

Citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada na ausência de irradiação em cultura de células HEp-2

Aline Helena Araujo Machado¹, Cristina Pacheco Soares², Mariana Isabel B.P. Martins², Maíra Maftoum Costa², Milton Beltrame Júnior³, Newton Soares da Silva¹

¹Laboratório de Biologia Celular & Tecidual, IP&D – UNIVAP. E-mail: alineh@univap.br

²Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares. IP&D – UNIVAP. E-mail: cpsoares@univap.br

³Laboratório de Síntese Orgânica, IP&D – UNIVAP. E-mail: beltrame@univap.br

Resumo- Terapia Fotodinâmica é uma técnica terapêutica minimamente invasiva para o tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas. O princípio básico deste tratamento é uma reação fotoquímica não térmica, a qual requer a presença simultânea de uma droga fotossensibilizante, oxigênio e luz visível. O objetivo do seguinte trabalho foi avaliar a citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada em cultura de células HEp-2 na ausência de irradiação. As células HEp-2 foram cultivadas como de rotina, incubadas com a ZnPcBr₈ nas concentrações 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 e 10µM por 1 hora. A análise dos resultados foi obtida através da técnica MTT (Citotoxicidade). De acordo com os resultados, pode-se observar que as concentrações 0,25 à 1µM obtiveram uma alta porcentagem de atividade mitocondrial, ficando em torno de 98,5 à 85,6%, respectivamente. Portanto, pode-se concluir que a concentração da ZnPcBr₈ cuja viabilidade das células HEp-2 apresenta-se em uma porcentagem tolerável de aceitação, sendo considerada não-tóxica na ausência de irradiação está localizada em torno de 0,25 à 1µM.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, câncer, fotossensibilizante.

Área do Conhecimento: Engenharia IV

Introdução

Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma técnica terapêutica minimamente invasiva (AL-MUTAIRI et al., 2006), a qual demonstra um grande potencial para tratar doenças neoplásicas e não neoplásicas (DA-SILVA et al., 2007). Dentre tais doenças podemos citar, a degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenosis, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose, SIDA, entre outras (ALEXANDRATOU; YOVA; LOUKAS, 2005; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Essas doenças geralmente são caracterizadas pelo grande crescimento de células não desejadas ou células anormais (OLEINICK; MORRIS; BELICHENKO, 2002).

O princípio básico da TFD é uma reação fotoquímica não térmica, a qual requer a presença simultânea de uma droga fotossensibilizante, oxigênio e luz visível (OHMORI et al., 2005; MARTINEZ et al., 2007). O fotossensibilizante excitado por um fóton inicia uma cascata de reações químicas formando tanto o produto oxidativo (reação tipo I) quanto oxigênio singlete (reação tipo II), levando a uma citotoxicidade direta ou dano vascular, e subseqüentemente, a uma regressão tumoral (WANG et al., 2005; MARTINEZ et al., 2007). O processo fotodinâmico dos

sensibilizantes em tecidos neoplásicos ainda não está bem definido, embora seja geralmente aceito que o oxigênio singlete (¹O₂), produzido após a exposição do sensibilizante à luz, seja a principal espécie responsável pela inativação celular (ALVAREZ et al., 2000).

O fotossensibilizante ideal para a Terapia Fotodinâmica deve possuir os seguintes requisitos: ser quimicamente puro e de composição conhecida, ser biologicamente estável, ter toxicidade mínima no escuro sendo somente citotóxico na presença de luz, ser preferencialmente retido pelo tecido alvo, ser rapidamente excretado pelo corpo para prover baixa toxicidade sistêmica, ter uma alta eficiência quântica para o evento fotoquímico, ter forte absorção com um alto coeficiente de excitação na faixa de 600-800nm, onde a penetração da luz no tecido está no máximo e onde o comprimento de onda da luz permanece energético o suficiente para produzir oxigênio singlete (ACKROYD et al., 2001; DETTY; GIBSON; WAGNER, 2004; KARMAKOVA et al., 2006). Entre os mais promissores fotossensibilizantes de segunda geração estão as ftalocianinas, as quais vêm atraindo muita atenção há décadas devido ao fato de possuírem excelentes propriedades fotoquímicas, demonstrando excelente localização tumoral e alta eficiência fotodinâmica

(CEBURKOV; GOLLNICK, 2000; LIU et al., 2004; MACHADO et al., 2006).

O objetivo do seguinte trabalho foi avaliar a citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada em cultura de células HEP-2 na ausência de irradiação.

Materiais e Métodos

Fotossensibilizante: Zinco Ftalocianina Octa-bromada ($ZnPcBr_8$) desenvolvida pelo Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica - IP&D / UNIVAP foi preparada a uma concentração estoque de 1mM em Dimetil Sulfóxido estéril, esterilizada por filtração através de membrana Millipore (0.22 μ m) e estocada no escuro a 4°C.

Cultura de células: A linhagem utilizada foi a HEP-2 (Carcinoma de Laringe Humana). As células HEP-2 foram cultivadas como de rotina em garrafas de 25cm² com Meio Mínimo Essencial suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino por 24 horas em estufa a 37°C com atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Incubação com o fotossensibilizante: As células HEP-2 foram plaqueadas (densidade de 5x10⁵ células/mL) em placas de 24 poços (TPP, Switzerland, Europa). Após 24 horas de cultura, as células foram incubadas com a $ZnPcBr_8$ (diluída em Tampão Fosfato Salino estéril) nas concentrações 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μ M por 1 hora em estufa a 37°C.

Citotoxicidade através da técnica MTT: Após período de incubação, foi adicionado às células o MTT (3- [(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide]), na concentração de 0,5mg/mL, incubando-se por 1 hora. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos através da adição de 200 μ L de DMSO, mantidos 30 minutos sob agitação. A leitura das placas foi realizada em um aparelho Spectracount Reader (Packard), utilizando filtro de 570nm.

Análise estatística: O gráfico com as médias e o desvio padrão foi obtido através do programa GraphPad Software Incorporated, version 2.0. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA.

Resultados

O teste de MTT foi utilizado para analisar a atividade mitocondrial de células HEP-2 incubadas com o agente fotossensibilizante $ZnPcBr_8$ nas concentrações 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 e 10 μ M por 1 hora.

Os resultados obtidos no gráfico 01 demonstram que nas concentrações 0.25 a 1 μ M, as células permaneceram com uma alta porcentagem da atividade mitocondrial, ficando em torno de 98.5% para 0.25 μ M, 91.5% para 0.5 μ M e 85.6% para 1 μ M, sendo essas concentrações consideradas não-tóxicas para as células.

Porém, quando aumentou a concentração, ocorreu uma queda acentuada na porcentagem da atividade mitocondrial, ficando em torno de 41.7% para 2.5 μ M, 8.9% para 5 μ M e 8.8% para 10 μ M, sendo essas concentrações consideradas tóxicas para as células.

O grupo controle foi considerado como 100%.

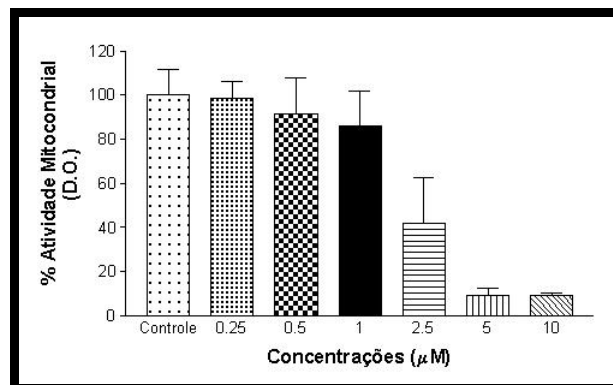


Gráfico 01 – Atividade mitocondrial de células HEP-2 após 1 hora de incubação com a $ZnPcBr_8$ em diferentes concentrações. Pelo teste ANOVA, as diferenças entre as concentrações foram estatisticamente significativas (n=3, p<0.05).

Discussão

As células HEP-2 foram incubadas com a $ZnPcBr_8$ por 1 hora em diferentes concentrações. Este período de incubação foi utilizado previamente em células CHO-K1 e L929, ambas as linhagens incubadas com $ZnPcBr_8$ (MACHADO et al., 2005; MACHADO et al., 2007).

O teste de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) é um dos métodos mais utilizados para medidas de proliferação celular e citotoxicidade (LIU et al., 1997; ABE; MATSUKI, 2000; MACHADO et al., 2007). A redução do MTT é geralmente atribuída a atividade mitocondrial, porém, esta também vem sendo relacionada a enzimas não mitocondriais, bem como endossomos e lisossomos (VELLONEN; HONKAKOSKI; URTTI, 2004).

De acordo com os resultados do teste de citotoxicidade através da técnica MTT, realizado em cultura de células HEP-2 incubadas com a $ZnPcBr_8$ sem irradiação, pode-se observar que uma concentração tolerável para um possível tratamento fotodinâmico varia de 0,25 a 1 μ M. Nestas concentrações a $ZnPcBr_8$ é considerada não-tóxica para as células HEP-2, possuindo uma porcentagem de atividade mitocondrial de 98.5 à 85.6%, respectivamente.

Conclusão

A concentração da ZnPcBr₈ cuja viabilidade das células HEP-2 apresenta-se em uma porcentagem tolerável de aceitação, sendo considerada não-tóxica para as células na ausência de irradiação, está localizada em torno de 0.25 à 1µM.

Agradecimentos

FAPESP, CAPES, UNIVAP-IP&D.

Referências

- ABE, K.; MATSUKI, N. Measurement of cellular 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neurosci. Res.** V.38, p.325-329, 2000.

- ACKROYD, R.; KELTY, C.; BROWN, N.; REED, M. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochem. Photobiol.** V.74, n.5, p.656-669, 2001.

- ALEXANDRATOU, E.; YOVA, D.; LOUKAS, S. A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. **Free Rad. Biol. Med.** V.39, p.1119-1127, 2005.

- AL-MUTAIRI, D.A.; CRAIK, J.D.; BATINIC-HABERLE, I.; BENOVA, L.T. Photosensitizing action of isomeric zinc N-methylpyridylporphyrins in human carcinoma cells. **Free Rad. Res.** V.40, n.5, p.477-483, 2006.

- ALVAREZ, M.G.; LA-PENNA, M.; YSLAS, E.I.; RIVAROLA, V.; DURANTINI, E.N. Photodamaging Effects of Porphyrin in a Human Carcinoma Cell Line. **Chem. Educ.** V.5, p.24-26, 2000.

- CEBURKOV, O; GOLLNICK, H. Photodynamic therapy in dermatology. **European J. Dermatol.** V.10, n.7, p.568-576, 2000.

- DA-SILVA, N.S.; RIBEIRO, C.M.; MACHADO, A.H.A.; PACHECO-SOARES, C. Ultrastructural changes in *Trichostrongylus axei* after treatments with AlPcS₄ and photodynamic therapy. **Vet. Parasitol.** V.146, p.175-181, 2007.

- DETTY, M.R.; GIBSON, S.L.; WAGNER, S.J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. **J. Med. Chem.** Vol. 47, n.16, p.3897- 3915, 2004.

- KARMAKOVA, T.; FEOFANOV, A.; PANKRATOV, A.; KAZACHKINA, N.; NAZAROVA,

A.; YAKUBOVSKAYA, R.; LEBEDEVA, V.; RUZIYEV, R.; MIRONOV, A.; MAURIZOT, J.C.; VIGNY, P. Tissue distribution and in vivo photosensitizing activity of 13,15-[N-(3-hydroxypropyl)]cycloimide chlorin p6 and 13,15-(N-methoxy)cycloimide chlorin p6 methyl ester. **J. Photochem. Photobiol B: Biol.** V.82, p.28-36, 2006.

- LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. **J. Neurochem.** V.69, p.581-593, 1997.

- LIU, M.O.; TAI, C.H.; SAIN, M.Z.; THE-HU, A.; CHOU, F. Photodynamic applications of Phthalocyanines. **J. Photochem. Photobiol. A: Chem.** V.165, p.131-136, 2004.

- MACHADO, A.H.A.; TAMIETTI, B.F.P.; PELISSON, M.M.M.; PACHECO-SOARES, C.; BELTRAME-JÚNIOR, M.; DA-SILVA, N.S. Localização e citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada em cultura de células CHO-K1. In: IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós Graduação, 1, 2005, São José dos Campos, SP. Anais... São José dos Campos: UNIVAP, 2005. p.120-123.

- MACHADO, A.H.A.; BRAGA, F.M.P.; LOBO, A.O.; MARTIN, A.A.; PELISSON, M.M.M.; BELTRAME-JR, M.; PACHECO-SOARES, C.; DA-SILVA, N.S. Utilização da Espectroscopia Raman para a análise da concentração da Zinco Ftalocianina Octa-bromada. **Rev. Univap.** v.13, p.2460-2462, 2006.

- MACHADO, A.H.A.; BRAGA, F.M.P.; PACHECO-SOARES, C.; PELISSON, M.M.M.; BELTRAME-JUNIOR, M.; DA-SILVA, N.S. Photodynamic Therapy with a New Photosensitizing Agent. **Photomed. Laser Surg.** V.25, n.3, p.220-228, 2007.

- MARTINES, N.S.; MACHADO, A.H.A.; DA-SILVA, N.S.; TEDESCO, A.C.; ZÂNGARO, R.A.; PACHECO-SOARES, C. Avaliação de células neoplásicas após terapia fotodinâmica. **Arq. Cat. Med.** V.36, n.1, p.59-64, 2007.

- OHMORI, S.; MASUDA, K.; YOSHIDA, M.; ARAI, T.; NAKAJIMA, S. The study of the characteristic of photocytotoxicity under high peak power pulsed irradiation with ATX-S10Na(II) in vitro. **Lasers Med. Sci.** V.20, p.54-61, 2005.

- OLEINICK, N.L.; MORRIS, R.L.; BELICHENKO, I. The role of apoptosis in response to

photodynamic therapy: what, where, why and how.

J. Photochem. Photobiol. Sci. V.1, p.1-21, 2002.

- SIMPLICIO, F.I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N.
Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos,
aplicações e avanços recentes no
desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova.**
V. 25, n.5, p.801-807, 2002.

- VELLONEN, K.S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A.
Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere
with the MTT assay in cells and may lead to
underestimation of drug toxicity. **Eur. J. Pharm.**
Sci. V.23, p.181-188, 2004.

- WANG, H.W.; ZHU, T.C.; PUTT, M.E.;
SOLOMONENKO, M.; METZ, J.; DIMOFTE, A.;
MILES, J.; FRAKER, D.L.; GLATSTEIN, E.; HAHN,
S.M.; YODH, A.G. Broadband reflectance
measurements of light penetration, blood
oxygenation, hemoglobin concentration, and drug
concentration in human intraperitoneal tissues
before and after photodynamic therapy. **J.**
Biomed. Optic. V.10, n.1, 014004-1- 014004-13,
2005.