

## Avaliação da atividade mitocondrial no processo de morte celular em células tumorais de mama após tratamento com Ciclosporina A e Photosan3®

Aline Llanos de Oliveira, Geisa Nogueira Salles, Juliana Macedo Costa Couceiro, Claudia Ebner, Newton Soares da Silva, Cristina Pacheco Soares\*

**Resumo** **Introdução:** A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade terapêutica para o tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas tendo como alvo a mitocôndria, organela que tem atraído maior atenção devido ao seu envolvimento direto no processo de morte celular. Inibindo a atividade mitocondrial é possível estudar outras organelas envolvidas no processo de morte celular. O objetivo deste estudo foi avaliar a importância da mitocôndria no processo de morte celular na linhagem celular M3, induzida após a fotossensibilização com Photosan3®. **Métodos:** Para os experimentos foram utilizados os seguintes grupos: grupo controle I, células sem nenhum tratamento; grupo II PDT, células incubadas com Photosan3®; grupo III PDT, células incubadas com CsA e Photosan3®; grupo IV células tratadas somente com Estaursporina (STS). Após a incubação com o fotossensibilizador os grupos II e III foram irradiados com diodo laser semiconductor ( $\lambda$  670 nm). Todos os grupos foram incubados a 37 °C em estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 h e 48 h. No final destes períodos todos os grupos foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade, pelo teste de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e corados com anexina V e iodeto de propídio para determinar a proporção de morte celular, sendo as análises realizadas por microscopia de fluorescência. **Resultados:** Os resultados mostraram que as células realizaram apoptose por via independente de mitocôndria. A CsA apresentou-se eficiente na inativação da mitocôndria no processo apoptótico durante a fotossensibilização com Photosan3®. **Conclusão:** A associação de CsA e Photosan3® na terapia fotodinâmica demonstrou a presença de morte celular por apoptose independente da participação mitocondrial.

**Palavras-chave** Mitocôndria, Ciclosporina A, Photosan3®, Câncer de mama.

## *Evaluation of mitochondrial activity in the cell death process in breast tumor cells after treatment with Cyclosporine A and Photosan3®*

**Abstract** **Introduction:** Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic modality for the treatment of neoplastic and non-neoplastic diseases. Mitochondria have attracted great attention due to their direct involvement in the cell death process. By inhibiting the mitochondrial activity, it is possible to study other organelles involved in the cell death process. The objective of this study was to evaluate the involvement of mitochondria in induced cell death process in M3 cell line after photosensitization with Photosan3®. **Methods:** The experiments involved the following groups: control group I, cells with no treatment; group II PDT, cells incubated with Photosan3®; group III PDT, cells incubated with CsA and Photosan3®; group IV, cells treated only with treated only Staurosporine (STS). After incubation with the photosensitizer, the groups II and III were irradiated using a semiconductor laser diode ( $\lambda$  670 nm). All groups were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> for 24 and 48 h. After this period, all groups were subjected to the MTT (3 - [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) cytotoxicity assay and labeled with Annexin V and Iodide Propidium to determine the rate of cell death. The analyses were performed by fluorescence microscopy. **Results:** The results show that PDT Photosan leads to apoptosis of breast cell line M3 by a route independent of the mitochondria. **Conclusion:** The association of CsA and Photosan3® in photodynamic therapy showed the occurrence of cell death (apoptosis) independent of mitochondrial participation.

**Keywords** Mitochondria, Cyclosporine A, Photosan3®, Breast cancer.

## Introdução

A terapia fotodinâmica (PDT) é uma modalidade terapêutica para o tratamento de doenças neoplásicas e não neoplásicas, que envolve a combinação de corantes não tóxicos conhecidos como fotossensibilizadores (FS) e luz visível de comprimento de onda específico a ser absorvido pelo FS (Kalka *et al.*, 2000), que na presença de oxigênio leva à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem danificar constituintes celulares levando à morte celular. O uso de PDT como terapia contra o câncer é especialmente atraente por causa de sua seletividade intrínseca, decorrente da afinidade do FS ao tecido maligno. Esta afinidade favorece a ativação do FS pela luz permitindo a geração de espécies reativas de oxigênio, as quais tem sido objeto de investigações intensas nos últimos anos. A descrição de morte celular programada ou apoptose (Samali *et al.*, 1996) tem revolucionado o campo das terapias citotóxicas em geral (Dixon *et al.*, 1997) e em especial da terapia fotodinâmica (Oleinick *et al.*, 2002). A localização sub-celular do FS, pode ocorrer em diferentes organelas celulares como as mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e membrana plasmática (Assunção Guimarães e Linden, 2004; Buckman *et al.*, 2001; Candal *et al.*, 2005; Castano *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005; Klionsky e Emr, 2000; Kübler, 2005). Entretanto as mitocôndrias têm despertado maior atenção devido ao seu envolvimento direto no processo apoptótico, sendo descrito por vários autores a importância da participação desta organela na PDT (Kessel e Luo, 1998; Panzarini *et al.*, 2006; Perrin Tamietti *et al.*, 2007). A Ciclosporina A (CsA), fármaco que tem sido utilizado em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças auto-imunes, como uma substância imunossupressora, em concentrações de 0,01 a 1,0  $\mu\text{M}$  pode proteger as células da apoptose induzida por estresse oxidativo não apenas impedindo a perda de potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ), mas também regulando a geração de ROS, proteína de choque térmico 70 (Hsp70) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (Chen *et al.*, 2002). A ação deste fármaco impede a montagem de proteínas complexas que formam o poro de transição de permeabilidade (PTP) da membrana mitocondrial interna (Rasola e Bernardi, 2007). CsA funciona bem nos primeiros estágios de apoptose e necrose envolvendo mitocôndrias, uma vez que abertura dos poros provoca despolarização, desacoplamento e aumento do volume mitocondrial. Pode haver ruptura da membrana externa, causando vazamento de proteínas do espaço intermembranar, incluindo o citocromo C, procaspase 9 e outros fatores que acionam a apoptose (Luo *et al.*, 1996).

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da mitocôndria no processo de morte celular por apoptose após a fotossensibilização com Photosan3<sup>®</sup>.

## Métodos

### *Cultura de células*

A linhagem celular murina M3 derivada de carcinoma de mama de camundongo, foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro. A cultura foi mantida em Meio de Cultura Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina 100 U/mL, streptomomicina 100 mM/mL e fungizona 0,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), todos obtidos da Life Technologies/Invitrogen. As células são mantidas em estufa incubadora a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> sendo tripsinizadas após crescimento confluinte e utilizadas nos experimentos.

### *Incubação com Ciclosporina A*

A linhagem celular M3 foi incubada com Ciclosporina A (CsA) nas concentrações de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , para avaliação da concentração ótima do bloqueio da atividade mitocondrial no processo de apoptose ( $n > 4$ ).

### *Incubação com o fotossensibilizante e tratamento fotodinâmico*

Após crescimento confluinte, a linhagem M3 foi tripsinizada e plaqueada na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL em microplacas de 24 poços ( $n \geq 4$ ). Foram separados os seguintes grupos: grupo controle I, células sem nenhum tratamento; grupo II PDT, células incubadas com Photosan3<sup>®</sup>; grupo III PDT, células incubadas com CsA e Photosan3<sup>®</sup>; grupo IV células tratadas somente com Estaurosporina (STS). Após 24 horas de incubação, as células dos grupos II e III foram incubadas com o fotossensibilizante Photosan<sup>®</sup> diluído em PBS (solução salina tamponada com fosfato), nas concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{M}/\text{mL}$  por 1 hora a 37°C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Ao grupo III, além do fotossensibilizante, foram adicionados 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de CsA. O grupo I controle foi incubado somente com PBS. O grupo IV foi utilizado como controle positivo para apoptose sendo utilizado 10  $\mu\text{g}$  de Estaurosporina (STS). Após 1 hora de incubação com Photosan3<sup>®</sup>, as células (grupo II e III) foram lavadas com PBS, sendo adicionados 200  $\mu\text{L}$  de PBS fresco para irradiação. Barreiras escuras foram colocadas entre os poços para prevenir a propagação da luz aos outros poços, sendo utilizada também uma barreira com orifício do diâmetro do poço (Figura 1).

A irradiação foi realizada ao abrigo da luz com diodo laser semicondutora (Unidade Laser Bio Wave LLLT Dual; Kondortech Equipamentos Odontológicos Ltda., São Carlos, Brazil). Os parâmetros de irradiação utilizados foram  $\lambda = 670$  nm, densidade de energia 4,5 J/cm<sup>2</sup> e potência de 35 mW. O grupo controle não submetido à irradiação também foi mantido ao abrigo da luz. Após irradiação o PBS foi removido e o meio DMEM com 10 % SFB foi adicionado às células de todos os grupos, que foram mantidas a temperatura de 37 °C em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. A viabilidade celular foi determinada 24 e 48 horas após o tratamento (n > 5).

### Viabilidade celular

Após os períodos de 24 e 48 horas após o tratamento, as culturas foram incubadas com 0,5 mg/mL de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma-Aldrich) por 1 hora e em

seguida adicionado dimetil sulfóxido (DMSO) sendo as culturas agitadas por 30 minutos. A leitura das placas foi realizada em Leitor de ELISA Spectracount (Packard Instrument Company Inc., Meriden, CT, USA) (n > 5).

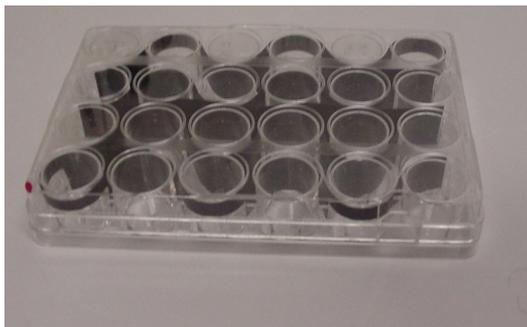
### Morte celular

Para avaliação do processo de morte celular as culturas, após os períodos de 24 e 48 horas pós- tratamento, foram incubadas com Anexina V e Iodeto de Propídio, marcadores fluorescentes indicadores de apoptose (Anexina V – 5 µL/mL) e necrose (Iodeto de Propídio 10 µL/mL), por 10 minutos, lavadas com tampão de ligação e analisadas ao microscópio invertido de fluorescência Leica DMIL, com câmera para captura de imagens modelo Leica DFC310FX (n > 5).

## Resultados

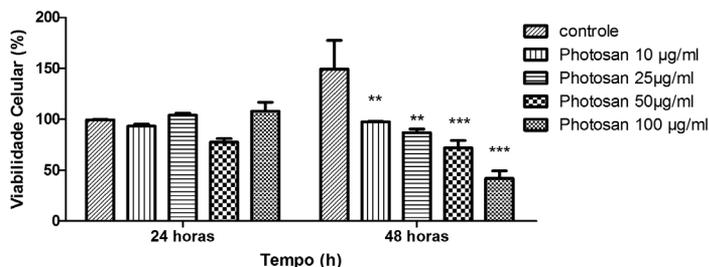
Trabalhos da década de 1990 relatam a utilização de Photosan3® nas concentrações de 7,5 µg-15 µg/mL, para PDT em queratinócitos e de 50-60 µg/mL para células da glia. Decorrente desta variação na concentração do fotossensibilizante para determinados tipos celulares, verificamos a necessidade de inicialmente estabelecer a concentração ótima para a linhagem M3, para tanto realizamos análise citotóxica do Photosan3® utilizando o teste de MTT. Os resultados obtidos demonstraram que a linhagem M3 requer uma concentração maior do fotossensibilizante, 100 µg/ml, para a obtenção de dose letal de 50% (DL50) após 48 horas da terapia (Figura 2).

A fotossensibilização das células M3 com Photosan3® teve como objetivo verificar o envolvimento da mitocôndria no processo de morte celular por apoptose, já que muitos trabalhos trazem esta organela como estrutura alvo na terapia fotodinâmica. Tal



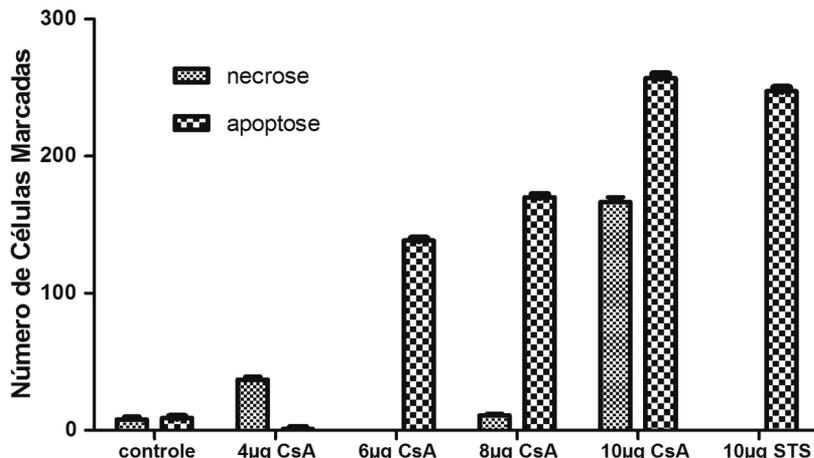
**Figura 1.** Modelo da placa utilizada para irradiação. Para o procedimento de irradiação os poços das placas de cultura foram isolados com máscaras pretas, impedindo a passagem de luz para os poços vizinhos.

**Figure 1.** Model plate used for irradiation. For the irradiation procedure the wells of the culture plates were isolated with black masks, preventing the passage of light for neighboring wells.



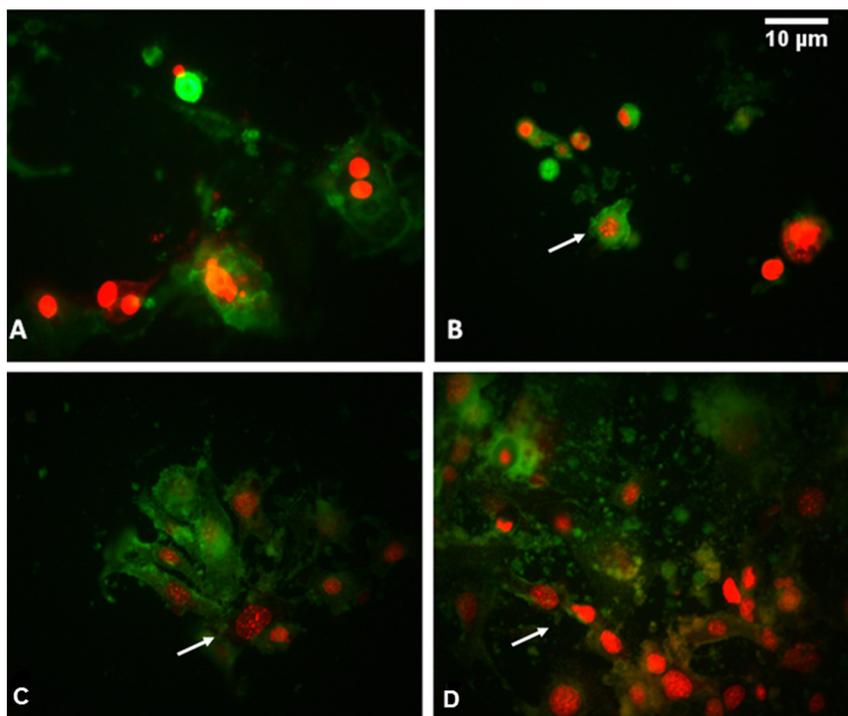
**Figura 2.** Gráfico de citotoxicidade pelo ensaio de MTT. As células M3 foram incubadas com concentrações crescentes de Photosan3®, sendo analisadas 24 e 48 horas após a PDT. Observa-se redução significativa (\*\* P<0,01) da viabilidade celular após 48 horas, quando comparadas as concentrações de 10 e 25 µg/mL de Photosan3®; com aumento da concentração do fotossensibilizador para 50 e 100 µg/mL observou-se uma redução extremamente significativa (\*\*\*) P<0,001) quando comparados com o grupo controle.

**Figure 2.** Graph of cytotoxicity by MTT assay. M3 cells were incubated with increasing concentrations of Photosan3®, and were analyzed 24 and 48 hours after PDT. There was significant reduction (\*\* P < 0.01) in cell viability after 48 hours, when compared the concentrations of 10 and 25 µg/ml Photosan3®; with increasing concentration of the photosensitizer to 50 and 100 µg/ml highly significant reduction was observed (P \*\*\* < 0.001) when compared with the control group.



**Figura 3.** Gráfico de morte celular por apoptose e necrose. A linhagem celular M3 foi incubada com concentrações crescentes de Ciclosporina A, sendo o controle positivo para apoptose 10 µg/mL de Estaurosporina (STS). A concentração de 4 µg/mL apresentou melhor desempenho, pois o número de células marcadas para apoptose foi o menor quando comparadas as outras concentrações.

**Figure 3.** Graph of cell death by apoptosis and necrosis. The M3 cell line was incubated with increasing concentrations of cyclosporine A, and the positive control for apoptosis 10 µg/mL of Staurosporine (STS). The concentration of 4 µg/mL showed a better performance, since the number of labeled cells to apoptosis was the smallest when compared to the other concentrations.



**Figura 4.** Avaliação de apoptose em células M3 submetidas a PDT. A linhagem celular M3, após incubação com CsA 4 µg/mL e 100 µg/mL de Photosan3®, foi submetida ao tratamento fotodinâmico e incubada por 24 horas e corada com iodeto de propídio (PI) e anexina V (AV). (A) Controle: apenas células. (B) Células M3 incubadas com 4 µg/mL de CsA com algumas células apoptóticas (seta). (C) Células M3 submetidas a PDT após incubação com CsA (4 µg/mL) e Photosan (100 µg/mL) apresentando células apoptóticas (seta). (D) Células M3 incubadas com STS 10 µg/mL, controle positivo para apoptose (seta).

**Figure 4.** Evaluation of apoptosis in M3 cells subjected to PDT. The M3 cell line, after incubation with CsA 4 µg/mL and 100 µg/mL of Photosan3®, was subjected to photodynamic treatment and incubated for 24 hours and stained with propidium iodide (PI) and annexin V (AV). (A) The control: only cells. (B) M3 cells incubated with 4 µg/mL CsA a few apoptotic cells (arrow). (C) M3 cells subjected to PDT after incubation with CsA (4 µg/mL) and Photosan (100 µg/mL) showing apoptotic cells (arrow). (D) M3 cells incubated with STS 10 µg/mL, positive control apoptosis (arrow).

importância é decorrente do papel da mitocôndria na apoptose já que ela induz a ativação de caspases e fragmentação do DNA (Adams, 2004). Para este estudo recorreu-se a utilização de CsA, fármaco que atua diretamente na formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, prevenindo a liberação de citocromo c para o citosol.

## Discussão

Os resultados obtidos demonstram que a concentração ótima de 4 µg/mL de CsA bloqueou a apoptose (Figura 3). Entretanto, quando as células M3 foram tratadas com CsA (4 µg) e Photosan3® (100 µg) e irradiadas observamos que a apoptose ainda ocorreu, como mostrado na Figura 4, independente da participação da mitocôndria. Este resultado sugere que, mesmo com o bloqueio da participação da mitocôndria, um mecanismo de morte apoptótica induzida pela fotossensibilização com Photosan3® em células da linhagem M3 ocorreu e portanto outras vias ou organelas podem estar envolvidas neste processo de morte celular (Figura 4).

O estabelecimento da(s) via(s) envolvida(s) no processo de morte celular, após PDT com Photosan3® em células da linhagem M3, necessita de mais estudos, uma vez que resposta a terapia tem variação de acordo com o tipo celular estudado. O envolvimento de diferentes alvos celulares como lisossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, na morte e sobrevivência celular permitem melhor compreender os mecanismos celulares desencadeados pela PDT. Além disso, sendo o Photosan3® um dos fotossensibilizantes mais utilizados, faz-se necessário pesquisar alternativas de entrega deste fotossensibilizante aos diferentes tipos celulares recorrendo-se a nanotecnologia, objetivando reduzir a concentração e ao mesmo tempo potencializando sua ação, uma vez que os resultados obtidos demonstram que PDT com Photosan3® para a linhagem M3 necessita de uma alta concentração do mesmo.

A utilização de CsA nas células tumorais de mama M3 permite concluir que a concentração de 4 µg de CsA é efetiva no impedimento da formação do poro de transição na membrana mitocondrial, bloqueando a participação da mitocôndria no processo apoptótico. O fotossensibilizante Photosan3® na concentração de 100 µg acarreta 50% de morte das células de mama M3. A associação de CsA e Photosan3® na terapia fotodinâmica permitiu concluir que a morte celular por apoptose não necessita somente da mitocôndria para ocorrer, outras vias podem ser utilizadas para ativar a morte celular.

## Agradecimentos

CNPq e FAPESP (projeto n° 2009/15206-8).

## Referências

- Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development*. 2004; 17:2481-95. PMID:14561771. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1126903>
- Assunção Guimarães C, Linden R. Programmed cell death. Apoptosis and alternative death styles. *European Journal of Biochemistry*. 2004; 271:1638-50. PMID:15096203. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04084.x>
- Buckman JF, Hernandez H, Kress GJ, Votyakova TV, Pal S, Reynolds IJ. Mito- Tracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *Journal of Neuroscience Methods*. 2001; 104:165-76. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0270\(00\)00340-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-0270(00)00340-X)
- Candal E, Anadon R, DeGrip WJ, Rodríguez-Moldes I. Patterns of cell proliferation and cell death in the developing retina and optic tectum of brown trout. *Developmental Brain Research*. 2005; 154:101-19. PMID:15617760. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devbrainres.2004.10.008>
- Castano AP, Deminova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnostic and Photodynamic Therapy*. 2004; 1:279-93. [http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4)
- Chen H-W, Chien C-T, Yu S-L, Lee Y-T, Chen W-J. Cyclosporine A regulate oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes: mechanisms via ROS generation, iNOS and Hsp70. *British Journal of Pharmacology*. 2002; 137(6):771-81. PMID:12411407 PMID:1573548. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0704908>
- Dixon SC, Soriano BJ, Lush RM, Borner MM, Figg WD. Apoptosis: its role in the development of malignancies and its potential as a novel therapeutic target. *Annals of Pharmacotherapy*. 1997; 31:76-82. PMID:8997471.
- Huang HF, Chen YZ, Wu Y. ZnPcS<sub>2</sub>P<sub>2</sub>-based photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in K562 cells. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. (Shanghai). 2005; 37:488-94. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2005.00067.x>
- Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2000; 42:389-413; quiz 414-6. [http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622\(00\)90209-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0190-9622(00)90209-3)
- Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 1998; 42(2):89-95. [http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344\(97\)00127-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1011-1344(97)00127-9)
- Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science*. 2000; 290: 1717-21.

PMid:11099404 PMCID:2732363. <http://dx.doi.org/10.1126/science.290.5497.1717>

Kübler AC. Photodynamic therapy. *Medical Laser Application*. 2005; 20:37-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mla.2005.02.001>

Luo Y, Chang CK, Kessel D. Rapid initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochemistry Photobiology*. 1996; 63(4):528-34. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03079.x>

Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. Apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why and how. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2002; 1:1-21. <http://dx.doi.org/10.1039/b108586g>

Panzarini E, Tenuzzo B, Palazzo F, Chionna A, Dini L. Apoptosis induction and mitochondria alteration in human HeLa tumour cells by photoproducts of Rose Bengal

acetate. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2006; 83(1):39-47. PMid:16427301. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2005.11.014>

Perrin Tamietti BF, Machado AHA, Maftoum-Costa M, Da Silva NS, Tedesco AC, Pacheco-Soares C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AIPCS4. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2007; 25(3):175-9. PMid:17603857. <http://dx.doi.org/10.1089/pho.2007.2040>

Rasola A, Bernardi P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis*. 2007; 12:815-33. PMid:17294078. <http://dx.doi.org/10.1007/s10495-007-0723-y>

Samali A, Gorman AM, Cotter TG. Apoptosis: the story so far. *Experimentia*. 1996; 52:933-41. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01920101>

---

## **Autores**

**Aline Llanos de Oliveira, Geisa Nogueira Salles, Juliana Macedo Costa Couceiro, Claudia Ebner, Cristina Pacheco Soares\***

Laboratório Dinâmica de Compartimentos Celulares, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, CEP 12244-390, São José dos Campos, SP, Brasil.

**Newton Soares da Silva**

Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP, São José dos Campos, SP, Brasil.