free base and the metalloporphyrin, were still more damaging than the anionic ones (Figure 5). Araki, 2000, suggests that the insertion of Zn in porphyrins causes them to partially intercalate in DNA. Despite that, our results further confirms that oxidative damage is the main mechanism of action of these porphyrins.

Even though it is important to understand the interaction between DNA and isolated porphyrins, there are many other variables that will affect the PS's action in the cell, as shown before (Tasso *et al*, 2017). For our compounds, the pattern is repeated in the cell lines. The TMePyP⁺ was more lethal to both cell lines used (Figure 6). The ZnTMe⁺, on the other hand, had some interesting results. Porphyrins containing Zn have been reported as highly toxic (Ma *et al*, 2010; Huang *et al*, 2019; Liang *et al*, 2019). In this study, the viability of HaCat cells was higher than the A375 cells. This means that even though they were not as toxic as their free base analogue, they exhibited some selectivity towards cancerous cells. Dubey *et al*. (2011) used cationic porphyrins and their metal complexes (Zn and Mn) against lung carcinoma cells, in which the conjugate with Zn(II) was more efficient, with an IC₅₀ of 5.9 μ M.

In the evaluation of the clonogenic assay, treatments using metal complexes when exposed to light, decreased cell proliferation and consequent formation of cell aggregates at concentrations of 0.1 and 5 μ M. Similar to our study, the decrease in tumour colony formation using ZnP1 was concentration-dependent, with higher toxicity at 1 μ M compared to 0.1 μ M

(Yegorov *et al.* 2023). ZnPP were able to reduce the formation of human and rabbit bone marrow cell colonies at concentrations from 1 to 20 μM (Lutton *et al.* 1997). In the study by Rapozzi *et al.* (2014), TMPyP4 porphyrins when photoactivated (7.2 J/cm²) in murine melanoma cells (B78-H1) caused strong inhibition of clonogenic growth. The porphyrins meso-tetra-4-N-methylpyridyl-porphyrin iodide and 5,10-di-(4-acetamidophenyl)-15,20-di-(4-N-methylpyridyl) porphyrin showed a decrease in human melanoma cell colonies in the concentrations of 42.1 μM and 16.8 μM when exposed to red light with a wavelength of 630 nm (Szurko *et al.* 2003). The anticancer mechanisms of porphyrins bound to metal complexes are generally attributed to 3 phenomena: coordination of metal ions to biomolecules through ligand exchange reactions, non-covalent interaction with molecules, and intracellular catalytic oxidation/reduction processes (Tong *et al.* 2020).

Understanding the interactions of DNA and a PS and the impact of alterations on the PS are vital steps on developing new drugs to be used in PDT. Our results showed that positively charged porphyrins were much more effective in inducing damage, generating ROS and reducing cell viability. It was also observed that the addition of a Zn center made the compound more selective towards tumours cells, even though it did not cause as much damage as the free base porphyrin. Therefore, these two porphyrins showed promising results, and seem to be worthy of further investigation.

References

Kessel, D. (2019). Photodynamic therapy: A brief history. In *Journal of Clinical Medicine* (Vol. 8, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jcm8101581>

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>

Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. In *Biochemical Journal* (Vol. 473, Issue 4, pp. 347–364). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>

Pavani, C., Uchoa, A. F., Oliveira, C. S., Iamamoto, Y., & Baptista, M. S. (2009). Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(2), 233–240. <https://doi.org/10.1039/b810313e>

Imran, M., Ramzan, M., Qureshi, A. K., Azhar Khan, M., & Tariq, M. (2018). Emerging applications of porphyrins and metalloporphyrins in biomedicine and diagnostic magnetic resonance imaging. In *Biosensors* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios8040095>

Kwak, M. I., Jeon, B. R., Kim, S. K., & Jang, Y. J. (2018). Binding mode of cationic porphyrin with CT-DNA: Importance of the location and the number of positively charged of periphery cationic ions of porphyrin. *ACS Omega*, 3(1), 946–953. <https://doi.org/10.1021/acsomega.7b01627>

Pages, B. J., Ang, D. L., Wright, E. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2015). Metal complex interactions with DNA. In *Dalton Transactions* (Vol. 44, Issue 8, pp. 3505–3526). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c4dt02700k>

McGhie, B. S., & Aldrich-Wright, J. R. (2022). Photoactive and Luminescent Transition Metal Complexes as Anticancer Agents: A Guiding Light in the Search for New and Improved Cancer Treatments. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030578>

Giannoudis, E., Benazzi, E., Karlsson, J., Copley, G., Panagiotakis, S., Landrou, G., Angaridis, P., Nikolaou, V., Matthaiaki, C., Charalambidis, G., Gibson, E. A., & Coutsolelos, A. G. (2020). Photosensitizers for H2 Evolution Based on Charged or Neutral Zn and Sn Porphyrins. *Inorganic Chemistry*, 59(3), 1611–1621. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01838>

Schuch, A. P., da Silva Galhardo, R., de Lima-Bessa, K. M., Schuch, N. J., & Menck, C. F. M. (2009). Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-

ultraviolet radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(1), 111–120. <https://doi.org/10.1039/b810085c>

Schuch, A. P., & Menck, C. F. M. (2010). The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(3), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.03.004>

Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N.-G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., van Remmen, H., ... Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>

Wang, F-T.; Wang, H.; Wang, Q-W.; Pan, M-S.; Li, X-P., Sun, W. Fan, Y-Z. Inhibition of autophagy by chloroquine enhances the antitumor activity of gemcitabine for gallbladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 86, 221-232, 2020.

Altevir Rossato VIANA, Nathieli Bianchin Bottari, Daniel Santos, Marissa Bolson Serafin, Bruna Garlet Rossato, Rafael Noal Moresco, Katianne Wolf, Aline Ourique, Rosmari Hörner, Érico Marlon de Moraes Flores, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Bruno Stefanello Vizzotto & Luciana Maria Fontanari Krause (2023) Insights of ethyl acetate fraction from *Vassobia breviviflora* in multidrug-resistant bacteria and cancer cells: from biological to therapeutic, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85:23, 972-987

Camino, D. A., & Durantini, E. N. (2008). Interaction and photodynamic activity of cationic porphyrin derivatives bearing different patterns of charge distribution with GMP and DNA. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 198(2–3), 274–281. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2008.04.005>

Jensen, T. J., Vicente, M. G. H., Luguya, R., Norton, J., Fronczek, F. R., & Smith, K. M. (2010). Effect of overall charge and charge distribution on cellular uptake, distribution and phototoxicity of cationic porphyrins in HEP2 cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 100(2), 100–111. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.05.007>

Cadet, J., Douki, T., & Ravanat, J. L. (2010). Oxidatively generated base damage to cellular DNA. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 49, Issue 1, pp. 9–21). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.025>

Hirakawa, K., Nishimura, Y., Arai, T., & Okazaki, S. (2013). Singlet oxygen generating activity of an electron donor connecting porphyrin photosensitizer can be controlled by DNA. *Journal of Physical Chemistry B*, 117(43), 13490–13496. <https://doi.org/10.1021/jp4072444>

Araki, K. (2000). Zinc tetraruthenated porphyrin binding and photoinduced oxidation of calf-thymus DNA. *Journal Inorganic Biochemistry*, 78, 269–173.

Tasso, T. T., Tsubone, T. M., Baptista, M. S., Mattiazzi, L. M., Acunha, T. v., & Iglesias, B. A. (2017). Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. *Dalton Transactions*, 46(33), 11037–11045. <https://doi.org/10.1039/c7dt01205e>

Ma, Z., Cao, Y., Li, Q., Guedes da Silva, M. F. C., Fraústo da Silva, J. J. R., & Pombeiro, A. J. L. (2010). Synthesis, characterization, solid-state photo-luminescence and anti-tumor activity of zinc(II) 4'-phenyl-terpyridine compounds. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 104(7), 704–711. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2010.03.002>

Huang, L., Liu, R., Li, J., Liang, X., Lan, Q., Shi, X., Pan, L., Chen, H., & Ma, Z. (2019). Synthesis, characterization, anti-tumor activity, photo-luminescence and BHB/HHb/Hsp90 molecular docking of zinc(II) hydroxyl-terpyridine complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 201. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2019.110790>

Liang, X., Jiang, J., Xue, X., Huang, L., Ding, X., Nong, D., Chen, H., Pan, L., & Ma, Z. (2019). Synthesis, characterization, photoluminescence, anti-tumor activity, DFT calculations and molecular docking with proteins of zinc(ii) halogen substituted terpyridine compounds. *Dalton Transactions*, 48(28), 10488–10504. <https://doi.org/10.1039/c8dt04924f>

Dubey, L. V. et al. 2011. Synthesis, Structure and Antiproliferative Activity of Cationic Porphyrin - Imidazophenazine Conjugate. *International Review of Biophysical Chemistry*. 2(4).

Yegorov, Y. E. et al. 2023. Mechanisms of Phototoxic Effects of Cationic Porphyrins on Human Cells In Vitro. *Molecules* 28, 1090. <https://doi.org/10.3390/molecules28031090>

Lutton, J. D. 1997. Zinc porphyrins: Potent inhibitors of hematopoieses in animal and human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94, 1432-1436

Szurko, A. et al. 2003. Photodynamic effects of two water soluble porphyrins evaluated on human malignant melanoma cells in vitro. *Acta Biochim Pol.* 50(4):1165-74.

Tong, K-C. et al. 2020. An anticancer gold(III)-activated porphyrin scaffold that covalently modifies protein cysteine thiols. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(3): 1321–1329.

5. Conclusão

Este trabalho avaliou diversos aspectos envolvidos na indução de danos e morte celular na TFD. Os ensaios de eletroforese em gel de agarose e detecção de ROS por DCFH-DA mostram que, assim como indicado na literatura, as porfirinas catiônicas foram mais eficientes em induzir danos ao DNA. Esse dano também foi condizente com o padrão da TFD, sendo majoritariamente oxidativo e dependente de luz. A taxa de inativação plasmidial não mostrou alterações nesse comportamento, indicando apenas essa via de ação dos compostos. As análises com culturas celulares mostram, ainda, esse comportamento das porfirinas. Entretanto, indicam também uma maior seletividade por células tumorais da porfirina ZnTMe⁺ quando comparada a TMePyP⁺. Apesar da necessidade de mais estudos, os resultados apresentados indicam potencial dos compostos para uso na TFD, bem como demonstram relevância de determinadas características, e seus efeitos na interação do FS com o DNA e a célula como um todo.

6. Perspectivas

Para continuidade do projeto, será necessário fazer mais análises de caráter físico-químico dos compostos, visando entender com mais precisão suas propriedades e ação no DNA e em outras biomoléculas. Também é interessante estudar, em cultura celular, a absorção e localização intracelular dos compostos, assim indicando as possíveis vias de morte celular. Como último passo, expandir os modelos experimentais, usando diferentes culturas celulares e modelos animais, além do modelo in-vitro de DNA já utilizado.

Referências

- O'Connor, A. E., Gallagher, W. M., & Byrne, A. T. (2009). Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. In *Photochemistry and Photobiology* (Vol. 85, Issue 5, pp. 1053–1074). <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>
- Gold, M. H. (2016). *A Historical Look at Photodynamic Therapy* (pp. 1–7). <https://doi.org/10.1159/000439327>
- Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. In *Biochemical Journal* (Vol. 473, Issue 4, pp. 347–364). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BJ20150942>
- Calixto, G. M. F., Bernegossi, J., de Freitas, L. M., Fontana, C. R., Chorilli, M., & Grumezescu, A. M. (2016). Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. In *Molecules* (Vol. 21, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules21030342>
- Imran, M., Ramzan, M., Qureshi, A. K., Azhar Khan, M., & Tariq, M. (2018). Emerging applications of porphyrins and metalloporphyrins in biomedicine and diagnostic magnetic resonance imaging. In *Biosensors* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/bios8040095>
- Kou, J., Dou, D., & Yang, L. (2017). Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. In *Oncotarget* (Vol. 8, Issue 46). www.impactjournals.com/oncotarget/
- Gomes, A. T. P. C., Neves, M. G. P. M. S., & Cavaleiro, J. A. S. (2018). Cancer, photodynamic therapy and porphyrin-type derivatives. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90(1), 993–1026. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170811>
- Allison, R. R., & Sibata, C. H. (2010). Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. In *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* (Vol. 7, Issue 2, pp. 61–75). <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>
- Pratviel, G. (2016). Porphyrins in complex with DNA: Modes of interaction and oxidation reactions. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 308, pp. 460–477). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.07.003>
- Pavani, C., Uchoa, A. F., Oliveira, C. S., Iamamoto, Y., & Baptista, M. S. (2009). Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(2), 233–240. <https://doi.org/10.1039/b810313e>

McGhie, B. S., & Aldrich-Wright, J. R. (2022). Photoactive and Luminescent Transition Metal Complexes as Anticancer Agents: A Guiding Light in the Search for New and Improved Cancer Treatments. In *Biomedicines* (Vol. 10, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10030578>

Dąbrowski, J. M., Pucelik, B., Regiel-Futyr, A., Brindell, M., Mazuryk, O., Kyzioł, A., Stochel, G., Macyk, W., & Arnaut, L. G. (2016). Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. In *Coordination Chemistry Reviews* (Vol. 325, pp. 67–101). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.06.007>

Davids, L. (2013). Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma. In *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*. InTech. <https://doi.org/10.5772/46052>

Araki, K. (2000). Zinc tetra-ruthenated porphyrin binding and photoinduced oxidation of calf-thymus DNA. *Journal Inorganic Biochemistry*, 78, 269–173.

Giannoudis, E., Benazzi, E., Karlsson, J., Copley, G., Panagiotakis, S., Landrou, G., Angaridis, P., Nikolaou, V., Matthaiaki, C., Charalambidis, G., Gibson, E. A., & Coutsolelos, A. G. (2020). Photosensitizers for H₂ Evolution Based on Charged or Neutral Zn and Sn Porphyrins. *Inorganic Chemistry*, 59(3), 1611–1621. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01838>

Deo, K. M., Pages, B. J., Ang, D. L., Gordon, C. P., & Aldrich-Wright, J. R. (2016). Transition Metal Intercalators as Anticancer Agents-Recent Advances. In *International journal of molecular sciences* (Vol. 17, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms17111818>

Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., Hahn, S. M., Hamblin, M. R., Juzeniene, A., Kessel, D., Korbelik, M., Moan, J., Mroz, P., Nowis, D., Piette, J., Wilson, B. C., & Golab, J. (2011). Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>

Schuch, A. P., & Menck, C. F. M. (2010). The genotoxic effects of DNA lesions induced by artificial UV-radiation and sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(3), 111–116. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.03.004>

Altevir Rossato VIANA, B. Godoy Noro, J. C. Lenz, M. Luiza Machado Teixeira, M. Bolson Serafin, R. Hörner, C. Franco, L. Maria Fontanari Krause, B. Stefanello Vizzotto & B.

Jalfim Maraschin (2022): Cytotoxic screening and antibacterial activity of Withaferin A, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 85:16, 685-698.

Murphy, M. P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C. J., Davies, K. J. A., Davies, M. J., Dick, T. P., Finkel, T., Forman, H. J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V. E., Kalyanaraman, B., Larsson, N.-G., Milne, G. L., Nyström, T., Poulsen, H. E., Radi, R., van Remmen, H., ... Halliwell, B. (2022). Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nature Metabolism*, 4(6), 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>

Altevir Rossato VIANA, Nathieli Bianchin Bottari, Daniel Santos, Marissa Bolson Serafin, Bruna Garlet Rossato, Rafael Noal Moresco, Katianne Wolf, Aline Ourique, Rosmari Hörner, Érico Marlon de Moraes Flores, Maria Rosa Chitolina Schetinger, Bruno Stefanello Vizzotto & Luciana Maria Fontanari Krause (2023) Insights of ethyl acetate fraction from *Vassobia breviflora* in multidrug-resistant bacteria and cancer cells: from biological to therapeutic, *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 85:23, 972-987

WANG, F-T.; WANG, H.; WANG, Q-W.; PAN, M-S.; LI, X-P., SUN, W. FAN, Y-Z. Inhibition of autophagy by chloroquine enhances the antitumor activity of gemcitabine for gallbladder cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 86, 221-232, 2020.