# OS EFEITOS FOTODINÂMICOS DO AZUL DE ORTO-TOLUIDINA DANIFICAM LIPÍDEOS MITOCONDRIAIS

Karina Borba Paulino dos Santos[1], Ana Flávia Gatto Raimundo[2], Juliana Moraes Mewes[3], Wilker Caetano[4], Paulo Cesar de Souza Pereira[5], Rodrigo Polimeni Constantin[6]

[1] Acadêmica do curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. karina_b@hotmail.com
[2] Acadêmica do curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. anafgatto@hotmail.com
[3] Acadêmica do curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá, Paraná. Bolsista CAPES. juliana.mewes@outlook.com
[4] Docente, doutor, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá– UEM. Maringá, Paraná. wcaetano@uem.br
[5] Docente, doutor, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá– UEM. Maringá, Paraná. paulocamver@hotmail.com
[6] Docente, doutor, Departamento de Bioquímica, Universidade Estadual de Maringá- UEM. Maringá, Paraná. rpconstantin@uem.br

**RESUMO**

O azul de orto-toluidina (AOT) tem sido estudado devido sua empregabilidade como fotossensibilizador (F) na terapia fotodinâmica (TFD), uma modalidade em ascensão para o tratamento de diversas doenças. A interação entre o F ativado pela luz e o oxigênio resulta na formação de espécies reativas de oxigênio responsáveis por promover efeitos citotóxicos. Tais espécies reativas podem interagir com lipídeos de membrana mitocondriais alterando sua fluidez, permeabilidade e integridade, que por sua vez podem levar à morte celular. Por isso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a lipoperoxidação em mitocôndrias hepáticas na presença ou não de AOT, com e sem fotoativação. As mitocôndrias hepáticas isoladas por centrifugação diferencial de ratos machos da linhagem Wistar foram pré-incubadas durante 10 minutos na ausência ou presença de AOT (1-40 µM) e irradiadas ou não com luz vermelha. A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da detecção de TBARS. Na ausência de irradiação o AOT não exerceu efeito significativo sobre a peroxidação lipídica. Por outro lado, ao ser fotoativado, o AOT estimulou a lipoperoxidação em até 109%. Dessa forma, conclui-se o AOT tem potencial para interagir com lipídeos, uma vez que potencializou a peroxidação lipídica mitocondrial sob irradiação. Interessantemente, o mesmo não ocorreu na ausência de irradiação, o que se alinha com uma das principais características dos Fs ideais, de não apresentar toxicidade no escuro. No entanto, estudos adicionais são necessários para esclarecer se o AOT é um F seguro para ser utilizado da TFD e em outras modalidades clínicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Estresse oxidativo; Fotossensibilizador; Lipoperoxidação; Terapia fotodinâmica.

## 1 INTRODUÇÃO

A capacidade de algumas moléculas em interagir com a luz de maneira que produza espécies altamente reativas de oxigênio e outras formas radicalares é conhecida como efeito fotodinâmico e essas moléculas fotossensíveis são denominadas fotossensibilizadores (Fs) (SILVA, 2007). O efeito fotodinâmico pode ser utilizado no tratamento de infecções localizadas, infecções fúngicas, acne e doenças como o câncer (PLAETZER et al., 2013). A terapia fotodinâmica (TFD) é um tratamento clínico que se baseia no uso de um fotossensibilizador (F), administrado sistemicamente, localmente ou topicamente. Após ser incorporado nas células ou tecidos alvo, o F é iluminado por uma fonte de luz visível e, na presença do oxigênio molecular é capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e consequentemente levar à morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN; 2004). O processo de iluminação desencadeia a geração de EROs por meio de dois mecanismos denominados do Tipo I ou do Tipo II. Após absorver um fóton com comprimento de onda específico, o fotossensibilizador passa do estado fundamental ($S_0$) para o estado excitado singlete ($S_1$). Neste estado excitado, ele pode retornar ao estado fundamental emitindo um fóton de energia através de processos radioativos (fluorescência) e não-radioativos (relaxações vibracionais) ou pode ainda inverter seu spin espontaneamente através do processo de cruzamento entre sistemas e

passar do estado $S_1$ para o estado excitado tripleto ($T_1$). O mecanismo Tipo I, envolve reações de transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no seu estado excitado ($S_1$ ou $T_1$) e um determinado substrato (lipídeos insaturados de membrana, proteínas, DNA ou mesmo oxigênio molecular dissolvido), resultando na formação de íons radicais que reagem rapidamente com o oxigênio molecular ($O_2$). Tais reações geram intermediários de oxigênio altamente reativos como o radical superóxido ($^{\bullet}O_2^-$), peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), capazes de oxidar uma grande variedade de biomoléculas (SILVA, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). O mecanismo tipo II caracteriza-se por apresentar reações de transferência de energia entre o fotossensibilizador no estado $T_1$ e o oxigênio molecular, cujo estado fundamental também é tripleto ($T_0$). Estas reações levam à formação de oxigênio singlete ($^1O_2$), uma espécie eletrofílica altamente reativa. Tanto as espécies reativas geradas pelo mecanismo do tipo I como o oxigênio singlete gerado pelo mecanismo do Tipo II, são capazes de atacar prontamente os constituintes e organelas celulares tais como membrana plasmática, mitocôndrias, lisossomos e núcleo. Consequentemente, fenômenos como a inativação enzimática irreversível, peroxidação lipídica, desnaturação proteica e reticulação, bem como outras alterações estruturais, podem resultar em danos irreversíveis e na morte celular via apoptose, necrose ou autofagia (VAN STRATEN et al., 2017).

O azul de orto-toluidina (AOT) (Figura 1) é um corante azul básico catiônico, da família das fenotiazinas, que é prontamente solúvel em água e etanol. Apresenta máxima absorção luminosa perto de 650 nm, um comprimento de onda consideravelmente útil na TFD devido à alta penetrabilidade tecidual. Ele é comumente utilizado na histologia para coloração de lâminas e pode ser utilizado na detecção de displasias e carcinoma na mucosa oral (CHAINANI-WU et al., 2015) além de úlceras gástricas malignas (GILER; KADISH; URCA, 1978). Apesar do potencial para uso na TFD, pouco se sabe sobre seus efeitos diretos e fotodinâmicos sobre o metabolismo celular e, especialmente, sobre o metabolismo energético mitocondrial. As mitocôndrias desempenham um papel fundamental na produção de energia celular. Além do mais, diversos estudos afirmam que a organela participa de forma contundente na morte celular fotodinâmica. Assim, fotossensibilizadores que danificam ou inibem alvos mitocondriais isoladamente ou de forma múltipla possuem diversas características desejáveis para um tratamento eficaz na TFD (OLIVEIRA et al., 2011; VAN STRATEN et al., 2017). Considerando que um F ideal deve apresentar baixa ou nenhuma toxicidade na ausência de fotoativação, além de outros aspectos supracitados, o presente estudo teve como objetivo avaliar a capacidade do AOT de induzir a peroxidação lipídica em mitocôndrias, diretamente e fotodinamicamente. Para tanto, mitocôndrias hepáticas foram utilizadas como um modelo de estudo.

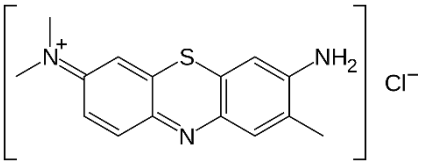


**Figura 1:** Estrutura molecular do azul de orto-toluidina.

## 2 DESENVOLVIMENTO

Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar (180–280 g). Mitocôndrias hepáticas foram isoladas por centrifugação diferencial e rompidas por congelamento-descongelamento. Logo após, as mitocôndrias foram pré-incubadas em água durante 10 minutos na ausência ou presença de AOT (1, 5, 20 e 40 µM) e irradiadas ou não com um sistema de diodo emissor de luz vermelha (636 nm, 2,6 mW × $cm^2$), fornecendo, portanto, uma dose de energia total de fótons (fluência) de 1,6 J × $cm^{-2}$. A peroxidação lipídica foi

avaliada por meio da detecção de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), predominantemente malondialdeído (MDA). Uma alíquota de 0,5 mL da pré-incubação mitocondrial (4 mg de proteína, volume final de 1,1 mL) contendo diferentes concentrações de AOT (1, 5, 20 e 40 µM), foi adicionada à 1,2 mL de uma solução contendo 0,4% de dodecilsulfato de sódio (SDS), 7,5% de ácido acético e 0,25% de ácido tiobarbitúrico (TBA), resultando em um volume final de 1,7 mL. Após 1 hora de incubação a 95 ºC, o complexo MDA-TBA foi extraído com 1,7 mL de n-butanol/piridina na proporção 15:1 (v/v) e a absorbância determinada a 532 nm. Padrões de MDA (200 µM) sempre eram concomitantemente analisados e utilizados como controle positivo da reação. A quantidade de lipoperóxidos foi expressa como nmol . mg proteína $^{-1}$.

De acordo com os resultados obtidos (Gráfico 2), na ausência de irradiação o AOT não exerceu efeito significativo sobre a peroxidação lipídica mitocondrial nas concentrações testadas. Por outro lado, quando irradiado e, consequentemente, fotoativado, o AOT estimulou a peroxidação lipídica mitocondrial. Nas concentrações mais baixas (1 e 5 µM), embora visivelmente aparente como pode ser visto após uma simples inspeção do gráfico abaixo, o estímulo não foi estatisticamente significativo. Nas concentrações mais altas (20 e 40 µM) os estímulos foram mais pronunciados, atingindo valores 86% e 109% maiores, respectivamente, em relação ao controle.

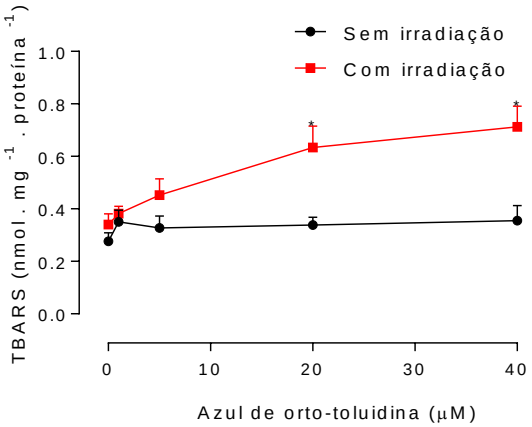


**Gráfico 1:** Efeitos de diferentes concentrações do azul de orto-toluidina na ausência e presença de irradiação sobre os níveis de peroxidação lipídica (TBARS). Cada ponto representa a média ± erro padrão da média de 6 a 7 experimentos com protocolo idêntico e preparações mitocondriais diferentes. A significância estatística relativa ao controle está indicada por asterisco (*$p$ < 0,05), de acordo com o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Dunnett.
Fonte: Dados da pesquisa.

## 3 CONCLUSÃO

Considerando os resultados do presente estudo, pode-se concluir que a mitocôndria pode ser considerada um alvo interessante para a TFD utilizando o AOT como F. Quando irradiados com luz de comprimento de onda adequado, os fenotiazínicos como o AOT geram EROs através dos mecanismos do Tipo I e Tipo II. Mas, segundo alguns dados literários, a maior parte dos danos oxidativos gerados por Fs desta classe é proveniente de reações que ocorrem com o oxigênio singlete ($^1O_2$), ou seja, através do mecanismo do Tipo II (CASTANO et al., 2004). Cineticamente, o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) do oxigênio singlete ($^1O_2$) está na casa dos µs (VAN STRATEN et al., 2017). Ou seja, para que o dano fotoquímico ocorra de forma eficiente, não basta apenas que o F seja fotoativado através de irradiação adequada, o mesmo precisa interagir diretamente com os seus alvos. Neste sentido, outras características físico-químicas do F tais como tamanho, forma, presença de

cargas e balanço hidrofílico/hidrofóbico adequado, também são relevantes para a atuação na TFD.

Apesar de ser solúvel em água, aparentemente o AOT tem também potencial para interagir com lipídeos, uma vez que potencializou a peroxidação lipídica mitocondrial sob irradiação. Interessantemente, o mesmo não ocorreu na ausência de irradiação, o que se alinha com uma das principais características dos Fs ideais, de não apresentar toxicidade no escuro. Do ponto de vista prático, um dos principais mecanismos da morte celular fotodinâmica é a apoptose que, como se sabe muito bem, pode ser desencadeada através de mecanismos mitocondriais que envolvem a presença de estresse oxidativo, peroxidação lipídica e liberação do citocromo C (OLIVEIRA et al., 2011). Embora não sejam conclusivos, os resultados indicam que o AOT poderia atuar através deste mecanismo.

A mitocôndria hepática foi utilizada como modelo de estudo neste caso. Mas sabe-se que as estruturas e as funções mitocondriais em diferentes tecidos e até mesmo em diferentes organismos, são altamente conservadas (XU et al., 2015). Assim, os efeitos fotodinâmicos agudos encontrados para o AOT no presente estudo, certamente não se restringem a mitocôndria hepática de ratos. O protocolo experimental utilizado permitiu a avaliação dos efeitos fotodinâmicos a curto prazo do AOT sobre a peroxidação lipídica. No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que este composto interaja também com outras biomoléculas e module suas atividades até mesmo sem fotoativação. Estudos adicionais são necessários para avaliar estas questões, inclusive utilizando outros protocolos experimentais tais como outras organelas isoladas, células em cultivo, órgãos intactos e tratamento crônico *in vivo*.

## 4 REFERÊNCIAS

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.

CHAINANI-WU, N. et al. Toluidine blue aids in detection of dysplasia and carcinoma in suspicious oral lesions. **Oral Diseases** v. 21, p. 879–885, 2015.

GILER, S.; KADISH, U.; URCA, I. Use of tolonium chloride in the diagnosis of malignant gastric ulcers. **Archives of surgery**, v. 113, p. 136-139, 1978.

OLIVEIRA, C. S. et al. Major determinants of photoinduced cell death: Subcellular localization versus photosensitization efficiency. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 4, p. 824-833, 2011.

PLAETZER, K. et al. New applications of photodynamic therapy in biomedicine and biotechnology. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2007.

VAN STRATEN, D. et al. Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, p. 19, 2017.

XU, T.; PAGADALA, V.; MUELLER, D. M. Undertanding structure, function, and mutations in the mitochondrial ATP synthase. **Microbial cell**, v. 2, n.4, p. 105, 2015.