

PROPRIEDADES ANTITUMORAIS E ANTIMICROBIANAS DE PORFIRINAS BASEADAS EM FERRO, ZINCO E MANGANÊS

Jade de Sousa Moreira da Silva¹; Rogerio Serrano Gallo²; Katia Cristina Ugolini Mugnolo³

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: jadesms@hotmail.com¹

Doutorando em Biotecnologia; e-mail: rogeriosg@umc.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: katiac@umc.br³

Área do Conhecimento: Bioquímica

Palavras chave: porfirinas, fotosensibilizadores, atividade antitumoral.

INTRODUÇÃO

Porfirinas são moléculas muito estudadas atualmente devido ao seu alto potencial antitumoral, tendo como atração sua alta afinidade por tecidos neoplásicos e pouca toxicidade ao organismo devido ao seu potencial gerador de espécies radiculares quando irradiadas com luz ultra-violeta, provocando uma desestabilização celular levando-a a morte, e, portanto, já estão sendo utilizadas em terapias fotodinâmicas (PDT) no tratamento de algumas variações de tumor de pele. São moléculas provenientes de modelagem sintética ou biológica, que apresentam macrociclos tetrapirrólicos policarboxilados e que podem acomodar em sua região central um íon metálico. Na grande maioria dos casos o metal envolvido é o ferro, porém podem também apresentar metais como cobre, zinco, manganês, rutênio e outros (PEREIRA *et al.*, 2013). Sua utilização, entretanto, costuma estar vinculada à fotoativação por luz ultra-violeta que, por si só, é um agente carcinogênico quando mal-empregado. Portanto, encontrar porfirinas que possam ser fotoativadas por uma luz sem efeitos deletérios, como a luz branca, é o desafio deste projeto.

OBJETIVOS

Determinar a ação antitumoral e antimicrobiana das porfirinas baseadas em ferro, zinco e manganês TMPyP₄, ZnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP e MnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP.

METODOLOGIA

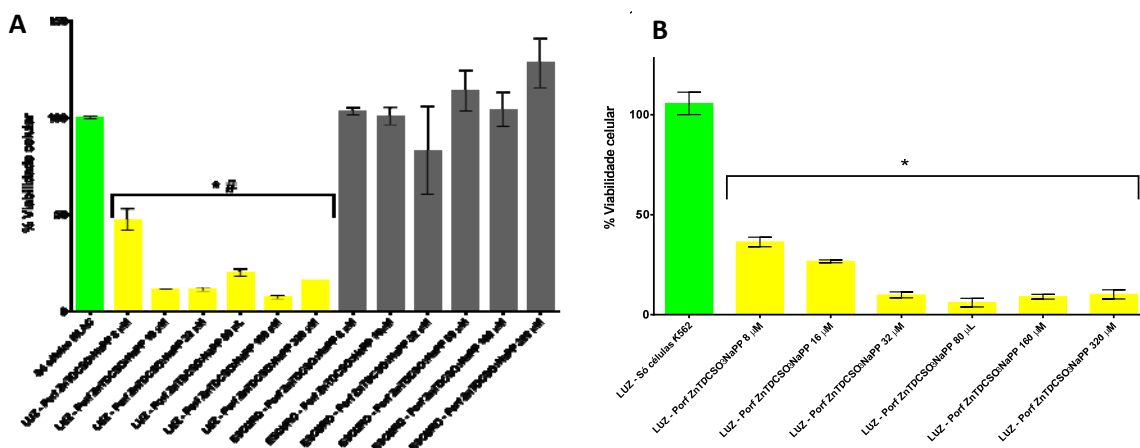
Para o desenvolvimento do projeto foram utilizadas células de linhagem de músculo liso de aorta de coelho (MLAC) e células de linhagem mieloide (K562) em cultura, cultivadas em meio de cultura DEMEN e RPMI, respectivamente, e incubadas à temperatura 37°C e em atmosfera de 5% de dióxido de carbono. As células K562, obtidas comercialmente, foram submetidas a tratamento com diferentes concentrações das porfirinas TMPyP₄ (5,10,15,20-Tetrakis(1-methyl-4-pyridinio)porphyrin tetra(p-toluenesulfonate), ZnTDC(SO₃Na)PP e MnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP. O experimento foi reproduzido igualmente em duas placas de ELISA de 96 poços sendo que uma placa permaneceu em condições de privação de luz, enquanto a outra placa foi irradiada, uniformemente, com luz branca LLUM Bulbo LED A60, bivolt ligada em 110V, 60 mm de diâmetro por 109 mm de altura total, luz branca 10W, fluxo luminoso 780 lm, temperatura de cor 6400K, ângulo de abertura 180°, fator de potência maior que 0,50, IRC maior que 80, frequência nominal 50/60 Hza. A irradiação ocorreu com a lâmpada sendo mantida a 10 cm das placas de teste. Ambos os grupos (escuro e irradiado) foram incubados por 48 horas em estufa a

37°C e atmosfera com 5% de CO₂ e então submetidos à mensuração da viabilidade celular por teste de MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Foram empregados como controle positivo de morte celular o dimetilsulfóxido (DMSO), o peróxido de hidrogênio e o azul de metileno. Para a caracterização espectroscópica e análise de alterações espectrais quando da irradiação luminosa em função do tempo, foi empregado o equipamento fotodiodo Multispec 1501 da Shimadzu Corporation. Para os testes de atividade antimicrobiana foram semeados os diferentes microorganismos em placas de ágar Muller Hinton e depositadas em poços escavados no meio as diferentes concentrações de porfirinas testadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos testes de viabilidade celular por MTT com porfirinas de ZnTDC(SO₃Na)PP (Figura 1) e TMPyP4 (Figura 2) promovem significativa diminuição da viabilidade celular tanto na linhagem de células normais (MLAC) quanto tumorais (K562) quando irradiadas com luz branca. Se o sistema mantido no escuro, não houve diferença significativa na viabilidade celular em relação ao controle (só células). Para a porfirina TMPyP₄ a redução da viabilidade celular se mostrou dose dependente e mais expressiva sobre a linhagem K562, onde o IC₅₀ foi calculado em 13,3 μM de porfirina contra 50,24 μM para a linhagem MLAC. Para a porfirina MnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP foi observado um efeito inesperado, o maior crescimento celular representado pelo aumento da viabilidade em relação ao controle só células, tanto com a porfirina irradiada quanto com o sistema no escuro e para as duas linhagens celulares (figura não mostrada). Na análise por espectroscopia no UV-vis (Figura 3) observa-se decaimento da banda Soret (λ máximo em 424 nm) em função do tempo de irradiação da porfirina TMPyP₄, selecionada para este experimento em função dos resultados promissores apresentados no teste de viabilidade celular. A alteração espectral observada pode ser decorrente da geração de espécies reativas de oxigênio quando da irradiação da porfirina com luz branca, sendo esta uma provável explicação para o efeito citotóxico da TMPyP₄. Os resultados da atividade antimicrobiana sob cepas de bactérias gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus sp*) e gram negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) se mostraram negativos quando da irradiação das três porfirinas com luz branca e também no escuro.

Figura 1. Teste de viabilidade celular por MTT para células MLAC (A) e K562 (B) sob influência de diferentes concentrações de porfirina de ZnTDC(SO₃Na)⁺PP, na ausência de luz (barras cinza) e sob irradiação de luz branca (barras amarelas). Controle negativo (só células) apresentado como barra em verde. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo considerando p<0,05. # Resultado estatisticamente diferente de seu respectivo (mesma concentração) no escuro considerando p<0,05.



branca (barras amarelas). Controle negativo (só células) apresentado como barra em verde. * Resultado estatisticamente diferente do controle negativo considerando $p < 0,05$. # Resultado estatisticamente diferente de seu respectivo (mesma concentração) no escuro considerando $p < 0,05$.

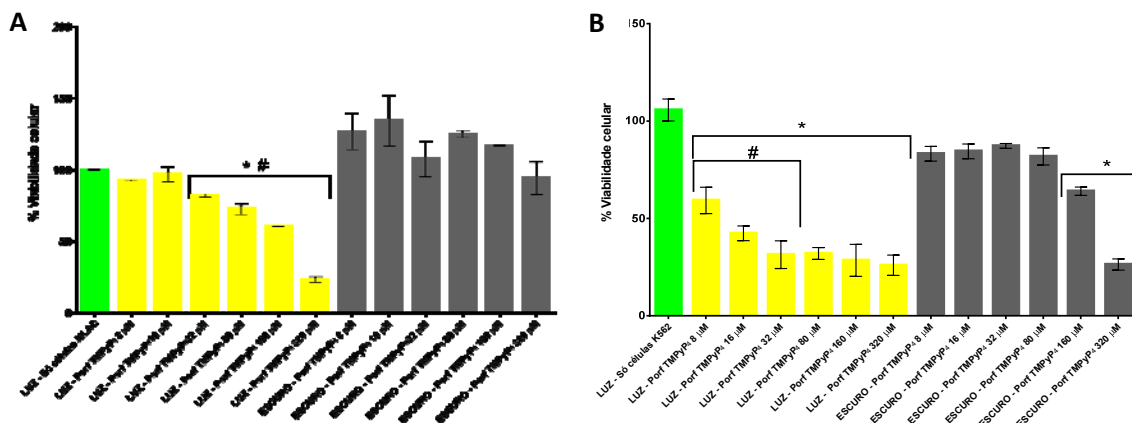
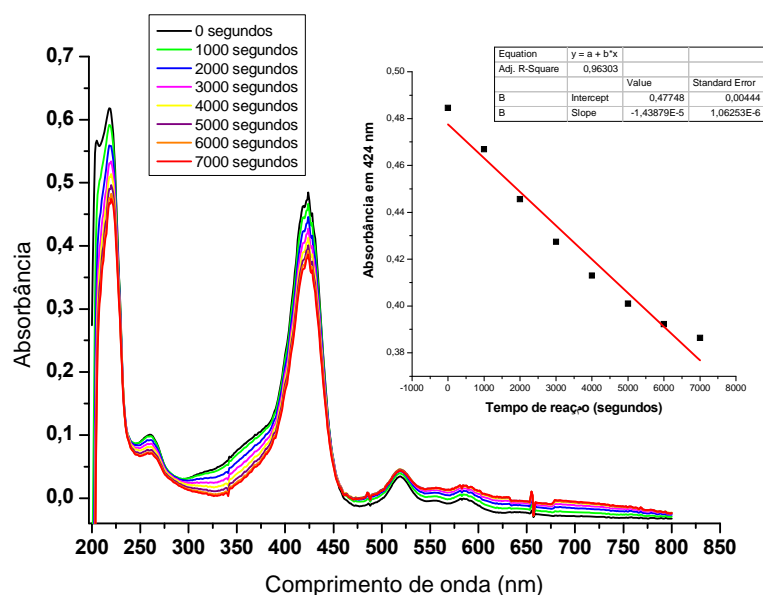


Figura 3. Espectros da porfirina TMPyP₄ irradiada com a luz branca de LED no intervalo de 0 a 7000 segundos. Na figura principal, valores de absorvância em cada um dos comprimentos de onda mensurados em função do tempo. No inserto, cinética de decaimento da banda Soret da porfirina TMPyP₄ (424 nm) em função do tempo de reação (tempo de exposição à luz), bem como equação da reta obtida a partir do plote dos valores de absorvância.



CONCLUSÕES

Os resultados obtidos até o momento revelaram que as porfirinas TMPyP₄ e ZnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP exercem efeito citotóxico sobre células normais em cultura quando irradiadas com luz branca, não apresentando tal efeito quando no escuro. A porfirina TMPyP₄, especificamente, demonstrou tal comportamento de modo dose-dependente, o que não ocorreu com a porfirina de zinco. A porfirina MnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP, diferentemente das outras duas, não apresentou efeito citotóxico sobre as células normais em cultura, tanto na presença de irradiação com luz branca quanto no escuro. Ao contrário, determinou aumento expressivo do crescimento celular. Na análise comparativa entre as porfirinas TMPyP₄ e ZnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP, a TMPyP₄ foi a que apresentou resultados mais

promissores, dado que aqui os efeitos foram dose-dependentes e com valores de IC50 menores quando sua ação se deu sobre a linhagem tumoral testada (K562). Os resultados obtidos na cinética por espectrofotometria da porfirina TMPyP₄ permitiu inferir que a luz exerce efeito tempo-dependente sobre a estrutura da porfirina, mais especificamente *bleaching*, o que pode ser decorrente da formação de espécies reativas de oxigênio e estas os elementos que diminuíram a viabilidade celular nos experimentos por MTT. Para confirmar esta hipótese novos experimentos deverão ser realizados. Para a porfirina MnTDC(SO₃⁻Na⁺)PP, novos experimentos estão previstos visando buscar compreender como a presença desta porfirina, tanto em condições de ausência ou presença de irradiação, aumentou o crescimento das células MLAC e K562 em cultura. Na continuidade deste projeto serão realizados novos testes de atividade antimicrobiana destas porfirinas quando irradiadas com luz branca e associadas a óleo essencial de bergamota como um agente potencializador de efeito. Também estão previstos testes para determinar o efeito destas porfirinas sobre sistemas-modelo de membrana celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CERQUEIRA F.M.; MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo. São Paulo – SP.

FERRARI, C.K.B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. Rev. Nutr., Campinas, v.11,n.1, pp. 3-14, 1998.

MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. Cienc.Cult. 66(3), versão online, 2014. ISSN 2317-6660

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results means. BR J Pharmacol. v. 142, n.2, pp. 231-255, 2004.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M. Free Radicals in Biology and Medicine, 4^a. Ed, Oxford University Press, 2007.

ALVES, A.N.L.; BURATTINI, M.N.; SUMITA, N.M.; Della ROSA, H.V. Validação de metodologia para dosagem de porfirinas urinárias por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 43, n. 4, 2007.

BONNETT, R. Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. London: Gordon and Breach Science Publisher, 2000.

RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A.; SILVA, A. R.; FLORES, A. V.; RONCHI, L. M.; TEDESCO, A.C. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. Eclética Química. v. 32, n.1. São Paulo, 2007.

FERREIRA, H. LUCIO, M.; SIQUET, C.; REIS, S. Utilização de modelos membranares na avaliação da atividade de fármacos. Química, v.99, pp. 39-51, 2005. Disponível em http://www.spq.pt/boletim/docs/boletimSPQ_099_039_09.pdf.

MORRIS, Mark J. et al. The porphyrin TmPyP4 unfolds the extremely stable G-quadruplex in MT3-MMP mRNA and alleviates its repressive effect to enhance translation in eukaryotic cells. *Nucleic acids research*, v. 40, n. 9, p. 4137-4145, 2012.