



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA – PPGBT<sub>ox</sub>)

Bruno Stefanello Vizzotto

**DANO AO DNA INDUZIDO POR FOTOCIVAGEM E ANÁLISE  
CITOTÓXICA DE UMA PORFIRINA *meso*-TETRA-RUTENADA SOB  
IRRADIAÇÃO POR LUZ VISÍVEL**

Santa Maria, RS  
2020

**Bruno Stefanello Vizzotto**

**DANO AO DNA INDUZIDO POR FOTOCLIVAGEM E ANÁLISE CITOTÓXICA DE  
UMA PORFIRINA *meso*-TETRA-RUTENADA SOB IRRADIAÇÃO POR LUZ  
VISÍVEL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do título de **Doutor em  
Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica**

Orientador: Prof. Dr. André Passaglia Schuch

Santa Maria, RS  
2020

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

Vizzotto, Bruno Stefanello

Dano ao DNA induzido por fotoclivagem e análise citotóxica de uma porfirina meso-tetra-rutenada sob irradiação por luz visível / Bruno Stefanello Vizzotto.- 2020.

79 p.; 30 cm

Orientador: André Passaglia Schuch

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2020

1. Melanoma 2. Terapia fotodinâmica 3. Porfirina de Rutênio 4. Genotoxicidade I. Schuch, André Passaglia II. Título.

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, BRUNO STEFANELLO VIZZOTTO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) 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.

**Bruno Stefanello Vizzotto**

**DANO AO DNA INDUZIDO POR FOTOCIVAGEM E ANÁLISE CITOTÓXICA DE  
UMA PORFIRINA *meso*-TETRA-RUTENADA SOB IRRADIAÇÃO POR LUZ  
VISÍVEL**

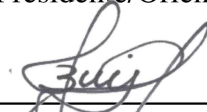
Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação  
em Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica, da Universidade Federal de  
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito  
parcial para obtenção do título de **Doutor em  
Ciências Biológicas: Bioquímica  
Toxicológica**

**Aprovado em 03 de dezembro de 2020:**



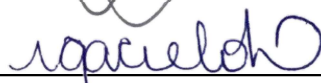
---

**André Passaglia Schuch, Dr. (UFSM) - Videoconferência**  
(Presidente/Orientador)



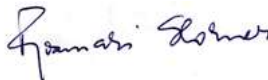
---

**Luiz Carlos Rodrigues Junior, Dr. (UFCSPA) - Videoconferência**



---

**Virgínia Cielo Rech, Dra. (UFN) - Videoconferência**



---

**Rosmari Hörner, Dra. (UFSM) - Videoconferência**



---

**Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM) - Videoconferência**

Santa Maria, RS  
2020

*“ So the problem is not so much to see what nobody has yet seen, as to think what nobody has yet thought concerning that which everybody sees. ”*

*“ Importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê. ”*

*Arthur Schopenhauer*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a minha família, que a vida inteira me deu suporte e incentivo para que alcançasse meus sonhos...*

## AGRADECIMENTOS

A minha família, meus pais Dirceu e Elsa, meu irmão Leonardo, agradeço pelo amor, apoio e dedicação que vocês sempre tiveram por mim.

Ao Prof. André P. Schuch, como um dos responsáveis pela minha formação como pesquisador, agradeço pela confiança, amizade, conselhos e paciência, um profissional cujo trabalho vai muito além do que o dever impõe.

Aos colegas do Laboratório de Fotobiologia - UFSM, agradeço por terem tornado o dia a dia na pós-graduação uma experiência leve e prazerosa! Foi muito enriquecedor compartilhar este momento com cada um de vocês.

Ao grupo de pesquisa do Depto. de Química - UFSM, Prof. Bernardo e Renne, pela síntese e caracterização do composto, além do auxílio científico.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia Celular - UFN, Prof. Luciana e Altevir, pela amizade e parceria científica.

Aos amigos da Universidade Franciscana - UFN, William, Aline e Ana Paula, por todos os momentos bons que tivemos, sua amizade foi muito importante durante todo este período

Aos amigos de uma vida, Isabel, Karen, Ana Júlia e Gabriela, agradeço pelo companheirismo e parceria de sempre.

A todos vocês, meus mais sinceros agradecimentos!!!

## RESUMO

### DANO AO DNA INDUZIDO POR FOTOCIVAGEM E ANÁLISE CITOTÓXICA DE UMA PORFIRINA *meso*-TETRA-RUTENADA SOB IRRADIAÇÃO POR LUZ VISÍVEL

AUTOR: Bruno Stefanello Vizzotto

ORIENTADOR: André Passaglia Schuch

A Terapia Fotodinâmica (TFD), aliada ao uso de moléculas contendo o anel porfirínico associado ao metal de transição Rutênio, tem representado um método alternativo ao tratamento tradicional do melanoma. Aqui, demonstramos as análises de dano ao DNA, propriedades de fotocivagem e citotoxicidade de uma porfirina *meso*-tetra-rutenada de base livre ( $H_2RuTPyP$ ). O potencial citotóxico e genotóxico de  $H_2RuTPyP$  foi investigado por ensaio colorimétrico de tetrazólio e pela análise de fotocivagem de DNA plasmidial seguida de incubação com enzimas específicas de reparo de DNA, respectivamente. A porfirina  $H_2RuTPyP$  induziu eficientemente danos ao DNA na concentração mais baixa de  $5,0 \mu M$ , resultando em sua degradação completa a  $15 \mu M$ . A presença de diferentes sequestradores para espécies reativas de oxigênio durante a exposição à luz visível não diminuiu a formação de quebras de DNA, sugerindo um mecanismo hidrolítico para a quebra desta molécula. Além disso, o composto  $H_2RuTPyP$  exibiu citotoxicidade mais elevada frente a linhagem celular de melanoma, em comparação com a de queratinócitos. Portanto, o composto  $H_2RuTPyP$  mostrou-se um fotossensibilizador eficaz muito promissor, representando uma alternativa para o desenvolvimento de novos tratamentos para o melanoma por meio da TFD.

**Palavras-chave:** Melanoma. Terapia fotodinâmica. Porfirina de Rutênio. Genotoxicidade



## ABSTRACT

### DNA DAMAGE INDUCED BY PHOTOCLEAVAGE AND CYTOTOXIC ANALYSIS OF A MESO-TETRA-RUTENATED PORPHYRIN UNDER VISIBLE LIGHT RADIATION

AUTHOR: Bruno Stefanello Vizzotto

ADVISOR: André Passaglia Schuch

Photodynamic Therapy (PDT) combined with the use of molecules containing the porphyrin ring associated with ruthenium transition metal has become an alternative method to the traditional treatment of melanoma. Here, we demonstrate DNA damage analyses, photocleavage properties and cytotoxicity of a free-based meso-terta-ruthenated porphyrin ( $H_2RuTPyP$ ). Cytotoxic and genotoxic potential of  $H_2RuTPyP$  was investigated by colorimetric assay and by plasmid DNA photocleavage analysis followed by incubation with specific DNA repair enzymes, respectively.  $H_2RuTPyP$  porphyrin efficiently induced DNA damage at the lowest concentration of  $5.0 \mu M$ , resulting in its complete degradation at  $15 \mu M$ . The presence of different scavengers for reactive oxygen species during exposure to visible light did not decrease the formation of DNA breaks, suggesting a hydrolytic mechanism for the breakdown of this molecule. In addition, the compound  $H_2RuTPyP$  exhibited a higher cytotoxicity towards melanoma cell line compared to keratinocytes. Therefore,  $H_2RuTPyP$  compound demonstrated to be a very promising effective photosensitizer, representing an alternative for the development of new treatments for melanoma by PDT.

**Keywords:** Melanoma. Photodynamic therapy. Ruthenium porphyrin. Genotoxicity

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

<b>Figura 1</b> - Espécime original de melanoma, removido por John Hunter (1787).....	15
<b>Figura 2</b> - Taxas mundiais de incidência (A) e mortalidade (B) do melanoma. ....	17
<b>Figura 3</b> - Corte transversal do sistema tegumentário.....	18
<b>Figura 4</b> - Estrutura celular da epiderme. ....	19
<b>Figura 5</b> - Apresentações clínicas mais comuns do CBC.....	23
<b>Figura 6</b> - Apresentações clínicas mais comuns do CCE.....	24
<b>Figura 7</b> – Características fenotípicas do MS de pele. ....	25
<b>Figura 8</b> - Características fenotípicas do MN de pele. ....	26
<b>Figura 9</b> – Características fenotípicas do MLM de pele. ....	27
<b>Figura 10</b> – Características fenotípicas do MLA <i>in situ</i> .....	27
<b>Figura 11</b> - Critérios “ABCDE” para diagnóstico precoce do MM. ....	32
<b>Figura 12</b> - Mecanismos de ação da TFD segundo o digrama de Perrin-Jablonski .....	38
<b>Figura 13</b> - Diferentes modelos de morte celular tumoral induzido pela TFD. ....	40
<b>Figura 14</b> - Representação estrutural do núcleo porfirínico. ....	43
<b>Figura 15</b> - Síntese química da meso-tetrapiridilporfirina. ....	47
<b>Figura 16</b> - Espectro UV-Visível de porfirinas. ....	48
<b>Figura 17</b> – Tetrapiridilporfirina contendo 4 grupos de Ru ligados periféricamente.....	49
<b>Figura 18</b> - Estrutura química dos principais AFS baseados em Ru. ....	51
<b>Figura 19</b> – Modelo <i>in vivo</i> de melanoma para aplicação da TFD.....	69

### ARTIGO

<b>Fig 1</b> - Representative structure of the free-base porphyrin H <sub>2</sub> RuTPyP.....	58
<b>Fig 2</b> - Quantification of DNA lesions generated by H <sub>2</sub> RuTPyP porphyrin in dark and light conditions.....	60
<b>Fig 3</b> - Quantification of DNA lesions generated by Ru(bpy) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (3.A and 3.B) and 4-TPyP (3.C and 3.D) start materials of free-base tetra-ruthenated porphyrin H <sub>2</sub> RuTPyP, in dark and light conditions.....	60
<b>Fig 4</b> - Incubation of plasmid DNA samples with H <sub>2</sub> RuTPyP (5.0 μM) and different ROS scavengers followed by visible light exposure.....	60
<b>Fig 5</b> - Murine melanoma (B16F10) and human keratinocyte (HaCat) cell viability (%) after incubation with H <sub>2</sub> RuTPyP (5.0, 10, 15, 20 μM) for 60 min under visible light or dark conditions.....	61
<b>Fig 6</b> - Effect of H <sub>2</sub> RuTPyP (5μM) on the production of intracellular ROS in B16F10 cells after 1 h of exposure to visible light or in the dark.....	61
<b>Fig S1</b> - Emission spectrum of the visible light source.....	63

### LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - AFS a base de porfirina aprovados para uso clínico na TFD. ....	45
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFS	Agente fotossensibilizador
AgCl	Cloreto de prata
AgNO <sub>3</sub>	Nitrato de prata
AJCC	American Joint CoMMittee on Cancer
ALA	Ácido 5-aminolevulinico
ASIP	Gene agouti signaling protein
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino ATCC® CCL-6475™
BAP1	Gene BRCA1-associated protein-1
BE	Brometo de Etídeo
Bipy	2,2'-Bipyridine
BRAF	Gene v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CBC	Carcinoma Basocelular
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CDKN2A	Gene cyclin-dependent kinase inhibitor 2 <sup>a</sup>
CDK4	Gene cyclin-dependent kinase 4
CKIT	Proto-oncogene c-KIT
CPNM	Câncer de Pele Não Melanocítico
ctDNA	DNA de <i>Calf thymus</i>
DMF/DCM	Dimethylformamide/dichloromethane
DMF/EtOH	Dimethylformamide/ethanol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EB	Ethidium bromide
BE-DNA	Brometo de Etidio + DNA
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
Endo III	Endonuclease III
Endo III-SS	Endonuclease III-sensitive sites
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FBR	Variantes frequentes com baixo risco
FDA	Food and Drug Administration
Fpg	Formamidopyrimidine-DNA glycosylase
Fpg-SS	Formamidopyrimidine DNA glycosylase-sensitive sites
GNAQ	Gene G Protein Subunit Alpha Q
H <sub>2</sub> RuTPyP	Porfirina meso-tetra-rutenada
HMB-45	Human melanoma black
IHC	Imunohistoquímica
IL2	Interleucina-2
K <sub>b</sub>	Intrinsic binding constant
Kbp	Kilo-base pair
KI	Iodeto de Potássio
KIT	Gene KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
KP1019	Trans-[tetrachloridobis(1 H-indazole)ruthenate(III)]
KP1339	Sodium trans-[tetrachloridobis(1H-indazole)ruthenate(III)]
KP418	(imH) [trans-RuCl <sub>4</sub> (im) <sub>2</sub> ]
LED	Light-emitting diode
LDH	Lactato Desidrogenase
MAL	Metil-5-aminolevulinate
MAL-TFD	Terapia Fotodinâmica com Metil-5-aminolevulinate

MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MART-1	Melanoma antigen recognized by T cells 1
MITF	Gene Microphthalmia-associated transcription factor
MLA	Melanoma Lentiginoso Acral
MLM	Melanoma Lentigo Maligno
MM	Melanoma Maligno
MN	Melanoma Nodular
MS	Melanoma Superficial
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium
NAMI-A	((ImH)[trans-RuCl <sub>4</sub> (dmsO-S)(Im)], Im = imidazole)
NaN <sub>3</sub>	Azida sódica
NC	Negative control
NER	Via de reparo por excisão de nucleotídeos
NH <sub>4</sub> PF <sub>6</sub>	AMMonium hexafluorophosphate
NI	Non-irradiated control
NRAS	Proto-oncogene N-ras
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Triplete no Estado Fundamental
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Singlete no Estado Excitado
OCA2	Gene Oculocutaneous albinism type 2
•OH	Radical hidroxil
PARP1	Gene Poly [ADP-ribose] polymerase 1
pCMUT	DNA plasmidial
PDT	Photodynamic therapy
PSA	Photosensitive agents
ROS	Reactive oxygen species
RRM	Variantes raras com risco moderado
Rubpy	Porfirina tetra-rutenada
Ru	Rutênio
S <sup>o</sup>	AFS no Estado Singlete Fundamental
S <sup>1</sup>	AFS no Estado Singlete Excitado
SLC45A2	Gene solute carrier family 45 member 2
SOX10	SRY-related HMG-box 10
SSB	Single strand breaks
ssDNA	Salmon sperm DNA
T <sup>1</sup>	AFS no Estado Triplete Excitado
TBE	Tampão Tris/Borato/EDTA
TERT	Gene telomerase reverse transcriptase
TFD	Terapia Fotodinâmica
TLD1433	[Ru(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine)2(2-(2',2'':5'',2'''-terthiophene)-imidazol[4,5-f][1,10]phenanthroline')] <sub>2</sub> <sup>+</sup>
TPyP	Meso-tetrapiridilporfirina
Tris-HCl	Tris hydrochloride
Trpy	Terpyridine
TYR	Gene Tyrosinase
URAR	Variantes ultrarraras com alto risco
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta e visível
UV	Ultravioleta
λ / nm	Comprimento de onda em nanômetros
λ <sub>exc</sub>	Comprimento de onda de excitação

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	14
1.1.	MELANOMA MALIGNO	14
1.1.1.	Histórico e epidemiologia	14
1.1.2.	Anatomofisiologia da pele	17
1.1.3.	Câncer de pele	21
1.1.4.	Genética	28
1.1.5.	Diagnóstico e tratamento	32
1.2.	TERAPIA FOTODINAMICA	37
1.2.1.	Mecanismo de ação	37
1.2.2.	Citotoxicidade	39
1.2.3.	Mecanismos de resistência à TFD	41
1.2.4.	Agentes Fotosensibilizadores	42
1.3.	PORFIRINAS DE RUTÊNIO	46
1.3.1.	Síntese e estrutura química	47
1.3.2.	Complexos de Ru	50
1.3.3.	Interação de complexos metálicos com o DNA	53
1.4.	JUSTIFICATIVA	54
1.5.	OBJETIVOS	55
1.5.1.	Objetivo Geral	55
1.5.2.	Objetivos Específicos	55
<b>2.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO</b>	57
2.1.	DISCUSSÃO	64
<b>3.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	68
	PERSPECTIVAS	69
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	APÊNDICE – ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE H <sub>2</sub> RuTPyP	78

## APRESENTAÇÃO

A presente tese descreve no item **INTRODUÇÃO** uma revisão sobre a origem e tratamentos do melanoma maligno (MM), assim como a utilização da terapia fotodinâmica (TFD) aliada ao emprego de Porfirinas de Rutênio (Ru) como tratamento alternativo para esta doença. No item **DESENVOLVIMENTO** são mostrados os resultados encontrados no trabalho, os quais estão descritos na forma de ARTIGO CIENTÍFICO. O item **CONCLUSÃO** descreve principais interpretações gerais sobre o artigo contido nesta tese. Já o item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** apresenta os trabalhos consultados para a construção do estado-da-arte sobre o tema da pesquisa. O item **PERSPECTIVAS** engloba as análises futuras que visam determinar o mecanismo de morte celular induzida pelo composto e a aplicabilidade da TFD em modelo *in vivo*.

# **1.INTRODUÇÃO**

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. MELANOMA MALIGNO

Atualmente, o Melanoma Maligno (MM) continua a ser uma grande ameaça à saúde humana, representando a forma mais agressiva e mortal de câncer de pele (ZHOU, Y. et al., 2016). Caracteriza-se pela formação de um tumor maligno que surge da proliferação descontrolada de melanócitos (células produtoras de pigmento). Embora a forma mais comum de MM seja cutânea, também pode surgir em superfícies mucosas, trato uveal e leptomeninges. Se este for diagnosticado em seus estágios iniciais, a ressecção da lesão está associada a taxas de sobrevivência favoráveis. No entanto, representa uma malignidade agressiva que tende a produzir metástase além de seu local primário de detecção. Uma vez sendo avançado, a cirurgia não é mais suficiente e a doença se torna de difícil tratamento (MATTHEWS et al., 2017).

### 1.1.1. Histórico e epidemiologia

O MM geralmente é considerado como uma doença moderna exacerbada pela migração de pessoas de pele clara para áreas mais próximas do equador e pelo comportamento moderno de exposição ao sol. No entanto, embora as taxas de incidência de melanoma tenham certamente disparado nos tempos atuais, esta é uma doença antiga que tem sido documentada ao longo da história. O primeiro caso registrado data do século V por Hipócrates de Cos, e mais tarde pelo médico grego Rufus de Eufóses, mas evidências físicas anteriores de melanoma foram encontradas nos ossos de múmias pré-colombianas de ~2400 anos (DAVIS et al., 2019).

Entre 1650 e 1760, a literatura médica europeia fez inúmeras referências a "tumores negros fatais com metástases e fluido negro no corpo". O cirurgião escocês John Hunter, que atuou no *St George's Hospital Medical School*, em Londres, é creditado com a primeira remoção cirúrgica de um melanoma na literatura médica ocidental. Em 1787, operou e removeu com sucesso um melanoma recorrente da mandíbula de um homem de 35 anos (Figura 1). Neste caso relatou que o tumor era "macio e negro", com Hunter rotulando-o como uma "excrecência fúngica cancerosa" (REBECCA et al., 2012).



**Figura 1** - Espécime original de melanoma, removido por John Hunter (1787).



Fonte: (TAYLOR, 1830)

O espécime tumoral preservado foi diagnosticado como melanoma apenas em 1968, e ainda hoje encontra-se alojado no Museu Hunteriano em *Lincolns Inn Fields*, Londres (UK).

Na década de 1820, o Dr. William Norris descreveu o caso de um paciente que possuía uma "doença fungoide", e observando que o pai deste paciente também havia falecido de uma doença semelhante, postulou que a doença poderia, em certos casos, ser hereditária. Norris foi o primeiro a recomendar a remoção cirúrgica de lesões de melanoma com margens de excisão largas, sendo também um dos primeiros a propor uma possível ligação entre o melanoma e a exposição a fatores ambientais. Em 1892, o Dr. Herbert Snow ofereceu uma razão para a remoção de linfonodos, descrevendo-os como armadilhas que preveniam a propagação do câncer para o sangue. Por quase 100 anos depois disso, o tratamento do melanoma permaneceu praticamente o mesmo, com a excisão cirúrgica e remoção de linfonodos representando o único tratamento para melanoma primário. Não existiam opções de tratamento para a doença após a metástase. Foi só na descoberta da quimioterapia na década de 1940 e sua utilidade no tratamento de alguns tipos de câncer, que surgiu o próximo pequeno avanço no tratamento do melanoma (DAVIS et al., 2019).

Em 1956, Henry Lancaster, um matemático australiano, fez a primeira conexão entre a luz solar e a incidência de melanoma, demonstrando que estava diretamente associada com a "latitude" ou a intensidade da luz solar. Em 1966, Wallace Clark criou uma escala padrão para avaliar o prognóstico do melanoma com base no exame histológico. O sistema, chamado níveis de Clark, refere-se à extensão da invasão descendente em cinco níveis da pele e subcutis, cada um mais mortal à medida que as células tumorais invadem mais profundamente a epiderme, a

derme e, finalmente, o tecido subcutâneo. Em 1970, Alexander Breslow observou que o prognóstico de melanoma cutâneo parecia ser uma função tanto do tamanho do tumor quanto do nível de invasão. Esses critérios ajudaram a estratificar os pacientes a terem ou não dissecação profilática do linfonodo (e agora biópsia do nódulo sentinela). O trabalho pioneiro de Clark e Breslow ainda é relevante até hoje, com a determinação da espessura do tumor sendo um dos principais fatores prognósticos para o melanoma localizado na versão atual do Sistema de Estadiamento de Melanoma AJCC (*American Joint CoMMittee on Cancer*) (REBECCA et al., 2012).

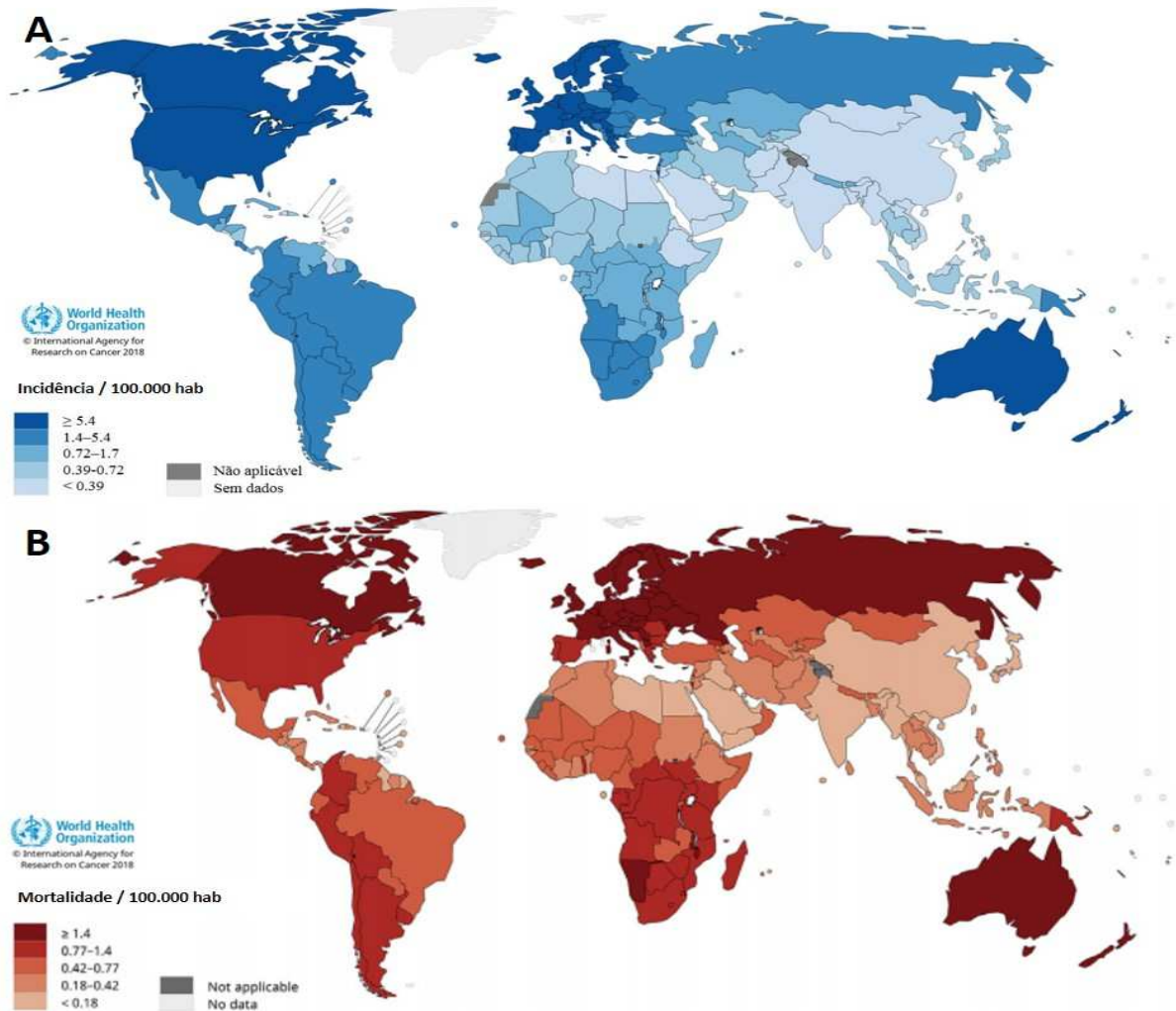
Além da considerável carga para a saúde pública, os custos anuais do manejo do MM são substanciais. Só nos Estados Unidos, os custos anuais do tratamento do melanoma aumentaram 288% em menos de uma década. À medida que novos tratamentos farmacológicos caros chegam ao mercado, os custos provavelmente aumentarão a taxas ainda maiores. O melanoma representa US\$ 3.3 bilhões do total de US\$ 8.1 bilhões em custos anuais do câncer de pele. Estima-se que os custos indiretos associados ao melanoma sejam superiores a US\$ 3.5 bilhões por ano. À medida que a incidência e a mortalidade aumentam, projeta-se que os custos de tratamento e cuidados indiretos aumentem simultaneamente. No entanto, à medida que mais estratégias preventivas são implementadas para combater o aumento da incidência, os custos relacionados ao melanoma podem melhorar com o potencial de reduzir a carga econômica em US\$ 2,1 bilhões por ano (MATTHEWS et al., 2017).

A faixa etária com maior número de diagnósticos de Mm é entre 40 e 60 anos, sendo a idade mediana para o diagnóstico e óbito de 57 e 67 anos, respectivamente. As taxas de incidência começam a aumentar a partir dos 40 anos de idade, portanto, o Mm é geralmente considerado um tumor que afeta pessoas jovens e de meia-idade. Da mesma forma, mulheres adolescentes e jovens adultas têm maiores taxas de incidência de MM do que os homens, principalmente devido a apresentarem maior comportamento de risco relacionado ao bronzamento e necessidades estéticas socialmente determinadas. No entanto, após os 40 anos, as taxas se invertem, e a incidência de melanoma entre os homens é maior do que a das mulheres, em função principalmente de os homens serem menos propensos do que as mulheres a examinar sua própria pele ou procurar ajuda de dermatologistas para o exame de pele (CARR et al., 2020).

Em 2018, a taxa de incidência global estimada para Mm foi de 3.1/100.000 hab, com quase 300.000 novos casos diagnosticados e 60.000 mortes relatadas no mesmo ano (MILLER et al., 2020). Em 2019, espera-se que 96.480 novos casos de MM sejam diagnosticados, e 7.230 pessoas morrerão apenas nos EUA (DAVIS et al., 2019). Segundo a Figura 2, em populações

de origem europeia, as taxas de incidência e mortalidade para o ano de 2018 foram, respectivamente, de 11.2 e 1.7/100.000 hab na Europa, 12.2 e 1.4/100.000 hab nos EUA, e 33.6 e 3.4/100.000 hab na Austrália e Nova Zelândia. Na Europa, as maiores taxas de incidência de MM foram observadas na Suécia e na Dinamarca e as menores na Grécia (CARR et al., 2020).

**Figura 2** - Taxas mundiais de incidência (A) e mortalidade (B) do melanoma.



Fonte: (FERLAY et al., 2018, CARR et al., 2020)

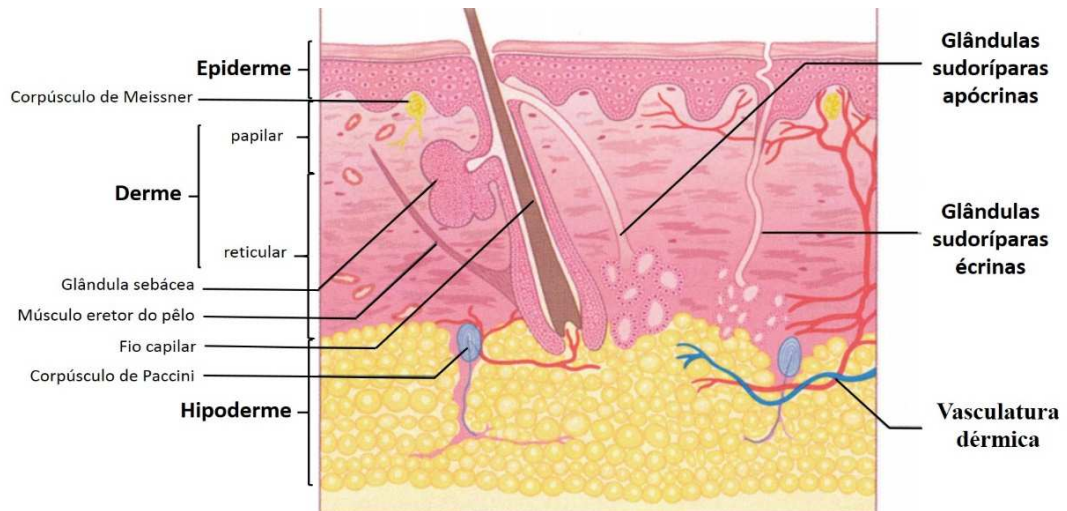
Taxas padronizadas de incidência mundial até o ano de 2018, expressas por 100.000 indivíduos, representativas de ambos os sexos e de todas as faixas etárias.

### 1.1.2. Anatomofisiologia da pele

A pele (Figura 3), o maior órgão do corpo humano, representa uma barreira de proteção contra patógenos, luz ultravioleta, produtos químicos, e lesões mecânicas, participando também do equilíbrio hidroeletrolítico pela limitação da perda de água pelo organismo. É composta por

três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme, todas variando significativamente em sua anatomia e função (SWANN, 2010).

**Figura 3** - Corte transversal do sistema tegumentário.



Fonte: (KOLARSICK et al., 2011)

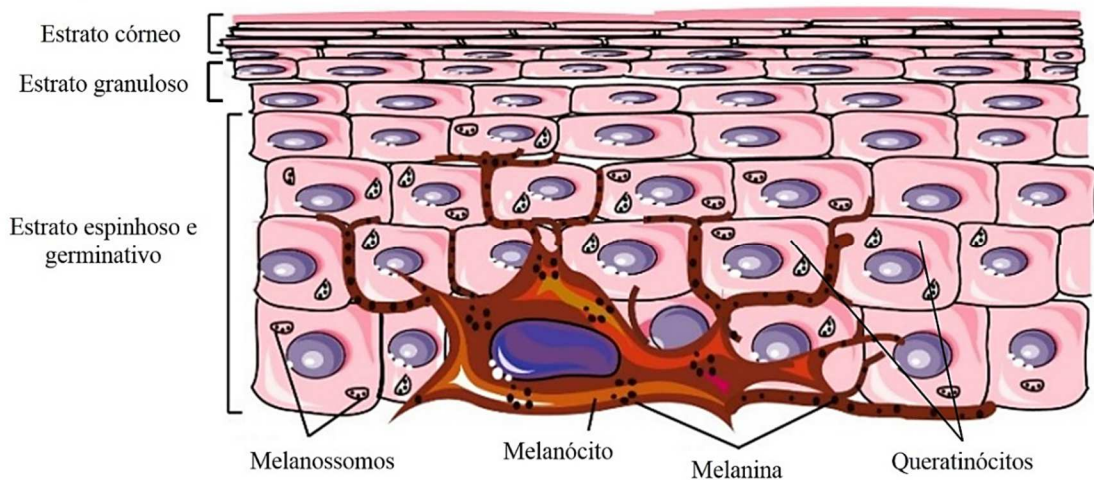
Na figura é demonstrada a pele a suas estruturas derivativas, as quais formam o sistema tegumentário.

A hipoderme (Figura 3) representa a camada abaixo da derme, também chamada de fáscia subcutânea, consistindo de uma rede de células de gordura e colágeno. Apesar da clara distinção anatômica entre derme e hipoderme, ambas são estrutural e funcionalmente integradas através da rede de vasos e nervos e através da presença de apêndices epidérmicos. A hipoderme consiste principalmente em tecido conjuntivo que, dependendo do local, forma grandes bolsões de tecido adiposo que isola e protege a pele. O tecido é particularmente rico em proteoglicanos e glicosaminoglicanos, o que atrai fluido para o tecido dando-lhe propriedades semelhantes a mucosas. Os tipos de células encontradas na hipoderme são fibroblastos, células adiposas e macrófagos que possuem um papel particular na homeostasia do adipócito na obesidade (WONG et al., 2016).

A derme (Figura 3) é um sistema integrado de tecido conjuntivo fibroso, filamentos e amorfo que compreende a maior parte da pele e fornece sua maleabilidade, elasticidade e resistência à tração, protegendo o corpo de lesões mecânicas e auxiliando na regulação térmica. O principal componente da derme é o colágeno, uma família de proteínas fibrosas, o qual representa 70% de seu peso seco e um dos principais materiais resistentes ao estresse da pele. (AIDA MARANDUCA et al., 2020). O componente celular principal da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e a substância amorfa, uma substância

gelatinosa em que os elementos dérmicos estão mergulhados. A vasculatura dérmica é composta pelo plexo subpapilar e o plexo inferior na interface dermal-subcutânea. Os corpúsculos de Meissner, encontrados nas papilas dérmicas, ajudam a mediar o toque, enquanto que os corpúsculos de Pacini são grandes órgãos nervosos que geram uma sensação de pressão e estão localizados na porção mais profunda da derme. Os anexos dérmicos representam um agrupamento de apêndices derivados ectodermicamente, incluindo glândulas écrinas e apócrinas, ductos e unidades pilossebáceas que se originam como crescimentos descendentes da epiderme durante o desenvolvimento. As glândulas sudoríparas écrinas estão envolvidas na regulação do calor e são mais abundantes nas solas dos pés e menos abundantes nas costas, enquanto as glândulas apócrinas estão envolvidas na liberação do odor. O pili erector é um feixe muscular liso que se prende à bainha externa da raiz do folículo. Acredita-se que a protuberância contenha células-tronco epiteliais responsáveis pela regeneração dos folículos, um papel crucial no ciclo de crescimento capilar (KOLARSICK et al., 2011).

**Figura 4** - Estrutura celular da epiderme.



Fonte: (D'MELLO et al., 2016)

Associação de queratinócitos e melanócitos. O melanócito está localizado na camada basal da pele e produz melanina, a qual é transferida para os queratinócitos.

A epiderme (Figuras 3 e 4), a camada mais superficial da pele, é constituída por um epitélio estratificado (múltiplas camadas celulares), pavimentoso (camada de células achatadas), queratinizado e avascular. Consiste em 4-5 camadas celulares sendo composta basicamente por células escamosas, basais e melanócitos. Atua como três linhas de defesa: barreira física (limita a agressão mecânica e a penetração de patógenos), barreira química (incluindo defesa antimicrobiana) e barreira contra a perda de água e eletrólitos. A interface entre a epiderme e a derme é formada por uma zona de membrana basal porosa que permite a

troca de células e fluidos e mantém as duas camadas unidas (AIDA MARANDUCA et al., 2020).

O estrato córneo representa a camada mais externa da epiderme (Figura 4), com aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  de espessura, formado pelo empilhamento dos chamados corneócitos, os produtos finais da diferenciação terminal dos queratinócitos. Essa diferenciação é um programa orientado de expressão gênica a qual tem início na camada basal e termina na superfície da epiderme. Durante sua jornada através das camadas espinhosas e granulares, os queratinócitos perdem seus núcleos e organelas celulares, ativam e silenciam genes específicos, passando por uma série de mudanças metabólicas e estruturais em sequência. Finalmente, os queratinócitos granulares passam por uma forma especializada de morte celular programada chamada cornificação, produzindo células achatadas e anucleadas ricas em queratina, os corneócitos. O processo de cornificação é caracterizado pela eliminação de todas as organelas e do núcleo, pela agregação de filamentos intermediários para formar uma matriz fibrosa intracelular, e pela montagem de uma camada proteica resistente na periferia do queratinócito. Esta última, denominada envelope celular cornificado, é composta por uma rede de proteínas de 15 nm de espessura, altamente insolúvel e complexa, a qual substitui a membrana plasmática dos queratinócitos terminalmente diferenciados (HENRY et al., 2012).

O estrato granuloso (Figura 4), o qual possui 3-5 camadas celulares, contém células em forma de diamante com grânulos de querato-hialina, contendo precursores de queratina, e grânulos lamelares contendo glicolipídios, com função de manutenção da união celular. O estrato espinhoso, uma camada composta por 8-10 células poliédricas irregulares com processos citoplasmáticos (chamados de "espinhas"), que se estendem para fora e entram em contato com células vizinhas por desmossomos. O estrato germinativo, também conhecido como camada basal, é a camada mais profunda, separada da derme pela membrana basal (lâmina basal) e anexada a esta por hemidesmossomos. As células encontradas nesta camada são células-tronco mitoticamente ativas cuboidais-colunares que estão constantemente produzindo queratinócitos, que então começam a migrar superficialmente (LOSQUADRO, 2017, YOUSEF et al., 2020).

No estrato germinativo da epiderme (Figura 4) situam-se os melanócitos, população minoritária de células (1500 células/ $\text{MM}^2$ ) responsáveis pela produção de melanina, a qual possui a capacidade de absorver os raios ultravioleta (UV) provenientes do sol. Em resposta à radiação UV, os queratinócitos produzem o hormônio estimulante de alfa-melanócitos ( $\alpha$ -MSH) que se liga ao receptor de melanocortina 1 (MC1R) em melanócitos sinalizando para a

indução da síntese de melanina. Os melanócitos então transferem a melanina para queratinócitos circundantes através de projeções semelhantes a dedos que alcançam estas células. Queratinócitos expostos ao sol acumulam melanina, que protege seus núcleos dos efeitos mutagênicos da radiação UV. À medida que os queratinócitos amadurecem, eles sofrem queratinização, perdem seu núcleo e morrem. Assim, a camada externa da pele é protegida tanto pelo pigmento de melanina em queratinócitos quanto por uma camada de queratinócitos mortos que agem como uma barreira para proteger as células vivas que se encontram nas camadas abaixo. Existem duas formas de melanina produzidas por melanócitos: eumelanina (pigmento preto/marrom) e feomelanina (pigmento vermelho/amarelo). A razão entre eumelanina e feomelanina na pele determina sua coloração, ao invés do número de melanócitos, que é relativamente constante em todos os tipos de pele. A eumelanina mais escura é um melhor escudo UV, conseqüentemente pessoas com pele mais escura têm um menor risco de desenvolver câncer de pele (DAVIS et al., 2019).

Há muito se sabe que o risco do desenvolvimento de MM está ligado à coloração da pele, cabelo e olhos, onde pessoas que possuem pele clara e dificuldade de bronzeamento, cabelos loiros ou ruivos e olhos claros, possuem um risco muito maior de desenvolver MM em comparação com o restante da população. A coloração da pele, cabelo e olhos é controlada, em parte, pelo gene *MC1R*, cujos polimorfismos determinam o nível de atividade da proteína MC1R. Variantes do gene que levam à redução da função MC1R resultam na produção predominantemente do pigmento feomelanina em pele clara que não se bronzeia, além de olhos e cabelos claros, sendo que MC1R totalmente funcional estimula a produção da eumelanina. Os indivíduos que abrigam variantes menos funcionais do gene *MC1R* acumulam mais mutações devido ao aumento da exposição dos núcleos a danos UV (DAVIS et al., 2019).

### **1.1.3. Câncer de pele**

O câncer é um grupo de doenças que envolvem o crescimento anormal de células de maneira descontrolada que pode se espalhar, metastatizar e invadir outros tecidos. Esta continua sendo uma doença grave, a qual tem ocupado a segunda posição em causa de morte após as doenças cardiovasculares nos países em desenvolvimento. O risco do desenvolvimento de câncer aumenta com a idade, e fatores determinantes para sua ocorrência incluem questões genéticas, estilo de vida, fatores ambientais e tabagismo (SARASWATI et al., 2019). Dessa forma, esforços em pesquisas são cada vez mais empregados no sentido do entendimento e combate desta doença, que ainda representa uma ameaça à comunidade médica, principalmente

devido a limitações no desenvolvimento de medicamentos adequados para o tratamento dos pacientes acometidos (KAR et al., 2020).

O câncer de pele é a doença maligna mais comum encontrada principalmente em caucasianos, sendo relatados mais de um milhão de novos casos em todo o mundo a cada ano. Os vários tipos de câncer de pele são nomeados após as células de onde se originam e seu comportamento clínico. Os tipos mais comuns são Carcinoma Basocelular (CBC), Carcinoma de Células Escamosas (CCE) (juntos chamados de câncer de pele não melanocítico - CPNM) e Melanoma Maligno (Mm) (ORTHABER et al., 2017). O CPNM, também conhecido como câncer de queratinócitos, é a neoplasia maligna mais comum em todo o mundo, sendo geralmente considerados curáveis, apresentando incidência elevada na Austrália (1000 casos/100.000 habitantes-ano) seguida pela Europa (98 casos/100.000 habitantes-ano). O CBC e o CCE da pele constituem 99% de todos os CPNM, sendo o restante representado por outras formas muito menos comuns como carcinoma de células Merkel, linfoma cutâneo primário de células B, sarcoma de Kaposi, carcinossarcoma e dermatofibrossarcoma (FAHRADYAN et al., 2017).

O CBC (Figura 5) representa 80-85% de todos os CPNM, tornando-o o câncer de pele mais comum em homens adultos e mulheres jovens, com aumento de 10% em sua incidência ao ano. Os fatores etiológicos mais importantes incluem luz UV, radiação ionizante e certos agentes cancerígenos químicos, sendo esperado que sua taxa de incidência dobre nos próximos 30 anos, principalmente entre as populações jovens femininas, provavelmente secundário ao uso de bronzeamento artificial e exposição solar (ORTHABER et al., 2017). O CBC é um tumor de crescimento lento para o qual metástases são raras, aparecendo como pápulas peroladas de tom rosa e ocorrem na cabeça ou no pescoço em 85% dos casos, sendo comum a visualização de úlceras ou vasos telangiectásicos (vasos muito finos) (LANOUE e GOLDENBERG, 2016). O CBC pode ser categorizado em subtipos bem definidos com achados clínicos e histopatológicos distintos: nodular, superficial, infundibulocístico, fibroepitelial, morfoforme (esclerosante, desmoplásico) e infiltrativo (Figura 3) (CAMERON et al., 2019).

O suporte principal do tratamento de CBC envolve técnicas cirúrgicas (excisão), intervenções não cirúrgicas (criocirurgia, radioterapia e terapia fotodinâmica [TFD]) e tratamento farmacológico. No entanto, eles também estão associados a comprometimento funcional potencial, cicatrizes e desfiguração, sendo que o manejo não cirúrgico pode ser uma alternativa desejável (LANOUE e GOLDENBERG, 2016). A TFD representa uma abordagem alternativa não invasiva ao tratamento do CBC, onde precursores de porfirina tópica (ácido 5-aminolevulinico (ALA), nanoemulsão ALA (BF-200 ALA) e Metil-5-aminolevulinato (MAL))



são aplicados na pele e convertidos em protoporfirina IX. A formação de EROs é induzida quando a pele é exposta a luz de comprimento de onda apropriado. A MAL-TFD já é aprovada para o tratamento do CBC na Europa, Austrália, Brasil, Nova Zelândia, Chile e África do Sul (WANG et al., 2020).

**Figura 5** - Apresentações clínicas mais comuns do CBC.

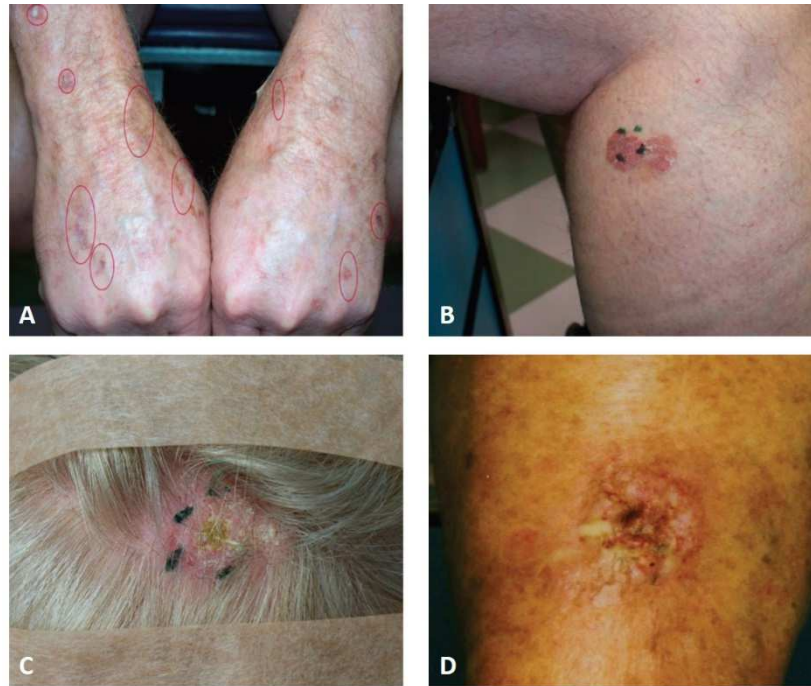


Fonte: (CAMERON et al., 2019).

**A.** CBC nodular avançado na testa. **B.** Infundibulocístico (pápula perolada bem circunscrita). **C.** Morfoforme (placa grande, infiltrada, cicatriz com bordas mal definidas e superfície brilhante). **D.** Superficial pigmentado. **E.** Fibroepitelial (placa séssil rosada) **F.** Infiltrativo (placas grandes, mal definidas, com crosta sobreposta, erosões e ulcerações).

O câncer do tipo CCE (Figura 6) é o segundo CPNM mais prevalente, sendo a forma mais potencialmente devastadora desta categoria de câncer de pele. Sua prevalência gira em torno de 58 indivíduos/100.000, sendo as regiões do pescoço e cabeça as mais afetadas (67% dos casos), apresentando taxas de mortalidade mais elevadas em homens de idade avançada, sendo mais frequentemente desenvolvido nas orelhas. Fatores de risco extrínsecos que contribuem para o desenvolvimento de CCE são exposição à luz solar UV, cancerígenos industriais como piche, alcatrão, óleo de parafina bruta, óleo combustível, creosoto, óleos lubrificantes, arsênico e nitrosoureas. Já os fatores de risco intrínsecos incluem idade, pigmentação de pele mais clara, cicatrizes e dermatoses associadas à fotossensibilidade (lúpus cutâneo crônico), ulcerações e líquen plano (SHULSTAD e PROPER, 2010, QUE et al., 2018).

**Figura 6** - Apresentações clínicas mais comuns do CCE.



Fonte: (SHULSTAD e PROPER, 2010)

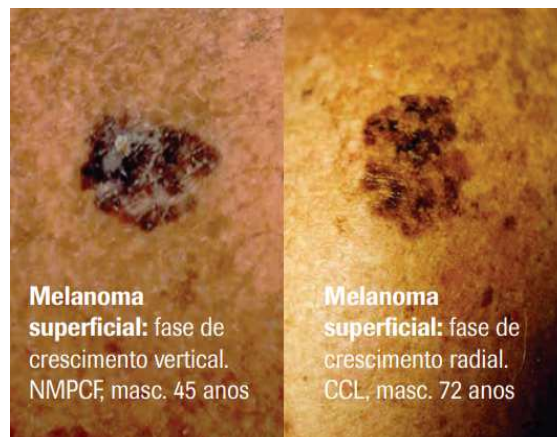
**A.** Ceratoses actínicas no dorso das mãos. **B.** CCE *in situ* no aspecto medial da panturrilha superior. **C.** CCE invasivo no couro cabeludo. **D.** CCE verrucoso, na perna.

A ceratose actínica (Figura 6A) é o primeiro precursor observável de um CCE, apresenta placas menores de 1 cm, ásperas, amarronzadas, vermelhas ou cor de pele. Essas lesões pré-cancerosas podem ser tratadas com criocirurgia, eletrodessecação e curetagem, cremes quimioterápicos ou moduladores imunológicos tópicos. CCE *in situ* (Figura 6B) apresenta-se como uma mácula, pápula ou placa bem delimitada, ou hiperqueratótica, podendo ser quase indistinguível de ceratoses actínicas a olho nu, o qual envolve toda a espessura da epiderme com queratinócitos pleomórficos (múltiplos tamanhos e formas), não havendo evidência de invasão na derme. Podem ser tratadas da mesma forma que a anterior, porém sem tratamento adequado podem avançar para forma de CCE invasivo (Figura 6C). Esta representa uma malignidade dos queratinócitos da epiderme os quais invadem a derme, possuindo também potencial de invadir tecido adiposo, músculo, ossos e cartilagem, criando metástases que migram para linfonodos e tecidos distantes. Assim, requer tratamento mais agressivo, como a excisão cirúrgica, sendo o tratamento de escolha para todos os tumores invasivos, podendo levar a recidivas ou metástases se realizada de forma insuficiente. Múltiplas variantes desta doença podem ocorrer, incluindo células de fuso, acantolítico, verrucoso, linfoepitelioma, desmoplásico, adenoescamoso, cístico e queratoacantoma, diferindo em características

histológicas e de prognóstico. O CCE verrucoso (Figura 6D) é uma variante de baixo grau, tipificada por queratinócitos bem diferenciados, com baixo potencial de risco metastático e são identificados por sua localização (tumores orais, plantares e Buschke-Loewenstein) (SHULSTAD e PROPER, 2010).

O MM pode ser classificado de acordo com o sítio de apresentação em cutâneo e não cutâneo (ocular, gastrointestinal, geniturinário e nasofaríngeo). O prognóstico do melanoma baseia-se na espessura da lesão, sendo as mais espessas correspondentes a uma maior taxa de mortalidade. Portanto, a detecção precoce e a ressecção das lesões são necessárias para prevenir o surgimento de metástases (SCOLYER et al., 2011).

**Figura 7** – Características fenotípicas do MS de pele.



Fonte: (SCOLYER et al., 2011)

Melanoma superficial (MS) se apresenta como uma lesão plana irregular de crescimento lento com pigmentação variada, caracterizada por lesão marrom planas ou ligeiramente elevadas, com coloração preta, azul ou rosa tipicamente maiores que 6 mm de diâmetro, com bordas assimétricas irregulares.

O MS (Figura 7) é o tipo mais comum de MM cutâneo, representando aproximadamente 70% de todos os melanomas, o qual caracteriza-se por um padrão de crescimento horizontal prolongado (durante anos) na pele antes de se tornar invasivo. Geralmente ocorre em pacientes em torno de 50 anos, envolvendo sítios anatômicos intermitentemente expostos ao sol, como tronco, costas e extremidades (SEER, 2020). Histologicamente, a porção intraepidérmica do MS é caracterizada pela presença de melanócito epitelióide pleomórfico grande, mostrando migração ascendente aninhada e de célula única (invasão epidérmica pagetoide). Outras características incluem circunscrição, espessamento epidérmico variável e melanização intracitoplasmática proeminente (SCOLYER et al., 2011).

Melanomas nodulares (MN, Figura 8) representam cerca de 15 a 30% de todos os melanomas, tendem a ocorrer em pacientes em média com 70 anos de idade, comumente

encontrados em todas as superfícies do corpo, especialmente no tronco. Apresentam-se como lesões elevadas ou polipoides de rápida ampliação, que muitas vezes são azuis ou pretas e apresentam uma fase de crescimento vertical precoce (SEER, 2020). Histologicamente, não há nenhum componente epidérmico que se estenda além das bordas do componente dérmico (SCOLYER et al., 2011).

**Figura 8** - Características fenotípicas do MN de pele.



Fonte: (SCOLYER et al., 2011).

O MN normalmente apresenta-se como uma pápula marrom-preto escura ou nódulo em forma de cúpula.

O Melanoma Lentigo Maligno (MLM, Figura 9) é responsável por aproximadamente 5% dos melanomas, ocorrendo mais comumente em pacientes idosos na faixa de 80 anos, com pele cronicamente exposta ao sol, como a região da cabeça, pescoço ou antebraço. Muitas vezes passam-se muitos anos entre a primeira aparição deste melanoma e sua invasão epitelial (SEER, 2020). MLM é caracterizado histologicamente por uma proliferação lentiginosa de melanócitos atípicos na pele severamente danificada pelo sol, mostrando atrofia epidérmica, elastose solar dérmica grave e afinamento dérmico. O envolvimento da porção superficial de estruturas anexas da pele e melanócitos multinucleados ocasionais ou gigantes estão frequentemente presentes. À medida que a lesão progride, o componente epidérmico muitas vezes mostra crescimento lentiginoso confluyente, aninhamento e invasão epidérmica pagetoide, semelhante ao observado em MS (SCOLYER et al., 2011).

**Figura 9** – Características fenotípicas do MLM de pele.



Fonte: (SCOLYER et al., 2011).

A lesão precursora o MLM é tipicamente maior que 3 cm de diâmetro, e, ao se tornar invasiva, desenvolve uma cor marrom-preto escuro ou um nódulo azul-preto elevado.

O Melanoma Lentiginoso Acral (MLA, Figura 10) representa menos de 5% dos casos de MM, sendo mais comum em indivíduos de pele negra, respondendo por até 70% dos melanomas na população negra e até 46% na população asiática. As lesões surgem mais comumente em sítios acrais, como palmas das mãos, solas dos pés, região subungueal e, ocasionalmente superfícies mucosas, sendo extremamente agressivo, com rápida progressão da fase de crescimento horizontal para vertical. Histologicamente, o MLA é geralmente caracterizado por melanócitos atípicos únicos espalhados ao longo da camada epidérmica juncional. A presença de um infiltrado linfocítico associado, obscurecendo em parte a junção dermoepidérmica pode ser uma pista para o seu diagnóstico. Formas mais avançadas mostram crescimento confluyente lentiginoso e aninhado e alguma invasão epidérmica pagetóide (SCOLYER et al., 2011).

**Figura 10** – Características fenotípicas do MLA *in situ*.



Fonte: (SCOLYER et al., 2011).

### 1.1.4. Genética

A gênese do MM pode ser dividida em 2 estágios principais: iniciação e progressão. A iniciação do MM requer proliferação de melanócitos e desvio de senescência. Após um certo número de divisões, as células entram em senescência e, a fim de contorná-la e permitir o crescimento adicional das células, o ciclo celular e o comprimento dos telômeros devem ser aumentados (BERTRAND et al., 2020). Mutações germinativas ou constitutivas (que afetam os gametas e são hereditárias) aumentam o risco de formação do MM. Já os fatores ambientais atuam modulando esses riscos, induzindo mutações somáticas (ocorrendo durante a divisão mitótica, não sendo hereditários), modificações epigenéticas e alogenéticas e/ou modificando o microambiente. Embora aproximadamente 5 a 12% dos casos de MM possuem caráter hereditário, a maior parte surge a partir de mutações somáticas adquiridas durante a vida (DAVIS et al., 2019).

#### 1.1.4.1. Mutações Germinativas

Cerca de 15% dos casos de MM ocorrem em pacientes com histórico familiar, e um subconjunto desses pacientes possuem mutação germinativa em um gene que aumenta a predisposição. Os fatores que influenciam o risco de MM em uma família incluem experiências de exposição solar compartilhadas, localização geográfica, fototipo da pele e variantes genéticas (TOUSSI et al., 2020). Variantes nos genes de suscetibilidade ao MM foram classificadas de acordo com sua frequência e o grau de risco de desenvolvimento em três classes: (i) variantes ultrarraras com alto risco (URAR), (ii) variantes raras com risco moderado (RRM) e (iii) variantes frequentes com baixo risco (FBR) (BERTRAND et al., 2020).

As variantes “URAR” são responsáveis por 2% do risco total de desenvolvimento de melanoma. Estas são definidas como mutações genéticas que conferem ao indivíduo um elevado risco de desenvolvimento de MM, sendo usualmente associadas com casos de melanoma múltiplo dentro da mesma família (POTRONY et al., 2015). Aproximadamente 22% das famílias propensas ao desenvolvimento de MM estão associadas com mutações em 9 genes de suscetibilidade de MM de alto risco (19% para o gene *cdkn2a* e 3% para os outros 8 genes). No entanto, os 78% restantes podem ser parcialmente contabilizados pelas variantes RRM e FBR (BERTRAND et al., 2020). O gene *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

codifica 2 proteínas (p16 e p14) que inibem a quinase dependente de ciclina (CDK) regulando assim os pontos de verificação do ciclo celular. Representa o gene que se encontra mais comumente mutado nos casos de MM hereditário, aumentando o risco de desenvolvimento em 65 vezes, sendo o MM superficial mais comumente envolvido em portadores de mutação CDKN2A, incluindo cabeça e pescoço (TOUSSI et al., 2020). Mutações no gene CDK4 (*cyclin-dependent kinase 4*), o qual codifica outro regulador de ciclo celular, também foram ligadas à formação de MM em famílias com fenótipos semelhantes aos de famílias com mutações CDKN2A. A proteína CDK4 é uma quinase que regula a progressão do ciclo celular G1, que quando mutado leva a progressão do ciclo, porém suas variantes são raras, podendo ser encontradas em menos de 1% dos casos familiares de melanoma, com penetrância de 74% aos 50 anos (BERTRAND et al., 2020).

O papel dos telômeros é altamente implicado na tumorigênese, sendo mutações germinativas no gene *TERT* (*telomerase reverse transcriptase*), codificando um dos principais componentes da telomerase, comuns em tumores humanos incluindo MM. Este gene codifica uma transcriptase reversa a qual cria um modelo para adição de telômeros e forma os principais componentes da telomerase. Enquanto telômeros curtos acabam levando à senescência celular, telômeros mais longos estão associados ao câncer, incluindo MM cutâneo. A família de genes *shelterin* regula o processamento e estabilidade dos telômeros, onde mutações germinativas nos genes *ACD* (*shelterin complex subunit and telomerase recruitment factor*), *TERF2IP* (*Telomeric Repeat Binding Factor 2, Interacting Protein*) e *POT1* (*protection of telomeres 1*) causam MM hereditário. Como o gene *TERT*, estes genes estão implicados na manutenção dos telômeros e suas mutações podem aumentar o seu comprimento e fragilidade. Dessa forma, mutações do promotor *TERT* e do complexo *shelterin* resultam em telômeros mais longos, favorecendo o desvio da senescência (TOUSSI et al., 2020).

Mutações germinativas de perda de função no gene *BAP1* (*BRCA1-associated protein-1*) foram encontradas associadas a uma síndrome de predisposição tumoral. Este é um gene supressor tumoral localizado no cromossomo 3 (3p21), codificando uma deubiquitinase que participa de complexos multiproteínas, desempenhando papéis em inúmeros processos celulares, incluindo resposta a danos no DNA, regulação do ciclo celular, crescimento celular, metabolismo e regulação de respostas inflamatórias. As mutações de perda de função do *BAP1* estão associadas a aproximadamente 15% de risco de MM cutâneo (TOUSSI et al., 2020).

Um grupo menos comum de mutações germinativas que aumentam o risco de desenvolvimento do melanoma, são mutações em vias de reparo por excisão de nucleotídeos

(NER). A radiação UV cria lesões de DNA volumosas que devem ser removidas e reparadas por mecanismos de reparo como o NER; se essas vias forem interrompidas, eventos mutacionais serão propagados. A falta de vias NER funcionais resulta no acúmulo de mutações UV ou quimicamente induzidas na pele e um risco aumentado de malignidades cutâneas. Pacientes com *Xeroderma pigmentosum*, uma doença causada por mutações hereditárias em genes da via NER, apresentam extrema sensibilidade à radiação UV. Muitas vezes estes pacientes desenvolvem alguma forma de câncer de pele antes dos 10 anos de idade e possuem um risco muito maior de desenvolver MM na pele exposta ao sol do que a população em geral (DAVIS et al., 2019).

As variantes RRM são representadas por mutações germinativas nos genes *MITF* (*Microphthalmia-associated transcription factor*) e *MC1R* (*melanocortin 1 receptor*). A variante germinativa do gene *MITF* (p.E318K) mostrou-se envolvida na predisposição ao MM, estando associada à um risco de 3 a 5 vezes maior de desenvolvimento. Como parte da família gênica *myc*, o gene *MITF* codifica um fator de transcrição específico da linha melanocítica que regula a diferenciação, proliferação e sobrevivência dos melanócitos. A mutação p.E318K é uma variante de ganho de função que causa prejuízo ao processo de sumoilação da proteína e, portanto, regulação aberrante de vias seguintes. Variantes do gene *MC1R* (16q24) são relativamente comuns, encontradas em até 11% dos indivíduos, embora com menor penetrância. A proteína *MC1R*, um regulador-chave da síntese de melanina em melanócitos sob estimulação UV, é um receptor acoplado a proteína G que regula tanto a pigmentação capilar quanto a dérmica. Quando ativado pela radiação UV, o receptor é ligado pelo hormônio alfa-melanócito estimulante, resultando em regulação da melanina no interior dos melanócitos e estimulação de mecanismos de reparo de DNA (TOUSSI et al., 2020). A melanina é então transferida para até 40 queratinócitos circundantes para atuar como um protetor solar natural para absorver a irradiação UV. O gene *MC1R* é altamente polimórfico (> 80 variantes) em populações caucasianas, sendo seis variantes de perda de função (p.ins86-87A, p.D84E, p.R142H, p.R151C, p.R160W e p.D294H) definidas como variantes do tipo “R”, pois aumentam o risco relativo de melanoma em 2-3 vezes, e outras 4 variantes (p.V60L, p.V92M, I155T e p.R163Q) são classificadas como variantes do tipo “r”, pois conferem risco de melanoma abaixo de 2. O gene *MC1R* é um gene de suscetibilidade ao MM de penetrância moderada, mas também é um gene que modifica o risco de MM em pacientes com mutação *CDKN2A* (BERTRAND et al., 2020).



As variantes do tipo FBR são representadas pelos genes associados a pigmentação *OCA2* (*Oculocutaneous albinism type 2*), *ASIP* (*agouti signaling protein*), *TYR* (*Tyrosinase*), *TYRP1* (*Tyrosinase-related protein 1*), *MATP* (*microtubule-associated protein tau*), *SLC45A2* (*solute carrier family 45 member 2*), *KIT* (*KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*), and *PARP1* (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*), estando associados a um ligeiro aumento (12%) no risco de formação de MM, mas combinações dessas variantes de baixo risco podem representar até 78% dos MM não familiares. Eles também são responsáveis pelo fototipo do indivíduo e, portanto, são importantes para determinar a interação entre o fenótipo e o ambiente. Essas variantes de pigmentação frequentes provavelmente desempenham um papel como modificadores do risco de MM de outras origens genéticas, como as variantes ultrarraras e raras, conferindo alto e moderado risco de desenvolvimento de MM, respectivamente (BERTRAND et al., 2020).

#### 1.1.4.2. Mutações Somáticas

Nem todas as variantes do MM possuem as mesmas frequências mutacionais, no entanto, há mutações somáticas recorrentes que aparecem frequentemente em todos os tipos de MM. Mutações de condução no MM tendem a estar em vias de sinalização que regulam a proliferação, crescimento e metabolismo, resistência à apoptose, tempo de vida replicativo, identidade celular e controle de ciclo celular (DAVIS et al., 2019).

A via de sinalização MAPK desempenha papéis-chave na sobrevivência e proliferação celular e é frequentemente vista no MM. A alteração mais frequente na via MAPK é no gene *BRAF* (*v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*), resultando em proliferação, migração e sobrevivência de células tumorais descontroladas. Mutações *BRAF* são encontradas em 50-60% de todos os casos de MM metastático, sendo que a mutação V600E é mais comum que resulta na substituição de um ácido glutâmico por valina no aminoácido 600 (MIRAFLOR et al., 2017).

Outros 15 a 20% dos MM possuem mutações *NRAS* (*Proto-oncogene N-ras*), 2% possuem mutações *CKIT* (*Proto-oncogene c-KIT*, comuns em MM de mucosas), e 50% dos melanomas uveais possuem mutações *GNAQ* (*G Protein Subunit Alpha Q*). A via MAPK está envolvida no controle da proliferação e sobrevivência em resposta aos fatores de crescimento, de modo que quando mutações causam atividade constitutiva, as células crescem de forma descontrolada. Portanto, este é um caminho oncogênico particularmente importante tornando-o um alvo primordial para a intervenção terapêutica. O *BRAF* é um alvo atraente nessa via, pois

é mutado em aproximadamente metade dos pacientes com MM, é fácil de atingir e não é ativo em células saudáveis. A radiação UV também estimula diretamente a sinalização MAPK e tem se mostrado um importante caminho envolvido na carcinogênese induzida por UV (DAVIS et al., 2019). A ativação induzida por UV dessa via é uma área de interesse para a pesquisa do MM, pois a compreensão do mecanismo pelo qual ocorre a carcinogênese induzida por UV pode resultar no desenvolvimento de medicamentos para atingir essas vias, o que pode levar a novas opções de tratamento para câncer de pele, como o MM. Embora a histologia ainda seja importante para o seu diagnóstico, uma das mudanças mais influentes na compreensão da progressão do câncer foi a constatação de que este surge devido ao acúmulo de mutações genéticas, levando à desregulação das vias celulares (DAVIS et al., 2019).

### 1.1.5. Diagnóstico e tratamento

A detecção precoce dos casos de MM tem aumentado ao longo do tempo devido, em parte, ao processo de conscientização da população e vigilância do aparecimento de lesões cutâneas anormais. O MM é inicialmente diagnosticado pela inspeção visual da pele (auto-avaliação), permitindo o reconhecimento de diferentes padrões de Assimetria, Bordas, Coloração, Diâmetro e Evolução (critérios “ABCDEs”, Figura 11), cuja detecção aumenta em 90% a sensibilidade da auto avaliação na detecção precoce do MM (CARR et al., 2020). Os critérios ABCDE foram criados em 1985 para aumentar a conscientização da população sobre a importância da detecção precoce do câncer de pele, sendo que qualquer lesão cutânea que tenha uma ou mais dessas características deve ser avaliada por um dermatologista (CARR et al., 2020).

**Figura 11** - Critérios “ABCDE” para diagnóstico precoce do MM.



Fonte: (CARR et al., 2020).

**A.** Ambos os lados da lesão não apresentam simetria. **B.** As bordas da lesão tendem a ser irregulares e dentadas. **C.** Múltiplas cores no interior da lesão. **D.** Diâmetro da lesão maior do que 6MM. **E.** Lesão apresenta mudança no tamanho, formato ou coloração.

O procedimento padrão-ouro para o diagnóstico de MM é a biópsia, existindo diversos tipos disponíveis, porém os mais comuns são a biópsia incisional e a biópsia por aspiração de agulha fina. Se o MM ainda não possui metástases e permanece superficialmente localizado na pele, são utilizadas biópsias excisionais, em que toda a massa tumoral em uma pequena lesão pode ser removida, com margens de 1-2 MM de pele normal, sendo o diagnóstico confirmado por exame histopatológico da lesão. Biópsia incisional somente é aceitável se a excisional não puder ser realizada devido ao tamanho ou a localização da lesão. No entanto, essa forma de diagnóstico tem desvantagens devido à sua natureza invasiva e limitante, pois não permite a identificação da origem primária ou secundária do tumor. A biópsia por aspiração de agulha fina é um procedimento rápido, econômico e minimamente invasivo, que envolve a inserção de uma agulha oca diretamente na massa tumoral para remover fluido, células e/ou tecido. Este procedimento tem provado ser extremamente sensível para a detecção de MM. No entanto, este procedimento também é limitador devido ao fato de que ele simplesmente não pode determinar a fonte original de MM e assim a efetividade do tratamento geral é reduzida, havendo um alto risco de recorrência do MM devido à metástase (HARTMAN e LIN, 2019, NAIDOO et al., 2019).

Devem ser descritos no exame anatomopatológico os seguintes achados: diagnóstico e subtipo de melanoma, margens, presença de crescimento radial (somente) ou vertical associado, espessura tumoral (índice de Breslow e nível de Clark), presença de ulceração, invasão vascular ou perineural, regressão, infiltrado inflamatório e índice mitótico. A biópsia é tipicamente realizada com anestesia local, devendo avaliar a profundidade da invasão (espessura de Breslow), devido este ser o indicador prognóstico mais importante, o qual orienta o tratamento. A profundidade (invasão) do tumor é um determinante fundamental do prognóstico e do tratamento e é descrita de duas maneiras: o índice de Breslow, que avalia a profundidade do tumor em milímetros (atualmente é o principal fator usado para estadiamento do MM e base indispensável para o tratamento), e o nível de Clark, que descreve a invasão neoplásica em cinco níveis em relação às camadas da pele (BRASIL, 2013).

A extensão do tumor na pele e para além dela (estadiamento clínico) é dado pelos exames clínico e histopatológico, sendo os definidores do tratamento e prognóstico dos pacientes. O estadiamento clínico permitirá a definição dos seguintes critérios: tamanho do tumor em relação à profundidade na derme ("T", definido patologicamente de pT1 a pT4), acometimento linfonodal (N0 a N3) e ausência (M0) ou presença (M1) de metástase(s) à distância (BRASIL, 2013). A histopatologia do MM revela o aumento das células de melanócitos atípicos/melanoma na epiderme e/ou derme. Melanócitos atípicos podem ser vistos

na epiderme, denominada, propagação pagetóide, podendo haver melanócitos atípicos contínuos ao longo da junção dérmico-epidérmica, denominada proliferação lentiginosa (HARTMAN e LIN, 2019).

A imunohistoquímica (IHC) é a técnica auxiliar mais comumente empregada por patologistas para auxiliar no diagnóstico de MM, pois está prontamente disponível na maioria dos laboratórios, é relativamente barata, confiável e reprodutível. Para o MM, existem dois tipos de biomarcadores mais comumente utilizados para fins diagnósticos e prognósticos: marcadores melanocíticos e marcadores proliferativos. Marcadores melanocíticos são usados para determinar se uma lesão ambígua é de origem melanocítica, e tendem a ser proteínas envolvidas na síntese de melanina, biogênese ou diferenciação de melanócitos, enquanto os marcadores proliferativos são usados para avaliar a atividade do ciclo celular em uma lesão. Atualmente, a determinação da proliferação do tumor é tipicamente feita contando-se figuras mitóticas (mitose/mm<sup>2</sup>); no entanto, estudos recentes têm demonstrado que a detecção de marcadores proliferativos pode ser um indicador robusto de atividade proliferativa com importância prognóstica. O Melan-A/MART-1 (*melanoma antigen recognized by T cells 1*) são um dos biomarcadores mais utilizados para detecção de MM, pois são mais sensíveis que o HMB-45 (*human melanoma black*) para reconhecer o MM, sendo este último um anticorpo que reconhece o antígeno melanocítico gp100 (também conhecido como Pmel 17), o qual desempenha papel na polimerização de melanina e biogênese. Outros marcadores melanocíticos comuns utilizados para o diagnóstico de MM incluem proteína S100, MITF, Tirosinase e SOX10 (*SRY-related HMG-box 10*). O MelanA/MART-1 e HMB-45 possuem algumas das maiores especificidades, sua expressão é limitada a tumores melanocíticos e apenas algumas outras entidades raramente encontradas (DAVIS et al., 2019).

Além da auto-avaliação, novas tecnologias têm buscado melhorar a precisão do diagnóstico pré-biopsia. Estas incluem análise de imagem por meio de inteligência artificial, obtenção de imagens 3D de corpo inteiro, microscopia confocal de reflectância, tomografia de coerência óptica e recuperação de informações genéticas epidérmicas (HARTMAN e LIN). Os recentes avanços tecnológicos resultaram no surgimento de tecnologia de imagem não invasiva para detecção do melanoma. Vários aplicativos para smartphones, como SkinVision, UMSkinCheck e MoleScope, foram desenvolvidos com supostos objetivos de acessibilidade de ampla disseminação, triagem econômica e, finalmente, maior detecção precoce para pacientes. À medida que a tecnologia evolui e se torna mais confiável, essas aplicações podem se tornar ferramentas muito eficazes para o diagnóstico do MM, mas atualmente os usuários devem escolher aplicativos criteriosamente para garantir que sejam eficazes (DAVIS et al., 2019).

Ensaio bioquímico e hematológico não são rotineiramente utilizados no diagnóstico do MM, porém possuem utilidade no monitoramento da eficácia do tratamento administrado. Um exame de sangue é utilizado para determinar os níveis de contagem sanguínea, vitamina D ou lactato desidrogenase (LDH) (NAIDOO et al., 2019). Um dos indicadores prognósticos independentes mais significativos para MM é a dosagem de LDH, a qual catalisa a conversão do piruvato em lactato, em condições de falta de oxigênio, como é o caso do microambiente tumoral. Um índice elevado de LDH é reconhecido como um indicador prognóstico adverso para pacientes com MM avançado e indica menor chance de sobrevivência (DAVIS et al., 2019).

O desenvolvimento de técnicas de imagem para MM tornou-se mais desejável, uma vez que são mais confiáveis, rápidas e viáveis, bem como completamente não-invasivas e indolores (NAIDOO et al., 2019). Dois dispositivos, MelaFind e SIAscope (Análise Intracutânea Espectrofotométrica), utilizam luz infravermelha visível (~400 a ~1000 nm) para visualizar lesões e fornecer informações para auxiliar os médicos a decidir se uma biópsia é necessária. MelaFind é um sistema de diagnóstico totalmente automático desenvolvido em 2010, o qual utiliza luz para visualizar lesões cutâneas de até 2,5 MM de profundidade, e fornece informações sobre a desorganização morfológica das células em uma lesão. À medida que a tecnologia de imagem multiespectral se torna mais refinada e continuar a fornecer evidências de redução de custos pelo emprego de uma biópsia mais direcionada, ela pode encontrar seu caminho para o uso clínico de rotina (FARBERG et al., 2017).

Uma modalidade de fluorescência óptica extremamente promissora para o diagnóstico de MM é o diagnóstico fotodinâmico (DPD), também conhecido como diagnóstico de fluorescência. As poucas desvantagens dessa modalidade podem ser evitadas pelo desenvolvimento de medicamentos de baixo custo, sendo que esta ferramenta de diagnóstico pode ser usada em conjunto com a TFD. Essa abordagem combinada pode permitir a detecção sensível e precoce do MM, bem como garantir simultaneamente um tratamento rápido, não invasivo e confiável para a erradicação de células cancerígenas (NAIDOO et al., 2019).

O tratamento do MM é definido após a confirmação histopatológica e o estadiamento patológico do tumor primário. As abordagens terapêuticas atuais incluem ressecção cirúrgica, quimioterapia, TFD, imunoterapia e terapia-alvo. A estratégia terapêutica pode incluir agentes únicos ou terapias combinadas, dependendo da saúde, estágio e localização do tumor do paciente. A eficiência desses tratamentos pode ser diminuída devido ao desenvolvimento de diversos mecanismos de resistência. Novos alvos terapêuticos surgiram a partir de estudos do perfil genético dos melanócitos e da identificação de fatores moleculares envolvidos na

patogênese da transformação maligna. A quimioterapia representou o pilar do tratamento para MM metastático antes do início dos anos 2000. As combinações de quimioterapia foram avaliadas para melhorar as respostas clínicas, mas a sobrevida geral não apresentou melhora. A resistência à apoptose é provavelmente a principal causa de resistência a medicamentos quimioterápicos no MM. Embora tenha sido substituída por opções adicionais, a quimioterapia continua sendo importante no tratamento paliativo de melanomas refratários, progressivos e recidivos (DOMINGUES et al., 2018).

Dacarbazina foi o primeiro agente aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), seu mecanismo de ação inclui a alquilação de bases no DNA no intuito de evitar que as células se reproduzam. Não só as taxas de resposta são baixas, mas os efeitos a longo prazo são leves, com apenas 1% dos pacientes alcançando uma resposta quimioterápica de longo prazo. Temozolomida, um derivado da dacarbazina, foi aprovado no ano 2000 como quimioterápico oral para MM metastático, e devido ao fato de poder atravessar a barreira hematoencefálica, foi usado principalmente para metástases cerebrais. A temozolomida foi igualmente eficaz em termos de sobrevivência global como a dacarbazina, mas sua formulação oral foi associada à melhoria da qualidade de vida e ao funcionamento físico. No geral, os referidos agentes quimioterápicos não tinham melhora significativa na sobrevida, o que muitas vezes é a métrica mais valorizada no manejo do MM. Isso levou ao desenvolvimento de novas terapias, como agentes imunoterápicos direcionados e inibidores de *checkpoint* (NGUYEN et al., 2020).

Um aspecto da radioterapia que tem sido observado recentemente é sua capacidade de reduzir o crescimento do tumor fora do campo direto da radiação, um fenômeno descrito como efeito abscopal. A radiação ionizante ativa vias inflamatórias que levam à ativação de células dendríticas e de células T específicas do tumor (NGUYEN et al., 2020). O MM tem sido considerado historicamente um tumor resistente à radioterapia quando comparado a outros tipos de câncer. Embora o tratamento curativo seja a cirurgia de ressecção completa da lesão primária, a radioterapia mantém-se útil para casos selecionados de tumores irresssecáveis, quando o resultado cosmético da cirurgia for desfavorável, principalmente em estruturas da região da face, da cabeça e do pescoço (BRASIL, 2013).

A interleucina-2 (IL2) é utilizada para o tratamento de vários tipos de câncer devido à sua capacidade de estimular a proliferação e ativação de células T infiltradas por tumores. A administração de IL2 resulta em uma taxa de resposta objetiva global de 16%, com 6% alcançando resposta completa e 10% alcançando resposta parcial. A IL2 sistêmica é atualmente considerada uma opção de tratamento de primeira linha para pacientes com MM em estágio IV não ressecáveis com "bom estado de desempenho", independente do estado de mutação do gene

*BRAF*. O CTLA-4 é um receptor de ponto de verificação imune expresso em células T ativadas que, quando ativado, regula as respostas imunes de células T. Ipilimumab é um anticorpo monoclonal anti CTLA-4 direcionado contra o receptor inibitório e serve para neutralizar o efeito inibitório da ativação CTLA-4, permitindo ativação de células T e lise tumoral. Quase 50% dos pacientes com MM cutâneo possuem mutação no gene *BRAF*. Vemurafenib é um inibidor altamente seletivo de *BRAF* mutado que inicialmente foi promissor no tratamento para MM metastático. Vemurafenib é mais eficaz que a dacarbazina e, além disso, foi associado a uma redução relativa de 63% no risco de morte em relação à dacarbazina. Apesar de sua eficácia clínica, a maioria dos pacientes desenvolve resistência ao vemurafenib em 6-7 meses de tratamento. Acredita-se que este fenômeno esteja relacionado à reativação da via MAPK (via intrínseca) ou à ativação da via P13K/AKT/mTOR (via extrínseca) (NGUYEN et al., 2020)

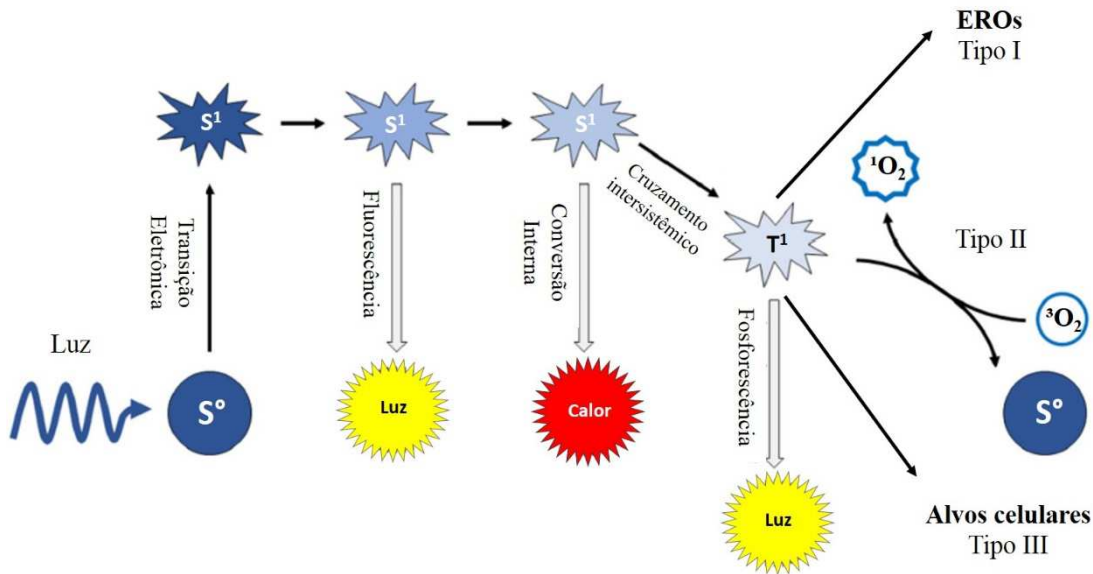
## 1.2. TERAPIA FOTODINAMICA

Como visto, uma variedade de estratégias terapêuticas, tais como cirurgia, quimioterapia e terapia com radiação, são amplamente utilizadas no tratamento clínico do MM atualmente. No entanto, a toxicidade sistêmica, a resistência aos medicamentos e sua baixa seletividade muitas vezes levam a resultados insatisfatórios. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias inovadoras que aumentem a taxa de cura e reduzam os efeitos colaterais da terapia do MM são extremamente necessárias, e neste sentido, a TFD tem representado um método alternativo ao tratamento tradicional do MM, a qual já se encontra registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em “Produtos para saúde” com o nome técnico de “Sistema a LED para Terapia” (BRASIL, 2013). Em comparação com os métodos tradicionais de tratamento tumoral, a TFD produz baixos efeitos tóxicos e adversos, além da não-invasividade, e devido à sua baixa densidade energética, ela só age na ativação do Agente Fotosensibilizador (AFS) sem causar danos teciduais, o que é mais adequado para algumas pessoas, como indivíduos idosos e pacientes sensíveis a quimioterapia (YU et al., 2020).

### 1.2.1. Mecanismo de ação

O tratamento clássico empregando a TFD para o câncer utiliza a administração de um AFS ao paciente. A droga então se acumula no tecido tumoral e na área do tumor e em seguida é irradiada em um comprimento de onda luminoso específico, o qual ativa o FS e induz a morte celular (Figura 12) (PASZKO et al., 2011).

**Figura 12** - Mecanismos de ação da TFD segundo o digrama de Perrin-Jablonski



Fonte: (KWIATKOWSKI et al., 2018)

Diagrama ilustrando os processos físicos que podem ocorrer após um AFS absorver um fóton com energia da faixa ultravioleta ou visível. S<sup>0</sup>: AFS no Estado Singlete Fundamental. S<sup>1</sup>: AFS no Estado Singlete Excitado. T<sup>1</sup>: AFS no Estado Triplete Excitado. <sup>3</sup>O<sub>2</sub>: Oxigênio Triplete no Estado Fundamental. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>: Oxigênio Singlete no Estado Excitado.

O mecanismo de ação molecular da TFD baseia-se em três componentes não tóxicos, os quais produzem os efeitos desejados no interior dos tecidos patológicos apenas por interações mútuas entre o AFS, a luz com o comprimento de onda apropriado e o oxigênio dissolvido nas células. Há três mecanismos principais de reação fotodinâmica, sendo dois deles dependentes de moléculas de oxigênio presentes no interior celular. Na primeira fase destes mecanismos, o AFS depois de entrar na célula, é irradiado com um comprimento de onda luminoso coincidindo com o seu espectro de absorção, sendo convertido do seu estado de energia singlete fundamental (S<sup>0</sup>) para o estado singlete excitado (S<sup>1</sup>) de vida curta, devido a absorção de fótons. Parte da energia é então irradiada na forma de um quantum de fluorescência, no entanto a molécula também pode sofrer cruzamento intersistêmico do estado S<sup>1</sup> para o estado triplete excitado (T<sup>1</sup>) mais estável e duradouro (KWIATKOWSKI et al., 2018).

No mecanismo do Tipo I da reação fotodinâmica (Figura 12), o AFS no estado T<sup>1</sup> pode transferir energia para as biomoléculas de seu entorno. Entre o AFS no estado T<sup>1</sup> e o tecido cancerígeno (substrato), um hidrogênio ou elétron é transferido, o que leva à formação de radicais livres e radicais aniônicos do AFS e do substrato. Elétrons interagem com moléculas de oxigênio, as quais permanecem em seu estado energético fundamental. Esse processo leva à produção de EROs - inicialmente sob a forma do radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), o qual dá



seguimento à geração de EROs no interior das células. A cascata de reações iniciada leva ao estresse oxidativo que resulta na destruição das células do câncer (DI MASCIO et al., 2019).

No mecanismo do Tipo II da reação fotodinâmica (Figura 12), como resultado da transição do AFS para o estado  $T^1$ , a energia é transferida diretamente para o oxigênio molecular no estado energético fundamental ( $^3O_2$ ). A transferência direta de energia entre moléculas (AFS  $\rightarrow$   $^3O_2$ ) é possível devido possuírem os mesmos “spins”. Desta forma, partículas de oxigênio singlete excitadas ( $^1O_2$ ) são geradas, as quais são caracterizadas por propriedades oxidativas extremamente fortes. No entanto, as moléculas de oxigênio são caracterizadas pelo seu estado triplete (como fundamental) e excitação no singlete. Devido a este fato, partículas de AFS excitados não danificam estruturas celulares orgânicas e reagem apenas com moléculas de oxigênio dissolvidas no citoplasma. Supõe-se que o mecanismo do tipo II é o processo mais importante condicionando a eficiência da TFD. No entanto, a razão da contribuição de ambos os mecanismos depende de muitos fatores, incluindo: concentração de oxigênio, constante dielétrica tecidual, pH e estrutura do AFS. À medida que o oxigênio se esgota, o mecanismo do Tipo I começa a prevalecer. Os AFS mais conhecidos usados na TFD apresentam reação fotoquímica do tipo II, quando a transferência de energia para  $^3O_2$  ocorre para produzir  $^1O_2$  (DI MASCIO et al., 2019).

O mecanismo menos observado do Tipo III (Figura 12) envolve condições de hipóxia, que impulsiona a oxidação direta de biomoléculas alvo nas proximidades do AFS. Os efeitos são semelhantes aos dos processos I e II, mas ocorrem sem a presença de um radical intermediário produzido (HORNE e CRONJE, 2017). Na ausência de oxigênio, a molécula do AFS no estado  $T^1$  induz a morte de células tumorais destruindo diretamente seu DNA (YU et al., 2020).

### 1.2.2. Citotoxicidade

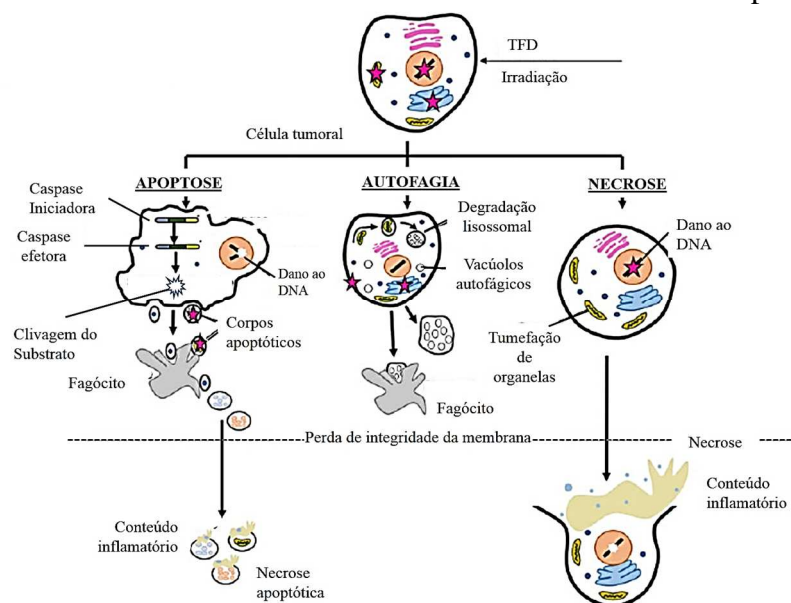
Durante o mecanismo de ação da TFD, a geração de EROs induz um modelo de morte celular do tipo apoptose, autofagia e/ou necrose. Os fatores que influenciam o modo e o grau de morte celular incluem morfologia celular, respostas imunológicas, atividade enzimática, comprimento de onda de luz e intensidade, concentração de oxigênio e características físico-químicas do AFS, bem como localização subcelular deste. Esses fatores determinam se o modo de morte celular é programado ou não (NAIDOO et al., 2018).

Espécies de oxigênio altamente reativas causam a fotodestruição de proteínas, ácidos graxos e outras moléculas na área fotossensibilizada. Este mecanismo leva à morte direta de

células tumorais no processo de apoptose e/ou necrose. A contribuição mútua de diferentes tipos de morte celular depende da localização intracelular do AFS. O dano a mitocôndrias pode levar à apoptose, já a destruição de membrana celular e perda de integridade pode induzir necrose, e danos de lisossomos ou retículo endoplasmático podem provocar autofagia (KWIATKOWSKI et al., 2018).

A apoptose (Figura 13) é um modo programado de morte celular que geralmente é caracterizado por degradação de membranas e do núcleo. Os AFS geralmente tendem a se localizar em mitocôndrias celulares quando este mecanismo ocorre, sendo o modo mais comumente associado de morte celular na TFD. A apoptose em células-alvo é ativada por sinais específicos que desencadeiam uma variedade de vias para a célula cometer suicídio em resposta a esses sinais. À medida que as vias colapsam, caspases proteicas são ativadas para degradar conteúdos celulares como material nucleico e polipeptídeos, tornando a apoptose um processo induzido e altamente regulado (NAIDOO et al., 2018). Durante a apoptose, os sinais iniciais são observados ao nível nuclear, onde a cromatina se condensa e se localiza logo abaixo da membrana celular, e como resultado ocorre a condensação e fragmentação do núcleo. O próximo passo é a condensação do citoplasma e a formação de vesículas na superfície celular. Como resultado de sua separação, os corpos apoptóticos são formados, os quais incluem a cromatina, citoplasma e organelas celulares concentradas, sendo que ao final, os corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos (GALCZYNSKA et al., 2020).

**Figura 13** - Diferentes modelos de morte celular tumoral induzido pela TFD.



Fonte: (NAIDOO et al., 2018).

Diferentes formas de morte celular induzidas pela TFD para o tratamento do câncer, nomeadamente Apoptose, Autofagia e/ou Necrose.

A necrose (Figura 13) é um modo não programado de morte celular, caracterizado por expansão citoplasmática, danos graves a organelas e ruptura da membrana plasmática, levando à liberação de conteúdo celular e inflamação (HOU et al., 2020). O AFS que induz necrose tende a se localizar no interior da membrana plasmática das células-alvo. Modos apoptóticos de morte celular induzidos pela TFD podem ser convertidos em necrose quando condições como alta concentração do AFS é administrada a células-alvo ou fluências muito altas são usadas para excitá-lo. Estes podem fazer com que as células se desintegram rapidamente e morram quando comparadas à morte celular apoptótica programada (NAIDOO et al., 2018).

A autofagia (Figura 13) induzida pela TFD ocorre quando uma célula tenta se reparar para superar a fotolesão; no entanto, se essa resposta falhar, a célula é sinalizada para apoptose programada (NAIDOO et al., 2018). A autofagia é um processo catabólico básico fortemente regulado, no qual o material citoplasmático danificado e organelas são inicialmente capturados por autofagossomos, em seguida, sequencialmente combinados com lisossomos para formar autolisossomos. Ao contrário da apoptose, a autofagia não é identificada exclusivamente com o estado de morte celular. É um mecanismo ativado em resposta às condições de estresse, o que resulta na degradação de proteínas citoplasmáticas ou na eliminação de organelas inteiras. A autofagia pode funcionar como uma estratégia de sobrevivência celular nas condições da disponibilidade limitada de nutrientes ou estresse (GALCZYNSKA et al., 2020).

A vasculatura tumoral fornece oxigênio e nutrição para dar suporte ao crescimento contínuo dos tumores e é uma das principais vias para a formação de metástase. A TFD antiangiogênica pode induzir lesão celular endotelial, vasoconstrição, liberação de fatores de coagulação, agregação plaquetária, ruptura vascular, oclusão vascular, estagnação do fluxo sanguíneo e hemorragia. Dessa forma, esta pode interromper ou danificar a vasculatura tumoral do MM, sendo que a combinação da TFD antiangiogênica com radioquimioterapia pode ser clinicamente eficaz para aliviar os sintomas e melhorar a taxa de sobrevivência de pacientes com MM. A TFD voltada a alvos vasculares pode inativar as células tumorais e ativar a resposta imune, melhorando assim a eficácia geral do tratamento (LI, X. Y. et al., 2020).

### **1.2.3. Mecanismos de resistência à TFD**

A melanina pode absorver luz UV e visível, a qual protege a pele da radiação solar. Este pigmento é sintetizado em melanócitos pela enzima tirosinase, convertendo tirosina à dopamina, e esta sendo convertida à dopamina quinona a qual é utilizada na síntese de

feomelanina e eumelanina. Na ausência de radiação, os melanócitos são expostos à eumelanina que causa danos moleculares induzindo a quebra de fitas de DNA. Além disso, a melanina pode danificar o DNA através de uma reação de Fenton, e pode impedir o acesso de enzimas de reparo de DNA aos locais danificados. Além disso, danos no DNA podem causar mutação melanocítica, aumentando a produção de melanina. Níveis moderados e altos de pigmentação têm sido observados em MM, e o teor de melanina nas células pode ser diretamente proporcional ao grau de diferenciação celular e inversamente proporcional ao crescimento celular. O  $^1\text{O}_2$  produzido pela TFD pode reduzir a oxidação natural da melanina assim como os danos ao DNA causados por ela. Tem sido sugerido que a TFD reduz o teor de melanina e a atividade de tirosinase em melanócitos, mas não afeta a sobrevivência celular. Estudos mostram que a melanina pode agir como um agente sequestrante (*scavenger*) de EROs, indicando que a melanina protege as células pigmentadas do estresse oxidativo, altera o metabolismo celular, induz a supressão imunológica e a mutagênese do microambiente tumoral, protegendo assim melanócitos malignos de vários tratamentos. Dessa forma, para evitar uma redução na eficácia da TFD devido à absorção de luz pela melanina, pode ser necessária a combinação desta terapia com o processo de despigmentação, onde uma droga com a capacidade de inibir a produção de melanina ou induzir a despigmentação seria utilizada, atuando como um componente importante no arsenal terapêutico no tratamento do MM de forma mais eficaz (LI, X. Y. et al., 2020).

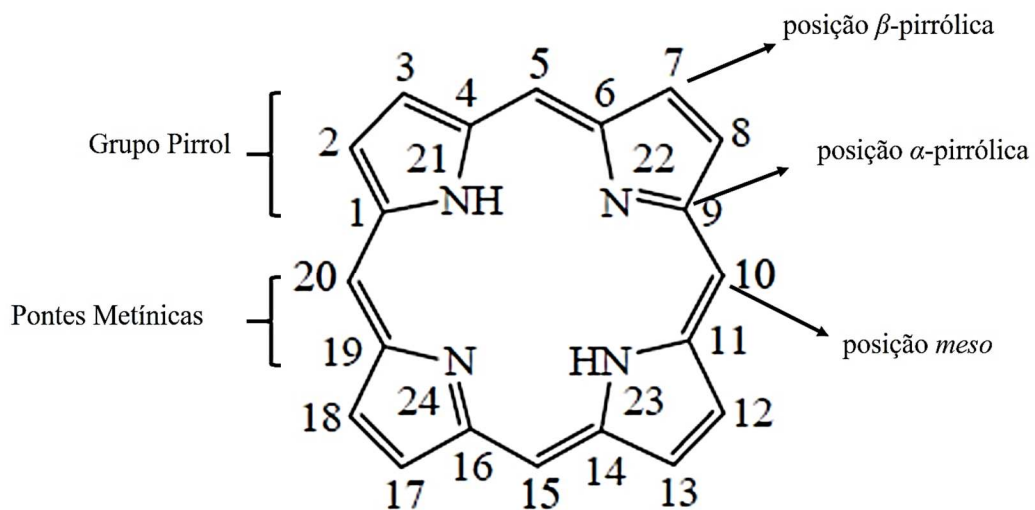
#### **1.2.4. Agentes Fotossensibilizadores**

Existem diferentes classes de AFS que têm sido investigadas ao longo dos anos para o tratamento do MM pela utilização da TFD. Estes são geralmente classificados como porfirinas e não-porfirinas, sendo esta última classe representada por clorinas e ftalalocianinas (NAIDOO et al., 2018). Estes compostos têm sido comumente utilizados como AFS, principalmente devido às suas características foto-físicas adequadas para a aplicação da TFD, como alto rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  e absorção em 600-750 nm, contribuindo para as aplicações que requerem maior penetração de luz (DE ANNUNZIO et al., 2019). Clorinas são AFS de segunda geração, reduzidos a partir de derivados de porfirina ou clorofila, consistindo de uma grande molécula aromática heterocíclica formada por um núcleo composto por 3 anéis pirrol e um anel pirrol reduzido acoplado por meio de quatro ligações metínicas. Foram introduzidas em 1980 como potenciais candidatos a TFD, e desde então várias moléculas tem sido sintetizadas

(JUZENIENE, 2009). As ftalalocianinas representam outra forma de macrociclos, semelhante em muitos aspectos às porfirinas. Estas são AFS de segunda geração, os quais possuem uma eficácia na TFD ainda maior, pois contêm um íon metálico diamagnético que permite a penetração profunda de laser no tecido, com efeitos colaterais foto-tóxicos muito menores (SWAVEY e TRAN, 2013, NAIDOO et al., 2018).

Porfirinas (Figura 14) representam uma classe de moléculas orgânicas, sendo os compostos mais frequentemente encontrados na natureza. As porfirinas, do grego *porphura* que significa “pigmento púrpura”, têm sido extensivamente estudadas como potenciais AFS na TFD devido a sua estrutura aromática planar aliada às propriedades foto-físicas e versatilidade sintética (SWAVEY e TRAN, 2013).

**Figura 14** - Representação estrutural do núcleo porfirínico.



Fonte: (ANANTHNAG e SHETTI, 2017)

Numeração do anel proposta pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). **1-24**: átomos pertencentes ao macrociclo. **N21 e N23**: átomos de hidrogênio ligados ao azoto (N).

Os AFS à base de porfirina também costumam ser classificados como de primeira, segunda e terceira geração. Este consiste de quatro anéis pirrólicos unidos por ligações metínicas (-CH-), formando uma estrutura geral de macrociclo tetrapirrólico, ligando-se a quatro átomos de azoto (nitrogênio) presentes no centro da molécula (Figura 14). O agente de primeira geração, a hematoporfirina (Hp), foi inicialmente isolado a partir da hemoglobina durante pesquisa sobre a natureza do sangue em 1841, porém demonstrou várias limitações que levaram à investigação de novos agentes com melhores propriedades e menores efeitos colaterais

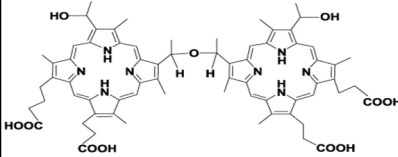
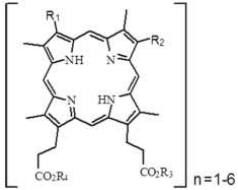
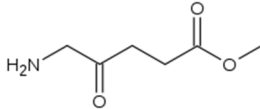
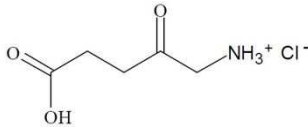
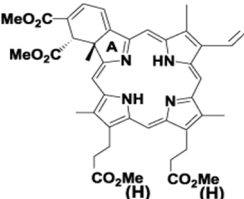
tóxicos. Os AFS de segunda geração representaram tais agentes, e demonstram maior absorção na faixa de 650-800 nm, onde a penetração tecidual é ótima, possuindo coeficientes de absorção e extinção mais altos do que os de primeira geração. O acúmulo tecidual é muito menor e, portanto, o tratamento pode ser realizado no mesmo dia da administração do medicamento. Além disso, os AFS de segunda geração apresentam menor toxicidade, mas a maioria desses ainda é muito hidrofóbica e apresenta baixa seletividade tumoral. Atualmente, pesquisas sobre a terceira geração de AFS estão em andamento, sendo caracterizados pela conjugação com moléculas carreadoras ou pró-fármacos, ambas direcionando especificamente o AFS para as células alvo, resultando em acúmulo minimizado em tecidos saudáveis (PASZKO et al., 2011).

O primeiro AFS a alcançar utilização clínica é representado pelo Photofrin<sup>®</sup> (Quadro 1), o qual é uma molécula solúvel em água, a qual possui afinidade por agir a nível tumoral e de vasculatura, relativamente não-tóxico e facilmente formulado. Contudo, há alguns inconvenientes significativos que mereceram atenção, como a geração de uma persistente fotossensibilização da pele, necessitando a manutenção dos pacientes afastados de fontes luminosas por várias semanas (KESSEL, 2019). Este composto foi aprovado para uso nos Estados Unidos contra câncer de pulmão em estágio inicial e tardio, assim como câncer de esôfago e displasia. Esta droga após a foto-excitação na região visível (vermelha) do espectro gera <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por meio da transferência de energia (mecanismo tipo II), resultando em morte celular (SWAVEY e TRAN, 2013).

O composto Metvix<sup>®</sup> (Quadro 1) foi aprovado pela Comunidade Europeia para o tratamento fotodinâmico de CBC, onde suas propriedades farmacocinéticas foram extensivamente estudadas e um protocolo de tratamento ideal foi padronizado. Crostas e escamas, se houverem, devem ser removidas com agentes ceratolíticos ou curetagem antes de aplicar este creme (CALZAVARA-PINTON et al., 2007). O ALA, comercializado sob o nome comercial Levulan<sup>®</sup> para preparação imediatamente antes do tratamento, e MAL, comercializada sob o nome comercial de Metvix<sup>®</sup> como um creme pronto para uso, estão disponíveis no mercado brasileiro. O tempo de incubação do AFS é determinado por protocolos pré-estabelecidos. Uma camada de 1 MM de espessura do creme MAL deve ser aplicada sobre a lesão, deixando uma margem de 5-10 MM ao seu redor, e mantida por três horas sob um curativo plástico oclusivo. No topo do curativo plástico, uma folha de alumínio laminado deve ser aplicada como proteção contra a luz para evitar qualquer efeito da luz natural durante o tempo de incubação da droga. A medicação é removida antes da exposição à luz, sendo que o tempo de exposição e a energia a ser utilizada dependerão da fonte de luz selecionada. O

protocolo MAL-PDT estabelece o uso de uma luz vermelha de 635 nm com uma dose total de 37 J/cm<sup>2</sup> (ISSA e MANELA-AZULAY, 2010).

**Quadro 1 - AFS a base de porfirina aprovados para uso clínico na TFD.**

AFS	Geração	Fórmula química	Câncer de Pele	Referência
Photofrin®	1 <sup>a</sup>		50% de morte em cultura celular de MM, conc. de 3.5 µg/ml	(CHANG et al., 2008)
Photogem®	1 <sup>a</sup>		Aprovado na Europa e Rússia para o tratamento de CBC	(SOKOLOV et al., 1995)
Metvix®	2 <sup>a</sup>		Aprovado para tratamento do CBC na Europa, conc. 160 mg/g de MAL	(CALZAVAR A-PINTON et al., 2007)
Levulan®	2 <sup>a</sup>		Combinação com Imiquimod resultou em maior eficiência no tratamento de CBC	(OSIECKA et al., 2012)
Visudyne®	2 <sup>a</sup>		Induziu degradação de proteínas iniciadoras do MM em ensaios de cultura celular	(LUI et al., 2019)

Fonte: (DE ANNUNZIO et al., 2019).

Para ser considerado um AFS ideal, a porfirina deve ter boa estabilidade, tendência mínima de auto-agregação, não apresentar toxicidade na ausência de exposição à luz, apresentar forte absorção na região do vermelho e do infravermelho-próximo do espectro, ter alta especificidade ao alvo e rápida liberação sistêmica. Uma variedade de porfirinas tem sido desenvolvida como AFS para serem utilizadas na TFD. Contudo, poucas delas vêm sendo utilizadas em ensaios clínicos devido à sua baixa seletividade tumoral, excitação por comprimentos de onda relativamente curtos, baixos coeficientes de extinção e altas taxas de

acúmulo na pele. Além disso, a maioria das moléculas de porfirina são hidrofóbicas e tendem a formar agregados, que podem resultar em uma redução na formação de  $^1\text{O}_2$  e no rendimento quântico de fluorescência (ZHOU, Q-X. et al., 2010).

Pesquisadores demonstraram grande interesse na porfirina e seus derivados, não apenas devido a suas propriedades fotossensibilizantes bem descritas, mas também por sua capacidade de se acumular seletivamente em tecidos tumorais por longos períodos de tempo (ZHOU, Q-X. et al., 2010). O pH de muitos tumores de crescimento rápido é frequentemente encontrado como sendo significativamente menor do que o do tecido normal no mesmo indivíduo. No tecido tumoral, a microvasculatura é substancialmente alterada, levando a um fluxo sanguíneo reduzido. Isso, por sua vez, força as células tumorais a sofrerem glicólise anaeróbica, produzindo grandes quantidades de ácido láctico. Correlações entre o conteúdo de ácido láctico e o pH intersticial foram demonstradas em muitos tumores, sendo recentemente sugerido que a acidificação do tumor deve aumentar a biodistribuição seletiva de AFS do tipo porfirina (BARRETT et al., 1990).

### 1.3. PORFIRINAS DE RUTÊNIO

Desde meados dos anos 50 (DWYER et al., 1952), as propriedades anticancerígenas dos complexos de Rutênio (Ru), um metal raro de transição pertencente ao grupo da platina, são reconhecidas e, atualmente, há um crescente interesse no desenvolvimento de novos complexos metálicos com atividades anticâncer visando superar as desvantagens associadas à cisplatina. A coordenação da porfirina com fragmentos metálicos periféricos pode ocorrer tipicamente pela adição de anéis piridil como ligantes periféricos para a coordenação de íons de metais de transição, no caso do Ru, a coordenação de quatro moléculas de Ru a uma meso-tetrapiridilporfirina (TPyP) (GIANFERRARA et al., 2009).

Complexos de Ru representam tais compostos que têm atraído muito interesse nesta área, principalmente devido às suas propriedades favoráveis como redução do crescimento tumoral por mecanismos envolvendo interação com DNA e RNA. Os compostos de Ru são candidatos promissores para a quimioterapia devido à sua ação contra algumas linhagens de células resistentes à cisplatina e maior seletividade para captação pelas células cancerosas em comparação com as células normais (SCHMITT et al., 2008).

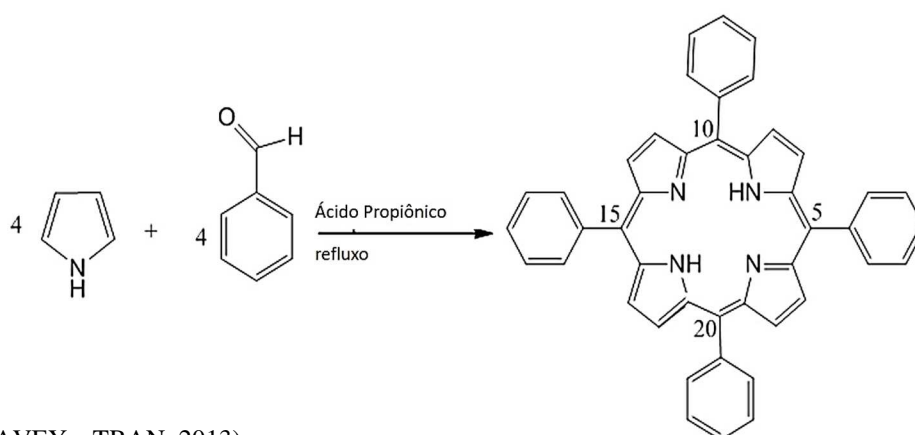


### 1.3.1. Síntese e estrutura química

O mundo sintético das porfirinas é extremamente rico, e sua história tem início em meados da década de 1930. Diversos procedimentos sintéticos foram relatados até agora, e a razão pode ser facilmente compreendida analisando a molécula porfirínica. Do ponto de vista estrutural, as porfirinas são compostas por quatro unidades pirrólicas unidas de forma coplanar por quatro pontes metálicas, dando origem a uma estrutura macrocíclica planar (Figura 15) (SWAVEY e TRAN, 2013, IMRAN et al., 2018).

Embora as rotas sintéticas em direção às porfirinas levem a rendimentos relativamente baixos, seus materiais iniciais são tipicamente baratos e sua síntese é geralmente simples. Em princípio, existem muitas estratégias químicas para sintetizar porfirinas (Figura 15), envolvendo diferentes blocos de construção, como pirrol, aldeídos, dipirometanos, dipirometenos, tripirranos e tetrapirroles lineares. A rota de polimerização monopirrol mais conhecida para obtenção de porfirinas envolve a síntese de porfirinas tetrafenílicas, a partir da reação entre pirrol e benzaldeído. O macrociclo porfirínico é uma molécula altamente conjugada contendo 22 elétrons  $\pi$ , mas apenas 18 deles são delocalizados de acordo com a regra de aromaticidade de Hückel ( $4n+2$   $\pi$ -elétrons deslocalizados, onde  $n = 4$ ) (GIOVANNETTI, 2012).

**Figura 15** - Síntese química da meso-tetrapiridilporfirina.



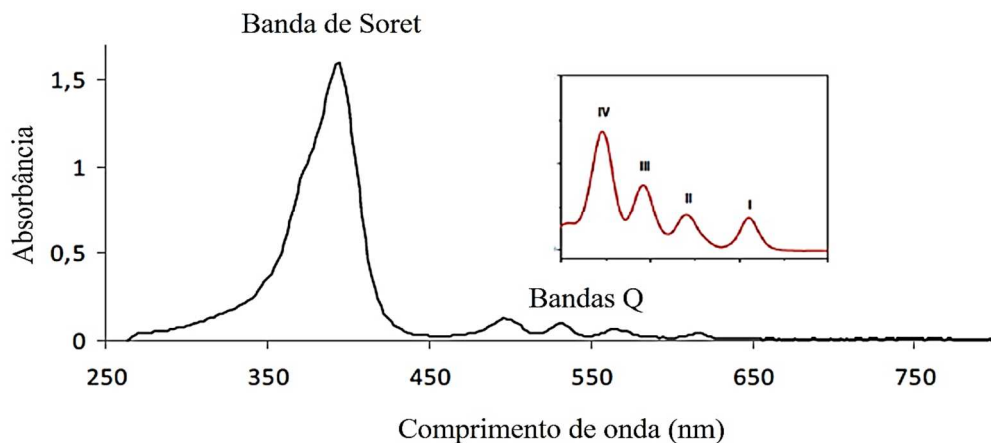
Fonte: (SWAVEY e TRAN, 2013)

5, 10, 15, 20. Posições *meso* do anel porfirínico.

Nas porfirinas de base livre supõe-se que 18 dos 22 elétrons estejam conjugados, os quais são responsáveis pelas propriedades redox e eletrônica. A conjugação extensiva de 18 elétrons em porfirinas dá origem a transições  $\pi \rightarrow \pi^*$ , que por sua vez dão origem a duas bandas distintas dentro da região visível de radiações eletromagnéticas. Como ilustrado no espectro

eletrônico da Figura 16, as porfirinas exibem uma intensa banda de absorção denominada “Banda B” ou “Banda de Soret” entre 350 a 500 nm (aprox. 410 nm), resultante da transição do estado fundamental para o segundo estado singlete excitado ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) com um coeficiente de absorção molar de  $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , e quatro bandas de menor intensidade conhecidas como “Banda-Q” observadas entre 500 a 750 nm, resultantes da transição do estado fundamental para o primeiro estado excitado ( $S_0 \rightarrow S_1$ ) com um coeficiente de absorção molar de  $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . A inserção de um íon metálico na cavidade porfirínica ou a protonação dos átomos de nitrogênio ou ainda a variação dos substitutos periféricos pode resultar em uma mudança no comprimento de onda e intensidade do espectro de absorção (IMRAN et al., 2018).

**Figura 16** - Espectro UV-Visível de porfirinas.



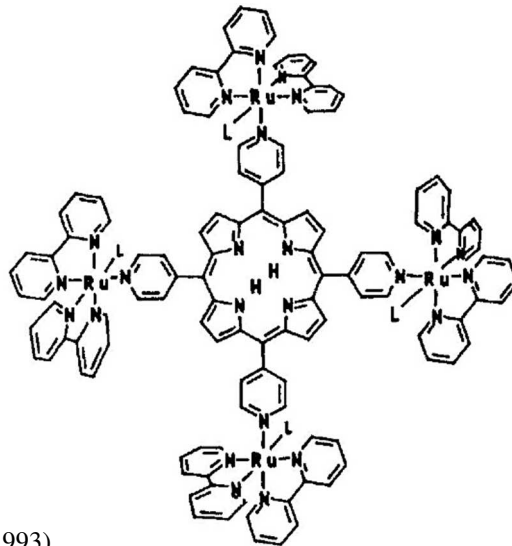
Fonte: (GIOVANNETTI, 2012).

Espectro UV/Vis característico de porfirinas consistindo de duas regiões bem distintas: uma no UV próximo e outra na região visível. **nm**: nanômetros. **I-IV**: Bandas Q em destaque.

As porfirinas de base livre podem formar um complexo com vários cátions metálicos e podem adotar uma grande variedade de conformações, dependendo do tamanho da coordenação dos cátions metálicos, da presença de ligantes axiais e também da presença e tamanho dos substituintes periféricos. Se o raio catiônico for maior que 80-90 pm, metaloporfirinas “*sitting-atop*” (SAT) são formadas, em que os átomos de metal estão localizados fora do plano de porfirina. As propriedades foto-físicas, fotoquímicas e redox das metaloporfirinas podem ser controladas pelo ajuste fino da distância dos ligantes na cavidade porfirínica. Ao alterar os substitutos periféricos e o metal central, proporciona-se uma ampla diversidade de funções bioquímicas, sendo que diferentes tipos de porfirinas e metaloporfirinas tem sido extensivamente examinadas visando aplicações biomédicas (IMRAN et al., 2018).

Os macrociclos de porfirina foram desenvolvidos e utilizados clinicamente nas últimas décadas. Cadeias laterais contendo grupos funcionais, como o ácido carboxílico de átomos de nitrogênio e açúcar, são frequentemente incorporadas a molécula de porfirina. Além disso, houve um crescimento recente do interesse na preparação de conjugados metaloporfirina como potenciais AFS (ZHANG et al., 2018). Os complexos de Ru com ligantes polipiridínicos como a 2,2'-bipiridina (bipy) tem sido largamente empregados na síntese de supermoléculas contendo compostos de coordenação, devido a sua estabilidade e propriedades fotoquímicas (ARAKI e TOMA, 2002).

**Figura 17** – Tetrapiridilporfirina contendo 4 grupos de Ru ligados periféricamente.



Fonte: (ARAKI e TOMA, 1993).

Complexo de Ru exibindo grupamentos ativos fotoquímicos e eletroquímicos, ligados diretamente ao anel porfirínico.

Em pesquisa desenvolvida pelo grupo de Araki e Toma, 1993 (Figura 17), houve a descrição da rota de síntese da *meso*-tetrapiridilporfirina (TPyP), contendo 4 complexos  $[Ru(bipy)_2Cl]^+$ , a qual exibe grupos fotoquimicamente e eletroquimicamente ativos diretamente ligados à porfirina. Este composto foi sintetizado a partir do refluxo dos constituintes  $[Ru(bipy)_2Cl_2]$  e TPyP em ácido acético glacial por 45 minutos. Após a remoção do solvente em rota-evaporador, o sólido resultante é dissolvido em metanol e submetido a refluxo por 45 minutos. O produto é então precipitado pela adição de acetona saturada com Cloreto de Lítio (LiCl), e o sólido de cor vermelho escuro resultante é lavado em acetona e seco a vácuo. O complexo hexafluorofosfato correspondente é obtido pela adição de Amônio Hexafluorofosfato ( $NH_4PF_6$ ) à solução metanólica do complexo cloridrato correspondente, onde o precipitado é então dissolvido em uma solução de acetona/metanol (2:1). A tetrapiridilporfirina modificada

contendo quatro grupos  $[\text{Ru}(\text{bipy})_2\text{Cl}]^+$  coordenados aos resíduos de piridina foi isolada como um pó negro apresentando estabilidade ao ar, sendo solúvel em uma variedade de solventes como água, metanol, acetonitrila e DMF (N,N'-dimetilformamida), em contraste à porfirina inicial (ARAKI e TOMA, 1993).

### 1.3.2. Complexos de Ru

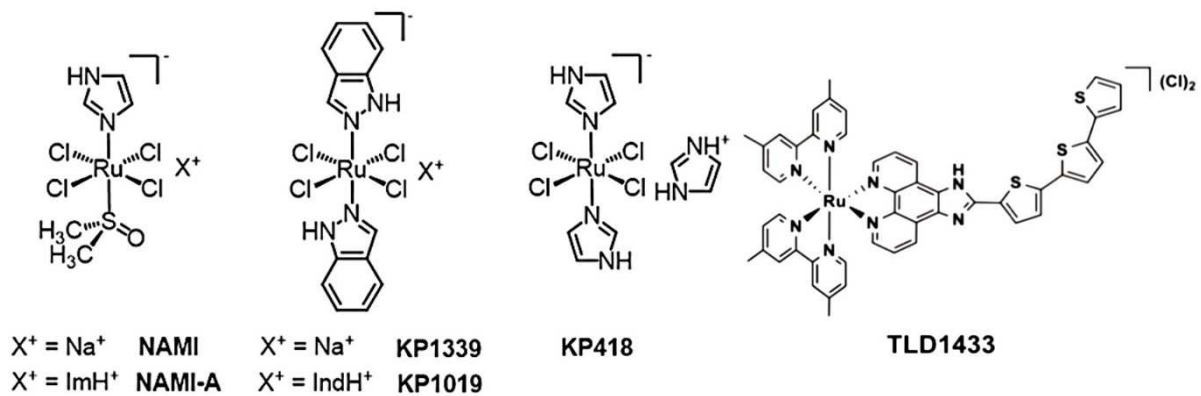
No intuito de aperfeiçoar a internalização celular e a capacidade fototóxica, AFS podem também ser acoplados a agentes quimioterapêuticos. O número de estudos sobre complexos de Ru empregados para o tratamento do câncer tem aumentado constantemente desde o início dos anos 80, onde o foco em pesquisas era quase exclusivamente voltado para AFS coordenados a derivados de platina tais como a cisplatina ou oxaliplatina, as quais foram desenvolvidos e testados *in vitro* para promover efeitos citotóxicos globais. Esses complexos visam combinar a citotoxicidade da platina com a atividade fotodinâmica das porfirinas, levando a um efeito genotóxico aditivo à TFD. No entanto, a utilidade clínica da cisplatina tem sido frequentemente limitada por efeitos adversos graves, como nefrotoxicidade, toxicidade gastrointestinal e ototoxicidade. Dessa forma, a utilização de outros compostos metálicos é muito atraente para superar as desvantagens associadas à cisplatina e/ou oxaliplatina (PERNOT et al., 2012, ALESSIO e MESSORI, 2018).

Compostos a base de Ru parecem ser uma alternativa atraente à platina, uma vez que estes são conhecidos por apresentar citotoxicidade menos generalizada do que seus homólogos de platina, além de serem capazes de interagir com DNA e proteínas. A conjugação de Ru a um AFS pode ser sugerida com vistas a combinar a citotoxicidade do Ru com a atividade fotodinâmica destes, aperfeiçoar a seletividade tumoral e internalização celular dos AFS devido ao transporte do Ru à células tumorais realizado pela transferrina, aumentar a hidrofiliabilidade dos AFS de acordo com os ligantes de Ru e combinar a ativação do AFS e a fotoclivagem do DNA induzida por Ru pela irradiação tumoral (PERNOT et al., 2012). Os complexos de Ru podem se ligar tanto à transferrina quanto à albumina quando incubados apenas com cada proteína separadamente em condições tamponadas que simulam o meio fisiológico. No entanto, estes compostos exibem uma preferência pela albumina no sangue, porém a transferrina transporta de forma específica o Ru para células tumorais devido ao seu reconhecimento por receptores transferrina altamente expressos na superfície destas células (CETINBAS et al., 2010). Esses novos compostos à base de rutênio apresentam efeitos adversos menos graves e

podem substituir os medicamentos quimioterapêuticos convencionais à base de platina devido ao seu modo de ação distinto (BOGOEVA et al., 2016).

Atualmente, três complexos de Ru(III) (NAMI-A, KP1019 e KP1339) entraram em ensaios clínicos, sendo caracterizados por exibirem menor citotoxicidade em comparação com drogas contendo platina, internalização celular mediada por transferrina e redução para o íon Ru(II) sob condições de hipóxia em tumores. Da mesma forma, recentemente o composto TLD14333 (baseado em Ru(II)) também entrou em testes clínicos (Figura 18) (MITAL e ZIORA, 2018, THOTA et al., 2018).

**Figura 18** - Estrutura química dos principais AFS baseados em Ru.



Fonte: (ALESSIO e MESSORI, 2018, CHEN et al., 2020).

**NAMI-A**: imidazolium trans-[tetracloro(dimetilsulfoxido)(1H-imidazol)ruthenate(III)]; **KP1019**: Sal indazolico de trans-[tetraclorobis(1H-indazole)ruthenate(III)]; **KP1339**: Sal sódico de trans-[tetraclorobis(1H-indazole)-ruthenate(III)]; **KP418**: imidazolium trans-[tetracloridobis(1H-imidazole)ruthenate(III)]; **TLD1433**: Ru(II)(4,4'-dimethyl-2,2'-bipyridine(dmb))2-(2(20,200:500,2000-terthiophene)-imidazo[4,5-f][1,10]phenanthroline)]2+.

O composto NAMI-A (Figura 18) foi o primeiro complexo de Ru a ser testado em humanos, o qual foi introduzido em estudos clínicos de fase I em 1999, porém demonstrou eficácia limitada em estudos de fase II, limitando sua empregabilidade clínica (THOTA et al., 2018). Tanto o composto NAMI quanto NAMI-A compartilham o mesmo centro de Ru pseudo-octaédrico (III) cercado por quatro ligantes de cloreto no plano equatorial. Um grupamento DmsO (dmsO-S) e um imidazol ocupam as duas posições axiais. A carga negativa é neutralizada pelo sódio ( $Na^+$ ) no composto NAMI e pelo cátion imidazólio no composto NAMI-A (ALESSIO e MESSORI, 2018). O NAMI-A possui toxicidade relativamente baixa em relação às células cancerígenas, mas é particularmente eficaz contra metástases de tumores sólidos em tumores experimentais de camundongos. Acredita-se que a atividade antimetastática do NAMI-

A seja devida aos efeitos combinados no controle da angiogênese (possivelmente pela interferência no metabolismo do óxido nítrico *in vivo*) e propriedades anti-invasivas contra células tumorais e vasos sanguíneos, e não à sua interação com ácidos nucleicos, embora interaja com o DNA *in vitro* (PIZARRO e SADLER, 2009). Os efeitos biológicos do NAMI-A aparentemente derivam da ligação do rutênio ao colágeno presente na matriz extracelular e integrinas da superfície celular, levando ao aumento da adesão e à redução da invasividade das células (ALESSIO e MESSORI, 2018). O trabalho de Gava et al. 2006 (GAVA et al., 2006) demonstra o efeito antimetastático do complexo NAMI-A frente a um modelo *in vitro* (linhagem celular B16) e *in vivo* (camundongos B6D2F1) de melanoma, onde pode-se observar a redução da produção de metástases nos animais tratados além de sua ação seletiva nas células de melanoma, a qual ocorreu de forma independente da concentração do composto utilizada, sugerindo que a inibição de metástases ocorreu devido à modulação negativa dos processos de invasão da célula tumoral, aliado à redução da atividade gelatinolítica das células tumorais, a qual possui um papel central no processo de invasão celular.

No trabalho publicado por Keppler e Rupp (KEPPLER e RUPP, 1986), foram apresentados os compostos KP418 e KP1019, contendo ligantes heterocíclicos coordenados por nitrogênio, quatro ligantes de cloreto equatorial e um íon azol ou sódio protonado para compensação de carga. Ambos os complexos apresentaram boa atividade anticâncer contra linhagens de células cancerígenas colorretais resistentes a platina. Apesar das promissoras propriedades anticancerígenas, o composto KP418 não foi submetido a testes em humanos devido a gerar maior nefrotoxicidade em modelos murinos em comparação com KP1019. O modo primário de ação foi postulado como ligação ao DNA. O composto KP1019 sofre troca lenta de ligantes em condições fisiológicas, da mesma forma que os agentes anticancerígenos à base de platina. Outros estudos mostraram que os íons Ru foram localizados principalmente no citosol e na região nuclear celular. Infelizmente, este composto falhou em um teste de fase II, principalmente por causa da má solubilidade em água. A análise sanguínea de pacientes tratados com KP1019 mostrou menos de 1% da dose de KP1019 é vinculada à transferrina, sugerindo um papel limitado para esta proteína no transporte de drogas. Outras pesquisas mostraram que a albumina de soro humano liga prontamente KP1019 e seu análogo NKP1339 no plasma, e esta proteína sanguínea provavelmente desempenha um papel significativo no transporte e localização desta classe de drogas (MITAL e ZIORA, 2018). Foi demonstrado que a citotoxicidade de todos os três compostos KP está relacionada ao seu transporte transmembrana, com KP418 sendo pelo menos 10 vezes menos eficientemente absorvido em células do que KP1019 e KP1339. O composto KP418 nunca entrou em ensaios clínicos devido ao seu

transporte transmembrana dificultado e, conseqüentemente, toxicidade sistêmica em doses efetivas *in vivo* (HUDEJ et al., 2014).

O complexo de Ru mais recente a ser introduzido em ensaios clínicos foi o TLD-1433 (Figura 18), um complexo polipirídico Ru(II) adequado para aplicações na TFD. A combinação de TLD-1433 com transferrina (Rutherrin) melhora as propriedades foto-físicas, farmacocinéticas (absorção celular rápida) e toxicológicas (redução da toxicidade no escuro), em comparação apenas com TLD-1433. O modo de ação relatado é baseado na produção de EROs, destruindo as mitocôndrias e induzindo apoptose celular (MITAL e ZIORA, 2018). Sua ativação nas células é ótima no domínio verde do espectro (520 nm), e embora o mecanismo de morte celular por TLD-1433 ativado pela luz não seja completamente claro, este AFS gera  $^1\text{O}_2$  de forma eficaz. O modo de ação do Tipo II deste AFS na TFD envolve a formação de uma população de moléculas excitadas, que, após cruzamento intersistêmico, levam a estados tripletes excitados que são muito sensíveis ao oxigênio (CHEN et al., 2020).

### 1.3.3. Interação de complexos metálicos com o DNA

Complexos metálicos podem interagir com o DNA tanto de forma direta como indiretamente. A geração de EROs a nível celular é um exemplo de interação indireta com o DNA, onde o radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ) é adicionado a ligações duplas de bases de DNA heterocíclicas, abstraindo o átomo de hidrogênio a partir do grupo metila de timinas, assim como de cada um dos cinco átomos de carbono do radical 2'desoxirribose, causando quebras de fitas de DNA e a formação de sítios AP (apúrico ou apirimídico). O radical  $\bullet\text{OH}$  gera vários produtos no DNA, os quais geram várias modificações em bases nitrogenadas e açúcares, sítios AP, quebras de fitas e ligações DNA-proteína. Por meio da reação do radical  $\bullet\text{OH}$  com a Timina e o açúcar no DNA, são formados adutos-OH com as bases do DNA. Os radicais resultantes dos resíduos de timina podem reagir com oxigênio para formar peróxidos. Isso leva a formação de três isômeros de peróxido de timidina, os quais possuem um grupamento peróxido nas posições 5 e 6 do anel pirimidina, ou um grupo metila ligado a carbono. Os primeiros dois peróxidos formam uma molécula derivada de timidina denominada timidina glicol. O terceiro peróxido de timidina é clivado para formar 5-hidroximetil-2'-deoxiuridina e 5-formil-2'-deoxiuridina. Reações do radical  $\bullet\text{OH}$  com citosina também podem causar a formação de produtos análogos aos derivados da timina. Os radicais  $\bullet\text{OH}$  também são adicionados às purinas dando origem aos radicais adutos C4- $\bullet\text{OH}$ , C5- $\bullet\text{OH}$  e C8- $\bullet\text{OH}$ . Os adutos resultantes então

desidratam e oxidam radicais purina, levando a formação de 8-hidroxi-purinas (7,8-dihidro-8-oxopurine) e pirimidinas formamidas, respectivamente. A adição do radical  $\bullet\text{OH}$  ao C8 da Guanina produz 8-hidroxi-guanina e 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamido-pirimidina. As reações análogas de adenina produzem 8-hidroxi-adenina e 4,6-diamino-5-formamidopirimidina. A reação do radical ligado ao C5' do açúcar no DNA é a sua ligação ao C8 do anel purínico no mesmo nucleosídeo, o que leva à ciclização intramolecular, resultando em 8,5'-ciclopurina-2'-desoxinucleosídeos (GALCZYNSKA et al., 2020).

Complexos metálicos também podem causar danos diretamente ao DNA. O composto anticancerígeno mais conhecido que interage diretamente com o DNA é a cisplatina. A hidrólise de cisplatina ocorre na célula e suas formas catiônicas reagem com DNA para gerar numerosos adutos de cisplatina-DNA. Podem formar ligações cruzadas entre guaninas adjacentes d(GpG) na mesma fita de DNA, entre guaninas e adeninas adjacentes d(ApG), e entre purinas separadas por uma ou mais bases d(GpNpG). Além disso, podem ser formadas ligações entre fitas diferentes e entre DNA-proteínas. A interação mais importante é a ligação d(GpG) na mesma fita à platina, a qual é coordenada com átomos de guanina N7 adjacentes. O complexo de rutênio (III) interage com o DNA causando danos de diferentes quantidades e qualidades em comparação com a atividade da cisplatina, mas o mecanismo exato ainda não está elucidado. O complexo rutênio NAMI-A também foi mostrado interagir com o DNA *in vitro*, no entanto, esta atividade não é crítica para sua ação anti-metastática (GALCZYNSKA et al., 2020).

#### 1.4. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o câncer pele do tipo MM continua a ser uma grande ameaça à saúde humana, sendo que sua detecção precoce, o diagnóstico preciso e o tratamento auxiliam no aumento das taxas efetivas de sobrevivência. Uma variedade de estratégias terapêuticas, tais como cirurgia, quimioterapia e terapia com radiação, são amplamente utilizadas no seu tratamento clínico. No entanto, a toxicidade sistêmica, a resistência aos medicamentos e sua baixa seletividade muitas vezes levam a resultados insatisfatórios. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias inovadoras que aumentem a taxa de cura e que reduzam os efeitos colaterais da terapia do MM são extremamente necessárias. A TFD, aliada ao uso de moléculas contendo o anel porfirínico associado ao metal de transição Rutênio, tem representado um método alternativo ao tratamento tradicional do câncer de pele. Portanto, torna-se extremamente necessária a caracterização do uso da porfirina  $\text{H}_2\text{RuTPyP}$  em células de melanoma, no intuito de avaliar a sua potencial utilização no tratamento fototerapêutico desta neoplasia.



## 1.5. OBJETIVOS

### 1.5.1. Objetivo Geral

A presente pesquisa visou demonstrar a capacidade de interação do análogo de porfirina H<sub>2</sub>RuTPyP com a molécula de DNA, assim como sua atividade fototerapêutica específica frente a cultura celular de melanoma murino.

### 1.5.2. Objetivos Específicos

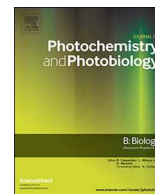
- Caracterizar a capacidade de interação com o DNA e do seu potencial genotóxico;
- Caracterizar a ação citotóxica específica frente a linhagens celulares de melanoma murino e queratinócito humano;
- Averiguar a participação de diferentes EROs nos mecanismos de dano ao DNA e citotoxicidade;

## **2. DESENVOLVIMENTO**



Contents lists available at ScienceDirect

## Journal of Photochemistry &amp; Photobiology, B: Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jphotobiol](http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol)DNA photocleavage and melanoma cells cytotoxicity induced by a *meso*-tetra-ruthenated porphyrin under visible light irradiationBruno S. Vizzotto<sup>a</sup>, Renne S. Dias<sup>b</sup>, Bernardo A. Iglesias<sup>b</sup>, Luciana F. Krause<sup>c</sup>, Altevir R. Viana<sup>c</sup>, André P. Schuch<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Laboratory of Photobiology, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria – UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil<sup>b</sup> Laboratory of Bioinorganic and Porphyrinoid Materials, Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria – UFSM, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil<sup>c</sup> Department of Health Sciences, Franciscan University – UFN, 97010-032 Santa Maria, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Photodynamic therapy  
Cationic porphyrins  
Ruthenium(II) complexes  
DNA damage  
Melanoma

## ABSTRACT

Porphyrins are used as photosensitizing agents in photodynamic therapy (PDT) for several pathologies. Here we demonstrate the DNA photocleavage and cytotoxicity properties of a free-base *meso*-tetra-ruthenated porphyrin (**H<sub>2</sub>RuTPyP**) in purified DNA samples and in a melanoma cell line, respectively. Cytotoxicity of **H<sub>2</sub>RuTPyP** was investigated by the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay and its genotoxic potential by direct plasmid DNA photocleavage after incubation with specific DNA repair enzymes. **H<sub>2</sub>RuTPyP** porphyrin efficiently induced DNA damage at the lower concentration of 5.0 μM, whereas it induced complete DNA degradation at 15 μM. The addition of different scavengers for reactive oxygen species (ROS) during the visible light exposures did not decrease the DNA damage formation, suggesting a hydrolytic mechanism for the induction of DNA breaks. Also, **H<sub>2</sub>RuTPyP** exhibited a much higher cytotoxicity in melanoma cells in comparison to a keratinocyte cell line. The detection of intracellular reactive oxygen species (ROS) produced by **H<sub>2</sub>RuTPyP** through the DCF-DA assay also suggests that ROS have a minor role in the induction of cytotoxicity. Therefore, **H<sub>2</sub>RuTPyP** seems to be a very effective photosensitizer, representing a promising alternative for the development of new skin cancer treatments using PDT process.

## 1. Introduction

Since 1950's, anticancer properties of Ru(II) complexes are recognized [1]. A growing interest on the development of new Ru(II) complexes have aroused considerable attention because of the potential to retard tumor growth by its interaction with DNA and RNA, cell permeability, accumulation within the mitochondria of cancer cells due to their lipophilic cationic nature, and their applications in PDT [2–7]. Furthermore, since DNA is the main target for anticancer drugs, the investigation of mechanisms of interaction of Ru(II) complexes with this biomolecule is of interest. In general, it can bind to DNA by groove binding and electrostatic modes [8].

Porphyrins are an important class of naturally occurring macrocyclic compounds that play a very important role in the metabolism of living organisms. Furthermore, these molecules represent the great majority of photosensitizers (PS) currently applied in clinics, bearing excellent photochemical and biological characteristics [9,10]. Unlike most organic photosensitizers, porphyrins act as PDT agents primarily through singlet oxygen formation through type II mechanism [11].

Then, porphyrins and metalloporphyrins have been used as PS for cancer treatment due to their aromatic structure, efficient ROS generation, relatively inexpensive starting materials and straight synthesis [12]. They also have a system of highly conjugated π-bond which helps in effectively absorbing visible light, representing promising PS [13]. Their high affinity for tumor cells can be explained by their ability to bind transferrin due to the over-expression of transferrin receptors by tumor cells compared to normal tissues [14].

Conjugation of ruthenium(II) polypyridyl complexes to a porphyrin at peripheral positions, such as pyridyl porphyrins, is a strategy to improve the phototoxicity activity of the PS. The intracellular dissociation through the binding of cationic ruthenium species to proteins and DNA can lead to cellular damage, apoptosis and autophagy processes [15,16]. To be used as an PS, the porphyrin-ruthenium complex should have solubility in biological media, DNA binding ability, selective accumulation in cancer cells and produce considerable yields of ROS under irradiation [17].

Currently, the evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of porphyrin-ruthenium conjugates is of great interest [18]. Here, we

\* Corresponding author at: Av. Roraima, 1000, P.O. Box 5021, room 3010, Camobi, Santa Maria, RS 97110-970, Brazil.

E-mail address: [andre.schuch@ufsm.br](mailto:andre.schuch@ufsm.br) (A.P. Schuch).<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111922>

Received 4 April 2020; Received in revised form 21 May 2020; Accepted 27 May 2020

Available online 31 May 2020

1011-1344/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

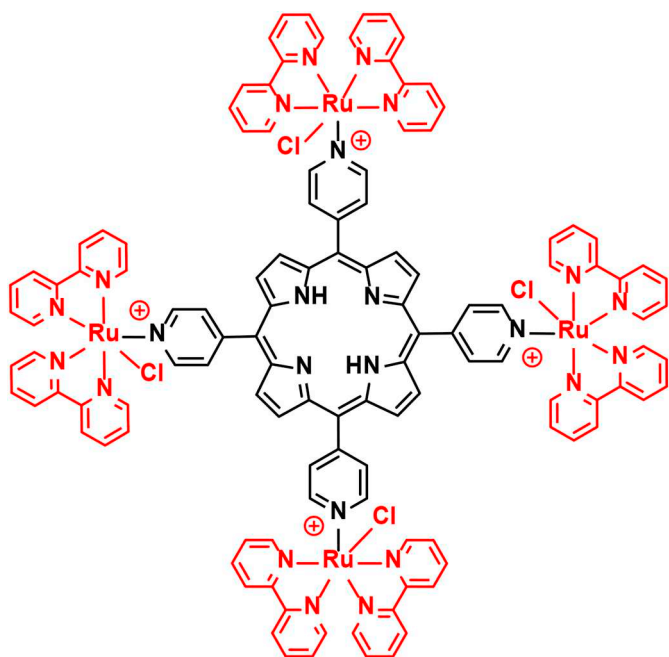


Fig. 1. Representative structure of the free-base porphyrin  $H_2RuTPyP$ . Hexafluorophosphate counter-ions are omitted for clarity.

analyzed the induction of DNA breaks and oxidized purines and pyrimidines, as well as the preferential mechanism of DNA base oxidation through ROS formation after the exposure of plasmid DNA solution with different concentrations of free-base  $H_2RuTPyP$  porphyrin (Fig. 1) to a visible light source. This is a *meso*-tetra-cationic(ruthenated)porphyrin synthesized and described firstly by Araki and co-workers in several publications [19,20]. In addition, the cytotoxic activity and the intracellular generation of ROS was both evaluated in melanoma and keratinocyte cell lines in dark and light conditions. The results presented in this work confirm that  $H_2RuTPyP$  derivative interact with DNA and induces high amounts of strand breaks, leading to complete degradation at higher concentrations. Moreover, our findings also indicate that ROS formation does not play the major role in the induction of DNA strand breaks and cell death. Surprisingly, after exposure to visible light, this tetra-cationic porphyrin specifically induced cell death in melanoma cell line, without generating decrease of cell viability in keratinocytes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Reagents

Enzymes Endonuclease III (Endo-III) and Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase (Fpg) were purchased from NEB – New England Biolabs (New England Biolabs, USA) and storage at  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Tris-HCl buffer solution, Agarose, loading buffer solution, Dimethyl sulfoxide, Sodium Azide, Potassium Iodide, Ethylenediamine tetraacetic acid, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide were purchased from Sigma Aldrich (Sigma Aldrich, USA).

### 2.2. Synthesis

Synthesis and fully characterization were previously described by Araki and co-workers [19,20]. Starting complex  $[Ru(bpy)(H_2O)Cl]^+$  were prepared in a 50 mL flask through the reaction of 235.9 mg of  $[Ru(bpy)Cl_2]$  dissolved in 15 mL of 2:1 DMF/EtOH mixture with 85.1 mg of  $AgNO_3$  dissolved in 5 mL of water to obtain an excess of about 1% of  $AgNO_3$ . Reaction mixture was kept under agitation and warmed ( $50\text{ }^\circ\text{C}$ )

for 20 min, leading to  $AgCl$  precipitation. The mixture was then filtered through a sintered plate funnel with a Celite layer of approximately 1.0 cm and the solvent evaporated. To obtain the tetra-ruthenium(II) supramolecular species of  $H_2RuTPyP$ , 310 mg of the *meso*-tetra-(4-pyridyl)porphyrin was dissolved in 10 mL of a 1:4 mixture of DMF/DCM followed by the addition of the aquo-complex ruthenium(II). After 20 min of stirring and gentle heating, the solvent volume was reduced to 5 mL on the rotary evaporator. The solution was then dripped onto a concentrated aqueous solution of  $NH_4PF_6$  and filtered on a sintered plate funnel. The dark brown colored solids obtained were purified by recrystallization in diethyl ether. Characterization data of the compound  $H_2RuTPyP$ : HRMS-ESI ( $m/z$ ): 1067  $[M - 3Ru(bpy)_2Cl]^+$ ; 759  $[M - 2Ru(bpy)_2Cl]^+$  and 472  $[Ru(bpy)_2Cl + Na]^+$ ; and elemental analysis  $C_{120}H_{90}Cl_4F_{24}N_{24}P_4Ru_4 \cdot 6H_2O$ , exp. (calc.): %C = 46.94 (46.46), %H = 3.40 (3.31), %N = 10.95 (10.84).

It is important to mention that the interaction of the free-base porphyrin  $H_2RuTPyP$  (Fig. 1) with DNA molecule was also analyzed in this work (data not shown) by UV-vis spectroscopy, as previously performed by Onuki and co-workers [16]. A series of calf-thymus DNA titrations were incubated with a solution of  $H_2RuTPyP$  and the absorption spectra showed the overall changes in the transition bands. The observed hypochromicity in the UV-vis spectra after addition of DNA +  $H_2RuTPyP$  solutions and the intrinsic binding constant ( $K_b$ ) suggest that free-base Ru(II)-porphyrin has a good affinity with DNA, as previously reported.

### 2.3. Plasmid DNA photocleavage assay

The DNA photocleavage ability of  $H_2RuTPyP$  was examined following the conversion of the plasmid supercoiled DNA (FI) form to the relaxed open circular (FII) form. For this purpose, 300 ng of pCMUT (1762 bp) plasmid DNA samples diluted in 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) were mixed with different concentrations of  $H_2RuTPyP$  (5.0, 10, 15, 20  $\mu\text{M}$ ) and exposed to a visible light source (25 mW/cm<sup>2</sup> and light dosage of 90 J/cm<sup>2</sup>; emission spectrum is presented in the Supplementary Material, Fig. S1) for 60 min at room temperature. A negative control was included (NC, exposed to light but without  $H_2RuTPyP$ ), as well as a non-irradiated control (NI, without  $H_2RuTPyP$  and without light exposure) to verify initial plasmid integrity. A DNA dosimeter system, which is a versatile and reliable system composed by an UV-vis light transparent polymer was used for the exposure of plasmid DNA samples in the presence or absence of  $H_2RuTPyP$  under visible light [21]. DNA samples were then incubated with 0.8 U of *E. coli* formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg protein, New England Biolabs, USA; which recognizes oxidized purines) and Endonuclease III (New England Biolabs, USA; which recognizes oxidized pyrimidines) at  $37\text{ }^\circ\text{C}$  for 1 h, in order to discriminate the induction of different types oxidized DNA bases after exposure to visible light. DNA was also incubated at  $37\text{ }^\circ\text{C}$  for 1 h without the presence of enzymes in order to quantify the amount of single strand breaks (SSB). Reactions were quenched by adding 2.0  $\mu\text{L}$  of a loading buffer solution (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.01% bromophenol blue, 50% glycerol, and 250 mM EDTA) and then subjected to electrophoresis migration on 0.8% agarose gels containing *UniSafe Dye*<sup>®</sup> (Uniscience, Brazil) at 60 V for 3 h in  $0.5 \times$  TBE buffer (44.5 mM Tris pH 8.0, 44.5 mM boric acid, and 1 mM EDTA).

### 2.4. DNA damage quantification

In order to determine the average number of different types of DNA lesions generated by  $H_2RuTPyP$  porphyrin under the visible light treatment and dark condition, the relative amounts of supercoiled (FI) and circle-relaxed (FII) plasmid DNA forms were measured after electrophoresis migration using the Amersham<sup>™</sup> Imager 600 system along with ImageQuant<sup>™</sup> TL software (GE Healthcare<sup>®</sup>, USA). The number of enzyme sensitive sites and SSBs per kbp of plasmid DNA was calculated,

assuming a Poisson distribution adapted to this technique, as previously demonstrated by Schuch and co-workers [22].

### 2.5. ROS production

To evaluate the influence of ROS in the generation of DNA breaks by **H<sub>2</sub>RuTPyP** under the visible light treatment, the plasmid DNA photocleavage assay was carried out in the presence of scavengers for superoxide (Potassium Iodide, KI; 8.0 mM), hydroxyl radicals (Dimethyl sulfoxide, DMSO; 0.8 mM), singlet oxygen (Sodium Azide, NaN<sub>3</sub>; 8.0 mM), and metal ions (Ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA; 10 mM) [12]. Plasmid DNA samples in the presence of each scavenger were incubated with the lower concentration of **H<sub>2</sub>RuTPyP** (5.0 μM) and exposed to visible light for 60 min at room temperature. After white-light exposure, 300 ng of pCMUT plasmid DNA was incubated with Fpg or Endo-III enzymes to quantify the amount of oxidized purine and pyrimidine, respectively, as well as without the presence of enzymes to quantify the induction of SSBs after electrophoresis migration in agarose gels.

Intracellular ROS levels were also determined by H2DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; Sigma Aldrich, USA) assay, which is a cell-permeable redox sensitive fluorescent probe that is oxidized by ROS to yield the highly fluorescent product 2,7-dichlorofluorescein. In this experiment, the murine melanoma cell line B16F10 cells (ATCC® CRL 6475™), at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well, were seeded in triplicate in a 96-well plate, followed by incubation with 5 μM of **H<sub>2</sub>RuTPyP** for 1 h, under light or dark conditions. Then, the cells were re-incubated with 5 μM of H2DCF-DA at 37 °C for 30 min. Fluorescence intensity was recorded under 485 nm excitation, using a plate reader (Perkin Elmer, Singapore).

### 2.6. Cell viability assay

Cytotoxicity of **H<sub>2</sub>RuTPyP** (5.0, 10, 15, 20 μM) was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma Aldrich, USA) assay, which measured the cell viability of B16F10 and the keratinocyte HaCaT (ATCC® PCS-200-011TN™) cell lines, according to the manufacturer's instruction. Briefly,  $1 \times 10^4$  cells of each cell line were seeded in triplicate in 96-well plates. After 1 h of incubation with **H<sub>2</sub>RuTPyP** (5.0, 10, 15, 20 μM) in the dark or under light exposure, cell cultures were then incubated for 24 h hours at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere in the dark. Then, 10 μL of MTT dye (10 μg/mL) was added to each well, and the cells were incubated for more 4 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. The formazan crystals were dissolved in DMSO and the absorbance was measured at 540 nm with a plate reader (Perkin Elmer, Singapore).

### 2.7. Statistical analysis

The experiments were performed in triplicates and repeated three times independently. Data were analyzed using the statistical software GraphPad Prism (version 6.01). The significance of differences among the averages of each group was discriminated by one-way ANOVA followed by Tukey's test ( $p < .05$ ).

## 3. Results

The induction of SSB and oxidized DNA bases by **H<sub>2</sub>RuTPyP** compound was evaluated after visible light irradiation, as well as in the dark condition, by plasmid DNA photocleavage assay (Fig. 2A). As observed in non-treated DNA control, all tested concentrations of **H<sub>2</sub>RuTPyP** showed no cleavage of plasmid DNA in the dark (Fig. 2B). However, after the exposure to visible light, it was observed a concentration-dependent increase in the formation of DNA damage. Porphyrin **H<sub>2</sub>RuTPyP** promoted the complete conversion of supercoiled form (FI) of pCMUT vector to the open relaxed form (FII) at the lower

concentration of 5.0 μM (Fig. 2A). At 10 μM, an initial degradation of plasmid DNA can be observed, especially in the DNA samples treated with the Fpg enzyme. At 15 μM, and especially 20 μM, it is possible to observe complete DNA degradation, which is indicated by the disappearance of DNA bands along the gel (Figs. 2A and 2C).

In the same manner, the genotoxic potential of the constituents of **H<sub>2</sub>RuTPyP** was tested separately (Fig. 3). None of the separate constituents (Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> or 4-TPyP) induced significant amount of DNA damage, ensuring that only the complete **H<sub>2</sub>RuTPyP** complex is effective to induce DNA damage under visible light irradiation. The fact that the starting materials are not active can be attributed to two factors: (i) the complex alone [Ru(bpy)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] has labile chloride ligands that can be exchanged for water molecules in solution, losing activity; and (ii) the *meso*-tetra-(4-pyridyl)porphyrin has no peripheral charges to favor an electrostatic interaction during the photo-cleavage process.

In order to investigate ROS involvement in DNA cleavage induced by **H<sub>2</sub>RuTPyP** after irradiation with visible light, specific ROS scavengers were added to the DNA samples prior to white-light irradiation (Potassium Iodide for superoxide species; Mannitol or dimethyl sulfoxide for hydroxyl radicals; Sodium azide for singlet oxygen species; and EDTA to avoid Photo-Fenton reaction). As shown in Fig. 4, DNA cleavage promoted by **H<sub>2</sub>RuTPyP** was not avoided by any ROS scavenger, affording no significant protection against the formation of DNA lesions.

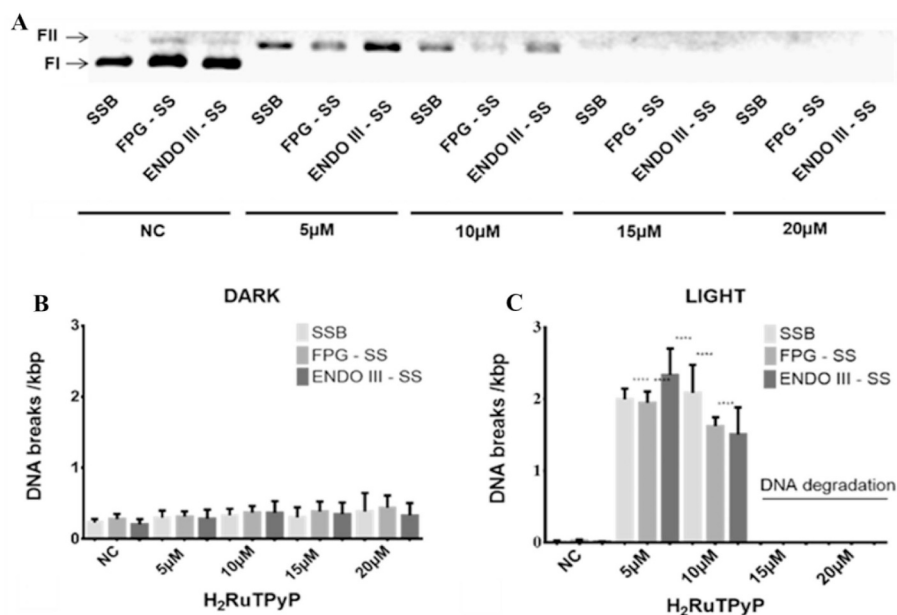
Cytotoxicity of different concentrations of **H<sub>2</sub>RuTPyP** (5.0, 10, 15, 20 μM) was also evaluated in both melanoma murine B16F10 and human keratinocyte HaCaT cell lines (Fig. 5). This result shows that all **H<sub>2</sub>RuTPyP** concentrations were cytotoxic, even in dark condition (~57% of cell viability), to the B16F10 cell line. However, after 60 min of light exposure, the cytotoxicity of **H<sub>2</sub>RuTPyP** significantly increased in this melanoma cell line (~33% of cell viability). A significant difference in relation to the cell viability of the negative control was observed among all tested concentrations of **H<sub>2</sub>RuTPyP** in melanoma cells exposed to visible light exposure or kept in dark condition. However, there were no significant differences among the tested concentrations of **H<sub>2</sub>RuTPyP** in melanoma cells exposed to visible light exposure or kept in dark condition. For HaCaT cell line, the compound was not cytotoxic under both dark and light conditions, suggesting the safety of **H<sub>2</sub>RuTPyP** to non-neoplastic cells.

Intracellular ROS formation was also evaluated in this work by **H<sub>2</sub>DCF-DA** assay (Fig. 6). This result clearly indicates that there is no increase in the fluorescence signal when the B16F10 cells were treated with 5.0 μM of **H<sub>2</sub>RuTPyP**, both under visible light and dark conditions, thus suggesting the non-involvement of ROS on the cytotoxicity induced by **H<sub>2</sub>RuTPyP**.

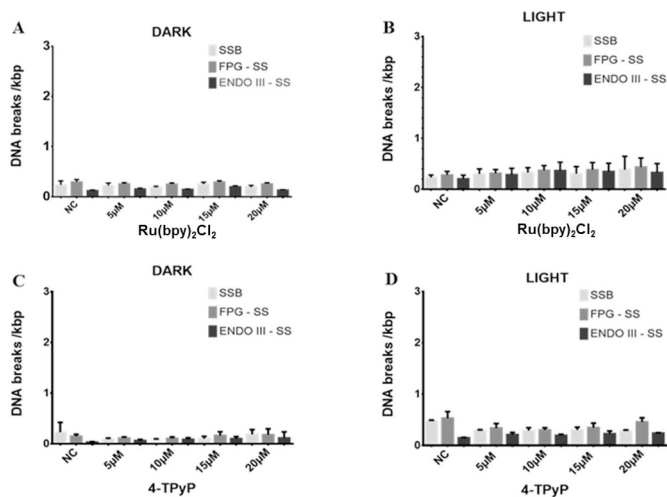
## 4. Discussion

Photosensitivity of Ru(II) complexes attached with N-pyridyl position of porphyrin macrocycles is well documented in literature, representing an appealing opportunity to improve the activity of a PS towards PDT of cancer. The binding mode of these compounds with DNA provides insight into the action mechanisms and effectiveness of these molecules. The hypochromicity and binding constant values for our free-base tetra-ruthenated porphyrin indicates that this porphyrinoid derivative interact to DNA by H-bonding and/or by non-classical stacking modes involving most probably the partial insertion of the Ru (II) peripheral complexes between adjacent base pairs on DNA (data not shown).

Our results also show an efficient cleavage of supercoiled plasmid DNA in the presence of 5.0 μM of **H<sub>2</sub>RuTPyP** upon irradiation with visible light for 60 min, while concentrations equal or higher than 15 μM generated complete degradation of DNA molecule. Furthermore, SSBs could be efficiently detected in the concentrations of 5.0 μM and 10 μM, what overlapped the ROS-induced base oxidation detected by Fpg and Endo-III enzymes. In concentrations equal or higher than



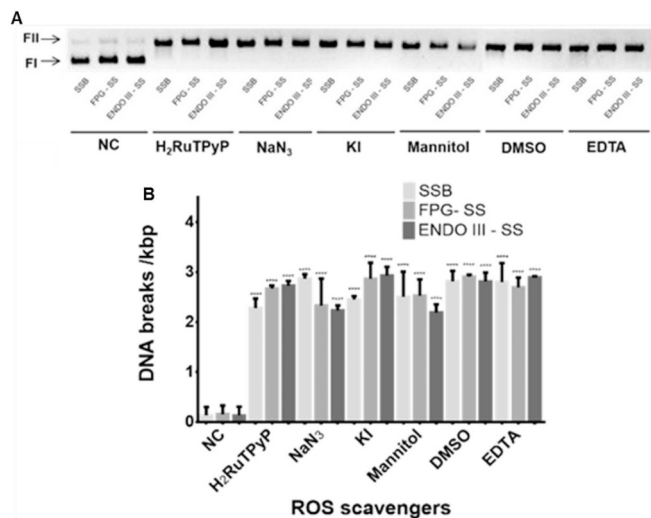
**Fig. 2.** Quantification of DNA lesions generated by  $H_2RuTPyP$  porphyrin in dark and light conditions. **A.** Illustrative example of an electrophoresis migration of plasmid DNA samples treated with different concentrations of  $H_2RuTPyP$  and incubated with Fpg (Fpg-sensitive sites; Fpg-SS) and Endo III (Endo III-sensitive sites; Endo III-SS) enzymes or without the enzymes (SSB; single strand breaks) after visible light exposure. **B.** Quantification of DNA lesions induced by  $H_2RuTPyP$  in the dark. **C.** Quantification of DNA lesions induced by  $H_2RuTPyP$  after exposure to visible light. NC: negative control. Average and standard deviation of three independent experiments, \*\*\*\*  $p < .0001$ .



**Fig. 3.** Quantification of DNA lesions generated by  $Ru(bpy)_2Cl_2$  (3.A and 3.B) and 4-TPyP (3.C and 3.D) start materials of free-base tetra-ruthenated porphyrin  $H_2RuTPyP$ , in dark and light conditions. NC: negative control. SSB: DNA single-strand breaks. FPG-SS: Formamidopyrimidine DNA glycosylase-sensitive sites. ENDO III-SS: Endonuclease III-sensitive sites. Average and standard deviation of three independent experiments.

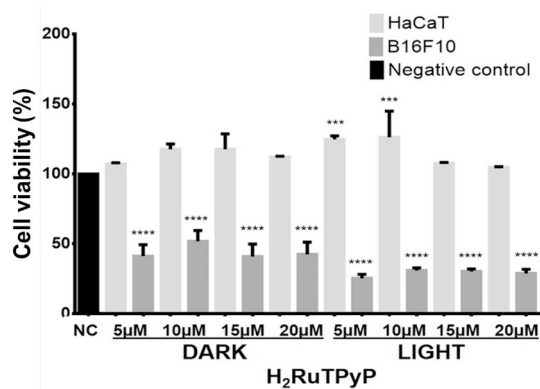
15  $\mu M$ , double strand breaks were probably the main type of DNA damage induced by this PDT, leading to the complete degradation of DNA samples and causing the disappearance of DNA bands from the gel.

Although ROS are often involved in the oxidative mechanism of DNA damage induction in PDT, other authors have already shown almost complete DNA degradation after irradiation with ruthenium(II)-porphyrin conjugates [22–25]. In this work, plasmid DNA photocleavage assay was also carried out in the presence of previously published concentrations of ROS scavengers [12] in an attempt to verify if ROS generation was responsible for the induction of DNA breaks. Our result shows that the DNA photocleavage promoted by  $H_2RuTPyP$  is not inhibited by typical ROS scavengers, emphasizing the non-involvement of oxidative species as the causative factors in the induction of DNA breaks. This evidence suggests that the extensive DNA break caused by  $H_2RuTPyP$  was due to the cleavage of phosphodiester bonds by hydrolysis after excitation by light exposure [26,27]. Recently, Deshpande and collaborators showed that different Ru(II) polypyridyl

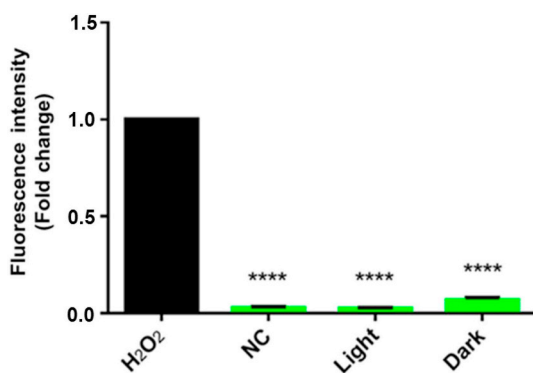


**Fig. 4.** Incubation of plasmid DNA samples with  $H_2RuTPyP$  (5.0  $\mu M$ ) and different ROS scavengers followed by visible light exposure. **A.** Illustrative example of an agarose gel showing plasmid migration after treatments. **B.** Quantification of DNA lesions induced by  $H_2RuTPyP$  exposed to visible light in the presence of different ROS scavengers. NC: negative control (Non-irradiated DNA).  $H_2RuTPyP$ : Ruthenium(II) porphyrin.  $NaN_3$ : Sodium azide (8.0 mM). KI: Potassium iodide (8.0 mM). DMSO: Dimethyl sulfoxide (0.8 mM). EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid (10 mM). SSB: single-strand breaks. FPG-SS: Formamido-pyrimidine DNA glycosylase-sensitive sites. ENDO III-SS: Endonuclease III-sensitive sites. Average and standard deviation of three independent experiments, \*\*\*\*  $p < .0001$ .

complexes that favor electrostatic binding mode cleave DNA by hydrolytic mechanism while those that contain intercalating ligands form conjugates with and then can cleave DNA by a combination of oxidative and hydrolytic mechanism [26]. Moreover, Deshpande and collaborators [27] previously demonstrated a similar DNA cleavage mechanism as observed in our study using a ruthenium(II) polypyridyl complex ( $[Ru(bpy)_2(BPG)]Cl_2$ ), where the hydrogen bonds established between the DNA phosphate backbone oxygen atoms and the N–H groups of the ruthenium-bound bipyridine-glycoluril facilitate the DNA hydrolytic cleavage. In addition, Gonçalves and co-workers [28] reported that the free-base porphyrin  $H_2RuTPyP$  generates small amounts of singlet



**Fig. 5.** Murine melanoma (B16F10) and human keratinocyte (HaCaT) cell viability (%) after incubation with  $H_2RuTPyP$  (5.0, 10, 15, 20  $\mu M$ ) for 60 min under visible light or dark conditions. NC: Negative control (non-treated HaCaT and B16F10 cells). Error bars represent the standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. Statistically significant differences of cellular viability in relation to untreated control; \*\*\* $p < .001$ , \*\*\*\* $p < .0001$ .



**Fig. 6.** Effect of  $H_2RuTPyP$  (5  $\mu M$ ) on the production of intracellular ROS in B16F10 cells after 1 h of exposure to visible light or in the dark. Bars represent the fold change of fluorescence signal relative to the positive control (B16F10 cells treated with 100  $\mu M$  of  $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$ : Positive control. NC: Negative control (untreated B16F10 cells). Error bars represent the standard deviation of three independent experiments performed in triplicate. Asterisks indicate statistically significant differences in the fluorescence signal relative to the positive control ( $H_2O_2$ ), \*\*\*\* $p < .0001$ .

oxygen and radical species, mainly in aqueous media. Therefore, these data corroborate with our results obtained with the plasmid DNA photocleavage assay performed in the presence of ROS scavengers and further reinforces a possible hydrolytic mechanism in the induction of DNA breaks by  $H_2RuTPyP$ .

The photosensitizing properties of  $H_2RuTPyP$  were quite efficient to induce photocytotoxicity in melanoma cells (about 70% of cell death). Moreover,  $H_2RuTPyP$  presents a high specificity towards melanoma cell line, but avoid damage generation in human keratinocytes under both visible light and dark conditions. This cell specificity can be explained mainly by the action of the ruthenium on the cell uptake mechanism into melanoma cells [29]. Rani-Beeram and collaborators [30] suggest that there is a clear link between the number of pendant ruthenium complexes and cell toxicity, as well as with the preference of uptake of ruthenium complexes for melanoma cells. In addition, it is also important to highlight that the higher cellular uptake of transferrin by cancer cells is an additive factor for ruthenium(II)-porphyrin complexes [9]. Kratz and co-workers have showed that ruthenium compounds bound to apotransferrin can exceeds the antitumor activity of free complexes since the natural transferrin cycle allows the release of ruthenium compounds towards an acidic pH, as observed in melanoma

cells [31]. Therefore, our results also suggest that the main mechanism involved in the  $H_2RuTPyP$ -induced cytotoxicity in melanoma cells could be related to the cancer cell uptake of  $H_2RuTPyP$ , since a significant decrease of melanoma cell viability could be observed even in the dark. However, further experiments are still necessary to better explain the specific cytotoxicity induced by  $H_2RuTPyP$  in melanoma cells.

## 5. Conclusions

PS molecules that can hydrolyze the DNA phosphodiester bonds and induce targeted cytotoxicity towards melanoma cancer cells, such as the free-base porphyrin  $H_2RuTPyP$ , are valuable tools for PDT. Our results confirm that  $H_2RuTPyP$  interacts with DNA and induces high amounts of strand breaks, leading to complete degradation at higher concentrations. Moreover, the results suggest that ROS formation does not play the major role in the induction of DNA strand breaks and melanoma cytotoxicity. Surprisingly, after exposure to visible light, this cationic tetra-ruthenated porphyrin specifically induced cell death in melanoma cell line, without generating decrease in cell viability of a human keratinocyte cell line. Therefore,  $H_2RuTPyP$  is indeed a promising photosensitizer representing an alternative and noninvasive drug to be tested in further oncotherapy studies with animal models. In the future, studies with other derivatives containing  $[Ru(bpy)_2Cl]^+$  units on the periphery of porphyrin in different N-pyridyl positions, and with transition metals coordinated to the porphyrin core may be evaluated.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111922>.

## Funding

This work was supported by Federal University of Santa Maria, and financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) – PROEX Finance Code 23038.004173/2019–93, N° AUXPE: 0493/2019. B.A. Iglesias thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil – Universal Grant 409150/2018–5, and PQ Grant 304711/2018–7). A.P. Schuch also thanks to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil – Universal Grant 407103/2018–0, and PQ Grant 307063/2018–6).

## Author Statement

Bruno S. Vizzotto: executed the essays described in this work, analyzed the results and wrote the manuscript.

Renne S. Dias: helped in the synthesis and fully characterization of the chemical complexes used in this work.

Bernardo A. Iglesias: helped in the design and execution of the essays described in this work, in the revision of the manuscript, and also obtained the financial support.

Luciana F. Krause: helped in the execution of the essays described in this work and in the revision of the manuscript.

Altevir R. Viana: helped in the execution of the essays described in this work and in the revision of the manuscript.

André Passaglia Schuch: is the supervisor of this work. Helped in the design of the essays described in this paper, as well as in the analyses of the results, in the writing of the manuscript, and also obtained the financial support.

## Declaration of Competing Interest

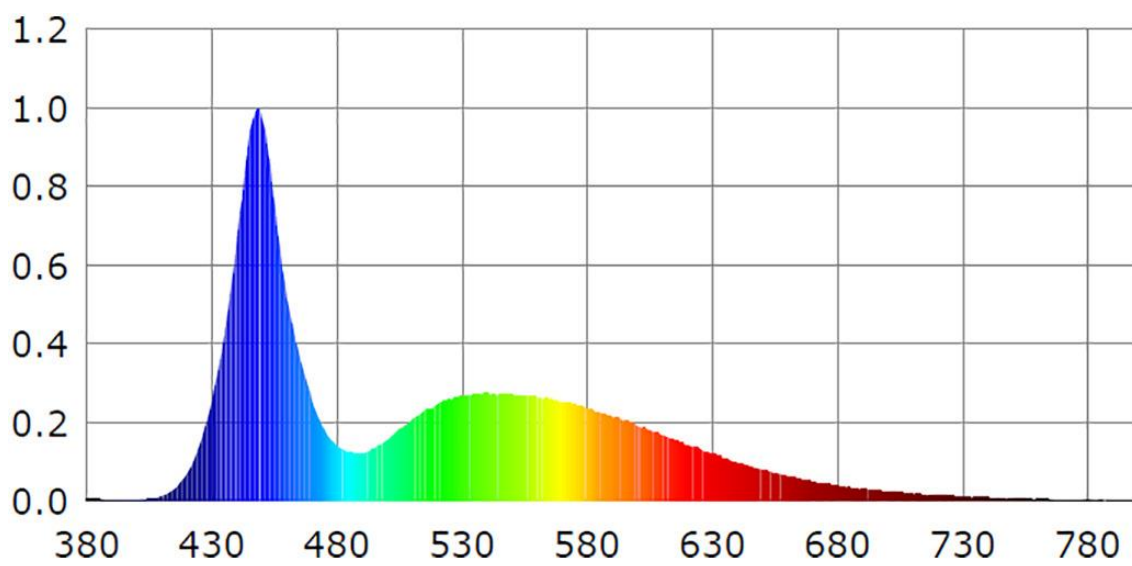
The authors declare that they have no competing financial interests or personal relationships that could have influenced the work reported in this paper.

## References

- [1] F.P. Dwyer, E.C. Gyrfas, W.P. Rogers, J.H. Koch, Biological activity of complex ions, *Nature* 170 (1952) 190–191, <https://doi.org/10.1038/170190a0>.
- [2] K.E. Erkkila, D.T. Odom, J.K. Barton, Recognition and reaction of metallointercalators with DNA, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2777–2796, <https://doi.org/10.1021/cr9804341>.
- [3] F. Gao, H. Chao, L.N. Ji, DNA binding, photocleavage, and topoisomerase inhibition of functionalized ruthenium(II)-polypyridine complexes, *Chem. Biodivers.* 5 (2008) 1962–1979, <https://doi.org/10.1002/cbdv.200890181>.
- [4] U. Schatzschneider, Photoactivated biological activity of transition-metal complexes, *Eur. J. Inorg. Chem.* 10 (2010) 1439, <https://doi.org/10.1002/ejic.201090025>.
- [5] G. Sava, S. Zorzet, C. Turrin, F. Vita, M.R. Soranzo, G. Zabucchi, M. Cocchiello, A. Bergamo, S. DiGiovine, G. Pezzoni, L. Sartor, S. Garbisa, Dual action of NAMI-A in inhibition of solid tumor metastasis: selective targeting of metastatic cells and binding to Collagen1, *Clin. Cancer Res.* 9 (2003) 1898–1905.
- [6] G. Sava, A. Bergamo, S. Zorzet, B. Gava, C. Casarsa, M. Cocchiello, A. Furlani, V. Scarcia, B. Serli, E. Iengo, G. Alessio, G. Mestroni, Influence of chemical stability on the activity of the antimetastasis ruthenium compound NAMI-A, *Eur. J. Cancer* 38 (2002) 427–435, [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(01\)00389-6](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(01)00389-6).
- [7] K. Arora, M. Herroon, M.H. Al-Afyouni, N.P. Toupin, T.N. Rohrabough Jr., L.M. Loftus, et al., Catch and release photosensitizers: combining dual-action ruthenium complexes with protease inactivation for targeting invasive cancers, *J. Am. Chem. Soc.* 140 (2018) 14367–14380, <https://doi.org/10.1021/jacs.8b08853>.
- [8] W.-J. Mei, X.-Y. Wei, W.-N. Li, Q. Xia, Cytotoxic and DNA-binding properties of two ruthenium(II) porphyrin complexes, *Transit. Met. Chem.* 33 (2008) 1053–1058, <https://doi.org/10.1007/s11243-008-9154-z>.
- [9] C. Mari, V. Pierroz, S. Ferrari, G. Gasser, Combination of Ru(II) complexes and light: new frontiers in cancer therapy, *Chem. Sci.* 6 (2015) 2660–2686, <https://doi.org/10.1039/C4SC03759F>.
- [10] F. Moret, E. Reddi, Strategies for optimizing the delivery to tumors of macrocyclic photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT), *J. Porphyrins Phthalocyanines* 21 (2017) 1–18, <https://doi.org/10.1142/S1088424617300014>.
- [11] J.D. Spikes, Photobiology of porphyrins, in: D.R. Doiron, C.J. Gomer (Eds.), *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*, Alan R. Liss, New York, 1984, pp. 19–39.
- [12] V.A. Oliveira, B.A. Iglesias, B.L. Auras, A. Neves, H. Terenzi, Photoactive meso-tetra (4-pyridyl)porphyrin-tetrakis-[chloro(2,2'-bipyridine)platinum(II)] derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation, *Dalton T.* 46 (2017), pp. 1660–1669, <https://doi.org/10.1039/C6DT04634G>.
- [13] M. Imran, M. Ramzan, A.K. Qureshi, M.A. Khan, M. Tariq, Emerging applications of porphyrins and Metalloporphyrins in biomedicine and diagnostic magnetic resonance imaging, *Biosensors (Basel)* 8 (2018) 1–17, <https://doi.org/10.3390/bios8040095>.
- [14] V. Bogoeva, M. Siksjo, K.G. Saeterbo, T.B. Melo, A. Bjorkoy, M. Lindgren, et al., Ruthenium porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 14 (2016) 9–17, <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2016.01.012>.
- [15] A. Pothig, A. Casini, Recent developments of supramolecular metal-based structures for applications in Cancer therapy and imaging, *Theranostics* 9 (2019) 3150–3169, <https://doi.org/10.7150/thno.31828>.
- [16] J. Onuki, A.V. Ribas, M.H.G. Medeiros, K. Araki, H.E. Toma, L.H. Catalan, P.D. Mascio, Supramolecular cationic Tetraruthenated porphyrin induces single-strand breaks and 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine formation in DNA in the presence of light, *Photochem. Photobiol.* 63 (1996) 272–277, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03024.x>.
- [17] L. Conti, A. Bencini, C. Ferrante, C. Gellini, P. Paoli, M. Parri, et al., Cover feature: highly charged ruthenium(II) Polypyridyl complexes as effective photosensitizer in photodynamic therapy, *Chem. Eur. J.* 25 (2019) 10514, <https://doi.org/10.1002/chem.201902431>.
- [18] T. Gianferrara, A. Bergamo, I. Bratsos, B. Milani, C. Spagnul, G. Sava, et al., Ruthenium-porphyrin conjugates with cytotoxic and phototoxic antitumor activity, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 4678–4690, <https://doi.org/10.1021/jm1002588>.
- [19] F.M. Engelmann, P. Losco, H. Winnischofer, K. Araki, H.E. Toma, Synthesis, electrochemistry, spectroscopy and photophysical properties of a series of meso-phenylpyridylporphyrins with one to four pyridyl rings coordinated to [Ru(bipy)2Cl]+ groups, *J. Porphyrins Phthalocyanines* 6 (2002) 33–42, <https://doi.org/10.1142/S1088424602000063>.
- [20] K. Araki, H.E. Toma, Synthesis and characterization of a multibridged porphyrin complex containing peripheral Bis(Bipyridine)-ruthenium(II) groups, *J. Coord. Chem.* 30 (2006) 9–17, <https://doi.org/10.1080/00958979308022742>.
- [21] A.P. Schuch, R.G. da Silva, K.M. de Lima-Bessa, N.J. Schuch, C.F.M. Menck, Development of a DNA-dosimeter system for monitoring the effects of solar-ultraviolet radiation, *Photochem. Photobiol. Sci.* 8 (2009) 111–120, <https://doi.org/10.1039/B810085C>.
- [22] O.A. Lenis-Rojas, C. Roma-Rodrigues, A.R. Fernandes, F. Marques, D. Pérez-Fernández, J. Guerra-Varela, et al., Dinuclear Ru(II)(bipy)2 derivatives: structural, biological, and in vivo zebrafish toxicity evaluation, *Inorg. Chem.* 56 (2017) 7127–7144, <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.7b00790>.
- [23] E. Yavin, E.D.A. Stemp, L. Weiner, I. Sagi, R. Arad-Yellin, A. Shanzer, Direct photo-induced DNA strand scission by a ruthenium bipyridyl complex, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 1750–1756, <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.07.016>.
- [24] S. Swavey, M. Wang, N. Lundy, J. Allen, Photoreactions of DNA with a bimetallic ruthenium(II) polypyridyl complex bridged by an organic chromophore, *Inorg. Chim. Acta* 454 (2017) 234–239, <https://doi.org/10.1016/j.ica.2016.05.033>.
- [25] Q.-X. Zhou, W.-H. Lei, C. Li, Y.-J. Hou, X.-S. Wang, B.-W. Zhang, DNA photocleavage in anaerobic conditions by a Ru(II) polypyridyl complex with long wavelength MLCT absorption, *New J. Chem.* 34 (2010) 137–140, <https://doi.org/10.1039/B9NJ00465C>.
- [26] M.S. Deshpande, A.A. Kumbhar, A.S. Kumbhar, M. Kumbhakar, H. Pal, U.B. Sonawane, et al., Ruthenium(II) complexes of Bipyridine–Glycoluril and their interactions with DNA, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 447–459, <https://doi.org/10.1021/bc800298t>.
- [27] M.S. Deshpande, A.A. Kumbhar, A.S. Kumbhar, Hydrolytic cleavage of DNA by a ruthenium(II) Polypyridyl complex, *Inorg. Chem.* 46 (2007) 5450–5452, <https://doi.org/10.1021/ic070331d>.
- [28] P.J. Gonçalves, F.C. Bezzerra, A.V. Teles, L.B. Menezes, K.M. Alves, L. Alonso, A. Alonso, M.A. Andrade, I.E. Borissevitch, G.R.L. Souza, B.A. Iglesias, Photoinactivation of salmonella enterica (serovar typhimurium) by tetracationic porphyrins containing peripheral [Ru(bpy)2Cl]+ units, *J. Photochem. Photobiol. A* 391 (2020) 112375, <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2020.112375>.
- [29] F. Schmitt, P. Govindaswamy, O. Zava, G. Süß-Fink, L. Juillerat-Jeanerret, B. Therrien, Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2008) 101, <https://doi.org/10.1007/s00775-008-0427-y>.
- [30] S. Rani-Beeram, K. Meyer, A. McCrate, Y. Hong, M. Nielsen, S. Swavey, A fluorinated ruthenium porphyrin as a potential photodynamic therapy agent: synthesis, characterization, DNA binding, and melanoma cell studies, *Inorg. Chem.* 47 (2008) 11278–11283, <https://doi.org/10.1021/ic8015589>.
- [31] F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, L. Messori, The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 2581–2588.



### Supplementary data



Supplementary Fig. S1. Emission spectrum of the visible light source.

## 2.1. DISCUSSÃO

A terapia baseada na utilização de compostos de Ru tem mostrado que estes representam candidatos promissores com propriedades biológicas aceitáveis para a quimioterapia, emergindo como um aditivo favorável à terapêutica derivada da platina. Nas últimas décadas, a terapêutica de Ru tem sido usada com sucesso em pesquisas clínicas e seus mecanismos de ação antitumoral têm sido relatados, representando uma classe emergente de compostos anticâncer, os quais podem complementar o arsenal existente de drogas devido ao seu mecanismo único de ação (WERNITZNIG et al., 2019). Estes complexos estão sendo investigados há décadas devido a esta atividade, ganhando especial atenção desde que dois complexos, o NAMI-A e o KP1019 (e o respectivo sal sódico KP1339), passaram por testes clínicos iniciais (FREI et al., 2014).

Na presente pesquisa, os autores visaram demonstrar a capacidade de  $H_2RuTPyP$  em atuar como um AFS e gerar danos à molécula de DNA sob influência de luz visível. Para isso, o DNA plasmidial (pCMUT) foi exposto a concentrações crescentes do composto, na presença e na ausência de uma fonte luminosa por 60 min, seguido pelo tratamento com enzimas específicas de reparo de DNA para caracterizar e quantificar a genotoxicidade do mesmo. Observou-se que o dano sofrido pela molécula de DNA ocorreu apenas na presença da fonte luminosa, e em uma concentração do composto de  $5 \mu M$ , havendo fragmentação completa da molécula de DNA na concentração de  $15 \mu M$ . Na ausência da fonte luminosa, não foram observadas quebras de fita, comprovando-se a influência desta energia na ativação do potencial genotóxico da molécula, o que já é bastante discutido na literatura, como no trabalho de Swavey et al. 2015, que ao submeter uma solução aquosa de porfirina bisrutenada a uma molécula de DNA superenovelado, demonstraram a quebra completa de fita simples do DNA quando o composto foi irradiado com luz visível (energia menor do que  $550 \text{ nm}$ ). Outras pesquisas (SWEIGERT et al., 2012) demonstraram que diferentes complexos de porfirina de Ru coordenados com dois radicais  $[Ru(bipy)_2Cl]^+$  ligados aos átomos de nitrogênio do anel piridil interagem fortemente com a molécula de DNA possivelmente por meio de um mecanismo de intercalação. Estudos sobre o complexo de Ru de base livre mostraram uma capacidade elevada em fotoclicar o DNA, induzindo quebras de fita dupla e fragmentando a molécula. Em outro trabalho, os autores demonstraram a capacidade do complexo de Ru em ligar-se e fotoclicar a o DNA na presença e ausência de oxigênio, induzindo quebras de fita em ambas condições (XU e SWAVEY, 2011).

A fim de investigar o envolvimento de EROs no processo de clivagem do DNA induzido pelo composto H<sub>2</sub>RuTPyP, após irradiação sob luz visível, agentes sequestrantes específicos de EROs foram adicionados às amostras de DNA previamente à irradiação. É sabido que a exposição de um AFS à luz apropriada leva a uma reação foto-física e a produção de EROs, os quais constituem a principal força motriz para induzir morte celular (SPARSA et al., 2013). O uso de complexos de Ru para a produção de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> tem ganhado atenção recentemente, onde pesquisas já relataram a síntese de complexos de Ru polipiridil os quais produzem eficientemente <sup>1</sup>O<sub>2</sub> após a irradiação com luz branca, exibindo altos índices foto-tóxicos em um modelo de melanoma metastático (LINCOLN et al., 2013). No trabalho de Li et al. foi realizada a avaliação dos potenciais efeitos anticancerígenos de seis novos complexos de Ru(II) em vários tipos de linhagens celulares de câncer, e a geração de EROs possui correspondência significativa com suas atividades inibitórias em células tumorais, principalmente pela geração do radical •OH, superóxido e óxido nítrico livre (LI, W. et al., 2017).

Pesquisas realizadas por Ramu et al. (RAMU et al., 2017) demonstraram a forte interação de dois complexos apoptóticos Ru(II)-polipiridil com CT-DNA. O ensaio cometa indicou que esses complexos podem danificar o DNA celular, o que é atribuído ao acúmulo significativo de <sup>1</sup>O<sub>2</sub> mesmo na irradiação com luz de baixa intensidade. Ao contrário dos estudos relatados, na presente pesquisa não foram verificadas a produção de EROs pela irradiação de H<sub>2</sub>RuTPyP com luz visível, mesmo sendo observada a elevada indução de danos à molécula de DNA. Dessa forma, podemos propor uma via não-oxidativa para a clivagem da molécula de DNA pelo composto H<sub>2</sub>RuTPyP, como demonstrado nas Figuras 4 e 6 do artigo. A maior parte dos complexos de rutênio-polipiridil ligam-se de forma não-covalente ao DNA em diferentes modos, por exemplo eletrostático, ligação superficial ou intercalação, e iniciam reações de clivagem de DNA sob fotoirradiação, seja por transferência de elétrons para formação de fotoaductos covalentes ou por transferência de energia para oxigênio molecular gerando <sup>1</sup>O<sub>2</sub> ou raramente por um mecanismo hidrolítico.

Pesquisas demonstraram a clivagem do DNA pelo mecanismo de hidrólise por complexos Ru-polipiridil, onde o composto liga-se ao DNA por intercalação. As ligações de H entre os átomos de oxigênio do radical fosfato do DNA e os grupos N-H do composto Ru-Bipiridina, facilitaram a clivagem hidrolítica da molécula de DNA (DESHPANDE et al., 2007).

As propriedades fotossensibilizantes de H<sub>2</sub>RuTPyP foram bastante eficientes para induzir foto-citotoxicidade em células de melanoma (cerca de 70% da morte celular). Além disso, o H<sub>2</sub>RuTPyP apresentou uma alta especificidade para a linhagem celular de MM, sem a geração de danos em queratinócitos humanos sob condições claro e escuro. Comparando cinco

compostos tetranucleares de Ru, semelhantes ao analisado em nossa pesquisa, foi demonstrada uma excelente foto-toxicidade direcionada às células de melanoma quando expostos à luz laser em 652 nm. Estudos de microscopia de absorção e localização celular revelaram que estes compostos se acumularam no citoplasma das células do MM em estruturas granulares diferentes dos lisossomos (SCHMITT et al., 2008). Já outros compostos a base de porfirina, como ALA, Metvix e Photofrin não demonstraram eficiência frente ao MM, como demonstrado em câncer de pele não-melanoma, provavelmente devido à presença do pigmento melanina, o qual atua como um mecanismo de defesa, primeiramente devido à sua capacidade de absorver o comprimento de onda de luz necessário para ativar o AFS e em segundo lugar, devido ao seu comportamento como agente sequestrador de EROs, neutralizando a produção destas espécies induzidas pela TFD (BALDEA et al., 2015).

No presente estudo, enfatiza-se a necessidade do desenvolvimento de novos AFS à serem utilizados na TFD para o tratamento do MM. Há muitos desafios a serem sobrepostos, como a toxicidade destes compostos baseados em metais como o Ru, a habilidade do melanoma pigmentado em absorver comprimentos de onda necessários para ativar o AFS, e ainda, a natureza metastática do MM. Em nosso estudo, foi possível demonstrar a capacidade do composto  $H_2RuTPyP$  em gerar fototoxicidade de forma específica frente a células do MM, assim como inferir um possível modo de interação com a molécula de DNA. Em combinação com os tratamentos tradicionais para o MM, a TFD está se tornando um regime mais aceitável de terapia para esta forma mais letal do câncer de pele.

### **3. CONCLUSÕES**

### 3. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos na presente pesquisa podemos concluir que:

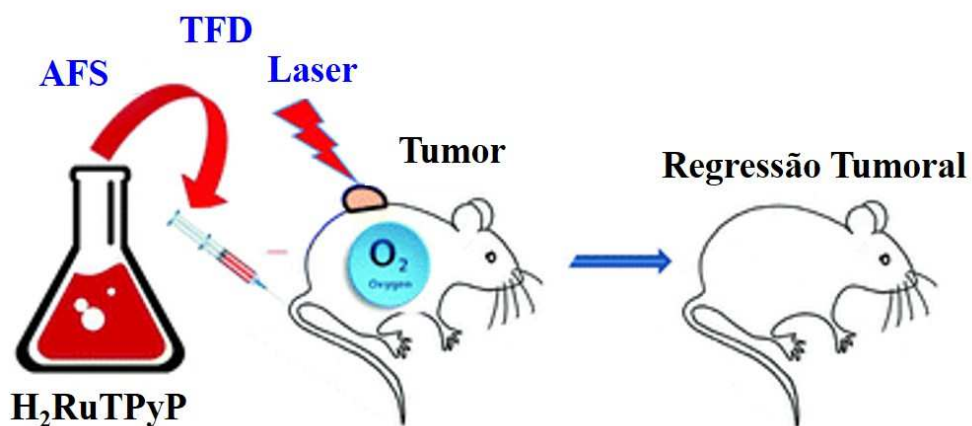
1. O composto H<sub>2</sub>RuTPyP induziu quebras de fitas de DNA
  - A partir da concentração de 5uM, houve a indução de quebras de fita simples no DNA;
  - A partir da concentração de 15uM, observou-se a degradação completa da molécula de DNA
  
2. O mecanismo de dano ao DNA não se dá pela produção de EROs
  - Nos ensaios de detecção, não foi demonstrada a geração de EROs empregando os agentes sequestrantes específicos para cada espécie.
  - No ensaio de DCF, também não houve a detecção da produção de EROs pela irradiação do composto;
  
3. O composto H<sub>2</sub>RuTPyP apresentou citotoxicidade específica frente à linhagem de células B16F10 de melanoma murino;
  - Tanto nas condições claro e escuro, o composto apresentou toxicidade seletiva à linhagem celular B16F10, não demonstrando toxicidade frente à linhagem de fibroblastos HaCaT.
  - A capacidade citotóxica foi independente da concentração utilizada do composto;
  
4. Desta forma, nosso trabalho mostra que o composto H<sub>2</sub>RuTPyP demonstra grande potencial para utilização como AFS na TFD visando o tratamento do MM, necessitando que futuros estudos sejam realizados visando o desenvolvimento de novos tratamentos alternativos e não invasivos de oncoterapia para MM.

## PERSPECTIVAS

Como perspectivas futuras da pesquisa, visamos ampliar o conhecimento acerca da interação de  $H_2RuTPyP$  com o MM por meio do estudo de localização e morte celular, assim como o desenvolvimento de uma forma farmacêutica como possível veículo de aplicação deste composto para análises em modelo *in vivo* de MM.

Os estudos de localização e morte celular serão realizadas por microscopia de escaneamento a laser confocal, onde pretende-se expor a cultura de células de MM ao composto  $H_2RuTPyP$  e presença de uma fonte luminosa, aos reagentes Mitotracker (200 nM), LysoTracker (100 nM) e DAPI (300 nM), os quais verificam o acúmulo do composto a nível mitocondrial, lisossomal e nuclear, respectivamente. Da mesma forma, para distinguir o modelo de morte celular após o estímulo do composto à fonte luminosa, pretendemos realizar a marcação das células com os compostos Annexin V-FITC (apoptose) e Iodeto de Propídio (Necrose). No trabalho de Raza, et al (RAZA et al., 2020) pode-se observar o resultado final de células de MM tratadas com composto a base de Ru (Ru-Ru TAP), mostrando que o composto demonstrou predomínio de acúmulo nuclear nestas células. Já os resultados de internalização em organelas sugerem acúmulo citoplasmático e lisossomal. Também pode-se observar tanto a ocorrência do processo de apoptose quanto necrose nos estudos sobre o mecanismo de morte celular, quando as células foram tratadas com o composto e submetidas a incidência de luz.

**Figura 19** – Modelo *in vivo* de melanoma para aplicação da TFD.



Fonte: (LUPU et al., 2018)

O composto  $H_2RuTPyP$  será avaliado em um modelo tumoral ectópico de MM (Figura 19) utilizando células B16F10 inoculadas de forma subcutânea em camundongos BALB/C. Os animais serão utilizados para os experimentos de TFD quando os tumores

atingirem diâmetros superficiais entre 4 e 6 MM e profundidade de 2,5 a 3 MM. O AFS será administrado por injeção na veia caudal ou de intradérmica, e o local do tumor será então irradiado por 1h com luz de comprimento de onda apropriado. Os estudos em animais ocorrerão de acordo com as orientações para cuidados com o bem-estar animal em protocolos de pesquisa determinados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSM) (LUPU et al., 2018).



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIDA MARANDUCA, M., et al. "Skin - a vast organ with immunological function (Review)." **Exp Ther Med** 20(1): 18-23 (2020).
- ALESSIO, E. e MESSORI, L. "The Deceptively Similar Ruthenium(III) Drug Candidates KP1019 and NAMI-A Have Different Actions. What Did We Learn in the Past 30 Years?" **Met Ions Life Sci** 18 (2018).
- ANANTHAG, G. S. e SHETTI, V. S. "Synthesis, structure and catalysis of organometallic porphyrin-pincer hybrids: a review." **Dalton Trans** 46(41): 14062-14082 (2017).
- ARAKI, K. e TOMA, H. E. "Synthesis and characterization of a multibridged porphyrin complex containing peripheral bis(bipyridine)-ruthenium(ii) groups." **Journal of Coordination Chemistry** 30(1): 9-17 (1993).
- ARAKI, K. e TOMA, H. E. "Química de sistemas supramoleculares constituídos por porfirinas e complexos metálicos %J Química Nova." 25: 962-975 (2002).
- BALDEA, I., et al. "Photodynamic therapy of melanoma using new, synthetic porphyrins and phthalocyanines as photosensitisers - a comparative study." **Clujul medical (1957)** 88(2): 175-180 (2015).
- BARRETT, A. J., et al. "The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: a volumetric titration study." **J Photochem Photobiol B** 6(3): 309-323 (1990).
- BERTRAND, J. U., et al. "Melanoma Risk and Melanocyte Biology." **Acta Derm Venereol** 100(11): adv00139 (2020).
- BOGOEVA, V., et al. "Ruthenium porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells." **Photodiagnosis Photodyn Ther** 14: 9-17 (2016).
- BRASIL "Ministério da Saúde. PORTARIA Nº 357, DE 8 DE ABRIL DE 2013. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Melanoma Maligno Cutâneo. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357\\_08\\_04\\_2013.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html)." (2013).
- CALZAVARA-PINTON, P. G., et al. "Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results." **J Eur Acad Dermatol Venereol** 21(4): 439-451 (2007).
- CAMERON, M. C., et al. "Basal cell carcinoma: Epidemiology; pathophysiology; clinical and histological subtypes; and disease associations." **J Am Acad Dermatol** 80(2): 303-317 (2019).
- CARR, S., et al. "Epidemiology and Risk Factors of Melanoma." **Surg Clin North Am** 100(1): 1-12 (2020).
- CETINBAS, N., et al. "Serum-protein interactions with anticancer Ru(III) complexes KP1019 and KP418 characterized by EPR." **J Biol Inorg Chem** 15(2): 131-145 (2010).

CHANG, C. J., et al. "In vitro and in vivo photosensitizing applications of Photofrin in malignant melanoma cells." **Chang Gung Med J** 31(3): 260-267 (2008).

CHEN, Q., et al. "TLD1433 Photosensitizer Inhibits Conjunctival Melanoma Cells in Zebrafish Ectopic and Orthotopic Tumour Models." **Cancers (Basel)** 12(3) (2020).

D'MELLO, S. A. N., et al. "Signaling Pathways in Melanogenesis." **International journal of molecular sciences** 17(7): 1144 (2016).

DAVIS, L. E., et al. "Current state of melanoma diagnosis and treatment." **Cancer biology & therapy** 20(11): 1366-1379 (2019).

DE ANNUNZIO, S. R., et al. "Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review." **International journal of molecular sciences** 20(16) (2019).

DESHPANDE, M. S., et al. "Hydrolytic Cleavage of DNA by a Ruthenium(II) Polypyridyl Complex." **Inorganic Chemistry** 46(14): 5450-5452 (2007).

DI MASCIO, P., et al. "Singlet Molecular Oxygen Reactions with Nucleic Acids, Lipids, and Proteins." **Chem Rev** 119(3): 2043-2086 (2019).

DOMINGUES, B., et al. "Melanoma treatment in review." **ImmunoTargets and therapy** 7: 35-49 (2018).

DWYER, F. P., et al. "Biological activity of complex ions." **Nature** 170(4318): 190-191 (1952).

FAHRADYAN, A., et al. "Updates on the Management of Non-Melanoma Skin Cancer (NMSC)." **Healthcare (Basel)** 5(4) (2017).

FARBERG, A. S., et al. "The Impact of Quantitative Data Provided by a Multi-spectral Digital Skin Lesion Analysis Device on Dermatologists' Decisions to Biopsy Pigmented Lesions." **J Clin Aesthet Dermatol** 10(9): 24-26 (2017).

FERLAY, J., et al. "Global Cancer Observatory: Cancer Today." **Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.** (2018).

FREI, A., et al. "Synthesis, characterization, and biological evaluation of new Ru(II) polypyridyl photosensitizers for photodynamic therapy." **J Med Chem** 57(17): 7280-7292 (2014).

GALCZYNSKA, K., et al. "Antitumor Activity of Pt(II), Ru(III) and Cu(II) Complexes." **Molecules** 25(15) (2020).

GAVA, B., et al. "Inhibition of B16 melanoma metastases with the ruthenium complex imidazolium trans-imidazoledimethylsulfoxide-tetrachlororuthenate and down-regulation of tumor cell invasion." **J Pharmacol Exp Ther** 317(1): 284-291 (2006).

GIANFERRARA, T., et al. "Synthetic strategies towards ruthenium-porphyrin conjugates for anticancer activity." **Dalton Trans**(48): 10742-10756 (2009).

GIOVANNETTI, R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins (2012).

HARTMAN, R. I. e LIN, J. Y. "Cutaneous Melanoma-A Review in Detection, Staging, and Management." **Hematol Oncol Clin North Am** 33(1): 25-38 (2019).

HENRY, J., et al. "Update on the epidermal differentiation complex." **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library** 17: 1517-1532 (2012).

HORNE, T. K. e CRONJE, M. J. "Mechanistics and photo-energetics of macrocycles and photodynamic therapy: An overview of aspects to consider for research." **Chem Biol Drug Des** 89(2): 221-242 (2017).

HOU, Y. J., et al. "Pathological Mechanism of Photodynamic Therapy and Photothermal Therapy Based on Nanoparticles." **Int J Nanomedicine** 15: 6827-6838 (2020).

HUDEJ, R., et al. "Modulation of activity of known cytotoxic ruthenium(III) compound (KP418) with hampered transmembrane transport in electrochemotherapy in vitro and in vivo." **J Membr Biol** 247(12): 1239-1251 (2014).

IMRAN, M., et al. "Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging." 8(4): 95 (2018).

ISSA, M. C. e MANELA-AZULAY, M. "Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation." **An Bras Dermatol** 85(4): 501-511 (2010).

JUZENIENE, A. "Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis." **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** 6(2): 94-96 (2009).

KAR, B., et al. "Ruthenium and iridium based mononuclear and multinuclear complexes: A Breakthrough of Next-Generation anticancer metallopharmaceuticals." **Inorganica Chimica Acta** 512: 119858 (2020).

KEPPLER, B. K. e RUPP, W. "Antitumor activity of imidazolium-bisimidazole-tetrachlororuthenate (III)." **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** 111(2): 166-168 (1986).

KESSEL, D. "Photodynamic Therapy: A Brief History." **J Clin Med** 8(10) (2019).

KOLARSICK, P. A. J., et al. "Chapter 1 - Anatomy and Physiology of the Skin." **Journal of the Dermatology Nurses' Association** 3(4) (2011).

KON, H., et al. "Structural, redox, and photophysical studies of the tetra(pyridyl)porphyrin complex containing four (2,2'-bipyridine)(2,2':6',2''-terpyridine)ruthenium(II) groups." **Inorg Chem** 45(17): 6875-6883 (2006).

KWIATKOWSKI, S., et al. "Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations." **Biomed Pharmacother** 106: 1098-1107 (2018).

LANOUE, J. e GOLDENBERG, G. "Basal Cell Carcinoma: A Comprehensive Review of Existing and Emerging Nonsurgical Therapies." **The Journal of clinical and aesthetic dermatology** 9(5): 26-36 (2016).

LI, W., et al. "In vitro evaluation of ruthenium complexes for photodynamic therapy." **Photodiagnosis Photodyn Ther** 18: 83-94 (2017).

LI, X. Y., et al. "Susceptibility and Resistance Mechanisms During Photodynamic Therapy of Melanoma." **Front Oncol** 10: 597 (2020).

LINCOLN, R., et al. "Exploitation of long-lived 3IL excited states for metal-organic photodynamic therapy: verification in a metastatic melanoma model." **J Am Chem Soc** 135(45): 17161-17175 (2013).

LOSQUADRO, W. D. "Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer." **Facial Plast Surg Clin North Am** 25(3): 283-289 (2017).

LUI, J. W., et al. "The Efficiency of Verteporfin as a Therapeutic Option in Pre-Clinical Models of Melanoma." **J Cancer** 10(1): 1-10 (2019).

LUPU, M., et al. "A glycoporphyrin story: from chemistry to PDT treatment of cancer mouse models." **Photochemical & Photobiological Sciences** 17(11): 1599-1611 (2018).

MATTHEWS, N., et al. "Epidemiology of melanoma. In: Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy." (2017).

MILLER, R., et al. "Epidemiology and survival outcomes in stages II and III cutaneous melanoma: a systematic review." **Melanoma Manag** 7(1): MMT39 (2020).

MIRAFLOR, A. P., et al. "Somatic mutation analysis in melanoma using targeted next generation sequencing." **Exp Mol Pathol** 103(2): 172-177 (2017).

MITAL, M. e ZIORA, Z. "Biological applications of Ru(II) polypyridyl complexes." **Coordination Chemistry Reviews** 375: 434-458 (2018).

NAIDOO, C., et al. "Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment: A Review." **Technol Cancer Res Treat** 17: 1533033818791795 (2018).

NAIDOO, C., et al. "Simultaneous Photodiagnosis and Photodynamic Treatment of Metastatic Melanoma." **Molecules** 24(17) (2019).

NGUYEN, K., et al. "Current and emerging treatment options for metastatic melanoma: a focused review." **Dermatol Online J** 26(7) (2020).

ORTHABER, K., et al. "Skin Cancer and Its Treatment: Novel Treatment Approaches with Emphasis on Nanotechnology." **Journal of Nanomaterials** 2017: 2606271 (2017).

OSIECKA, B., et al. "The application of Levulan-based photodynamic therapy with imiquimod in the treatment of recurrent basal cell carcinoma." **Med Sci Monit** 18(2): Pi5-9 (2012).

PASZKO, E., et al. "Nanodrug applications in photodynamic therapy." **Photodiagnosis Photodyn Ther** 8(1): 14-29 (2011).

PERNOT, M., et al. "Systems biology approach for in vivo photodynamic therapy optimization of ruthenium-porphyrin compounds." **J Photochem Photobiol B** 117: 80-89 (2012).

PIZARRO, A. M. e SADLER, P. J. "Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes." **Biochimie** 91(10): 1198-1211 (2009).

POTRONY, M., et al. "Update in genetic susceptibility in melanoma." **Ann Transl Med** 3(15): 210 (2015).

QUE, S. K. T., et al. "Cutaneous squamous cell carcinoma: Incidence, risk factors, diagnosis, and staging." **J Am Acad Dermatol** 78(2): 237-247 (2018).

RAMU, V., et al. "Photo-induced cytotoxicity and anti-metastatic activity of ruthenium(ii)-polypyridyl complexes functionalized with tyrosine or tryptophan." **Dalton Trans** 46(20): 6634-6644 (2017).

RAZA, A., et al. "A Dinuclear Ruthenium(II) Complex Excited by Near-Infrared Light through Two-Photon Absorption Induces Phototoxicity Deep within Hypoxic Regions of Melanoma Cancer Spheroids." **J Am Chem Soc** 142(10): 4639-4647 (2020).

REBECCA, V. W., et al. "A brief history of melanoma: from mummies to mutations." **Melanoma Res** 22(2): 114-122 (2012).

SAMPAIO, R. N., et al. "Investigation of ground- and excited-state photophysical properties of 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21H,23H-porphyrin with ruthenium outlying complexes." **J Phys Chem A** 116(1): 18-26 (2012).

SARASWATI, A. P., et al. "Raising the bar in anticancer therapy: recent advances in, and perspectives on, telomerase inhibitors." **Drug Discov Today** 24(7): 1370-1388 (2019).

SCHMITT, F., et al. "Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer." **J Med Chem** 51(6): 1811-1816 (2008).

SCOLYER, R. A., et al. "Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care." **Mol Oncol** 5(2): 124-136 (2011).

SEER "Surveillance, Epidemiology, and End Results. Training Modules. Types of Melanoma." **U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute. Acessado em: 21/09/2020.** Disponível em: <https://training.seer.cancer.gov/melanoma/intro/types.html> (2020).

- SHULSTAD, R. M. e PROPER, S. "Squamous Cell Carcinoma: A Review of Etiology, Pathogenesis, Treatment, and Variants." **Journal of the Dermatology Nurses' Association** 2: 12-16 (2010).
- SOKOLOV, V., et al. Photodynamic therapy of cancer with the photosensitizer PHOTOGEN, **SPIE** (1995).
- SPARSA, A., et al. "Photodynamic treatment induces cell death by apoptosis or autophagy depending on the melanin content in two B16 melanoma cell lines." **Oncol Rep** 29(3): 1196-1200 (2013).
- SWANN, G. "The skin is the body's largest organ." **J Vis Commun Med** 33(4): 148-149 (2010).
- SWAVEY, S. e TRAN, M. "Porphyrin and phthalocyanine photosensitizers as PDT agents: A new modality for the treatment of melanoma." **Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**: 253-282 (2013).
- SWEIGERT, P., et al. "Nickel, copper, and zinc centered ruthenium-substituted porphyrins: effect of transition metals on photoinduced DNA cleavage and photoinduced melanoma cell toxicity." **Dalton Trans** 41(17): 5201-5208 (2012).
- TAYLOR, R. "Catalogue of the Hunterian Collection in the Museum of the Royal College of Surgeons in London Part 1: The pathological preparations in spirit." **Museums of The Royal College of Surgeons of England**: viii, 97p (1830).
- THOTA, S., et al. "Ru(II) Compounds: Next-Generation Anticancer Metallotherapeutics?" **J Med Chem** (2018).
- TOUSSI, A., et al. "Germline mutations predisposing to melanoma." **J Cutan Pathol** 47(7): 606-616 (2020).
- WANG, B.-C., et al. "Photodynamic therapy with methyl-5-aminolevulinate for basal cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis." **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy** 29: 101667 (2020).
- WERNITZNIG, D., et al. "First-in-class ruthenium anticancer drug (KP1339/IT-139) induces an immunogenic cell death signature in colorectal spheroids in vitro." **Metallomics** 11(6): 1044-1048 (2019).
- WONG, R., et al. "The dynamic anatomy and patterning of skin." **Exp Dermatol** 25(2): 92-98 (2016).
- XU, Z. e SWAVEY, S. "Light induced photoreactions with plasmid DNA by Cu/Ru and Cu/Ru/Pt multi-metallic porphyrins." **Dalton Trans** 40(28): 7319-7326 (2011).
- YOUSEF, H., et al. "Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. [Updated 2020 Mar 29]." **In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; (2020).**

YU, W., et al. "Porphyrin-Based Metal-Organic Framework Compounds as Promising Nanomedicines in Photodynamic Therapy." **ChemMedChem** (2020).

ZHANG, J., et al. "An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy." **Acta Pharm Sin B** 8(2): 137-146 (2018).

ZHAO, P., et al. "DNA binding and photocleavage properties of cationic porphyrin-polypyridyl ruthenium(II) hybrids." **Journal of Coordination Chemistry** 66(23): 4220-4236 (2013).

ZHOU, Q.-X., et al. "DNA photocleavage in anaerobic conditions by a Ru(II) polypyridyl complex with long wavelength MLCT absorption." **New Journal of Chemistry** 34(1): 137-140 (2010).

ZHOU, Y., et al. "Porphyrin-loaded nanoparticles for cancer theranostics." **Nanoscale** 8(25): 12394-12405 (2016).

## APÊNDICE – ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE H<sub>2</sub>RuTPyP

Visando a caracterização do composto, os autores inicialmente realizaram análises de espectrometria UV-Vis para determinação das propriedades fotofísicas de H<sub>2</sub>RuTPyP, onde uma série de concentrações de ssDNA (*salmon sperm*) foram incubadas com uma solução do composto H<sub>2</sub>RuTPyP em uma concentração constante (1.5 µM). Na ausência de ssDNA, o composto demonstrou uma elevada absorbância na Banda de Soret ao redor de 419 nm. A hipocromicidade observada para o composto no espectro UV-Vis após a adição das soluções de ssDNA girou em torno de 22% (dados não mostrados). Este resultado indicou que o possível modo de interação de H<sub>2</sub>RuTPyP com a molécula de DNA se deu por meio de ligações de hidrogênio e/ou empilhamento não-clássico, provavelmente pela inserção parcial dos complexos periféricos de Ru(II) entre os pares de bases adjacentes na molécula de DNA.

O trabalho de Kon et al., 2006 (KON et al.) demonstra a síntese de complexos de tetra-(piridil)porfirina contendo quatro unidades de Ru(II)(bpy)(trpy), preparados pela coordenação dos nitrogênios piridil ao centro de Ru. O espectro de absorção dos complexos apresentou banda forte a 418 nm (correspondente à banda Soret) e bandas um pouco mais fracas a 515 e 549 nm (correspondentes à banda Q). A banda de Soret é atribuída à transição ao segundo estado singlete excitado, estando relacionada à forte transição eletrônica entre os orbitais  $\pi$  e  $\pi^*$  do anel porfirínico, enquanto as bandas Q relacionam-se à transição ao primeiro estado singlete excitado. Outra investigação demonstrou, ao investigar a influência da adição de grupamentos Ru nas propriedades fotofísicas de porfirinas tetrapiridil de base livre, que este processo favorece as propriedades de absorção de luz, e que tanto os processos de absorbância e emissão da porfirina são afetados pela adição de grupamentos Ru na periferia do anel porfirínico, causando também um aumento do processo de “cruzamento intersistêmico” (SAMPAIO et al., 2012).

Os resultados experimentais acima sugerem que há interações entre o composto e a molécula de DNA. Para comparar quantitativamente, a constante de afinidade de ligação (K<sub>b</sub>) com o ssDNA devem ser medidas. A titulação UV-Vis não é adequada para determinar o K<sub>b</sub> de compostos com vários locais de ligação. Dessa forma, análise de competição foi realizada, onde o espectro de emissão foi monitorado seguindo a adição de concentrações crescentes do composto à uma concentração fixa de ssDNA pré-tratada com Brometo de Etídeo (BE). Este método mede a diminuição da fluorescência do BE vinculado ao DNA na presença do composto de interesse. Pode ser utilizado para todos os compostos que possuam uma boa afinidade com



o DNA, quaisquer que sejam seus modos de ligação, pois mede apenas a capacidade de um composto em evitar a intercalação do BE no DNA (ZHAO et al., 2013). O ensaio demonstrou inicialmente uma forte emissão do complexo BE-DNA a 642nm quando excitado a 510nm, na ausência do composto. Quando o mesmo foi adicionado ao complexo BE-DNA, a intensidade de emissão de fluorescência do BE diminuiu, demonstrando que com a extinção desta ocorreu o possível deslocamento do BE pelo composto, sugerindo a interação de H<sub>2</sub>RuTPyP com a molécula de ssDNA, onde a constante K<sub>b</sub> obtida para o composto H<sub>2</sub>RuTPyP ( $1.21 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ) sugeriu uma boa afinidade com o DNA (dados não mostrados). No trabalho de SWAVEY et al. 2015, ao avaliar uma porfirina bis-rutenada frente a titulações crescentes de ct-DNA, os autores verificaram a geração de uma elevada K<sub>b</sub> ( $1.1 \pm 0.7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ ), indicando também uma forte interação entre o complexo de Ru e o DNA, corroborando os resultados de interação demonstrados para o composto H<sub>2</sub>RuTPyP.