

ARTIGO ORIGINAL

Avaliação pré-clínica de novas substâncias para uso como futuras drogas fotoquimioterápicas**Joselito Nardy Ribeiro¹, Gabriela Pessotti Novaes¹, Marciela Belisário¹, André Romero da Silva², Araceli Verónica Flores Nardy Ribeiro^{1,3}****Resumo**

O presente trabalho contempla a avaliação da capacidade fotossensibilizante de alguns derivados porfirínicos para futuro emprego em fotoquimioterapia. As substâncias testadas foram: protoporfirina IX (PpIX), protoporfirina IX de magnésio (MgPpIX), protoporfirina IX de zinco (ZnPpIX), octaetilporfirina (OEP) e octaetilporfirina de vanadil (VOOEP). Os testes consistiram na avaliação e comparação da capacidade destas substâncias em oxidar biomoléculas e destruir células na presença de luz e oxigênio. Os resultados revelaram que as diferenças observadas na eficiência destas porfirinas podem estar associadas com as diferenças nas estruturas das mesmas. Foi verificado que PpIX, MgPpIX e ZnPpIX são mais eficientes que OEP e VOOEP na fotoxidação de biomoléculas e fotodestruição de células. Os dados obtidos indicam a possibilidade de um futuro emprego destas porfirinas em fotoquimioterapia.

Descritores: 1. *Fotoquimioterapia;*
2. *Porfirinas;*
3. *Biomoléculas;*
4. *Células.*

Abstract

The work includes the assessment of photosensitizing capacity of some porphyrinic derivatives for future application in PDT. We evaluated the photosensitizing potential of octaethylporphyrin (OEP), vanadyl octaethylporphyrin (VOOEP), protoporphyrin IX (PpIX), zinc protoporphyrin IX (ZnPpIX) and magnesium protoporphyrin IX (MgPpIX) for use in photochemotherapy. This study was performed through the percentage of biomolecules photooxidation (tryptophan - Trp and bovine serum albumin - BSA) and cells photohemolysis provoked by OEP, VOOEP, PpIX, ZnPpIX and MgPpIX. The results demonstrated that PpIX, ZnPpIX and MgPpIX are more efficient than OEP and VOOEP in the oxidation of biomolecules and hemolysis of cells in the presence of light and oxygen. The differences observed in the photodynamic activity between porphyrins could be associated with differences in their molecular structures. These results stimulate new studies with the objective to transform these drugs into new options for use in photochemotherapy.

Key Words: 1. *Photochemotherapy;*
2. *Porphyrins;*
3. *Biomolecules;*
4. *Cells.*

¹ Laboratório Priestley, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES.

² Coordenadoria de Técnico em Químicas do Instituto Federal do Espírito Santo-IFES, Campus Aracruz.

³ Coordenadoria de Licenciatura do Instituto Federal do Espírito Santo - IFES, Campus Vitória.

Introdução

Todos os anos milhões de pessoas morrem de câncer no mundo ⁽¹⁾. No Brasil, só para o câncer de mama é esperado um número assustador de novos 49.400 casos até o final de 2008 ⁽²⁾. No entanto, apesar destes dados alarmantes, o avanço das pesquisas que buscam entender e desenvolver métodos para a cura desta enfermidade aponta para um cenário bastante promissor ⁽¹⁾.

Atualmente, os três tratamentos classicamente utilizados são: a quimioterapia, radioterapia e a cirurgia. No entanto, apesar do relativo sucesso, os mesmos apresentam efeitos colaterais graves⁽³⁾. Este fator, aliado ao da perspectiva de cura nem sempre eficaz, tem estimulado a pesquisa e aplicação de outros tipos de tratamentos, dentre os quais se destaca a Fotoquimioterapia, também conhecida como Terapia Fotodinâmica (PDT, *do inglês Photodynamic Therapy*) ⁽⁴⁾.

A PDT é um tratamento clínico, com poucos efeitos colaterais, que emprega a combinação de uma fonte de luz, oxigênio e uma substância fotossensibilizadora (SFTS) para o tratamento de uma variedade de tumores. Esta técnica se baseia na administração sistêmica da SFTS no paciente e, após algumas horas, irradiação do tecido doente com a fonte de luz. A SFTS, excitada pela luz, transfere energia e/ou elétrons para o oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS, *do inglês Reactive Oxygen Species*). Tais espécies geram um estresse oxidativo, no tecido tumoral, ocasionando a sua morte por apoptose e/ou necrose ⁽⁵⁾.

Apesar de algumas drogas, aprovadas pela FDA (*Food and Drug Administration*), já estarem sendo amplamente empregadas em PDT, a busca por novos fármacos mais eficientes e com menos efeitos colaterais, tem sido uma rotina em nosso laboratório e em outros ⁽⁶⁻¹¹⁾. Este artigo, por exemplo, apresenta os resultados preliminares obtidos com algumas substâncias que estão sendo investigadas pela nossa equipe. Os novos compostos avaliados são derivados de porfirinas conhecidos como: octaetilporfirina (OEP), octaetilporfirina de vanadil (VOOEP), protoporfirina IX (PpIX), protoporfirina IX de zinco (ZnPpIX) e protoporfirina IX de magnésio (MgPpIX) (Fig.1). As porfirinas são conhecidas por possuir grande capacidade de absorver luz e transferir esta energia para o oxigênio podendo gerar ROS em quantidade suficiente para destruir um dado tecido tumoral⁽¹²⁾. Para avaliar o potencial fotoquimioterápico, das porfirinas

citadas, foi verificada, inicialmente, a capacidade destas em oxidar biomoléculas (aminoácido e proteína) e foto-hemolisar células modelo (eritrócitos) na presença de luz e oxigênio. Os resultados foram comparados com os obtidos para o Photofrin[®], uma droga porfirínica amplamente empregada em tratamentos clínicos com PDT. O baixo custo e a eficiência destes ensaios justificam o emprego dos mesmos na pré-seleção de substâncias potencialmente promissoras para uso em fotoquimioterapia.

Métodos

Materiais e reagentes

As porfirinas foram obtidas da Frontier Scientific Inc. (Logan Utah, USA), e o Photofrin[®] foi cedido pela Axcan Pharma Ltda. As biomoléculas proteína albumina bovina (BSA) e o aminoácido triptofano (Trp) foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, USA). O NaCl, NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄ foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os equipamentos utilizados foram: espectrofotômetro SP-220 Biospectro, espectrofluorímetro da marca Perkin Elmer modelo LS55, canhão de luz contendo lâmpada de mercúrio Philips HPLN 80W e banho de ultra-som Unique Ultracleaner 1400 40kHz.

Ensaio de fotooxidação de biomoléculas

Para este teste foram preparadas soluções contendo 25 mM do aminoácido triptofano (Trp) ou 10 mM da proteína albumina bovina (BSA), além de 2,3 mg/L de PpIX ou ZnPpIX ou MgPpIX ou OEP ou VOOEP. As soluções foram tamponadas com tampão fosfato salino (PBS: 0,15M de NaCl, 1,9mM de NaH₂PO₄, 8,1mM de Na₂HPO₄, pH 7,4) e saturadas com oxigênio. Em seguida foram irradiadas com luz de mercúrio 80W a uma distância de 5 cm durante 60 minutos sendo a dosagem de luz igual a 22,57 J/cm². Após este tempo, as fluorescências de Trp (em 360 nm) e de BSA (em 330 nm) foram obtidas em espectrofluorímetro, excitando Trp e BSA em 280 nm. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem (%) de fotooxidação (foto-destruição) de biomoléculas, medindo-se as fluorescências no tempo zero e comparando as mesmas com as obtidas após 60 minutos de irradiação. As possíveis quedas na intensidade de fluorescências das biomoléculas indicam que as mesmas sofreram fotodegradação. Foram realizados ensaios de controles na ausência de luz ou na ausência das

porfirinas, para se descontar os efeitos da luz ou das porfirinas separadamente.

Ensaio de foto-hemólise de eritrócitos

Para o ensaio de foto-hemólise (foto-destruição de eritrócitos) foram preparadas soluções contendo 0,3% (v/v) de eritrócitos, tampão PBS pH 7,4 e 2,3 mg/L das porfirinas adicionadas separadamente. Tais amostras foram saturadas com oxigênio e irradiadas com lâmpada de mercúrio durante 60 minutos (dosagem de luz igual a 22,57 J/cm²). A quantificação da foto-hemólise foi realizada no final dos 60 minutos, através da leitura de absorbância (em 542 nm) da hemoglobina liberada, por células destruídas, no meio de reação. Um possível aumento na absorbância de hemoglobina extracelular indica rompimento (hemólise) de eritrócitos. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de eritrócitos foto-destruídos. Foram realizados ensaios de controle na ausência de luz ou na ausência das porfirinas.

Resultados e discussão

Fotoxidação de biomoléculas

As ROS produzidas em tratamentos com PDT podem danificar seriamente as biomoléculas de uma célula tumoral⁽¹³⁾. O oxigênio singlete (¹O₂), uma espécie altamente reativa, pode danificar lipídeos, ácidos nucleicos e resíduos de aminoácidos presentes em proteínas, especialmente o Trp. Se lipídios e proteínas são constituintes essenciais de membranas biológicas, os danos a estas moléculas, em uma célula tumoral, podem ocasionar rompimento de sua membrana plasmática levando-a a morte¹³. É interessante ressaltar, que o ¹O₂ é a principal espécie reativa produzida em tratamentos com PDT, sendo que a maioria das porfirinas, quando expostas a uma fonte de radiação, é eficiente na produção desta espécie⁽¹⁴⁾. Isto é vantajoso do ponto de vista clínico, pois além ser muito agressivo para o tumor, o ¹O₂ possui um tempo de vida muito curto levando seu raio de ação a ficar restrito na região do tecido doente. Isto evita que os tecidos saudáveis, vizinhos ao tumor, sejam danificados³. Em estudos anteriores nós detectamos que algumas porfirinas, aqui avaliadas, são eficientes em produzir ¹O₂^(7,15).

Deve-se destacar que ensaios *in vitro* de fotoxidação de biomoléculas, podem ser utilizados para se avaliar o potencial fotoquimioterápico de muitas substâncias⁽¹⁶⁾. Se um dado composto é capaz de

provocar a fotoxidação de um aminoácido e uma proteína *in vitro*, é provável que seja capaz, também, de provocar a fotoxidação de proteínas que constituem as células tumorais. Esta é uma ferramenta de avaliação pré-clínica muito valiosa e de custo reduzido, pois permite, como já dito antes, a pré-seleção de substâncias fotoativas para a realização de testes mais avançados e de elevado custo. Isto reduz o tempo e o custo da pesquisa⁽¹⁶⁾.

Em relação aos resultados, pode-se observar nas Figuras 2 e 3 que todas as substâncias foram capazes de oxidar biomoléculas, na presença de luz e oxigênio. Pode-se perceber que as protoporfirinas IX (PpIX, ZnPpIX e MgPpIX) metaladas ou não foram as mais eficientes em relação a OEP e VOEP, sendo que seus efeitos podem ser comparados ao do Photofrin[®] (fotoquimioterápico comercial). Em relação a OEP, percebe-se que a mesma é mais eficiente que VOOEP, o que nos leva a concluir que a adição do grupo vanadil (V=O), formado por vanádio e oxigênio, na estrutura de OEP, diminui bastante sua eficiência. Sabe-se que apesar das porfirinas serem bastante eficientes na geração fotoquímica de ROS, modificações químicas em sua estrutura, tanto na sua superfície quanto no centro do seu anel, podem aumentar ou diminuir sua capacidade de gerar espécies reativas⁽¹⁴⁾. A adição de metais no seu centro pode, por exemplo, diminuir ou aumentar sua eficiência fotoquímica⁽¹²⁾. Os resultados deste trabalho demonstram, então, que a adição de Zn ou Mg no anel central de PpIX (Fig.1) não causa diminuição ou aumento de sua eficiência na geração de ROS, visto que as porcentagens de fotoxidação tanto para Trp (Fig.2) quanto para BSA (Fig.3) são bastante similares para as três protoporfirinas IX. No entanto, nós percebemos, que a presença destes metais aumenta a solubilidade de PpIX em meio aquoso, o que do ponto de vista clínico é bastante relevante, pois facilita uma possível aplicação *in vivo*.

Foi salientado, anteriormente, que a fotoxidação de biomoléculas é monitorada através do decaimento da fluorescência das mesmas. No caso de Trp, sua fotoxidação envolve destruição do seu anel indol pelo ¹O₂, sendo este anel, o responsável pela emissão de fluorescência^(17,18). Em relação a BSA, sua emissão de fluorescência diminui, devido ao fato do ¹O₂ atacar resíduos de histidina e triptofano presentes nesta proteína¹⁸. Tais aminoácidos, principalmente Trp nas posições 134 e 214, são os responsáveis pela emissão de fluorescência por parte de BSA⁽¹⁸⁾.

Foto-hemólise de eritrócitos

A capacidade de provocar a fotoxidação de biomoléculas demonstrada anteriormente, pelas porfirinas, estimulou a realização de ensaios com estruturas mais complexas. Para isso foram empregados eritrócitos (como modelo de células). Tal procedimento teve como finalidade avaliar a capacidade destas porfirinas em provocar o rompimento (lise) de membranas de células, na presença de luz e oxigênio. Ensaios de foto-destruição de eritrócitos têm sido empregados, com relativo sucesso, na pré-seleção de substâncias fotoativas ^(8,15,18,19).

Os resultados obtidos nesta etapa (Fig. 4) revelaram que a irradiação de eritrócitos, na presença das porfirinas e de oxigênio, provocou a hemólise destas células. Os resultados são semelhantes aos apresentados na fotoxidação de biomoléculas, ou seja, as protoporfirinas foram mais eficientes do que OEP e VOOEP e apresentaram resultados semelhantes ao Photofrin⁰. Eles revelam, também, que a adição do grupo V=O provoca considerável redução na atividade fotodinâmica de OEP. É bom destacar que na ausência de luz ou das porfirinas, não foi observada a hemólise de eritrócitos. Isto é relevante do ponto de vista clínico, quando se trata da fonte de luz, pois só serão ativadas as porfirinas que estiverem sendo irradiadas na região do tumor. Isto possibilita ao médico selecionar a área tecidual onde as porfirinas deverão ser ativadas, diminuindo o risco de lesão em tecidos saudáveis.

Em relação à hemólise de eritrócitos, a mesma é verificada através da liberação de hemoglobina no meio de reação. Tal evento pode ser monitorado, em espectrofotômetro, através do aumento de intensidade no espectro de absorvância da hemoglobina, em 542 nm, em função do tempo de irradiação ⁽⁸⁾. Esta hemoglobina é liberada, devido ao rompimento da membrana celular, ocorrido durante o tratamento. Este rompimento ocorre como resultado da fotoxidação de proteínas e fosfolípidios presentes na membrana dos eritrócitos. Esta fotoxidação, ocasionada principalmente por oxigênio singlete reativo, resulta na formação de poros que são conseqüência da mobilidade dos fosfolípidios, o que provoca ruptura da membrana e liberação de hemoglobina para o meio extracelular ⁽²⁰⁾. Os danos causados na membrana das células modelo (eritrócitos) simulam o que ocorre nas membranas das células tumorais tratadas com PDT ⁽¹⁷⁾.

Os resultados obtidos com PpIX, ZnPpIX e MgPpIX são importantes, pois a similaridade dos mesmos com os

obtidos para o Photofrin⁰ permite-nos vislumbrar a possibilidade de um futuro emprego destas porfirinas em PDT. É bom ressaltar que apesar do Photofrin⁰ ser bastante eficiente no tratamento de vários tumores, o mesmo apresenta alguns inconvenientes: primeiramente ele requer altas dosagens para a obtenção de uma resposta terapêutica satisfatória. Isto provoca efeitos colaterais como, por exemplo, aumento da freqüência urinária e espasmos da bexiga. Além disso, possui uma baixa seletividade para os tecidos tumorais, acumulando-se também em tecidos saudáveis. O seu longo tempo de permanência na região cutânea, após o tratamento, faz com que o paciente tenha que ficar ao abrigo da luz natural por um longo período ^(7,17). Estes são alguns dos problemas que têm estimulado a busca por novos fotoquimioterápicos.

Conclusões

Os resultados deste trabalho nos permitem concluir que a adição de grupamentos nas estruturas das porfirinas pode afetar de maneira considerável a atividade fotodinâmica das mesmas. Neste trabalho percebeu-se que a adição do grupo V=O na estrutura de OEP diminuiu bastante sua eficiência na fotoxidação de moléculas e foto-destruição de células. No entanto, a adição de magnésio e zinco na estrutura de PpIX não afetou sua atividade, mas melhorou sua solubilidade em água, o que é importante para futura aplicação *in vivo*. Foi observado, também, que a eficiência de PpIX, MgPpIX e ZnPpIX é bastante semelhante a de Photofrin⁰. Estes dados estimulam a realização de estudos mais avançados, com a finalidade de transformar estas porfirinas em mais uma opção para aplicação em fotoquimioterapia.

Referências Bibliográficas:

1. Pivetta M. Câncer, esperanças divididas. Revista FAPESP 2004; 99: 46-48.
2. Instituto Nacional do Câncer-INCA, www.inca.gov.br. Acesso em: setembro de 2008.
3. Machado AEH. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. Química Nova 2000; 23, n.2: 237-243.
4. Ribeiro JN, Flores AV, Mesquita R, Nicola JH, Nicola EM. Terapia Fotodinâmica: uma luz na luta contra o câncer. Physicae 2005; 5, n.2: 5-14.
5. Ribeiro JN, Silva AR, Jorge RA. Involvement of mitochondria in apoptosis of cancer cells induced

- by photodynamic therapy. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2004; 40, n.6: 385-392.
- Ribeiro JN, Silva AR, Rettori D, Jorge RA. Type II photooxidation mechanism of biomolecules using chloro (5,10,15,20-tetraphenylporinate) indium (III) as a photosensitizer. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2008; 19, n.7: 1311-1320.
 - Ribeiro JN, Silva AR, Pelegrini A, Tedesco AC, Jorge. Influence of vanadyl group in the photodynamic activity of octaethylporphyrin. *Applied Cancer Research* 2005; 25, n.3: 142-150.
 - Ribeiro JN, Jorge RA. Análise das propriedades anticancerígenas de meso-tetramesitilporfirina empregando métodos espectroscópicos. *Analytica* 2004; 2, n.10: 43-49.
 - Ribeiro JN, Ronchi LM, Flores AV, Silva AR, Sena GL, Jorge RA. Influência da agregação e do fotobranqueamento na atividade fotodinâmica de protoporfirina de magnésio. *Revista Capixaba de Ciência e Tecnologia* 2007; 2: 5-21.
 - Marianne B, Riad AB, Fatemeh V, Michele S, Jean-Claude J, Dominique B, Herve F, Avigdor S, Yoram S, David B, Francine BC. Evaluation of the New Photosensitizer Stakel (WST-11) for Photodynamic Choroidal Vessel Occlusion in Rabbit and Rat Eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 2008; 49: 1633-1644.
 - Yan H, Guoxing X, Yiru P, Hong L, Xuedong Z, Maosong X. Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate ($ZnPcS_4$): A New Photosensitizer for Photodynamic Therapy in Choroidal Neovascularization. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2007; 23, n.4: 377-386.
 - Spikes JD. Photobiology of porphyrins. In porphyrin localization and treatment of tumors. Doiron DR, Gomer CJ (eds). Alan RL, New York; 1984. 275p.
 - Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Science* 2002; 1: 1-21.
 - Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanines series for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews* 1995; 24, n.1: 19-33.
 - Ribeiro JN, Jorge RA. Determinação do mecanismo de destruição de células mediado por meso-tetramesitilporfirina, octaetilporfirina, octaetilporfirina de vanadil e luz visível. *Eclética Química* 2005; 30, n.1: 7-13.
 - Ribeiro JN, Jorge RA, Flores AV, Silva AR, Ronchi LM. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. *Eclética Química* 2007; 32: 7-14.
 - Mac Donald IJ, Douguert TJ. Basic principles of photodynamic therapy. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* 2001; 5, n.2: 105-129.
 - Ribeiro JN. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica. Tese de Doutorado do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2005. 88p.
 - Silva AR. Análise das Propriedades Fotossensibilizantes do In(III)-mesotetrafenilporfirina para uso em Terapia Fotodinâmica. Dissertação de mestrado do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2003. 82p.
 - Kaestner L, Juzeniene A; Moan J. Erythrocytes – the ‘house elves’ of photodynamic therapy. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2004; 3: 981-989.

Figura 1. Estruturas de PpIX (A), MgPpIX (B), ZnPpIX (C), OEP (D) e VOOEP (E).

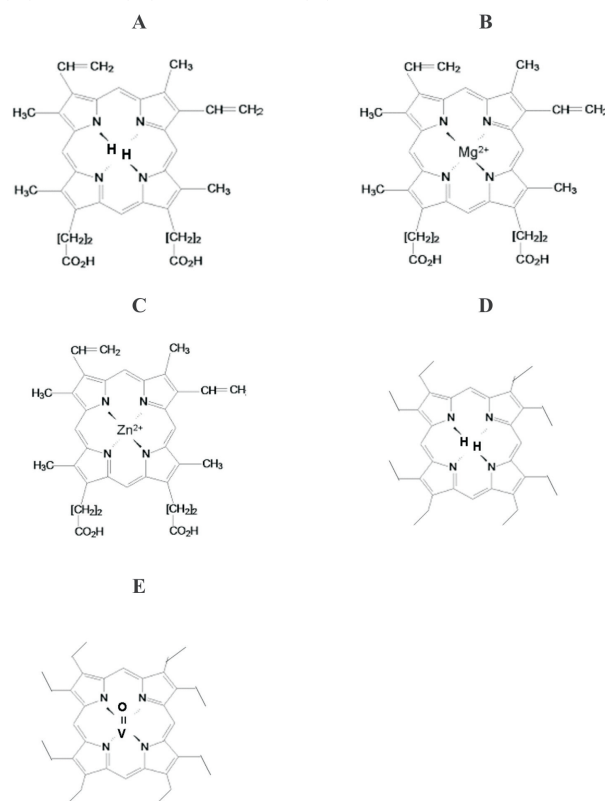


Figura 2. Porcentagem (%) de fotoxidação de triptofano nas presenças de luz de mercúrio na dosagem de 22,57 J/cm² e 2,3 mg/L de porfirinas presentes em meio saturado com oxigênio.

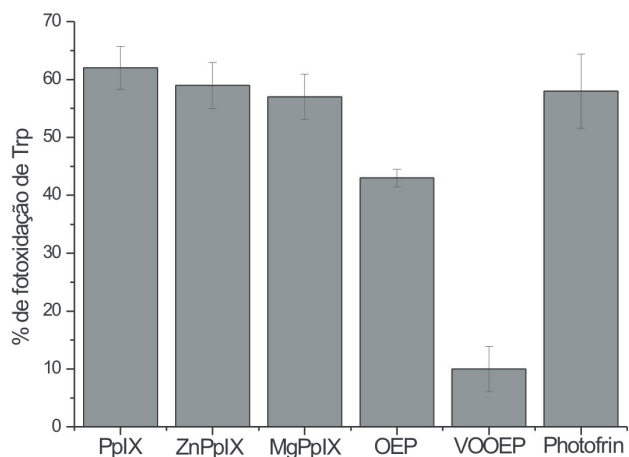


Figura 3. Porcentagem (%) de fotoxidação de albumina nas presenças de luz de mercúrio na dosagem de 22,57 J/cm² e 2,3 mg/L de porfirinas presentes em meio saturado com oxigênio.

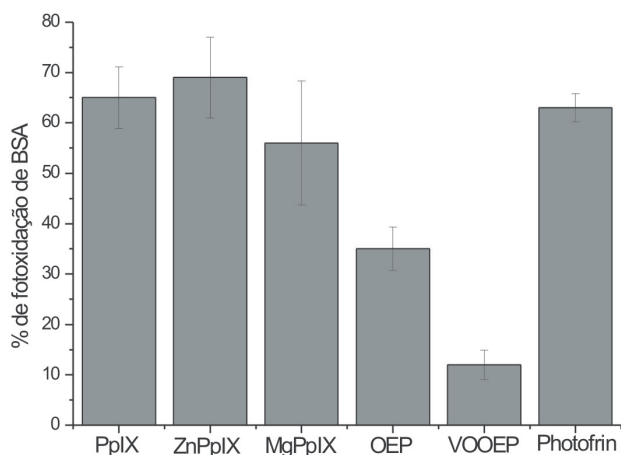
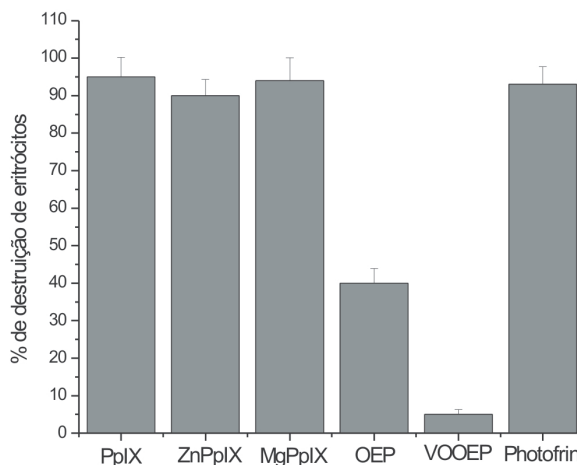


Figura 4. Porcentagem (%) de foto-hemólise (destruição) de células de eritrócitos nas presenças de luz de mercúrio na dosagem de 22,57 J/cm² e 2,3 mg/L de porfirinas presentes em meio saturado com oxigênio.



Endereço para Correspondência:

Laboratório de Bioquímica Médica e Ambiental,
Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito
Santo – UFES
Av. Marechal Campos s/n, Maruípe
Vitória-ES
CEP: 29040-091
E-mail: nariber@ig.com.br