AÇÃO DO FOTOSSENBILIZADOR AZUL DE METILENO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES SOBRE LINHAGENS DE FIBROBLASTOS (3T3)

Eduardo Grokoski (PIBIC/PROVIC), Eduardo Bauml Campagnoli(Orientador), Maristela Hoffmann Giraldi, Mariane Aparecida Savi Sanson.
e-mail: ebcampagnoli@yahoo.com.br.
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia.

Ciências da Saúde/ Odontologia/ Clínica Odontológica.

Palavras-chave: Azul de Metileno, Fibroblastos, Citotoxicidade.

Resumo

Atualmente três fotossensibilizadores possuem ação antineoplásicas: Photofrin® (derivado de hematoporfirina), Foscan®(Temoporfina) e Ácido 5-Aminolevulinico (5-ALA). Porém, estes são extremamente caros. Já o Azul de Metileno (AM), pode ser utilizado em tratamento de infecções bacterianas, fúngicas, neoplasias, com custo acessível. Portanto, essa pesquisa visa verificar a ação citotóxica do AM 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 AM em diferentes concentrações e após o período de incubação (24 horas e 48 horas), a viabilidade celular foi determinada pelo teste de conversão do sal dimetiltiazoldifeniltetrazolium (MTT). Houve redução significativa na viabilidade celular após o uso de AM em todas as concentrações testadas. No entanto as diferentes concentrações de AM não diferiram uma das outras no período de 24 horas. Já após 48 horas, a concentração de 20µg/ml de AM mostrou-se mais citotóxica quando comparada as demais concentrações testadas.

Introdução

Os fotossensibilizadores (FTS) são agentes, que, sob iluminação em determinado comprimento de onda e na presença de oxigênio, produzem espécies reativas de oxigênio, que são citotóxicas[03].Os FTS podem ser administrados na forma intralesional, tópica ou sistêmica, sendo que apresentam mecanismos diretos (apoptose e/ou necrose) e indiretos (resposta imune e inflamatória)[04].A primeira demonstração (1900) de fotossensibilização letal de células, quando verificou-se que alaranjado de acridina[09] no escuro, não possuíam efeito,mas, sob exposição à luz normal do dia, inativou microrganismos[02]. No final de 1980 aplicou-se FTS no tratamento de tumores malignos superficiais e, em seguida, no tratamento de infecções locais, fúngicas, bacterianas[01], câncer de bexiga, pulmão, cérebro, mama, pescoço, oral, doenças malignas da pele e para cânceres do tratoaerodigestivo. O AM tem um máximo de absorção de 660nm e exibe um bom valor de atividade fotodinâmica, sendo compatível com o uso de LED.

Propriedades fotossensibilizantes, são: menos tóxico possível, captado mais rapidamente pelo tecido alvo, pequena ou nenhuma toxicidade sem presença de luz, cinética e ser estável para que haja tempo suficiente na transferência de energia e elétrons[08].

No final do século XIX, foi descrito as propriedades do AM, um composto tricíclico que mais tarde se tornaria o núcleo de um grupo de compostos derivados que, juntos, constituem as fenotiazinas[05], os quais tem grande propensão à formação de espécies reativas de oxigênio.

Clinicamente, o TFD tem sido principalmente usado para câncer de bexiga, pulmão, cérebro, mama, pescoço, oral, doenças malignas da pele e para cânceres do tratoaerodigestivo. Além de terapia anti-neoplásica, infecções bacterianas, fúngicas, bioestimulação, carcinoma espinocelular[10], câncer de mama[06]e adenocarcinoma de pulmão[07].

Com base no exposto, este trabalho objetivou avaliar a ação citotóxica do fotossensibilizador azul de metileno em diferentes concentrações (1 µg/ml; 5 µg/ml; 10µg/ml e 20µg/ml) sobre linhagens de células de fibroblastos (3T3).

Materiais e Métodos

As soluções de Azul de Metileno (AM) foram preparadas nas concentrações de: 01µg/ml; 05µg/ml; 10ug/ml e 20µg/ml. Para tanto, utilizou-se solução salina tampanada com fosfato pH 7,4 (PBS) para solubilizar o AM.

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 sequência 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):**Idem ao grupo DMEM, porém com 100 µL de DMSO. **Grupo PBS:**Idem ao grupo DMEM, porém com 100 µL de PBS.**Grupo 1 (AM-1):**Idem ao grupo DMEM, porém com 100µL da solução de azul de metileno à 1 µg/ml.**Grupo 2 (AM-5):**Idem ao grupo DMEM, porém com 100µL da solução de azul de metileno à 5µg/ml.**Grupo 3 (AM-10):**Idem ao grupo DMEM, porém com 100µL da solução de azul de metileno à 10µg/ml.**Grupo 4 (AM-20):**Idem ao grupo DMEM, porém com 100µL da solução de azul de metileno 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.

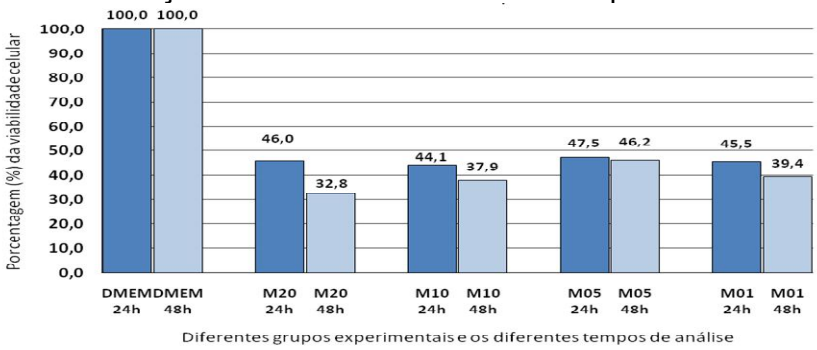
Os resultados obtidos foram analisados por meio do programa estatístico BioEstat 5.0 (Brasil, 2007). Inicialmente foi medida a normalidade da amostra, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Por ser a amostra normal, optou-se pelo uso de testes estatísticos paramétrico: análise da variância (ANOVA)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

Resultados e Discussão

Com base do GRÁFICO 01 nota-se que houve diferença estatisticamente significante (Figura 01) entre o grupo DMEM-24 (controle positivo) e as diferentes concentrações de Azul de Metileno que foram empregadas, tanto em 24 horas (ANOVA, p=0,000031), como em 48 horas (ANOVA, p<0,0001), mostrando que este fotossensibilizador tem propriedades citotóxicas, consequentemente causando morte celular, essencial fator para ser utilizado em terapias antineoplásicas.

No entanto, levando em consideração ação do Azul de Metileno em diferentes concentrações após 24 horas e 48 horas, não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (ANOVA, p= 0,9207 e p= 0,2447; respectivamente).

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.



Fonte: Dados da Pesquisa.

Na tabela 01 pode-se observar que houve diferença estatisticamente significativa 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 metileno durante 15 minutos tanto em 24 horas (ANOVA, p=0,0006) como em 48 horas (ANOVA, p=0,0005).

TABELA 01: Análise da viabilidade celular nas diferentes concentrações de azul de metileno aplicadas quando comparado ao PBS (tampão fosfato-salino) e DMSO (controle negativo).

Grupo	Viabilidade celular média (%)(desvio-padrão)	
	24 horas	48 horas
DMSO (controle negativo)	24,4%(DP = 1,45)^{B}	12,3%(DP = 1,57)^{B}
PBS (Tampão fosfato-salino)	55,6% (DP =10,36)^{A}	54,5% (DP = 7,92)^{A}
Metileno 20µg/ml	46,0%(DP =8,61)^{A}	32,8%(DP = 7,31)^{C}
Metileno 10µg/ml	44,1%(DP = 7,85)^{A}	37,9%(DP = 3,07)^{A}
Metileno 05µg/ml	47,4%(DP = 5,86)^{A}	46,2%(DP = 11,87)^{A}
Metileno 01µg/ml	45,5%(DP = 4,20)^{A}	39,3%(DP = 10,29)^{A}

Legenda: Letras iguais significam que não houve diferença estatisticamente significante. Letras diferentes mostra as diferenças estatisticamente significantes.
Fonte: Dados da Pesquisa.

Porém ao comparar a viabilidade celular entre as amostras tratadas somente com o PBS e as diferentes concentrações de azul de metileno, pode-se perceber pouca variação entre os grupos, resultando na ausência de significância estatística (ANOVA, p=0,2752 para 24 horas e p=0,0783 para 48 horas), exceto na

concentração de azul de metileno 20µg/ml (Teste de Tukey, p<0,05). Isso demonstrou, que o uso de solução de Azul de Metileno nessa concentração foi mais citotóxica se comparada as demais concentrações.

Conclusões

Pode-se concluir que houve redução significativa na viabilidade celular após o uso do fotossensibilizador Azul de Metileno, com isso concretizamos que este FTS tem eficácia relacionado à morte celular. No entanto, os procedimentos utilizados para os testes com as diferentes concentrações de Azul de Metileno e com somente o PBS reduziram a viabilidade celular ao se comparar com as células que foram mantidas o tempo todo no DMEM.

Além disso, somente a concentração de azul de metileno 20µg/ml mostrou mais citotóxica, após 48 horas, que as demais concentrações utilizadas.

Referências

01. MAISCH, Tim. Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?. Lasers in medical science, v. 22, n. 2, p. 83-91, 2007.
02. BRUGNERA JÚNIOR, Aldo et al. Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. In: Atlas de laserterapia aplicada à clínica odontológica. 2003.
03. ORTH, K. et al. Methylene blue mediated photodynamic therapy in experimental colorectal tumors in mice. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v. 57, n. 2-3, p. 186-192, 2000.
04. AMARAL, Leonard; VIVEIROS, Miguel; KRISTIANSEN, Jette Elisabeth. Phenothiazines: potential alternatives for the management of antibiotic resistant infections of tuberculosis and malaria in developing countries. Tropical Medicine &International Health, v. 6, n. 12, p. 1016-1022, 2001.
05. DOS SANTOS, Ancély F. et al. Methylene blue photodynamic therapy induces selective and massive cell death in human breast cancer cells. BMC cancer, v. 17, n. 1, p. 194, 2017.
06. HOSSEINZADEH, Reza; KHORSANDI, Khatereh; JAHANSHIRI, Maryam. Combination photodynamic therapy of human breast cancer using salicylic acid and methylene blue. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 184, p. 198-203, 2017.
07. STONE, R. W. Clinical updates on the use of dimethyl sulfoxide. Canine practice (USA),v.18, p.16-19, 1993.
08. MACDONALD, Ian J.; DOUGHERTY, Thomas J. Basic principles of photodynamic therapy. Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, v. 5, n. 02, p. 105-129, 2001.
09. SIMPLICIO, Fernanda Ibanez; MAIONCHI, Florângela; HIOKA, Noboru. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. Química Nova, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.
10. LEE, Yoojin; BARON, Elma D. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. , 30, 4, v. 30, n. 4, p. 199-209, 2011.