

Determinação do mecanismo de destruição de células mediado por *meso*-tetramesitylporfirina, octaetilporfirina, octaetilporfirina de vanadil e luz visível

J. N. Ribeiro*, R. A. Jorge

Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, UNICAMP, C.P. 6154, Barão Geraldo,
CEP: 13083-970 Campinas-SP, Brasil

*e-mail: nariber@ig.com.br

Resumo: A Terapia Fotodinâmica é um tratamento clínico empregado no combate a vários tipos de tumores. Nesta técnica, o paciente recebe uma certa dosagem de uma substância fotossensibilizadora que, por sua vez, acumula-se preferencialmente no tecido tumoral. Em seguida irradia-se luz visível, neste tecido, com a finalidade de se excitar o fotossensibilizador. Esta substância, excitada, pode transferir elétrons e/ou energia para o oxigênio, no estado fundamental, gerando espécies reativas de oxigênio como o radical superóxido e oxigênio singlete. O primeiro é gerado no mecanismo tipo I, pela transferência de elétrons, e o segundo no mecanismo tipo II, pela transferência de energia. Estas espécies reativas geram um estresse oxidativo, no tecido tumoral, levando as células cancerígenas à morte. Neste trabalho, foram avaliadas as propriedades fotossensibilizadoras de três porfirinas e constatou-se que as mesmas são capazes de destruir células, na presença de luz e oxigênio. Este evento foi mais pronunciado, na presença de água deuterada, e inibido por supressores de oxigênio singlete, indicando predominância do mecanismo tipo II.

Palavras-chave: Terapia Fotodinâmica, porfirinas, espécies reativas de oxigênio.

Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um tratamento clínico que requer oxigênio molecular, uma substância fotossensibilizadora (FTS) e luz visível, para tratar diversos tipos de tumores. Nesta técnica, o paciente recebe uma certa dosagem do FTS que, depois de um certo tempo, se acumula preferencialmente no tecido tumoral. Em seguida irradia-se, este tecido, com luz visível, para excitar o FTS. O FTS, no estado singlete excitado, pode decair para o estado fundamental ou passar ao estado triplete excitado. Neste último, O FTS pode transferir energia e/ou elétrons para o oxigênio, no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), e gerar espécies

reativas de oxigênio (EROs). Estas EROs induzem uma seqüência de eventos oxidativos que resultam na morte das células cancerígenas por apoptose e/ou necrose [1].

A geração de EROs pode ocorrer através de dois mecanismos conhecidos como tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I, o FTS transfere elétrons para o $^3\text{O}_2$ gerando o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) [2]. O $\text{O}_2^{\cdot-}$, por sua vez, pode reagir com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), presente no meio celular, e gerar o radical hidroxila (HO^{\cdot}), um potente agente oxidante [3]. No mecanismo tipo II, o FTS transfere energia para o $^3\text{O}_2$ e gera uma espécie extremamente reativa, conhecida como oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) (Fig.1) [2].

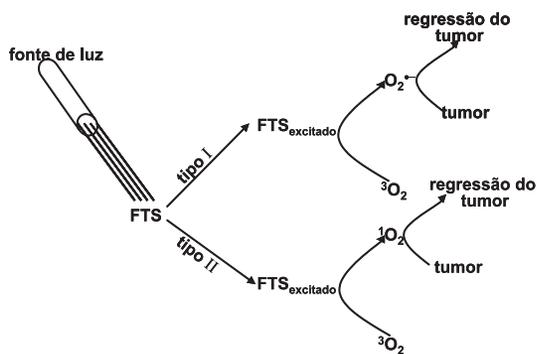


Figura 1. Esquema de excitação do FTS com luz visível. O FTS excitado transfere elétrons para o 3O_2 gerando $O_2^{\cdot -}$ (mecanismo tipo I) e/ou transfere energia, também para 3O_2 , gerando 1O_2 (mecanismo tipo II).

Atualmente o agente anticancerígeno fototerapêutico mais empregado para uso clínico é o Photofrin[®], cujo princípio ativo é uma mistura complexa de hematoporfirinas que, quando irradiadas, geram EROs que destroem o tecido tumoral. Este medicamento é utilizado para tratamento profilático de câncer de bexiga no Canadá, de pulmão, trato digestivo e urinário na Holanda, França, Alemanha e Japão [4] e de esôfago e pulmão nos Estados Unidos [5,6].

Apesar de ser um medicamento bastante eficiente, o Photofrin[®] apresenta alguns inconvenientes. Ele é tido como uma complexa mistura de hematoporfirinas das quais muitas não foram ainda identificadas, é pouco seletivo em relação ao tecido tumoral e seu baixo coeficiente de extinção molar revela que são necessárias altas dosagens para se obter uma resposta terapêutica satisfatória. Além disso, acumula-se em grande quantidade na pele fazendo com que o paciente tenha que ficar ao abrigo da luz natural por várias semanas após o tratamento [1,2].

Os problemas encontrados com o Photofrin[®] têm levado vários laboratórios a buscarem fotossensibilizadores alternativos e mais eficientes para uso em TFD. Neste estudo, foram avaliadas as propriedades fotossensibilizadoras de três substâncias conhecidas como *meso*-tetramesitilporfirina (*m*-TMP), octaetilporfirina (OEP) e octaetilporfirina de vanadil (VOOEP). Para isso, foi verificada a capacidade, destas substâncias, de destruir células em presença de luz e oxigênio, bem como o principal mecanismo (tipo I ou tipo II) envolvido neste proces-

so. As células utilizadas, como modelo, foram células vermelhas de sangue humano (eritrócitos). A facilidade e o baixo custo dos procedimentos justificam a utilização deste tipo de célula como modelo para se avaliar o potencial fototerapêutico de várias substâncias.

Material e Métodos

Material

Os compostos *m*-TMP, OEP e VOOEP foram obtidos da Porphyrin Product, Inc. (Logan Utah, USA). O polioxietilenosorbitan monolaurato (Tween 20[®]), acetato de etila, L-histidina e manitol foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). A azida de sódio, cloreto de sódio, fosfato monohidrogeno de sódio e fosfato dihidrogeno de sódio foram obtidos da Merck (Darmstald, Alemanha). A água deuterada (D_2O) foi obtida da Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, USA). O sangue humano foi doado pelo Hemocentro do Hospital das Clínicas da UNICAMP. A lâmpada de mercúrio, utilizada para excitar *m*-TMP, OEP e VOOEP, foi da marca Philips Modelo HPLN 80W com filtro para bloqueio das emissões abaixo de 400 nm e acima de 600 nm. As leituras de absorvância de hemoglobina, para determinar a fotodestruição de eritrócitos, foram realizadas em um espectrofotômetro UV/Vis da marca Hewlett Packard Modelo 8453. Utilizou-se, também, uma microcentrífuga Revan 14000D (Revan Instrumentos Científicos,), balança analítica Mettler AE200, microbalança Perkin Elmer AD-6, além de um banho se ultra-som Modelo 8890R-MT Cole-Parmer.

Métodos

Para verificar a fotodestruição de eritrócitos bem como o mecanismo predominante, neste processo, foram preparadas amostras contendo 0,7% (v/v) de eritrócitos, tampão fosfato salino (PBS: 0,15 M de NaCl, 1,9 μ M NaH_2PO_4 , 8,1 μ M Na_2HPO_4 , pH 7,4), Tween 20[®] 0,1% (m/v), acetato de etila 0,1% (v/v), 10 μ M de *m*-TMP ou OEP ou VOOEP, além de 50% de D_2O e diferentes concentrações de manitol, azida e L-histidina. As amostras foram saturadas com oxigênio e irradiadas com lâmpada de mercúrio (filtro de 400-600 nm) durante 60 minutos. A cada 10 minutos de irradiação uma

alíquota de 550 mL foi retirada da amostra e centrifugada a 2000 g e o sobrenadante, contendo hemoglobina, foi separado para a análise da fotodestruição. A quantificação da fotodestruição foi realizada através da leitura de absorbância, em 542 nm, da hemoglobina liberada, por eritrócitos destruídos, no meio de reação. Para o cálculo da porcentagem de fotodestruição (FD), das células, foi utilizada a seguinte equação:

$$A_{542\text{nm, FD}} = A_{542\text{nm, amostra}} - A_{542\text{nm, branco}} - A_{542\text{nm, FTS}} \quad (1)$$

onde $A_{542\text{nm, FD}}$ é a absorbância da hemoglobina liberada por eritrócitos destruídos, $A_{542\text{nm, amostra}}$ é a absorbância total da amostra, $A_{542\text{nm, branco}}$ é a absorbância do branco e $A_{542\text{nm, FTS}}$ é a absorbância de *m*-TMP ou OEP ou VOOEP. O branco continha todos os componentes da amostra, com exceção dos FTS. A solução onde se obteve a absorbância dos FTS ($A_{542\text{nm, FTS}}$) continha todos os componentes da amostra, com exceção dos eritrócitos.

A concentração de eritrócitos destruídos foi obtida através da Lei de Lambert-Beer:

$$A_{542\text{nm, FD}} = e.b.c \quad (2)$$

onde: *e* = coeficiente de extinção molar da fotodestruição [(cm%)⁻¹], *b* = caminho ótico (0,5 cm) e *c* = concentração de eritrócitos destruídos [% (v/v)].

O coeficiente de extinção molar da fotodestruição [(2,6 ± 0,2)/(cm.%)⁻¹] foi obtido utilizando-se a Lei de Lambert-Beer, medindo-se a absorbância da hemoglobina de uma amostra contendo 0,7% (v/v) de eritrócitos em PBS pH 7,4, Tween 20⁰ 0,1% (m/v), acetato de etila 0,1% (v/v) e *m*-TMP ou OEP ou VOOEP 10 μM. Esta amostra foi previamente submetida a um banho de ultrassom durante 10 minutos com o objetivo de se obter 100% dos eritrócitos destruídos.

Determinando-se a concentração de eritrócitos destruídos, a partir da equação 2, foi possível determinar a porcentagem de fotodestruição através da equação 3:

$$\% \text{ de fotodestruição} = (c \times 100)/0,7 \quad (3)$$

onde *c* = concentração de eritrócitos destruídos, nas amostras, dada em % e 0,7 = con-

centração inicial de eritrócitos, antes da irradiação, dada em % (v/v).

Resultados e Discussão

Os resultados, deste trabalho, demonstraram que as três substâncias foram capazes de causar a destruição de eritrócitos, na presença de luz e oxigênio, sendo que, *m*-TMP e OEP foram consideravelmente mais eficientes do que VOOEP (Fig.2). Esta menor eficiência de VOOEP pode ser devida à formação de agregados por parte desta substância. Os agregados são caracterizados por interações entre as próprias moléculas do fotossensibilizador. A formação destas estruturas ocorre, geralmente, quando fotossensibilizadores hidrofóbicos estão presentes em meio aquoso. Tal evento diminui o tempo em que a substância fotossensibilizadora permanece no estado triplete excitado, acarretando diminuição na geração de EROs e conseqüentemente redução na porcentagem de fotodestruição de células [7,8].

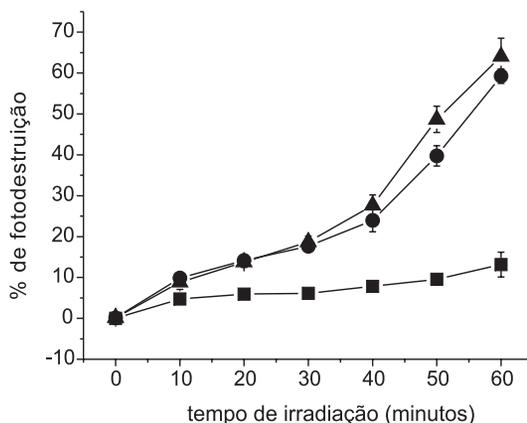


Figura 2. Porcentagem de fotodestruição, de eritrócitos, em função do tempo de irradiação com luz visível, na presença de VOOEP (■), OEP (●) e *m*-TMP (▲).

A fotodestruição de eritrócitos ocorre devida a fotoxidação de proteínas e fosfolipídios presentes na membrana do eritrócito. Esta fotoxidação, ocasionada por EROs, resulta na formação de poros e no aumento da mobilidade dos fosfolipídios, o que provoca a ruptura da membrana e liberação de hemoglobina para o meio extracelular [9].

A Figura 3 demonstra que a adição de manitol, no meio de reação, provocou uma certa queda na porcentagem de fotodestruição, de eritrócitos, mediada pelas três porfirinas. Sendo o manitol, um supressor de HO \cdot , pode-se deduzir que houve participação do O $_2^{\cdot-}$ e, portanto, ocorrência do mecanismo tipo I. No entanto, deve-se ressaltar, que o HO \cdot não é gerado somente no mecanismo tipo I. O $^1\text{O}_2$, gerado no mecanismo tipo II, pode, também, provocar a geração de HO \cdot através, por exemplo, da inibição da enzima catalase [10]. Esta enzima, presente nas células, é responsável pela conversão de H $_2\text{O}_2$ em H $_2\text{O}$ e O $_2$. Este processo protege as células dos efeitos deletérios ocasionados pelo H $_2\text{O}_2$ e impede a transformação desta espécie em HO \cdot [11].

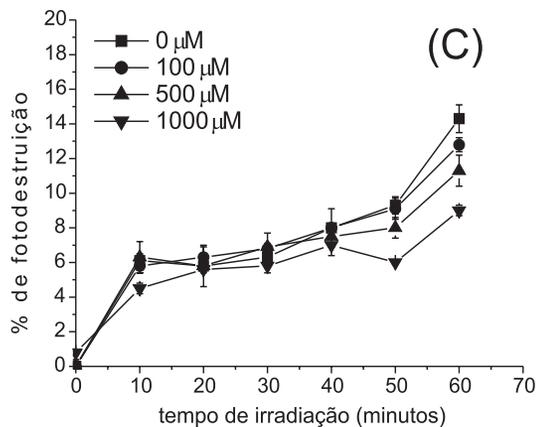
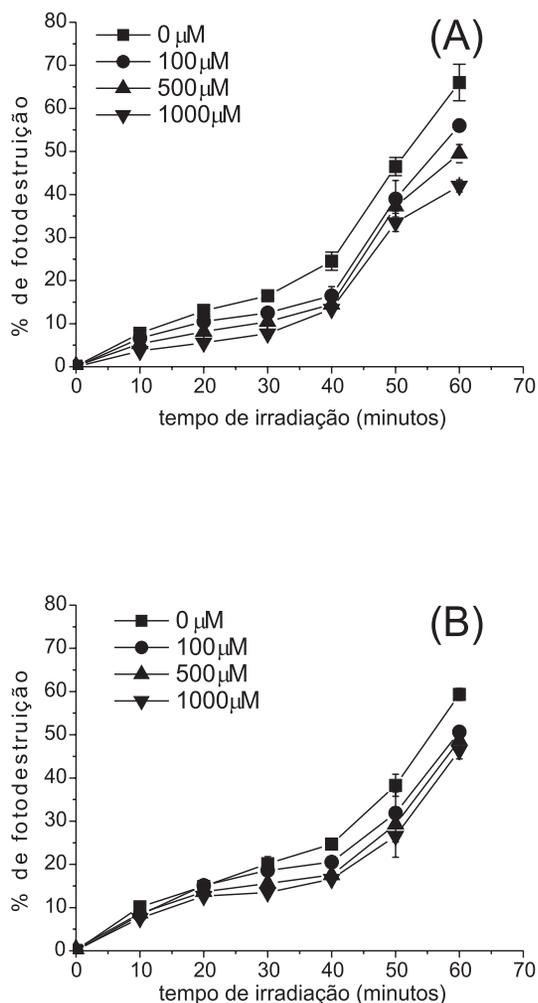


Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de manitol na porcentagem de fotodestruição de eritrócitos ocasionada por *m*-TMP (A), OEP (B) e VOOEP (C).

Uma forte evidência da participação do $^1\text{O}_2$, neste trabalho, reside no fato de que a adição de D $_2\text{O}$ provocou aumento na porcentagem de fotodestruição celular, ocasionada pelas três porfirinas (Fig.4). O tempo de vida do oxigênio singlete é profundamente influenciado pela natureza do solvente [12-14]. Em água comum, por exemplo, é cerca de 4,0 ms, já em água deuterada, este tempo de vida situa-se em torno de 70 ms. Em geral, em solventes que não possuem ligações C-H e grupos hidroxila na sua estrutura, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ tende a valores mais elevados. Por exemplo, para o tetracloreto de carbono, o tempo de vida do $^1\text{O}_2$ é de cerca de 30 ms, e em clorofórmio é de 250 ms [14]. Em sistemas biológicos, o oxigênio singlete apresenta tempos de vida extremamente baixos, inferiores a 0,04 ms, o que faz com que seu raio de ação seja extremamente reduzido [4, 15, 16]. Isto é muito importante, em tratamentos com TFD, pois o $^1\text{O}_2$ acaba agindo somente na região do tecido tumoral, evitando a destruição desnecessária de tecido sadio, vizinho do tumor. A razão para certos grupos funcionais suprimirem o $^1\text{O}_2$, encontra-se na possibilidade de transferência de energia eletrônica do $^1\text{O}_2$ para certos estados vibracionais associados às espécies supressoras. No caso de D $_2\text{O}$, utilizado neste estudo, pode-se afirmar que como esta molécula possui uma energia vibracional menor do que a água comum, isso favorece um aumento de 10 vezes no tempo de vida do $^1\text{O}_2$ em relação à H $_2\text{O}$ [17] e conseqüentemente aumenta a porcentagem de fotodestruição de eritrócitos.

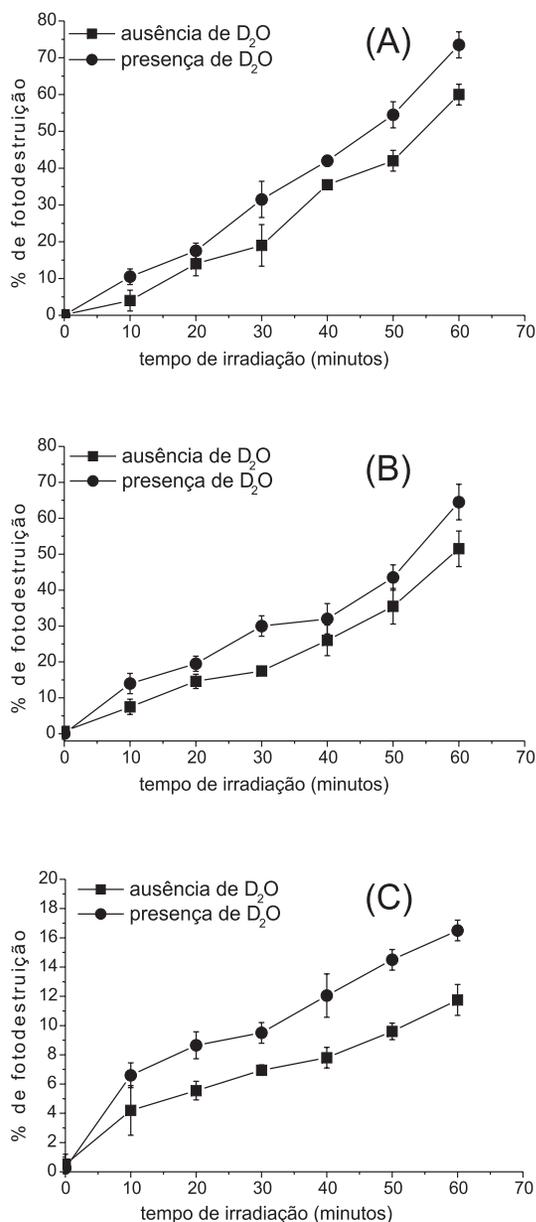


Figura 4. Efeito de D₂O 50% na porcentagem de fotodestruição de eritrócitos ocasionada por *m*-TMP (A), OEP (B) e VOOEP (C).

Além do aumento, da porcentagem de fotodestruição, proporcionado por D₂O, outro fato que reforçou a participação do ¹O₂ neste estudo, foi a diminuição, da fotodestruição, provocada por azida e L-histidina (Figuras 5 e 6) A azida transfere elétrons para o ¹O₂ regenerando o oxigênio no estado fundamental o que faz diminuir a quantidade de ¹O₂ no meio de reação. A L-histidina, por sua vez,

diminui a quantidade de ¹O₂, reagindo com o mesmo para formar endoperóxidos que se decompõem em uma mistura complexa de produtos [18].

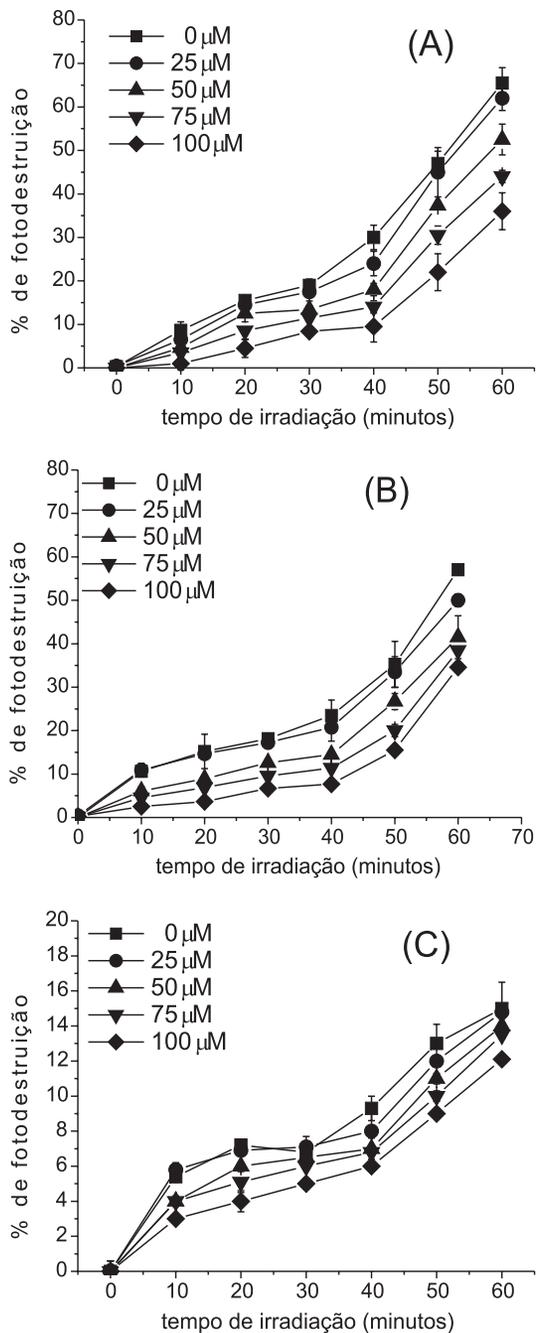


Figura 5. Efeito de diferentes concentrações de azida de sódio na porcentagem de fotodestruição de eritrócitos ocasionada por *m*-TMP (A), OEP (B) e VOOEP (C).

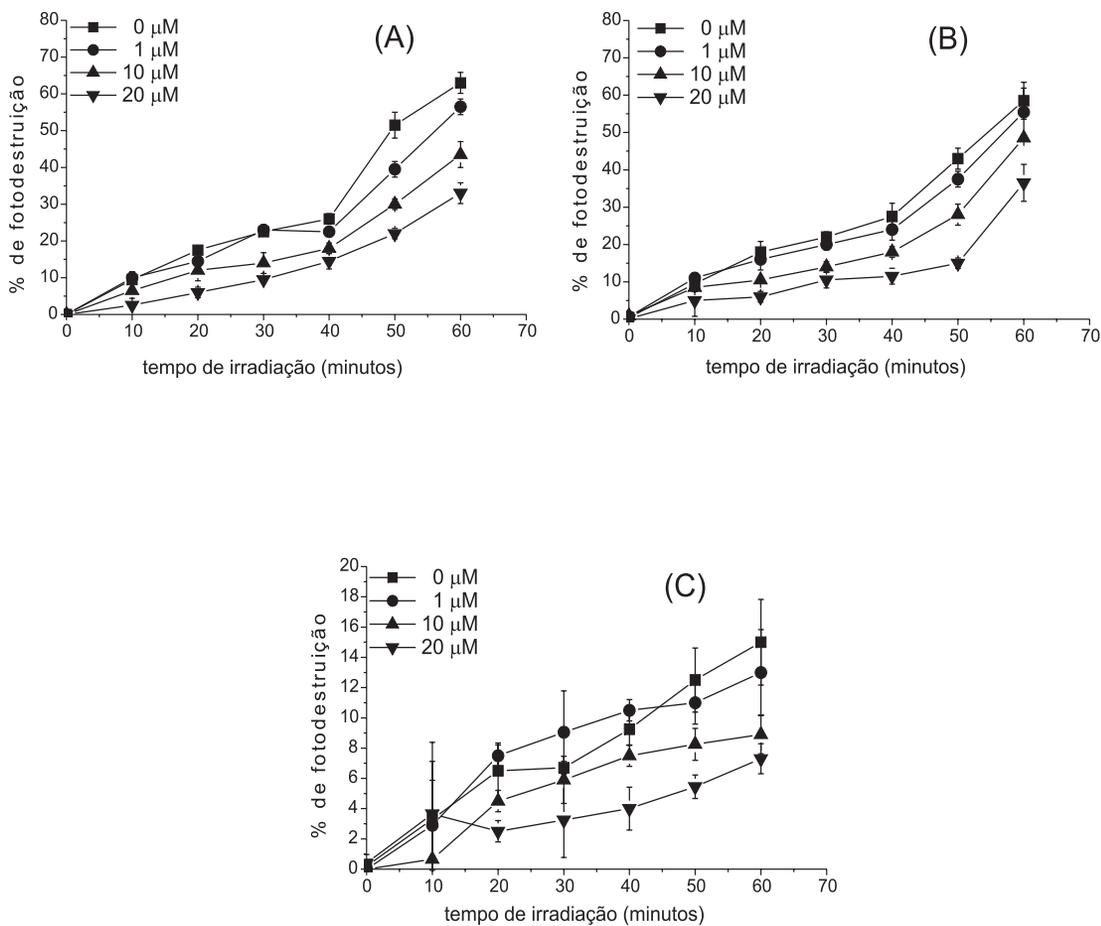


Figura 6. Efeito de diferentes concentrações de L-histidina na porcentagem de fotodestruição de eritrócitos ocasionada por *m*-TMP (A), OEP (B) e VOOEP (C).

Conclusão

Pode-se concluir, que tanto *m*-TMP quanto OEP e VOOEP foram capazes de causar a destruição de eritrócitos na presença de luz e oxigênio. Este processo ocorreu, principalmente, via mecanismo tipo II, ou seja, com participação do $^1\text{O}_2$. Os resultados, deste trabalho, demonstram que as substâncias, investigadas, possuem propriedades fotossensibilizantes e estimulam estudos, posteriores, que visem a aplicação, das mesmas, em Terapia Fotodinâmica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro e a Dilmara Lopes Vicentim, Michele Goulart e Heloisa Cristina Acosta, do Hemocentro do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pela doação de sangue.

Recebido em 03/05/2004

Aceito em 11/09/2004

J. N. Ribeiro, R. A. Jorge. Determination of the mechanism of destruction of cell mediated by *meso*-tetramesitylporphyrin, octaethylporphyrin, vanadyl octaethylporphyrin and visible light.

Abstract: Photodynamic therapy is a clinical treatment that employs a combination of a photosensitizer, oxygen, and visible light for the therapy of cancer. This technique is characterized by the systemic administration of photosensitizer, which is preferentially retained by tumoral tissue. The subsequent irradiation, with visible light, cause excitation of the photosensitizer resulting in the production of reactive oxygen species such as superoxide radical and singlet oxygen. These reactive species generate a sequence of oxidative events resulting in cancer cell death. The superoxide is generated in the type I mechanism by electron transference from excited photosensitizer to ground-state oxygen. Singlet oxygen is generated in the type II mechanism by energy transference from excited photosensitizer to ground-state oxygen. In this study we investigated the photosensitizing properties of three porphyrins. The results allow for the conclusion that the three porphyrins caused the destruction of cells in the presence of light and oxygen. This event was increased by deuterium oxide and inhibited by singlet oxygen scavengers indicating the predominance of type II mechanism.

Keywords: Photodynamic Therapy; porphyrins; reactive oxygen species.

Referências

- [1]. I. A. MacDonald, T. J. Dougherty, J. Porphyr. Phtalocya. 5 (2001) 105.
- [2]. A. E. H. Machado, Quim. Nova. 23(2) (2000) 237.
- [3]. K. Keyer, J. A. Imlay, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93 (1996) 13635.
- [4]. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan, Q. Peng, J. Nat. Cancer. Inst. 90 (1998) 889.
- [5]. Laser Medical Research Foundation. [http://209.41.253.5:80/pdt@lmrf]. Data de acesso: 10 de janeiro de 2004.
- [6]. National Cancer Institute. [http://cancernet.nci.nih.gov]. Data de acesso: 14 de janeiro de 2004.
- [7]. J. P. Daziano, S. Steenken, C. Chabannon, P. Mannoni, M. Chanon; M. Julliard, Photochem. Photobiol. 64(4) (1996) 712.
- [8]. A. M. Crouch, C.H. Langford, J. Photoch. Photobio. A. 52 (1990) 55.
- [9]. I. B. Zavodnik, L. B. Zavodnik, M. J. Bryszewska, J. Photochem. Photobiol B. 67 (2002) 1.
- [10]. T. G. Gantchev, J. E. Vanlier, Photochem. Photobiol. 62(1) (1995) 123.
- [11]. A. L. Lehninger, Princípios de Bioquímica. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000.
- [12]. P. Olgiby, C. S. Foote, J. Am. Chem. Soc. 105 (1983) 3423.
- [13]. A. A. Frimer, (Ed); Singlet Oxygen, CRC press, Califórnia, 1989.
- [14]. F. Wilkinson, W. Phillip Helmam, A. B. Ross, J. Phys. Chem. Ref. Data. 24 (1995) 663.
- [15]. M. J. Ochsner, Photochem. Photobiol B. 39 (1997) 1.
- [16]. G. Jori, EPA Newsletter. 60 (1997) 12.
- [17]. R. Schmidt, J. Am. Chem. Soc. 111 (1989) 1989.
- [18]. B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge. Free Radicals in Biology and Medicine, Third Edition, Oxford University Press, New York, 936p, 1999.