AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO SOBRE LINHAGENS DE FIBROBLASTOS (3T3)

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

Área de conhecimento: Odontologia
Subárea: Clínica Odontológica

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica**,** Lasers, Corantes, Fibroblastos.

Resumo
A Terapia Fotodinâmica (TDF) é uma modalidade terapêutica que envolve a administração de um agente fotossensibilizador (FS) seguida pela ativação por luz, agente fotoativador (FA), resultando em processos fotoquímicos e biológicos que geram produtos tóxicos à célula-alvo. O objetivo dessa pesquisa foi verificar o efeito citotóxico do Azul de metileno (AM) quando fotoativado por laser diodo (comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW e aplicação de modo contínuo) sobre fibroblastos da linhagem 3T3. Para tanto, as células foram cultivados em DMEM e submetidos aos seguintes tratamentos: 10 µL de AM nas concentrações de 5 e 10 µg/mL; aplicação do laser nas dosimetrias de 50 e 100 J/cm^2. Além disso, foi testada a ação combinada do FS e FA. Os testes foram realizados em quadruplicata e repetidos 3 vezes (n=12). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio do MTT (24 e 48 horas). A aplicação combinada do FS+FA acentuou o efeito tóxico sobre os fibroblastos, apresentando valores próximos a 35% de viabilidade celular, como evidenciado no teste de MTT. Isso indica o efeito deletério da TFD com azul de metileno em linhagens de fibroblastos (3T3).

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TDF) é uma modalidade terapêutica que envolve a administração de um agente fotossensibilizador (FS) seguida pela ativação do mesmo pela luz, agente fotoativador (FA). Isto resulta em uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que geram produtos fototóxicos danosos à célula-alvo (DOUGHERTY *et al.*, 1998). Formam-se na presença de oxigênio, íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas gerando uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs). A liberação dessas EROs promove o efeito citotóxico da TFD sobre as células-alvo (CASTANO *et al.*, 2004).

A busca por FS quimicamente puros, com melhor absorção de luz e com a redução da fotossensibilidade da pele em comparação ao Photofrin®, além de serem economicamente viáveis levou ao estudo de várias classes de compostos, como o Azul de Metileno (AM) sendo ele capaz de induzir efeito fototóxico em uma variedade de células tumorais *in vitro* (MELLISH *et al.*, 2002; WALKER *et al.*, 2004) e possui atividade fotodinâmica *in vivo* (ORTH *et al.*, 1995; WAINWRIGHT *et al.*, 1997). Além disso, a banda de absorção do AM varia entre 620 e 700 nm, com ótima penetração nos tecidos e absorção máxima em 665 nm em solução aquosa.

Segundo Mang (2008) os lasers foram escolhidos como fontes de iluminação porque produzem luz coerente e comprimento de onda monocromática que permitem o cálculo da dose de luz, importante para a definição os protocolos experimentais da TFD.

Mesmo sendo estudada na odontologia, a TFD aplicada em tratamento de lesões cancerizáveis de mucosa, como adjuvante na terapia periodontal e endodôtica, bem como no tratamento preventivo de lesões cariosas (WAINWRIGHT, 2002; DEMIDOVA e HAMBLIN, 2004), ainda não temos relato de estudos comparativos entre a viabilidade celular após aplicação da TFD em células normais, bem como as concentrações de FS e de FA isolados ou combinados que poderiam causar toxicidade celular em tecidos saudáveis. Nosso trabalho tem como objetivo a utilização do AM em algumas concentrações (FS) e o Laser Diodo em algumas dosimetrias (FA) ambos testados de modo isolado e também combinado em linhagem de fibroblastos (3T3).

Materiais e Métodos

A linhagem celular de Fibroblastos 3T3, proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (catálogo BCRJ n° 0018), foi acondicionada em ampolas de congelamento em geladeira a -80°C no Laboratório de Cultura de Células do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPG. Para realização dos experimentos, as células eram descongeladas e semeadas em placas de cultivo junto com meio de cultura DMEM a 1% SFB. Padronizou-se para cada poço de tratamento a concentração celular de 1 x 10^4 em 200µL de meio de cultura armazenadas em estufa a 37°C, com atmosfera em 5% de CO_2 e 95% de umidade. Após realização do plaqueamento, aguardou-se 24 horas para realizar o tratamento celular.

Para testar o efeito da TFD em fibroblastos 3T3, o AM foi utilizado como fotossensibilizador (FS) e o laser de diodo empregado como fotoativador (FA). O azul de metileno foi testado nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. As soluções foram preparadas por diluição seriada em Tampão Fosfato-Salino (PBS, de pH 7,4), esterilizadas por filtração em membrana de 0,22 µm (Millipore) e armazenadas em frascos âmbar de 15 mL, ao abrigo da luz e em temperatura de 4°C. O laser diodo (WhiteningLase II, DMC) foi empregado com o comprimento de onda de 660 nm, potência de 100 mW, emissão contínua em modo de operação pontual. As dosimetrias testadas foram de 100 e 50 J/cm^2.

Inicialmente foi testado o efeito isolado das diferentes concentrações do FS em 5 e 10 µg/mL do seguinte modo: a) remoção do meio de cultura dos poços; b) adicionado 10 µL da solução de azul de metileno; c) complementou-se com 40 µL de PBS (para cobrir o fundo do poço); d) aguardou-se 15 minutos para absorção do fotossensibilizador pelas células; e) removeu-se o conteúdo de tratamento e imediatamente adicionou-se 150 µL de PBS para lavagem celular e remoção de excessos; f) acrescentou-se 200µL do meio de cultura com 1% de SFB e incubou-se a placa de cultura em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade.

A sequência de tratamento com o FA de modo isolado após 24 horas foi: a) remoção do meio de cultura celular; b) adicionar 150 µL de PBS/poço; c) aplicação do laser nas devidas dosimetrias; d) remoção do PBS; e) adicionar 200 µL de meio de cultura respectivo de cada linhagem celular e incubar a em estufa com atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade.

A associação do FA e do FS para o tratamento celular designado de Terapia Fotodinâmica (TFD) foi a seguinte: a) remoção do meio de cultura; b) adicionado 10 µL da solução de azul de metileno em suas devidas concentrações; c) adicionado 40 µL de PBS (para cobrir o fundo do poço); d) aguardar 15 minutos para absorção do fotossensibilizador pelas células; e) remoção do conteúdo de tratamento; f) adição de 150 µL de PBS em cada poço; g) aplicação do laser de acordo com suas dosimetrias (50 e 100 J/cm^2); h) remoção do conteúdo; i) adicionar 200 µL de meio

de cultura e levar a placa de cultura para estufa em atmosfera de 5% de CO_2 e 95% de umidade.
Para determinação da viabilidade celular foi empregado teste colorimétrico com ensaio de (brometode [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium] – MTT.

Resultados e Discussão

A TFD aplicada aos fibroblastos 3T3 mostrou que a ação isolada do FS nas concentrações utilizadas (5 e 10 µg/mL) e do FA nas dosimetrias aplicadas (50 e 100 J/cm^2) quando comparados ao grupo de controle negativo de toxicidade (DMEM) e positivo de toxicidade (DMSO) apresentaram diferença estatística pelo ensaio de MTT em 24 horas após aplicação dos tratamentos (figura 1). Por sua vez, em 48 horas, com exceção do FA 100 J/cm^2, as mesmas diferenças foram encontradas (figura 2). Sugere-se que a aplicação do FA na dosimetria de 100J/cm^2 após o período de 48 horas, possa induzir a viabilidade celular, aproximando os valores de tal variável com o grupo DMEM. Estudos anteriores como o de Zancanela (2009), mostram que os processos fotoquímicos e fotobiológicos estudados na TFD podem estar ligados a bioestimulação celular, o que pode explicar tal resultado.
A ação combinada das variáveis de FS com FA (FS 5 µg/mL com 50 J/cm^2; FS 5 µg/mL com 100 J/cm^2; FS 10 µg/mL com 50 J/cm^2; FS 10 µg/mL com 100 J/cm^2) quando comparados ao grupo DMEM e ao grupo DMSO apresentaram diferença estatística pelo ensaio de MTT em 24 e em 48 horas, diminuindo a viabilidade celular para valores próximos a 35%, como pode ser identificado na figura 3 e 4, respectivamente. Considerando que a ativação do FS com o FA resulta em uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que geram produtos fototóxicos danosos à célula-alvo (DOUGHERTY *et al.*, 1998; BLISS *et al.*, 2004), os quais na presença de oxigênio formam íons peróxidos e radicais hidroxilas, acabam por gerar uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez promovem o efeito citotóxico da TFD sobre as células-alvo (CASTANO *et al.*, 2004), sugere-se que a viabilidade celular seja inferior aos valores do grupo positivo de viabilidade (DMEM). Desse modo, ao compararmos a ação combinada de FS+FA em 24 horas a viabilidade celular foi em torno de 35%, e em 48 horas em torno de 30%; propõem-se que houve efeito citotóxico.

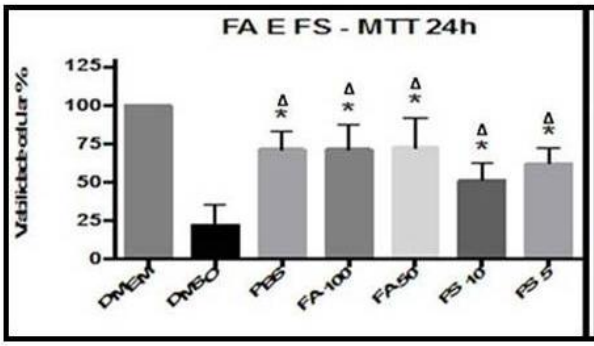


Fig 1: Porcentagem de viabilidade celular após 24 horas tratamento com FA e FS isolados quando comparados ao DMEM (n=12). * quando p<0,05 (DMEM) e Δ p<0,05 (DMSO). (Teste ANOVA, uma via complementado pelo teste de Tukey).

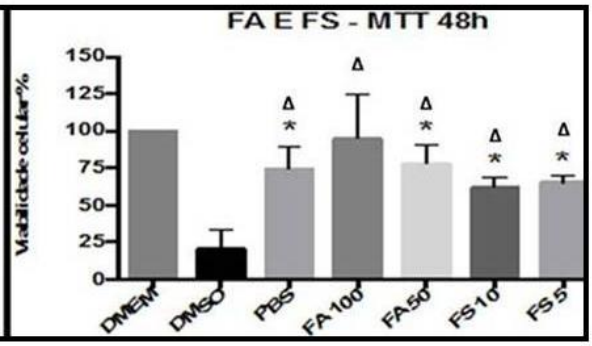


Fig 2: Porcentagem de viabilidade celular após 48 horas tratamento com FA e FS isolados quando comparados ao DMEM (n=12). * quando p<0,05 (DMEM) e Δ p<0,05 (DMSO). (Teste ANOVA, uma via complementado pelo teste de Tukey).

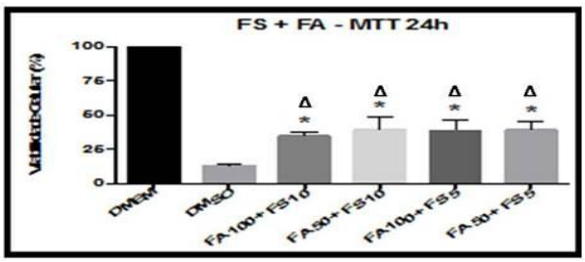


Fig 3: Porcentagem de viabilidade celular após 24 horas tratamento com FA e FS combinados quando comparados ao DMEM (n=12). * quando p<0,05 (DMEM) e Δ p<0,05 (DMSO). (Teste ANOVA, uma via complementado pelo teste de Tukey).

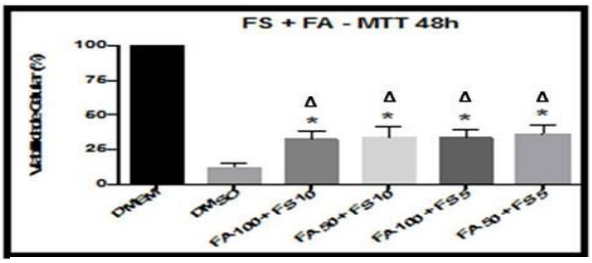


Fig 4: Porcentagem de viabilidade celular após 48 horas tratamento com FA e FS combinados quando comparados ao DMEM (n=12). * quando p<0,05 (DMEM) e Δ p<0,05 (DMSO). (Teste ANOVA, uma via complementado pelo teste de Tukey).

Conclusões

A ação isolada do FS, FA e de ambos combinada mostrou diferença estatística quando comparados ao grupo controle negativo de toxicidade (DMEM) e grupo positivo de toxicidade (DMSO) em 24 e 48 horas, exceto com a aplicação de FA 100J/cm^{2}comparado ao DMEM em 48 horas. A TFD com a ação combinada de FS e FA (FS 5 µg/mL com 50 J/cm^2; FS 5 µg/mL com 100 J/cm^2; FS 10 µg/mL com 50 J/cm^2; FS 10 µg/mL com 100 J/cm^2) sugere citotoxicidade, ao diminuir a viabilidade celular dos Fibroblastos 3T3 para valores próximo a 35% no período de 24 e para 30% em 48horas quando submetidos ao ensaio de MTT.

Agradecimentos

A Deus por ter me dado força e saúde para realização e conclusão desse trabalho. A esta Universidade por todo apoio na realização das atividades acadêmicas e na elaboração e conclusão desse trabalho. Agradeço de modo especial ao meu professor orientador Eduardo B. Campagnoli que não mediu esforços em contribuir com suas experiências, suas ideias e conhecimentos durante toda minha formação e na realização desse trabalho. Agradeço a minha co-orientadora Mariane S. Sanson por toda sua dedicação e seu esforço Ao professor Fábio André por abrir as portas do laboratório de Cultura. A Fundação Araucária pelo incentivo financeiro recebido para elaboração dos projetos de pesquisa. Muito obrigada!

Referências

BLISS, J. M. et al. Susceptibility of Candida species to photodynamic effects of photofrin. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 48, n. 6, p. 2000-6, Jun 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn Ther,** v. 1, n. 4, p. 279-93, Dec 2004.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol,** v. 17, n. 3, p. 245-54, Sep-Dec 2004.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst,** v. 90, n. 12, p. 889-905, Jun 17 1998.

ORTH, K. et al. Intraluminal treatment of inoperable oesophageal tumours by intralesional photodynamic therapy with methylene blue. **Lancet,** v. 345, n. 8948, p. 519-20, Feb 25 1995.

MANG, T. S. Dosimetric concepts for PDT. **Photodiagnosis Photodyn Ther,** v. 5, n. 3, p. 217-23, Sep 2008.

MELLISH, K. J. et al. In vitro photodynamic activity of a series of methylene blue analogues. **Photochem Photobiol,** v. 75, n. 4, p. 392-7, Apr 2002.

WALKER, I. et al. A comparative analysis of phenothiazinium salts for the photosensitisation of murine fibrosarcoma (RIF-1) cells in vitro. **Photochem Photobiol Sci,** v. 3, n. 7, p. 653-9, Jul 2004.

ZANCANELA, D. C. **Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na estimulação e crescimento celular de osteoblastos. Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência de fármacos fotossensíveis**. 2009. 73 Dissertação (Mestrado em Química), Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP.