

Avaliação do papel da ferroptose induzida pela terapia fotodinâmica com azul de metileno em tumores mamários à alta fluência.

Gabriel Santos Arini

Ancély Ferreira dos Santos

Letícia Labriola

Instituto de Química, Universidade de São Paulo

e-mail

Objetivos

O câncer de mama é um problema de saúde pública mundial e, mesmo com ampla gama de tratamentos, está frequentemente associado com alta morbidade. Deste modo, o desenvolvimento de procedimentos terapêuticos que apresentem resultados clínicos iguais, ou superiores, e que apresentem menos efeitos colaterais, é um campo de pesquisas de fundamental interesse. Uma destas alternativas eficazes é a terapia fotodinâmica (PDT), que se baseia na fotooxidação do material biológico e envolve a administração de fotossensibilizador (Ps) e sua ativação pela luz em comprimento de onda de específico ao Ps utilizado, bem como a presença de oxigênio. Em nível molecular, a PDT é capaz de induzir múltiplos mecanismos de morte celular, dependendo do tipo de Ps e do protocolo de irradiação utilizado. Dentre os diversos compostos que têm sido sintetizados e testados como possíveis agentes na PDT, o azul de metileno (MB) apresenta-se como um altamente eficiente e de baixo custo. Resultados recentes do grupo apontam na direção da eficiência da terapia fotodinâmica mediada por azul de metileno (MB-PDT) no tratamento do câncer de mama. No entanto, algumas inconsistências relacionadas à eficácia da PDT evidenciam a necessidade de estudos mais aprofundados sobre os parâmetros nela envolvidos para que seja

configurada como uma opção clínica adjuvante de tratamento. Os estudos moleculares em desenvolvimento pelo nosso grupo em modelos de tecido mamário humano vêm contribuindo para o entendimento da relação dose-efeito e para a viabilização de um protocolo eficiente na aplicação desta terapia no futuro. Nossos dados recentes apontam para a dependência da fluência de energia para o efeito citotóxico da MB-PDT. Além disso, observamos que este efeito é dependente do tipo celular. Resultados preliminares mostram que a diminuição do tempo de irradiação de 16 para 6 minutos, mas mantendo-se a mesma energia final, impacta significativamente no resultado do tratamento. Diante destes achados, entender qual o papel de uma via de morte celular regulada deflagrada por desbalanço redox, a ferroptose, mostra-se importante na medida em que pode determinar o sucesso do procedimento, contribuindo para uma melhor viabilização da terapia. Neste sentido, o presente projeto visa testar a hipótese de que a linhagem celular que responde pior ao desbalanço redox é mais suscetível à ferroptose em tratamentos de alta fluência.

Métodos e Procedimentos

No intuito de responder à questão levantada nos objetivos, linhagens de células já referenciadas como padrão nos estudos de câncer de mama: a tumoral metastática MDA-MB-231 (ATCC HTB-26™) e a tumoral não

metastática MFC-7 (ATCC HTB-22™), após 48h de plaqueamento, foram submetidas à incubação com o MB, na presença ou ausência do inibidor da via de ferroptose a 1 μ M (ferrostatina-1), na concentração final desejada de 20 μ M. Após incubação a 37°C durante 2 horas, as células foram irradiadas com um laser vermelho ($\lambda=630\text{nm}$) até atingirem um total 4.5J.cm⁻² de energia no tempo de 6 minutos, para o protocolo de alta fluência, e 16 minutos, para o protocolo de baixa fluência. Após a irradiação, nos tempos de 1h, 3h e 24h, a porcentagem de células mortas foi determinada através da contagem dos núcleos corados com o fluoróforo Hoescht 33342 e o número de células mortas, determinadas pelo número de núcleos coradas com iodeto de propídeo, onde tal determinação foi feita diretamente no microscópio de fluorescência invertido com aumento de 200x.

Resultados

Foi possível observar que em condições de alta fluência energética, o mecanismo de morte celular regulada dependente de ferro, a ferroptose, não é o fator preponderante à deflagração de morte tanto em células que melhor respondem ao desbalanço redox, no caso a linhagem MCF-7, quanto àqueleas mais susceptíveis ao desbalanço redox, a linhagem MDA-MB-231.

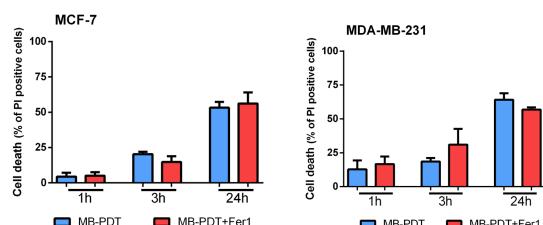


Figura 1: MB-PDT à alta fluência não é capaz de induzir morte celular por ferroptose.

Conclusões

No presente trabalho demonstramos que altas taxas de fluência não são capazes de induzir ferroptose, mas sim um processo de morte celular inespecífica. Deste modo, levantamos a hipótese de que em condições de alta fluência

energética, o dano deixa de ser mediado pelo oxigênio e passa a ocorrer diretamente pelo Ps.

Referências Bibliográficas

- Dos Santos AF et al. Fluence Rate Determines PDT Efficiency in Breast Cancer Cells Displaying Different GSH Levels. *Photochem Photobiol*. 2020 May;96(3):658-667.
- Dos Santos AF et al. Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells. *Cell Death Dis*. 2020 Dec 14;11(12):1070.
- Friedmann Angeli JP et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*. 2014 Dec;16(12):1180-91.
- Jiang X, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Apr;22(4):266-282.