

## CINÉTICA DE FOTOCLEARAMENTO DE AZUL DE METILENO EM MATRIZ DE COLÁGENO COM MITOCÔNDRIAS DE FÍGADO DE RATO

G. Lepore<sup>1\*</sup>, E. Miranda<sup>2\*\*</sup>, C.H. Yokomizo<sup>3\*\*</sup>, L.Cassiavilani<sup>4\*</sup>, I.L. Nantes<sup>5\*\*</sup>, N.A. Daghasanli<sup>6\*</sup>

\* Universidade Federal do ABC (CECS), Santo André, Brasil.

\*\* Universidade Federal do ABC (CCNH), Santo André, Brasil.

e-mail: nasser.daghasanli@ufabc.edu.br

**Resumo:** A Terapia Fotodinâmica (PDT) é baseada na ativação do fotossensibilizador pela luz na presença de oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio que causa destruição celular. Uma das limitações da TFD é a perda de capacidade para absorver luz (fotoclearamento), gerar espécies reativas, reduzindo assim a eficiência do tratamento. Neste trabalho foram estudadas as cinéticas de fotoclearamento de azul de metileno (MB), num meio que simula o tecido biológico (100 mg / ml de colágeno hidrolisado e 1 mg / ml de mitocôndrias de fígado de rato). As amostras foram irradiadas na presença de AM (15  $\mu$ M, 150  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) e medida a transmissão de um feixe de laser (635 nm) através das amostras e se calcularam as taxas cinéticas fotoclearamento (K). Observou-se que as taxas cinéticas foram variadas com o aumento da concentração de PM: a taxa foi aumentada na presença de mitocôndrias isoladas de fígado de rato e diminui na sua ausência. Alterações nas taxas de fotoclearamento da MB podem ser atribuídas às mudanças no estado físico do MB na presença de mitocôndrias.

**Palavras-chave:** Terapia Fotodinâmica, Azul de Metileno, Fotoclearamento.

**Abstract:** The Photodynamic Therapy (PDT) is based in activation of Photosensitizer by light in presence of oxygen, generating reactive oxygen species that causes cellular destruction. One of the limitations of PDT is the loss of ability to absorb light (photobleaching), generating reactive species, thereby reducing the treatment efficiency. In this work, we studied the kinetics of photobleaching of methylene blue (MB), in a medium that simulates the biological tissue (100 mg / mL collagen hydrolyzate and 1 mg / ml rat liver mitochondria). Samples were irradiated in the presence of AM (15 $\mu$ M, 50 $\mu$ M and 150 $\mu$ M) and measured the transmission of a laser beam (635 nm) through the samples, and were calculated the kinetic rates photobleaching (K). It was observed that the kinetic rates were varied with the increased concentration of AM: the rate was increased in the presence of rat liver mitochondria and decreases in its absence. Changes in rates of photobleaching of MB can be attributed to the changes in the physical state of the MB in the presence of mitochondrias.

**Keywords:** Photodynamic Therapy, Methylene Blue, photobleaching, kinetic.

### Introdução

A Terapia Fotodinâmica (TFD) pode ser definida como a administração de uma droga não-tóxica (ou corante) chamada de fotossensibilizador (FS) que pode ser administrado sistemicamente, localmente ou topicamente num paciente com uma lesão (frequentemente, mas não necessariamente cancerosa), seguida após algum tempo pela iluminação da lesão com luz de comprimento de onda adequado, levando à geração de espécies citotóxicas e conseqüentemente à morte celular e à destruição tecidual [1]. Na TFD, o FS (agente biocompatível) absorve luz, gerando as espécies reativas de oxigênio (EROS's), induzindo a destruição de biomoléculas nas suas vizinhanças, levando células à morte. A TFD é uma terapia antineoplásica, onde a morte celular pode ser alcançada com grande eficiência de modo localizado contra células e tecidos cancerosos. A TFD é uma terapia seletiva, pois se pode controlar a dose e local de irradiação da luz, reduzindo seus potenciais efeitos colaterais, mesmo com uma administração sistêmica do fármaco FS [2].

Dois mecanismos principais estão envolvidos na fotodestrução dos tecidos, os mecanismos do Tipo I ou II. No mecanismo do Tipo I, o FS absorve luz, passa ao seu estado excitado (FS\*) e reage diretamente com o substrato, numa reação de transferência de elétron, para produzir íon radical do FS e do substrato, geralmente um cátion radical do substrato e ânion radical do FS (FS<sup>-</sup>). Na presença de oxigênio, ocorre a transferência direta de elétron do FS<sup>-</sup> para o oxigênio molecular, gerando o radical ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), regenerando o FS original. No mecanismo do Tipo II, o FS no estado fundamental (FS<sup>0</sup>), ao absorver luz transaciona eletronicamente até o estado excitado superior tripleto (<sup>3</sup>FS\*) e transfere sua energia para o O<sub>2</sub>, formando o oxigênio Singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). As EROS's podem ser intencionalmente geradas em tecidos biológicos pela ação fotodinâmica do FS com luz durante a TFD, a qual promove o *stress* oxidativo em células, levando-as à morte. A TFD é utilizada para tratamento de certas condições não cancerosas que geralmente são caracterizadas pelo rápido

crescimento de células não desejadas, tais como os microrganismos [3-7]. Porém, pode ocorrer o fotocloreamento (PhB) uma degradação fotoinduzida do FS, que leva a diminuição da sua concentração e consequentemente a capacidade de absorção de fótons, levando a redução da capacidade de formação das moléculas de espécie citotóxica. Se o PhB ocorrer antes de as células serem atingidas, nenhum dano a elas ocorrerá, o que é adequado para células saudáveis expostas à terapia e não adequado para que as células malignas sejam tratadas. Mostrando então que o PhB está relacionado com a eficiência da terapia fotodinâmica [8].

Observe na Figura 1, o azul de metileno (AM) que é um fotossensibilizador que absorve luz na região do vermelho. O AM ao ser irradiado ( $\lambda_{MAX} = 665\text{nm}$ ) na forma monomérica gera preferencialmente o oxigênio singleto e o ânion superóxido é gerado diretamente na presença da forma dimérica [8-10]; e está bem estabelecido que a sua toxicidade no escuro em seres humanos é baixa, tendo eficácia de TFD contra células tumorais e patogênicas [9-12].

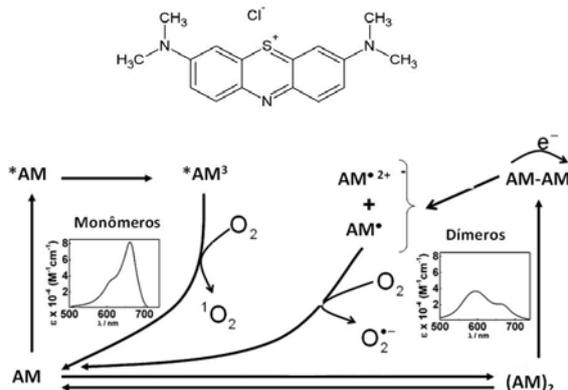


Figura. 1: Reações fotoquímicas do Azul de Metileno (AM). Em cima: estrutura química do AM. As inserções mostram os espectros de absorção eletrônica de monômeros e dímeros. Adaptado da ref. [10].

O objetivo deste trabalho foi estudar a cinética de PhB de azul de metileno, em meio simulando o tecido biológico formado de matriz polimérica de colágeno hidrolisado na presença ou ausência de mitocôndrias de fígado de ratos.

**Materiais e métodos**

As amostras (2mL) foram preparadas com 200mg de colágeno hidrolisado em água milli-Q para diferentes concentrações de Azul de Metileno (15µM, 50µM e 150µM), na presença ou não de 1mg/ml de mitocôndrias de fígado de rato. As amostras foram acondicionadas em cubetas de acrílico (caminho óptico 10 mm). Para a determinação das cinéticas de PhB, as amostras foram irradiadas com um feixe de laser de diodo (Coherent) de potência inicial ( $P_0$ ) de 7mW e  $\lambda=665\text{nm}$ . Mediu-se a potência transmitida ( $P_{trans}$ )

através da cubeta com um *powermeter* (Fieldmax II, Coherent) em função do tempo de irradiação. A Figura 2 mostra o esquema da disposição dos equipamentos utilizados.

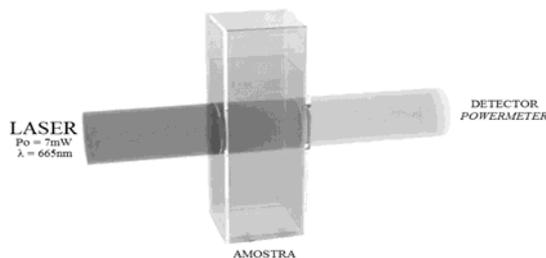


Figura 2: Esquema do experimento.

Os dados foram analisados através do *software* Origin utilizando a função (1), onde  $K$  é a taxa cinética de PhB do AM nas diferentes condições estudadas.

$$P_{tr} = P_0(1 - e^{-Kt}) \tag{1}$$

**Resultados**

A Figura 3 mostra o perfil da cinética PhB do AM na ausência (O) e na presença (■) de mitocôndrias de fígado de rato.

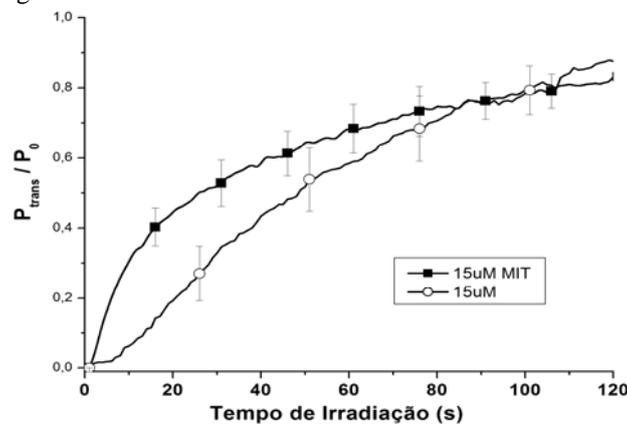


Figura 3: Curvas típicas da razão da potência de luz (665 nm) transmitida através de 2 ml amostras de colágeno hidrolisado na ausência (O) e na presença (■) de 15 µM de mitocôndrias de fígado de ratos. Os dados mostram a média±DP de 2 medidas. As curvas cinéticas foram ajustadas através da função  $P_{tr} = P_0(1 - e^{-Kt})$  e os resultados são apresentados na Tabela 1.

Foram realizados ajustes monoexponenciais dos dados para a presença de 15µM de mitocôndrias de fígado de ratos, que resultaram nas funções (2) e (3), na presença e ausência de mitocôndrias, respectivamente.

$$P_{tr}/P_0 = (1 - e^{-1.03 \times 10^{-2}t}) \tag{2}$$

$$P_{tr}/P_0 = (1 - e^{-1.9 \times 10^{-2}t}) \tag{3}$$

Tabela 1: Taxas cinéticas  $K$  de PhB do AM, montados a partir da função  $P_{tr} = P_0(1 - e^{-Kt})$  para 15, 50 e 150  $\mu\text{M}$  de AM, na presença e ausência de mitocôndrias de fígado de rato.

[AM] / $\mu\text{M}$	Presença de mitocôndrias ( $\text{s}^{-1}$ )	Ausência de mitocôndrias ( $\text{s}^{-1}$ )
15	$1,03 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$
50	$1,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$
150	$1,7 \times 10^{-2}$	$9,2 \times 10^{-3}$

### Discussão

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram que a presença de concentrações crescentes de mitocôndrias de fígado de rato apresenta efeitos opostos sobre a taxa cinética  $K$  de PhB do Azul de Metileno em matriz de colágeno. Assim, a taxa cinética  $K$  obtida para 15  $\mu\text{M}$  de AM quando as mitocôndrias de fígado de rato estão ausentes ( $1,9 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) é quase idêntico ao obtido em 150  $\mu\text{M}$  de AM quando as mitocôndrias de fígado de rato estão presentes ( $1,7 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Da mesma forma, a taxa cinética  $K$  obtida para 150  $\mu\text{M}$  de AM quando mitocôndrias de fígado de rato estão ausentes ( $9,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ) é quase idêntico ao obtido com 15  $\mu\text{M}$  de AM quando mitocôndrias de fígado de rato estão presentes ( $1,03 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Obtivemos valores similares da taxa cinética  $K$  ( $1,5 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) na presença e na ausência de mitocôndrias de fígado de rato, quando a concentração de MB foi de 50  $\mu\text{M}$ .

É importante notar que, na ausência de mitocôndrias de fígado de rato, as taxas cinéticas  $K$  têm seu valor reduzido quando se aumenta a concentração de MB, enquanto o oposto é observado quando mitocôndrias de fígado de rato estão presentes.

Nossos resultados podem ser justificados pelo encarceramento e agregação de azul de metileno em diferentes condições experimentais, na ausência e presença de mitocôndrias, afetando a cinética de PhB do AM sob irradiação.

O PhB do AM está associado ao estado de agregação do FS, uma condição na qual os radicais livres são gerados, enquanto a forma monomérica em solução não sofre PhB sob irradiação em baixas intensidades, como neste estudo. Podemos supor que, quando imobilizados em matriz de colágeno, as moléculas de AM estão aprisionadas formando agregados. No entanto, a relação dímero/monômero de AM não foi alvo deste trabalho, mas podemos supor que elas não são significativamente afetadas através do aumento da concentração de AM na matriz de colágeno no intervalo de concentração do FS e, nesta condição, o aumento da concentração do AM tenha efeito de filtro interno, o que leva à diminuição da taxa cinética  $K$ .

No entanto, quando as mitocôndrias estão presentes no meio de colágeno, temos a presença de cardiolipina carregado negativamente (membrana interna da mitocôndria). Esta organela concentra AM

na bicamada lipídica e na matriz mitocondrial. Deste modo, dois fatores podem responder pelo aumento do PhB do AM em concentração crescente: a propagação da geração de radicais livres na membrana mitocondrial interna e o aumento da proporção de dímero/monômero de AM carregada na matriz mitocondrial quando a matriz de colágeno não está presente. O AM se liga à mitocôndria através do potencial de prótons mitocondrial, ocasionando a formação de dímeros de MB [2]. Por sua vez a presença do alto potencial de membrana mitocondrial leva à redução do AM, tendo como consequência a formação da forma leuco do AM (leuco-AM), com consequente perda da sua banda principal de absorção em 664 nm (forma monomérica). A forma leuco (Figura 4) é a forma sem cor da molécula do AM, fotoquimicamente inativa, ou seja, a leuco-AM não gera ERO's ao interagir com luz. Isto acarreta a perda da eficiência fotodinâmica e fotocitotóxica do AM contra células.

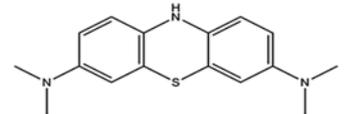


Figura 4: Representação da forma leuco do Azul de Metileno.

Os espectros de absorção do AM se alteram dependentes do seu estado: a forma monomérica possui em 664 nm sua principal banda de absorção eletrônica e o dímero tem em 610 nm sua principal banda de absorção eletrônica. Ambas as bandas estão dentro da região vermelha do espectro eletromagnético, região onde há interesse para a TFD. O AM apresenta outras bandas de absorção (em 290 nm para o monômero e em 260 nm para a forma leuco), as quais não possuem interesse direto para a TFD, uma vez que se encontram dentro da região espectral ultravioleta, onde a luz destes comprimentos de onda possui pouca penetração nos tecidos biológicos.

A eficiência da TFD depende da geração de ERO's nos sítios de interesse e esta produção depende de diversos fatores, tais como as propriedades fotofísicas e fotoquímicas dos FS's. As diferentes formas do AM, monômero ou dímero, dependem do microambiente específico onde ele se encontra e estas podem afetar significativamente a eficiência do tratamento de TFD com AM.

A eficácia da TFD na indução de morte celular em estudos *in vitro* e morte tumoral ou de microrganismos em estudos *in vivo* ou mesmo clínicos já é bem descrita na literatura [4-6]. No entanto, ainda não está bem estabelecido quais são os efeitos da interação dos FS's com organelas e estruturas que compõem os tumores em casos onde estes sistemas se apresentam de forma estruturada; e os efeitos destas organelas e estruturas sobre os estados de agregação dos FS's, o que pode afetar significativamente as propriedades de geração de ERO's e, consequentemente, a eficácia terapêutica

da TFD.

Em um estudo prévio [13] do uso do AM como FS contra tumores tipo melanoma B16 *in vivo* em camundongos *hairless* observou-se que a TFD foi eficaz para erradicar o tumor em uma única aplicação de TFD, apesar de o tumor ser altamente pigmentado. Desses resultados, pôde-se supor que a eficácia do tratamento só foi alcançada devido à indução de PhB do AM, permitindo a penetração de luz em camadas cada vez mais profundas do tumor. Estes resultados serviram de motivação para o estudo dos mecanismos de penetração de luz em tecidos biológicos, através do uso de modelos mais realistas que simulem estes tecidos, tais como o modelo de matriz de colágeno utilizado para simular o citoesqueleto celular e mitocôndrias como modelo de organela.

### Conclusão

O fotocclareamento do fotossensibilizador AM, pode afetar significativamente a eficiência do tratamento, uma vez que a geração de ERO's está diretamente associada à absorção de fótons pelo FS. Neste trabalho, onde a matriz de colágeno simulou a rede de citoesqueleto e a mitocôndria foi a organela verdadeira capaz de concentrar o corante, influenciando o seu estado de agregação. Foi observado que a presença das mitocôndrias pode modular o PhB do AM pela interação com estas biomoléculas. Outros estudos estão em andamento, onde estamos aumentando a complexidade do modelo para, assim, compreendermos os mecanismos de geração de ERO's em tumores e lançarmos mais "luz" no entendimento da TFD.

### Agradecimentos

Os autores agradecem às agências brasileiras FAPESP (2012/07456-7), CNPq, CAPES e para as subvenções para a Bioquímica e Biotecnologia Núcleo de UFABC, que é coordenado por ILN.

### Referências

- [1] Castano AP, Demidovaa TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2004; 1(4): 279-293.
- [2] Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. *Photochemistry and Photobiology*. 2004; 79(3): 227-32.
- [3] Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology*. 2008; 55(1): 145-157
- [4] Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*. 1991; 54(5): 659
- [5] Phoenix DA, Sayed Z, Hussain S, Harris F, Wainwright M. The phototoxicity of phenothiazinium derivatives against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2003; 39(1): 17-22
- [6] Wainwright M, Phoenix DA, Marland J, Wareing DR, Bolton FJ. A study of photobactericidal activity in phenothiazinium series. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 1997; 19(1): 75-80
- [7] Hamblin MR, O'Donnell DA, Murthy N, Rajagopalan K, Michaud N, Sherwood ME, Hasan T. Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002; 49(6): 941-951
- [8] Gorman SA, Brown SB, Griffiths J. An overview of synthetic approaches to porphyrin, phthalocyanine, and phenothiazine photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*. 2006; 25(1-2): 71-108.
- [9] Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nature*. 2003; 3: 380-387
- [10] Daghasanli NA, Itri R, Baptista MS. Singlet Oxygen Reacts with 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein and Contributes to the Formation of 2',7'-Dichlorofluorescein. *Photochemistry and Photobiology*. 2008; 84(5): 1238-1243
- [11] Núñez SC, Garcez AS, Kato IT, Yoshimura TM, Gomes L, Baptista MS, Ribeiro MS. Effects of ionic strength on the antimicrobial efficiency of methylene blue. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2014; 13(3): 595-602
- [12] Garcez AS, Núñez SC, Baptista MS, Daghasanli NA, Itri R, Hamblin MR, Ribeiro MS. Antimicrobial mechanisms behind photodynamic effect in the presence of hydrogen peroxide. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2011; 10: 483-490
- [13] Daghasanli NA, Baptista MS, Itri R. Efetividade da Terapia Fotodinâmica (TFD) contra tumores de melanoma B16- Estudos *in vivo* em camundongos HRS/J *hairless*. *Jornal Brasileiro de Laser*. 2007; 1:24-27.