

EFEITOS INTRÍNSECOS E FOTODINÂMICOS DO FOTOSSENSIBILIZADOR NOVO AZUL DE METILENO SOBRE O METABOLISMO OXIDATIVO MITOCONDRIAL

Heloisa Mayumi Tateyama (PIBIC/CNPq/FA/UEM)^a, Eduardo Makiyama Klosowski^b,
Byanca Thais Lima de Souza^b, Márcio Shigueaki Mito^b, Rodrigo Polimeni Constantin^b
(Orientador), e-mail: rpconstantin@uem.br.

^aUniversidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

^bUniversidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas/Maringá, PR.

Área: Ciências Biológicas. **Subárea:** Bioquímica, Metabolismo e Bioenergética.

Palavras-chave: Terapia fotodinâmica, Fossensibilizadores e Bioenergética.

Resumo:

Na Terapia Fotodinâmica (TF), quando um fotossensibilizador (FS) é submetido à irradiação com comprimento de onda adequado e na presença de oxigênio, este se torna capaz de gerar substâncias como o oxigênio singlete e outras espécies reativas de oxigênio. O novo azul de metileno (NAM) é um fenotiazínico que apresenta grande parte das propriedades físico-químicas de um FS ideal. Alguns estudos apontam a mitocôndria como um possível alvo dos efeitos do NAM e tal organela tem sido considerada um importante alvo na aplicação da TF. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as ações do NAM, sob fotoativação ou não, sobre a mitocôndria hepática de ratos saudáveis. De maneira geral, o NAM estimulou os estados II e IV da respiração mitocondrial na presença e ausência de irradiação, enquanto o estado III da respiração mitocondrial foi inibido apenas quando o sistema foi iluminado. Os valores do coeficiente de controle respiratório (RC) e da razão ADP/O caíram, tanto na presença como ausência de irradiação. Além disso, a atividade ATPásica de mitocôndrias foi afetada dependendo do tipo de preparação e condição analisada.

Introdução

Algumas moléculas são capazes de interagir com a luz de modo a gerar espécies de oxigênio altamente reativas como o oxigênio singlete (1O_2) e outras formas radiculares. Essas moléculas fotossensíveis são chamadas de fotossensibilizadores (FSs) e sua propriedade de interagir com a luz gerando espécies altamente reativas é conhecida por efeito fotodinâmico (SILVA, 2007). Fenotiazínicos catiônicos como o novo azul de metileno (NAM) são amplamente utilizados como FSs devido ao baixo custo de obtenção e alta eficiência na geração de oxigênio singlete. Estas moléculas exibem intensa absorção na região entre 600–660 nm do espectro, aspecto útil na terapia fotodinâmica, sendo considerada uma janela terapêutica adequada para penetração eficiente da luz nos tecidos (WAINWRIGHT et al., 1999). Existem poucos relatos sobre os mecanismos agudos de ação através dos quais estas substâncias

atuam em sítios subcelulares específicos como as mitocôndrias e as possíveis consequências destes efeitos. O presente trabalho foi planejado para estudar os efeitos intrínsecos e fotodinâmicos do NAM sobre mitocôndrias, melhorando nossa compreensão sobre os efeitos tóxico-farmacológicos deste FS.

Materiais e Métodos

Para realização dos experimentos foram utilizados fígados de ratos albinos machos da linhagem Wistar (180-220 g) anestesiados com a cetamina (70 mg/Kg) + xilazina (10 mg/Kg) em associação com fentanil (0,03 mg/Kg). As mitocôndrias foram isoladas por centrifugação diferencial. As concentrações do NAM utilizadas nos ensaios experimentais foram 0,5; 0,75; 1; 2; 5; 10 e 20 μM . O consumo de oxigênio foi avaliado polarograficamente e a atividade ATPásica foi analisada espectrofotometricamente. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEM (CEUA Nº 2113250919).

Resultados e Discussão

A Figura 1 (A-F) descreve os resultados que mostram os efeitos do NAM sobre a respiração de mitocôndrias intactas. Na ausência de irradiação e utilizando os substratos malato e glutamato (Fig. 1A-C), o NAM estimulou gradualmente os estados II e IV da respiração. Não houve alterações significativas sobre o estado III da respiração. Quando succinato foi o substrato administrado (Fig. 1D-F), os estados II e IV da respiração foram estimulados significativamente apenas na presença de 2 μM do FS. Neste caso, o NAM também não alterou de maneira significativa o estado III da respiração. A Tabela 1 mostra os efeitos do NAM sobre as razões ADP/O e os coeficientes de controle respiratório (RC). Como observado, o NAM foi capaz de reduzir significativamente ambos os parâmetros na presença de todos os substratos utilizados. Quando os mesmos experimentos foram realizados sob irradiação, os resultados obtidos foram relativamente distintos. Na presença de malato e glutamato, o consumo de oxigênio foi estimulado no estado II apenas quando as concentrações mais baixas testadas do NAM foram utilizadas. Já os estados III e IV foram inibidos de maneira significativa a partir das concentrações de 2 e 5 μM do FS, respectivamente. Quando succinato foi o substrato administrado, os estados II e IV da respiração mitocondrial foram inibidos significativamente a partir da concentração de 2 μM do NAM. Nestas mesmas condições, o estado III da respiração foi fortemente inibido e os efeitos sobre a razão ADP/O e RC foram bastante intensos com reduções dos valores de ambos os parâmetros avaliados para todos os substratos testados.

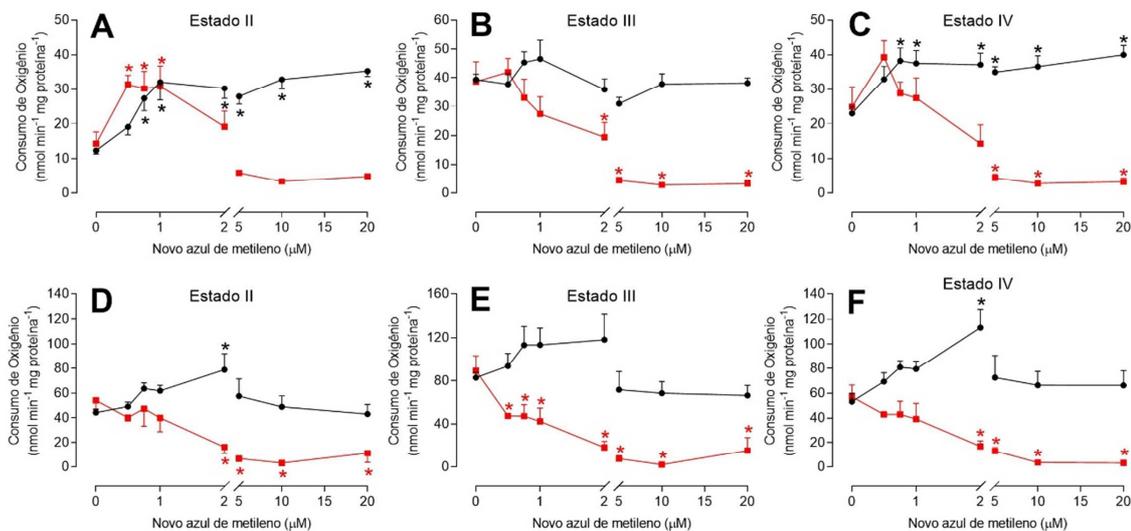


Figura 1 – Efeitos do NAM, na presença e ausência de irradiação, sobre a respiração mitocondrial, utilizando os substratos malato/glutamato (A, B e C) e succinato (D, E e F). Os resultados representam os valores obtidos através de 4-8 experimentos independentes e estão expressos como médias \pm erros padrões das médias. * $p < 0.05$, ANOVA seguido do teste de Dunnett.

Tabela 1 – Efeitos do NAM sobre o RC e a razão ADP/O em mitocôndrias isoladas de fígados de ratos.

Substrato	Novo azul de metileno (μM)	Sem irradiação		Com irradiação	
		RC	ADP/O	RC	ADP/O
Glutamato / Malato	0	1,98 \pm 0,25	2,26 \pm 0,24	1,71 \pm 0,22	2,29 \pm 0,32
	0,5	1,35 \pm 0,09*	1,98 \pm 0,18	1,07 \pm 0,04*	0,94 \pm 0,38*
	0,75	1,37 \pm 0,06*	1,43 \pm 0,09*	1,11 \pm 0,10*	0,65 \pm 0,32*
	1	1,23 \pm 0,05*	1,14 \pm 0,18*	1,00 \pm 0,00*	0,09 \pm 0,09*
	2	1,07 \pm 0,05*	0,45 \pm 0,22*	1,00 \pm 0,00*	—#
	5	1,00 \pm 0,00*	—#	1,00 \pm 0,00*	—#
	10	1,00 \pm 0,00*	—#	1,00 \pm 0,00*	—#
	20	1,00 \pm 0,00*	—#	1,00 \pm 0,00*	—#
Succinato	0	1,63 \pm 0,09	1,26 \pm 0,19	1,55 \pm 0,26	1,23 \pm 0,13
	0,5	1,39 \pm 0,06*	0,86 \pm 0,08	1,09 \pm 0,05*	0,87 \pm 0,22
	0,75	1,35 \pm 0,04*	0,88 \pm 0,04	1,14 \pm 0,06*	0,58 \pm 0,24
	1	1,39 \pm 0,07*	0,83 \pm 0,07	1,14 \pm 0,06*	0,59 \pm 0,24
	2	1,16 \pm 0,04*	0,59 \pm 0,16*	1,07 \pm 0,05*	0,33 \pm 0,20*
	5	1,20 \pm 0,06*	0,44 \pm 0,19*	1,00 \pm 0,00*	—#
	10	1,13 \pm 0,05*	0,20 \pm 0,20*	1,00 \pm 0,00*	—#
	20	1,17 \pm 0,06*	0,23 \pm 0,23*	1,00 \pm 0,00*	—#

Cada ponto de referência representa a média de 4-8 experimentos independentes. * $p < 0.05$, ANOVA seguido do teste de Dunnett.

A Figura 2 mostra os efeitos do NAM sobre a atividade ATPásica. Em mitocôndrias intactas acopladas sem irradiação (Fig. 3A), o NAM estimulou a atividade ATPásica. Sob irradiação, por outro lado, ocorreu inibição desta atividade já na presença de 5 μM do NAM. Na ausência de irradiação, o NAM não afetou a atividade ATPásica de mitocôndrias rompidas (Fig. 3C) ou intactas-desacopladas (Fig. 3B). No entanto, sob

irradiação, a atividade foi inibida em ambas as preparações, já a partir da primeira concentração do NAM testada (2 μM).

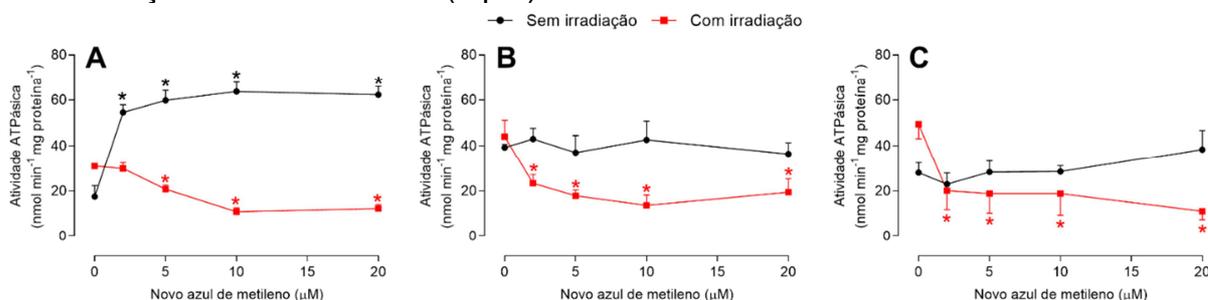


Figura 2 – Efeitos do NAM, na presença e ausência de irradiação, sobre a atividade ATPásica de mitocôndrias intactas (A), desacopladas (B) e rompidas (C). Os resultados representam os valores obtidos através de 4-5 experimentos independentes e estão expressos como médias \pm erros padrões das médias. * $p < 0.05$, ANOVA seguido do teste de Dunnett.

Na ausência de irradiação, o NAM estimulou o consumo de oxigênio por mitocôndrias intactas (estados II e IV da respiração), apontando para um possível efeito desacoplador. Possibilidade esta corroborada pelas diminuições na razão ADP/O e no RC. Além do nítido efeito desacoplador, a inibição causada pelo NAM sobre os estados II, III e IV da respiração, na presença de irradiação, poderia ser consequência da fotoativação de complexos enzimáticos da cadeia respiratória e da F_0F_1 -ATP sintase. Este último efeito é sugerido pela inibição da atividade ATPásica de mitocôndrias intactas-desacopladas e rompidas.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que o NAM, sob o efeito da irradiação, pode comprometer o metabolismo energético mitocondrial. Os mecanismos destas ações parecem envolver efeito desacoplador e fotoativação de enzimas mitocondriais. No entanto, também foi observado que o NAM tem a capacidade intrínseca de inibir a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa, atuando como desacoplador.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq, Fundação Araucária e CAPES pelo suporte financeiro e fomento à Iniciação Científica.

Referências

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

WAINWRIGHT, M.; GRICE, N. J.; PYE, L. E. C.; Phenothiazine photosensitizers: part 2. 3, 7-Bis (arylamino) phenothiazines. **Dyes and Pigments**, v. 42, n. 1, p. 45-51, 1999.