EFEITO DO FOTOSSENSIBILIZADOR AZUL DE TOLUIDINA SOBRE LINHAGENS DE FIBROBLASTOS (3T3)

Agnes Costa e Silva (PIBIC/PROVIC), Maristela Hoffman Giraldi, Mariane Aparecida Savi Sanson (Doutoranda) Eduardo Bauml Campagnoli (Orientador), e-mail: ebcampagnoli@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia.

Área das Ciências da Saúde e Subárea Odontologia.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica, odontologia, azul de toluidina.

Resumo

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que envolve a administração de um agente fotossensibilizador seguida pela ativação do mesmo pela luz. Porém, os agentes comercializados atualmente são extremamente caros, já o Azul de Toluidina (AT), muito utilizado nas infecções bacterianas e fúngicas; poderia apresentar propriedades semelhantes, com custo acessível. Portanto, essa pesquisa verificou a ação citotóxica do AT em diferentes concentrações (1µg/ml; 5µg/ml; 10µg/ml e 20µg/ml) sobre linhagens de células derivadas de fibroblastos (3T3). Para tanto, as células foram cultivadas em DMEM/F-12, tratadas por 15 minutos com solução de AT e após o período de incubação (24 horas e 48 horas) a viabilidade celular foi determinada pelo teste de conversão do sal dimetiltiazol difenil tetrazolium (MTT). Foi observado que as diferentes concentrações de Azul de Toluidina diminuíram a viabilidade celular, quando comparado com o grupo tratado somente com DMEM/F-12.

Introdução

Na odontologia, a Terapia Fotodinâmica (TFD) já foi estudada no tratamento de lesões com potencial de malignização, adjuvante na terapêutica periodontal e endodôntica, bem como no tratamento de prevenção da cárie, devido ao efeito antimicrobiano. No estudo de Buckm[01], a qual investigou a relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em TFD, concluiu que em eficiência os corantes fenotiazínicos possuem maior ação que o dos corantes xantenos, confirmando que entre os corantes fenotiazídicos o AT é o mais eficiente. O uso da TFD e do AT na ação antimicrobiana, verificando a sensibilidade de uma cepa laboratorial de Streptococcus mutans e dois isolados clínicos do grupo Estreptococos foi estudado por Paschoal et al.[02]. Os resultados mostraram que a combinação de 0,25 µg/mL-1 de fotossensibilizador combinado a 36 J/cm2 de LED vermelho foi capaz de fotoinativar o crescimento da cepa padrão de S. mutans, mas que uma maior concentração (2,5 µg/mL-1) foi necessária para fotoinativar ambos os isolados clínicos de estreptococos em combinação a 24 J/cm2 do mesmo LED. Na questão do efeito antitumoral não há muitas pesquisas sobre este agente fototerapêutico em especifico, mas a seletividade de corantes semelhantes por células tumorais foi comprovada e explicada pela associação do fotossensibilizador às lipoproteínas resultando em uma ação preferencial para nas células neoplásicas[03] , já que estas expressam um maior número de receptores de

membrana para proteínas de baixa densidade, fazendo com que o fotossensibilizador a internalize. Copper et al.[04] realizaram um estudo para testar a eficácia em longo prazo da TFD, utilizando Meta-tetra (hidroxifenil) clorina, no tratamento de 29 carcinomas de células escamosas em estágio inicial da cavidade oral e orofaringe. Em 86% dos casos obteve-se remissão completa do tumor primário, destes apenas quatro lesões desenvolveram doença recorrente local após um a seis meses. Por ser um fotossensibilizador mais acessível, possuir bons resultados quanto à eficiência fotodinâmica, com ótima penetração nos tecidos e absorção máxima em 665 nm em solução aquosa[05] , o uso do AT em tratamentos odontológicos de diversas áreas tem aumentado e este estudo pretende aprofundar os efeitos deste fotossensiblizador em células fibroblásticas, quanto à citotoxidade. Portanto esse estudo teve por objetivo verificar a ação do AT em diferentes concentrações (1µg/ml; 5µg/ml; 10µg/ml e 20µg/ml) sobre linhagens de células derivadas de fibroblastos (3T3)

Materiais e Métodos

As soluções do fotossensibilizador Azul de Toluidina foram preparadas nas seguintes concentrações: 01µg/ml; 05µg/ml; 10ug/ml e 20µg/ml, utilizando PBS (pH 7,4) para solubilizar o fotossensibilizador testado. Essas soluções foram armazenadas em frascos âmbar, ao abrigo da luz e em temperatura de 4ºC. Antes de serem utilizados nos meios de cultura, foram esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore).

As células 3T3 foram cultivadas em frascos plásticos de 50cm^2 em meio de cultura DMEM/F-12 (Invitrogen, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), à 37°C em atmosfera contendo 5% de gás carbônico e 95% de umidade. As células foram subcultivadas sempre que atingirem uma confluência de aproximadamente 70%.

Na sequencia foi realizado o plaqueamento e 1x10^4 células de fibroblastos/poços em placa de 96 poços de acordo com os grupos abaixo descrito e incubadas a 37°C.

- **Grupo DMEM (Controle Positivo):** 4 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células testadas e 100 µL de DMEM 1%.
- **Grupo DMSO (Controle Negativo):** 4 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células testadas e 100 µL de DMSO.
- **Grupo PBS:** 4 poços de cultura, contendo, cada poço, 100 µL da suspensão de células testadas e 100 µL de PBS.
- **Grupo 1 (AT-1):** 4 poços de cultura contendo, cada poço, 100µL da suspensão de células, 100µL da solução de Azul de Toluidina à 1 µg/ml.
- **Grupo 2 (AT-5):** 4 poços de cultura contendo, cada poço, 100µL da suspensão de células, 100µL da solução de Azul de Toluidina à 5µg/ml.
- **Grupo 3 (AT-10):** 4 poços de cultura contendo, cada poço, 100µL da suspensão de células, 100µL da solução de Azul de Toluidina à 10µg/ml.
- **Grupo 4 (AT-20):** 4 poços de cultura contendo, cada poço, 100µL da suspensão de células, 100µL da solução de Azul de Toluidina à 20µg/ml.

Para cada grupo foi aguardado 15 minutos para ação do fotossensibilizador e em seguida, este foi aspirado. Imediatamente após, acrescentou-se 200µl de PBS para lavar as células, sendo aspirado o conteúdo. Na sequência, foram acrescentados 200µl de DMEM 1%. Então as placas de 96 poços foram incubadas

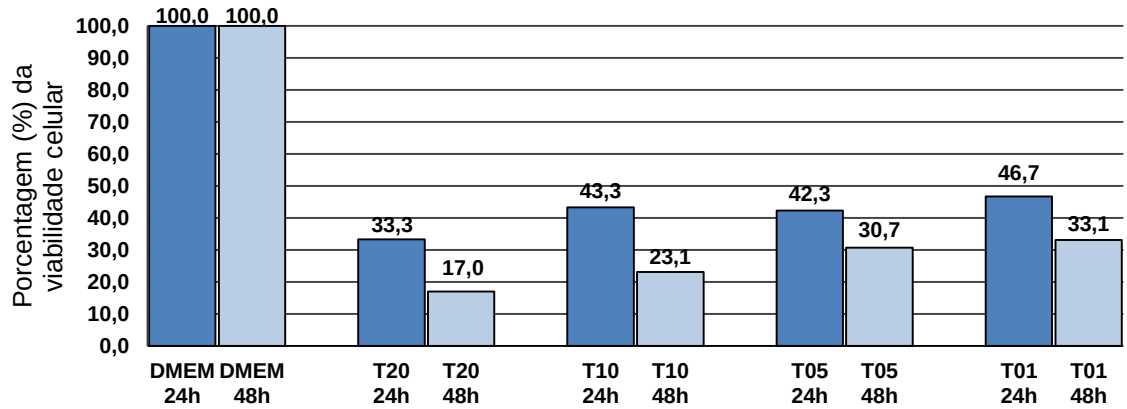
por 24 horas ou 48 horas. Após os períodos de incubação o meio foi renovado por meio fresco não suplementado com SFB contendo 0,5 mg/mL de MTT (dimetiltiazoldifeniltetrazolium). As placas foram, incubadas e protegidas da luz por 3h em estufa a 37°C. Decorrido o tempo de reação o meio foi descartado e o corante extraído com (1mL/poço) etanol (PA). O formazan azul foi quantificado em espectrofotômetro à 570nm.

Os resultados obtidos foram analisados por meio do programa estatístico BioEstat 5.0 (Brasil, 2007). Inicialmente foi medida a normalidade da amostra, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Por ser a amostra normal, optou-se pelo uso de testes estatísticos paramétrico: análise da variância (ANOVA) um critério, complementado pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando-se o nível de significância de 5%.

Resultados e Discussão

A diferença entre o grupo DMEM (controle positivo) e os as diferentes concentrações de AT que foram empregadas foram estatisticamente significante (Gráfico 01), tanto em 24 horas (ANOVA, p=0,000032) como em 48 horas (ANOVA, p<0,0001). No entanto, não houve diferença estatisticamente significante quando comparado somente as diferentes concentrações do fotossensibilizador AT no período de 24 horas (ANOVA, p= 0,1442). Já em 48 horas a concentração de 20 µg/ml de AT foi muito mais tóxica aos fibroblastos (3T3) quando comparada as concentrações de 05 µg/ml e de 01 µg/ml (ANOVA, p= 0,0022047).

GRÁFICO 01: Análise em porcentagem da viabilidade celular pela técnica do MTT em diferentes concentrações de azul de metileno nos tempos de 24h e 48h.



Diferentes grupos experimentais e os diferentes tempos de análise

Fonte: Dados da pesquisa

Notou-se um redução significativa na viabilidade celular após 48 horas, quando comparada ao tempo de 24 horas, principalmente nas concentrações de 20 µg/ml (Teste de Tukey, p<0,05), de 10 µg/ml (Teste de Tukey, p<0,05) e de 05 µg/ml (Teste de Tukey, p<0,05).

Também houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 01) ao comparar o DMSO (controle negativo) com as amostras tratadas somente com PBS (ANOVA, P<0,0001) e os grupos que foram tratados com diferentes concentrações de Azul de Toluidina durante 15 minutos tanto em 24 horas (ANOVA, p=0,0029028) como em 48 horas (ANOVA, p=0,0000884).

TABELA 01: Análise da viabilidade celular nas diferentes concentraões de Azul de Toluidina aplicadas quando comparado ao PBS (Tampão fosfato-salino) e DMSO (controle negativo).

Grupo	Viabilidade celular média (%)	
	24 horas	48 horas
DMSO (controle negativo)	24,4% (DP = 01,45)^{A}	12,3% (DP = 1,57)^{A}
PBS (Tampão fosfato-salino)	55,6% (DP = 10,36)^{B}	54,5% (DP = 7,92)^{B}
Toluidina 20µg/ml	33,3% (DP = 05,96)^{A}	17,0% (DP = 3,31)^{A}
Toluidina 10µg/ml	43,3% (DP = 06,88)^{B}	23,1% (DP = 3,98)^{C}
Toluidina 05µg/ml	42,3% (DP = 07,15)^{B}	30,7% (DP = 3,78)^{C}
Toluidina 01µg/ml	46,7% (DP = 10,40)^{B}	33,1% (DP = 7,19)^{C}

Legenda: Letras iguais significam que ausência de diferença estatistica. Letras diferentes mostram diferenças estatisticamente significantes, quando comparada com o grupo DMSO e PBS.
Fonte: Dados da pesquisa

Os procedimentos utilizados para os testes com as diferentes concentrações de Azul de Toluidina e com somente o PBS reduziram a viabilidade celular quando comparadas as células que foram mantidas o tempo todo no DMEM (controle positivo) e as diferentes concentrações de Azul de Toluidina foram extremamente citotóxica, principalmente no período de 48 horas. O uso do fotossensibilizante Azul de Toluidina na terapia fotodinâmica parece ser uma técnica promissora, porém novos estudos com novas concentrações precisam ser realizados, visto que as concentrações utilizadas neste estudo foram citotóxicas as células fibroblásticas.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesse estudo pode-se concluir que as diferentes concentrações de Azul de Toluidina foram extremamente citotóxicas aos fibroblastos da linhagem 3T3, principalmente na concentração de 20 µg/ml. A maior diminuição da viabilidade celular foi observada no período de 48 horas

Referências

01. BUCKM, S.T.G. **Relação entre eficiência fotodinâmica, citotoxicidade e propriedades moleculares de corantes para aplicação em terapia fotodinâmica.** São Carlos: Instituto de Química-USP, 2009. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências.
02. PASCHOAL, M.A.; SILVA T.C.; SILVA A.L.; CAMPANELLI A.P.; MACHADO, M.A.A.M. **Efeitos da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre microrganismos cariogênicos: estudo preliminar.** Disponível em <http://revista.uepb.edu.br/index.php/pboci/article/view/1994/pdf>. Acesso em 07/2018.
03. DOUGHERTY, T.J. et al. **Photodynamic therapy.** J. Natl. Cancer Inst., Cary, v. 90,n. 12, p. 889- 905, June 1998.
04. COOPER, M.P. TAN, I.B.; OPPELAAR, H.; RUEVEKAMP, M.C.; STEWART, F.A. **Meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck.** Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003 Jul;129(7):709-11
05. TUITE, E.M.; KELLY, J.M. **Photochemical interactions of methylene blue and analogues with DNA and other biological substrates.** J. Photochem. Photobiol. B, Lausanne, v. 21, n. 2-3, p. 103-124, Dec. 1993