

Caracterização da expressão de PDE5 em modelos tumorais murinos para aplicações terapêuticas experimentais

Palavras-Chave: PDE5i, PDE5, ONCOLOGIA

Autores:

MARCELLA ARRUDA FRANÇA, FCF – UNICAMP; GABRIEL CORDEIRO, IB - UNICAMP

Profa. Dra. CATARINA RAPÔSO DIAS CARNEIRO (orientadora), FCF - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

A fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5) é uma proteína específica para a hidrólise do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc), um segundo mensageiro que atua na regulação de diversos processos celulares como proliferação, diferenciação e morte celular (Li et al., 2023; Ahmed et al., 2021; Ganapathy et al., 2021).

Os inibidores da PDE5 (PDE5i) ligam-se ao domínio catalítico da proteína, impedindo a degradação do GMPc, o qual se acumula dentro da célula ocasionando diversos benefícios terapêuticos (Bonvared et al., 2022). O sildenafil, um PDE5i muito conhecido, é aprovado para o tratamento de disfunção erétil e hipertensão arterial pulmonar (Elhady et al., 2023). Entretanto, diversas evidências sugerem o potencial uso dessa classe para intervenções oncológicas, podendo influenciar importantes mecanismos tumorais como a proliferação celular e a angiogênese (Barone et al., 2019).

Diversos estudos também demonstraram a superexpressão da PDE5 em tecidos tumorais em comparação com os tecidos saudáveis adjacentes (Ibrahim, Tarek S. et al., 2020; Catalano et al., 2019). Entretanto, ainda existe uma notável falta de estudos sistemáticos que investiguem a expressão da PDE5 e sua função em uma ampla variedade de modelos tumorais, o que limita o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais abrangentes e específicas que aproveitem PDE5i no tratamento oncológico.

Dessa maneira, caracterizar a expressão e os efeitos da PDE5 em linhagens tumorais murinas pode ajudar a identificar aquelas mais responsivas ao tratamento bem como auxiliar o desenvolvimento de projetos mais direcionados e contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra tumores.

Portanto, o objetivo desse estudo foi identificar a expressão da PDE5 na linhagem tumoral de adenocarcinoma murino EO771, com o intuito de identificar tipos tumorais mais responsivos ao tratamento com PDE5i.

METODOLOGIA:

Trata-se de um estudo pré-clínico *in vitro*, onde foi utilizada uma linhagem tumoral murina: EO771, um adenocarcinoma mamário de C57BL6/J. Essas células foram cultivadas em meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico-antimicótico, incubadas a 37 °C e 5% de CO₂. Após atingirem 70% de confluência, as células foram dissociadas, contadas e 2x10⁵ células foram repicadas em placas de 96 poços. Após 24 h de estimulação, as células foram coletadas e processadas para citometria de fluxo com marcação com anticorpo anti-PDE5 (FITC), após fixação e permeabilização, as células foram analisadas no citômetro BD FacSymphony A5. Já a dosagem da secreção de cGMP foi realizada por ELISA competitivo (Genscript). Para isso 2x10⁵ células foram repicadas em placas de 96 poços, estimuladas 24 h após a distribuição em 3 grupos experimentais: Controle – que não receberam nenhum estímulo, somente o meio de cultura; S10 – receberam meio de cultura suplementado com uma concentração final de 10 µM/mL de PDE5i (Citrato de sildenafila >96% de pureza por HPLC); S100 – receberam meio de cultura suplementado com uma concentração final de 100 µM/mL. Após o período de tratamento, a placa foi centrifugada (1500 RPM por 5 min à 4 °C) e o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosar a concentração de cGMP seguindo as orientações da fabricante do kit. Todos os experimentos foram realizados com três réplicas biológicas e duas técnicas por grupo ($n = 6$). Os dados foram analisados no GraphPad Prism v9 e as análises estatísticas utilizaram ANOVA (one-way) e teste t de Student, considerando $p < 0,05$ como significativo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

O foco deste trabalho foi a detecção da expressão da fosfodiesterase tipo 5 (PDE5) na linhagem tumoral EO771. A identificação dessa expressão é fundamental, pois o inibidor de PDE5 (PDE5i) utilizado apresenta baixa afinidade por outras isoformas da fosfodiesterase, como PDE6 e PDE11, minimizando a possibilidade de reatividade cruzada (KAYIK et al., 2017). A expressão de PDE5 foi confirmada por imunomarcação, utilizando um anticorpo primário anti-PDE5 e um anticorpo secundário anti-IgG. A estratégia de gattling incluiu os controles de compensação e células viáveis seguido da seleção de célula PDE5⁺ (Figura 1A). Para garantir a especificidade da ligação do anticorpo, foi utilizado o citrato de sildenafila, um PDE5i, o que resultou em redução da sinalização em células tratadas. A linhagem EO771 demonstrou expressão consistente e elevada de PDE5 resultando numa expressão de 100% (Figura 1B).

Além disso, foi investigada a dinâmica do eixo PDE5-cGMP por meio da dosagem do GMP cíclico (cGMP) secretado pelas células EO771. Devido à dificuldade de extrair cGMP intracelular sem comprometer sua integridade em células murinas, utilizou-se o PDE5i para promover o acúmulo intracelular de cGMP, resultando na secreção por transporte ativo através de proteínas canais de efluxo como ABCC5 (PAN et al., 2024). Essa abordagem permitiu a quantificação do cGMP secretado e a

avaliação da atividade do eixo PDE5-cGMP nas células EO771. É importante notar que o aumento da secreção de cGMP observado foi dependente da concentração de PDE5i, tendo os maiores percentuais de secreção o grupo S100 (Figura 1C). Esses resultados sustentam os dados citométricos de PDE5 e confirmam a presença dessa proteína na população estudada.

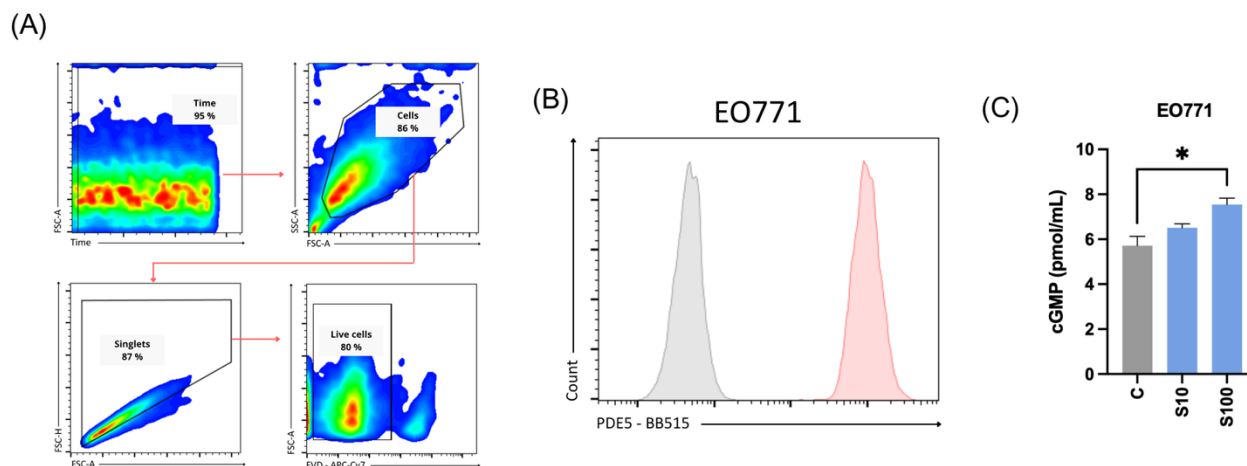


Figura 1. Análise da expressão de PDE5 e secreção de cGMP em populações de células EO771. (A) Estratégia de gating utilizada para identificar a população de EO771 PDE5+, incluindo a exclusão de eventos indesejados e seleção de células viáveis. Os grupos experimentais são representados por C (controle sem tratamento), S10 (citrato de sildenafil 10 μM/mL) e S100 (citrato de sildenafil 100 μM/mL). (B-C) Histograma e gráficos de barras apresentando a expressão de PDE5 e a secreção de cGMP, respectivamente. Análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste ANOVA de comparação múltipla com o grupo C; $p \leq 0,01$ (*). As análises foram realizadas com $n = 6$ por grupo.

CONCLUSÕES:

Até o momento, foi demonstrado que a linhagem tumoral murina EO771 apresenta expressão elevada de PDE5, com 100% das células marcadas positivamente por citometria de fluxo. A funcionalidade dessa via foi confirmada por meio da quantificação de cGMP, que revelou um aumento significativo na sua concentração intracelular após o tratamento com inibidores de PDE5, indicando que a enzima está ativa e desempenha papel regulatório na homeostase de GMPc nessas células. Esses achados sugerem que a linhagem EO771 é um modelo tumoral responsivo à inibição da PDE5 e reforçam o potencial do uso de inibidores dessa enzima, como o citrato de sildenafil, como ferramenta terapêutica em contextos oncológicos. Futuras análises funcionais com foco em proliferação, morte celular e migração serão essenciais para aprofundar o entendimento do papel da via PDE5/cGMP na progressão tumoral e avaliar a aplicabilidade clínica dessa estratégia.

BIBLIOGRAFIA

- AHMED, Wesam S.; GEETHAKUMARI, Anupriya M.; BISWAS, Kabir H. Phosphodiesterase 5 (PDE5): Structure-function regulation and therapeutic applications of inhibitors. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 111128, 2021.
- BARONE, Ines; GIORDANO, Cinzia; BONOFIGLIO, Daniela; ANDÒ, Sebastiano; CATALANO, Stefania. Phosphodiesterase type 5 and cancers: progress and challenges. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1393, 2019.
- BONDAREV, Andrey D. et al. Recent developments of phosphodiesterase inhibitors: Clinical trials, emerging indications and novel molecules. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 1057083, 2022.
- CATALANO, Stefania et al. Phosphodiesterase 5 (PDE5) is highly expressed in cancer-associated fibroblasts and enhances breast tumor progression. **Cancers**, v. 11, n. 11, p. 1740, 2019.
- ELHADY, Ahmed K. et al. Advancements in phosphodiesterase 5 inhibitors: unveiling present and future perspectives. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 9, p. 1266, 2023.
- GANAPATHY, A. Anand; PRIYA, VM Hari; KUMARAN, Alaganandam. Medicinal plants as a potential source of Phosphodiesterase-5 inhibitors: A review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 267, p. 113536, 2021.
- IBRAHIM, Tarek S. et al. Design and synthesis of novel pyrazolo [3, 4-d] pyrimidin-4-one bearing quinoline scaffold as potent dual PDE5 inhibitors and apoptotic inducers for cancer therapy. **Bioorganic Chemistry**, v. 105, p. 104352, 2020.
- KAYIK, Gülru; TÜZÜN, Nurcan Ş.; DURDAGI, Serdar. Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 311-330, 2017
- LI, Shujuan et al. CGMP signaling in photoreceptor degeneration. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 11200, 2023.
- PAN, Y., WU, M., & CAI, H. Role of ABCC5 in cancer drug resistance and its potential as a therapeutic target. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p.1446418, 2024.