XXX Congresso de Iniciação Científica UNICAMP

Avaliação dos efeitos do antibiótico triclosan na morfologia mitocondrial de linhagens celulares de carcinoma de células escamosas orais (SCC-9 e LN-1A): Resultados preliminares com células SCC-9.

Clara A. Zaninetti, Amanda Mazzaro, Willian P. Boelcke, Edgard Graner, Débora C. Bastos.

Resumo

A regulação da dinâmica mitocondrial em células eucarióticas é regulada pelos processos de fusão/fissão e biogênese/degradação mitocondriais. O equilíbrio destes processos está associado com a manutenção da morfologia, número e função das mitocôndrias normais e podem ser desregulados em resposta a estressores ambientais. O Triclosan (antibiótico amplamente utilizado em produtos de higiene) é uma molécula da classe dos desacopladores de fosforilação oxidativa (FosOx) promovendo a diminuição da força próton-motriz e consequentemente a redução da produção de ATP, perda de potencial de membrana e consequentemente a alterações morfológicas mitocondriais. Além disso, o TCS é inibidor do domínio enoil redutase (ER) da enzima ácido graxo sintase (FASN). A FASN é responsável pela síntese endógena de ácidos graxos de cadeia longa, sendo superexpressa e associada a maior agressividade e risco de metástases no carcinoma de células escamosas oral (CCEO), assim, surge como um possível alvo terapêutico para esta neoplasia. Em trabalhos prévios de nosso grupo o TCS foi capaz de reduzir a proliferação, migração, invasão e adesão das células SCC-9 mais eficientemente quando comparado aos demais inibidores testados (C75, cerulenina e orlistat). De acordo com a teoria endossimbiótica do surgimento das mitocôndrias, podemos especular que a maior eficiência do TCS esteja associada a efeitos na FASN mitocondrial alterando a biogênese desta organela e o metabolismo energético. O papel do TCS na alteração da morfologia mitocondrial ainda não foi reportado na literatura. Nossos resultados demonstraram que o TCS aumentou significativamente o número de mitocôndrias, promoveu uma redução da eletron-densidade das cristas mitocondriais e resultou em um alongamento mitocondrial nas células SCC9 tratadas com TCS.

Palavras-chave: Ácido Graxo Sintase, Câncer Oral, Mitocôndria

Introdução

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) representa 90% das neoplasias malignas que acometem o sistema estomatognático, apresenta altos índices de recidiva e de metástases (El-Naggar et al., 2017). A enzima ácido graxo sintase (FASN - fatty acid synthase, EC 2.3.1.85) é responsável pela síntese endógena de ácidos graxos de cadeia longa, a partir dos precursores acetil-CoA e malonil-CoA (Kuhajda et al., 2000). A expressão de FASN tem sido associada a maior agressividade e risco de metástases no CCEO. Assim, a enzima FASN surge como um possível alvo terapêutico para esta neoplasia (Flavin et al., 2010).

A FASN possui sete sítios catalíticos os quais estão organizados sequencialmente em duas cadeias polipeptídicas (Smith et al., 2003). Inibidores naturais ou sintéticos da FASN contêm propriedades antiproliferativas e antineoplásicas e, em trabalhos anteriores do nosso grupo, o triclosan (TCS), inibidor do domínio enoil redutase (ER) da FASN, quando comparado aos demais inibidores testados (C75, cerulenina e orlistat), foi capaz de reduzir a proliferação, migração, invasão e adesão das células SCC-9 mais eficientemente (Boelcke et al., 2022). De acordo com a teoria endossimbiótica do surgimento das mitocôndrias (Zimorski et al., 2014), podemos especular que a maior eficiência do TCS esteja associada a efeitos na FASN mitocondrial alterando a biogênese desta organela e o metabolismo energético.

Além disso, o TCS é um conhecido desacoplador de FosOx (Ajao et al., 2015). Outros desacopladores de FosOx já foram reportados por promoverem alterações morfológicas em mitocôndrias associadas a perda de potencial de membrana (Jin et al., 2020). Os processos de fusão/fissão e biogênese e degradação de mitocôndrias, que podem ser avaliados através de microscopia eletrônica, são responsáveis pela dinâmica mitocondrial em células eucarióticas (Meyer et al., 2017). Esta complexa dinâmica de mitocôndrias são críticas para a regulação da morfologia, número, distribuição e função de mitocôndrias em células normais e tumorais e também a resposta a estresses ambientais (Meyer et al., 2017; Srinivasan et al., 2017).

Sendo assim, o objetivo deste projeto foi analisar e identificar as alterações mitocondriais vistas em células SCC-9 ZsGreen tratadas com TCS, utilizando microscopia eletrônica de transmissão. Foram avaliadas características morfológicas que

refletem alterações na biologia e função destas organelas como o número de mitocôndrias, eletrondensidade das cristas mitocondriais, área e perímetro, além da distância entre as mitocôndrias, presenças de mitocôndrias em vacúolos, fissão/fusão e alongamento mitocondrial.

Material e Métodos

Cultura

- Células SCC9 p-33 a p-35
- Meio DMEM/F-12 + 10% FBS
- Placa de Petri 90 x 20 mm

Plaqueamento

- $8X10^5$ células
- Meio DMEM/F-12 + 10% FBS
- Garrafas T25

Sincronização ciclo celular

- Meio DMEM/F-12 sem FBS – 24h

Tratamento

- Triclosan em diferentes concentrações (tabela 1)
- Por 48h em meio DMEM/F-12 + 2% FBS
- Veiculo DMSO
- Troca meio e drogas a cada 24h
- Doses calculadas em trabalhos prévios

Processamento

- Fixação: solução de Karnovsky – 24h
- Tampão fosfato de Sorensen – 5 minutos
- Tetróxido de ósmio a 1%.
- Desidratação (acetona) e infiltração por resina (Dr. Spurr)

Análise

- Área
- Perímetro
- Distância entre mitocôndrias
- Vacúolos autofágicos com mitocôndrias
- Fusão mitocondrial
- Alongamento mitocrondrial (medida dos eixos)

	TCS (uM)	TCS à 5 mM (uL)	DMSO (uL)
DMSO	0	0	2.33
$IC_{12,5}$	5.82	3.49	10.48
IC_{25}	11.64	6.98	6.99
IC_{50}	23.29	13.97	0.00

Tabela 1: Doses relativas ao $IC_{12.5}$, IC_{25} e IC_{50} de TCS para os tratamentos e seus respectivos volumes aplicados.

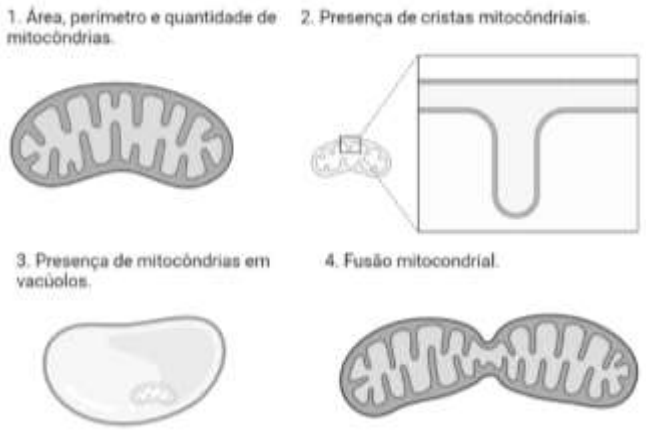

Figura 1: Características morfológicas mitocondriais comparadas entre células tratadas com TCS e com seu veículo (DMSO).

Resultados e Discussão

A morfologia das células SCC9 é afetada pelo tratamento com o TCS.

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa evidenciaram que, após tratamento com TCS as células SCC9 apresentaram redução no tamanho celular e aumento de grânulos citoplasmáticos (Boelcke et al., 2022). No presente projeto, as alterações morfológicas descritas por Boelcke et al., 2022 foram reproduzidas. Observamos que além da redução progressiva do número de células nos tratamentos com as concentrações relativas ao $IC_{12,5}$ (Figura 1B), IC_{25} (Figura 1C) e IC_{50} (Figura 1D), o tamanho das células no tratamento com o IC_{50} também foi reduzido.

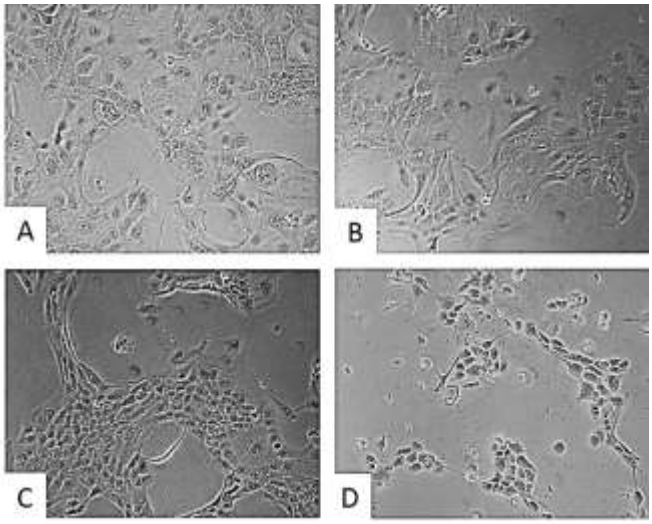

Figura 2: Células SCC-9 tratadas com diferentes concentrações de TCS por 48 horas. Células que receberam somente o veículo apresentaram tamanho e morfologia igual às células SCC-9 (A). As células tratadas com concentrações relativas ao $IC_{12,5}$ (B) IC_{25} (C) e IC_{50} (D) tiveram redução progressiva na confluência e do tamanho.

O número de mitocôndrias em células SCC9 é significativamente aumentado com doses elevadas de triclosan.

A análise comparativa feita através da contagem das mitocôndrias das células SCC9 tratadas com o TCS em comparação ao veículo revelou um aumento significativo do número de mitocôndrias na concentração máxima relativa ao IC_{50} deste composto (Figura 3A). É importante notar que a diferença no número de mitocôndrias do grupo relativo ao IC50 se manteve após a normalização do número de mitocôndrias pela área total das células (Figura 3B). O tamanho celular foi afetado pelo tratamento com a dose relativa ao IC_{50} conforme observado na Figura 3F em comparação ao veículo e às concentrações relativas ao IC12,5 e IC25 (Figura 3C-E).

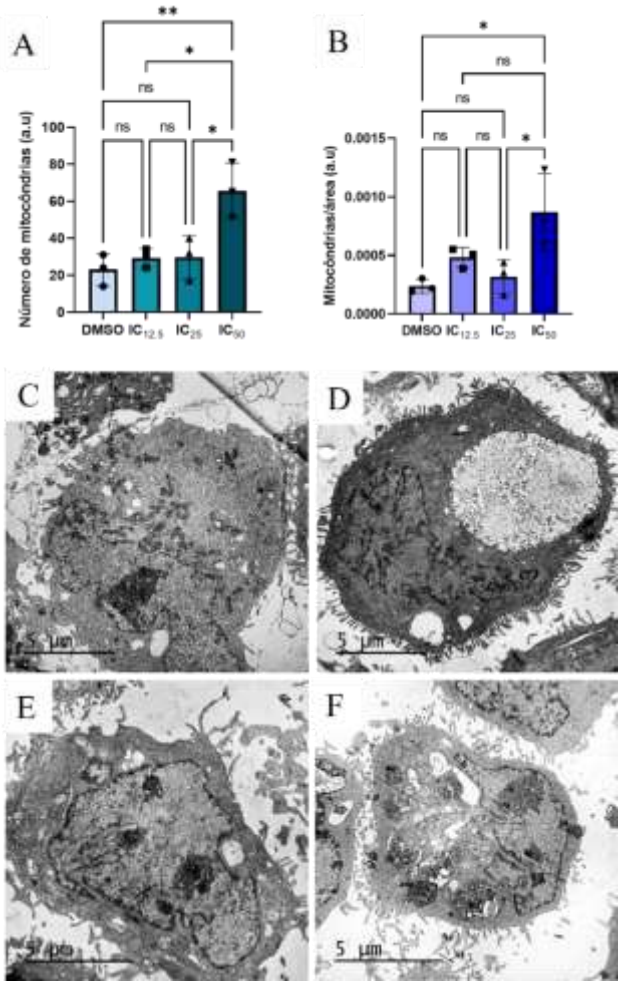

Figura 3: O tratamento com TCS promove redução do tamanho das células SCC9 e aumento no número de mitocôndrias. **A)** O número de mitocôndrias foi significativamente aumentado pelo tratamento com a concentração relativa ao IC_{50} do TCS. **B)** O número de mitocôndrias por célula permaneceu significativamente aumentado nas células SCC9 tratadas com a concentração relativa ao IC50 após a normalização pela área. O tratamento com o IC_{50} (F) promoveu também uma redução importante do tamanho das células SCC9 em relação ao DMSO **(C),** $IC_{12,5}$ **(D)** e IC_{25} **(E)**. As fotomicrografias C, D, E, F evidenciam também a quantidade mitocôndrias por célula de cada grupo das células SCC9. Os gráficos representam a média das análises de três células diferentes. ns=não significativo, *p<0.05, **p<0.005; one-way ANOVA, post test Tukey.

A área, o perímetro e a distância entre as mitocôndrias não são afetados pelo tratamento com triclosan, já as cristas mitocondriais ficam menos evidentes com o tratamento.

A análise comparativa feita através da medição das mitocôndrias presentes nos 4 grupos de células SCC9 não apontou diferença estatística significativa na área (Figura 4A), perímetro (Figura 4B) e distância intermitocondria (Figura 4C) entre o grupo controle e o tratamento com diferentes concentrações de TCS. Por outro lado, o número de mitocôndrias com cristas evidentes na microscopia eletrônica foi significativamente maior no controle (Figura 4D e 4E-detalhe) em relação ao tratamento com as concentrações relativas ao $IC_{12,5}$ (Figura 4F), IC_{25} (Figura 4G) e IC_{50} (Figura 4H).

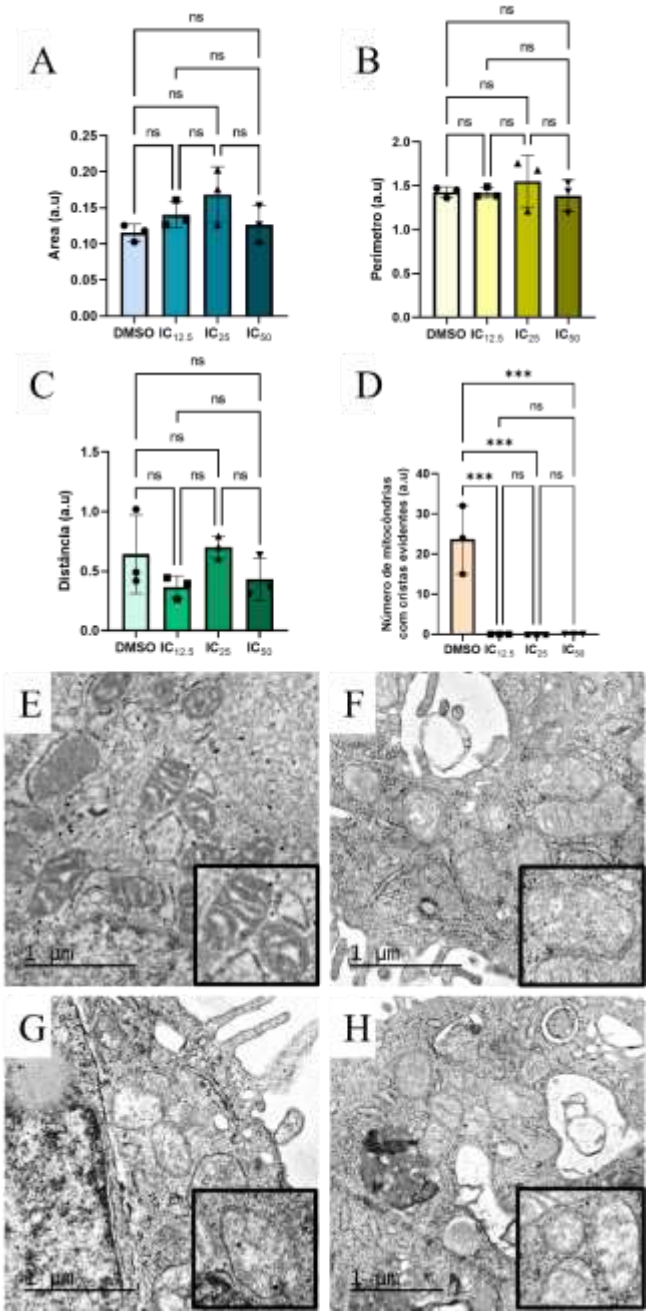

Figura 4: O tratamento com TCS não afeta a área, perímetro e distância entre as mitocôndrias nas células SCC9 mas interfere significativamente da eletron-densidade das cristas mitocondriais. As diferenças encontradas na área (A), perímetro (B) e distância intermitocondrial (C) das células tratadas com diferentes concentrações de TCS não foram estatisticamente significativas quando comparadas ao veículo DMSO. **D)** A presença de cristas mitocondriais evidentes em

células tratadas apenas com o veículo DMSO (E) foi significativamente afetada pelo tratamento com o IC12,5 (F), IC25 (G) e IC50 (H). Os gráficos representam a média das análises de três células diferentes. ns=não significativo, ***p<0.0005; one-way ANOVA, post test Tukey.

O tratamento com doses elevadas de TCS aumenta, porém não significativamente, a presença de mitocôndrias em vacúolos e não interferem no processo de fusão/fissão mitocondrial.

O tratamento com doses elevadas de TCS foi capaz de promover um aumento, não significativo, de mitocôndrias em vacúolos celulares (Figura 5A). Os vacúolos celulares são identificados pela presença de áreas não eletron-densas na microscopia eletrônica e contêm pequenos fragmentos mitocondriais em seu interior (Figura 5B). A análise comparativa feita pela identificação de fusão/fissão mitocondrial demonstrou diferenças não significativas (Figura 5C). Os processos de fusão/fissão não podem ser distinguidos em microscopia eletrônica e se caracterizam pela presença de uma parede eletrondensa no interior mitocondrial (Figura 5D).

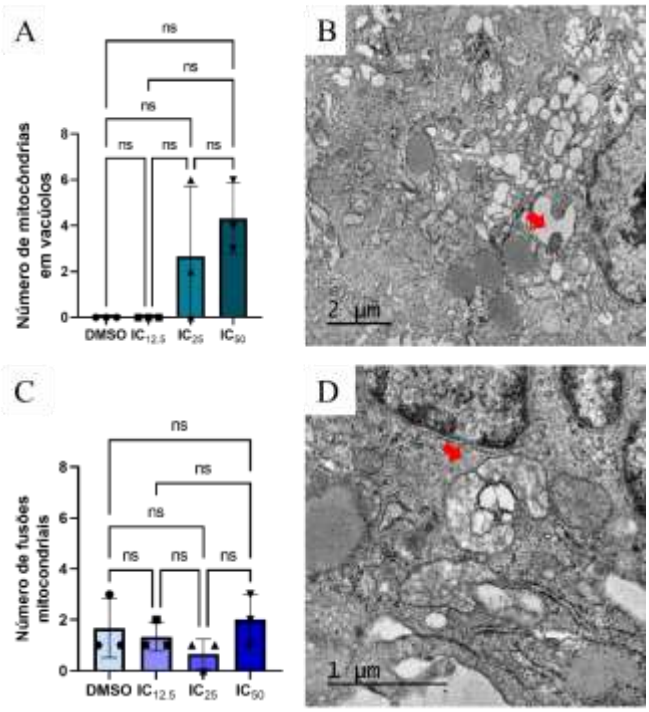

Figura 5: O TCS pode interferir na degradação mitocondrial. A) A presença de mitocôndrias em vacúolos em células tratadas com as concentrações relativas ao IC_{25} e IC_{50} de TCS foi aumentada, porém não significativamente em relação ao veículo. **B)** A seta evidencia mitocôndria presente em vacúolo celular, em uma célula presente no grupo IC_{25}. **C)** Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos de células tratadas com o TCS em comparação às células tratadas apenas com o veículo. **D)** A seta evidencia a presença de fusão mitocondrial, em uma célula presente no grupo IC_{25}. Os gráficos representam a média das análises de três células diferentes. ns=não significativo; one-way ANOVA, post test Tukey.

O tratamento com triclosan resulta em aumento da relação entre os eixos mitocondriais evidenciando alongamento mitocondrial.

O maior e o menor eixo de cada uma das mitocôndrias do veículo e das diferentes concentrações de TCS foi mensurada. A média do maior eixo das mitocôndrias foi de 0,5 µM e a média do menor eixo foi de 0,25 µM. Observamos uma tendência ao aumento de mitocôndrias com o maior eixo acima da média (Figura 5A) e uma redução do número de mitocôndrias com menor eixo abaixo da média encontrada. (Figura 5B) no tratamento com diferentes concentrações de TCS. A relação média entre o maior e o menor eixo foi de 0,2. Observamos um aumento do número de mitocôndrias com a razão entre os eixos maior que a média e uma redução do número de mitocôndrias com a razão menor que 0,2 (Figura 5C). Esses resultados mostram uma tendência ao alongamento mitocondrial a presença de TCS.

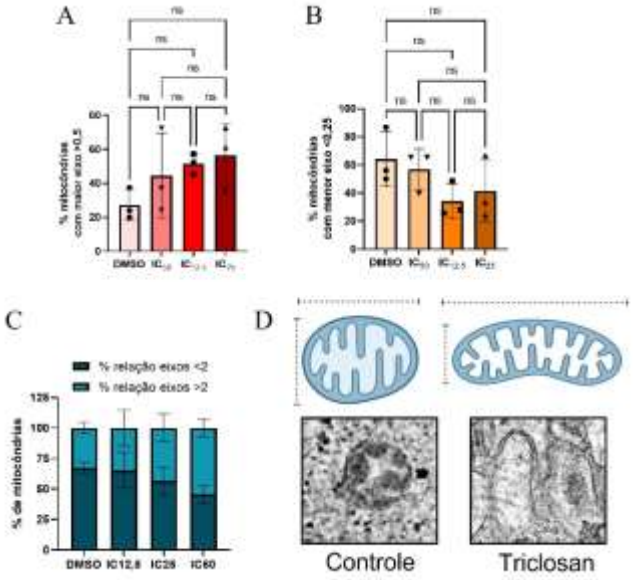

Figura 6: **O tratamento com TCS resulta em uma tendência ao alongamento mitocondrial. A)** O tratamento com TCS promoveu aumento do eixo mitocondrial em concentrações relativas ao $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}, porém não significativamente. **B)** O tratamento com triclosan promoveu redução da porcentagem de mitocôndrias com menor eixo <0,25 em concentrações relativas ao $IC_{12,5}$, IC_{25}, IC_{50}, porém de maneira não significativa. **C)** A porcentagem de mitocôndrias com a relação entre os eixos aumentada (maior que a média 2) foi aumentada de maneira dose-dependente.,. **D)** Diferenças morfológicas, relativas ao formato celular, vistas nas células do grupo controle e tratamento com IC_{50}. Os gráficos representam a média das análises de três células diferentes. ns=não significativo; one-way ANOVA, post test Tukey.

Conclusão

O tratamento com TCS promoveu um aumento do número de mitocôndrias na concentração relativa ao IC_{50} e uma possível redução da eletro-densidade das cristas mitocondriais em todas as concentrações utilizadas. Além disso, observamos que o número de mitocôndrias em vacúolos foi aumentado, não significativamente, e houve uma tendência ao alongamento mitocondrial em concentrações mais elevadas do TCS. Em conjunto, esses resultados sugerem que o uso do TCS pode afetar características morfológicas mitocondriais que refletem alterações importantes da dinâmica mitocondrial, especialmente a

mitobiogênse, mitofagia e perda do potencial de membrana.

Referências

Ajao C, Andersson MA, Teplova VV, Nagy S, Gahmberg CG, Andersson LC, Hautaniemi M, Kakasi B, Roivainen M, Salkinoja-Salonen M. Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. Toxicol Rep. 2015 Apr 7;2:624-637.

Boelcke WP, Teixeira IF, Aquino IG, Mazzaro AR, Cuadra-Zelaya FJM, de Souza AP, Salo T, Della Coletta R, Graner E, Bastos DC. Pharmacological fatty acid synthase inhibitors differently affect the malignant phenotype of oral cancer cells. Arch Oral Biol. 2022 Mar;135:105343.

El-Naggar AK, Chan JK, Grandis Jennifer R, Takata T, Slootweg PJ, organizadores. WHO Classif Head Neck Tumours. Fourth. 2017;109– 11

Flavin R, Peluso S, Nguyen PL, Loda M. Fatty acid synthase as a potential therapeutic target in cancer. Future Oncology. 2010; 6(4): 551-562.

Jin JY, Wei XX, Zhi XL, Wang XH, Meng D. Drp1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease. Acta Pharmacol Sin. 2021 May;42(5):655-664. doi: 10.1038/s41401-020-00518-y. Epub 2020 Sep 10.

Kuhajda FP. Fatty-Acid Synthase and Human Cancer: New Perspectives on Its Role in Tumor Biology. Nutrition. 2000; 16: 202-208.

Meyer JN, Leuthner TC, Luz AL. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity. Toxicology. 2017 Nov 1;391:42-53. doi: 10.1016/j.tox.2017.07.019. Epub 2017 Aug 5.

Smith S, Witkowski A, Joshi AK. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. Progress in Lipid Research. 2003; 42: 289-317.

Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. Biochim Biophys Acta Bioenerg. 2017 Aug;1858(8):602-614. doi: 10.1016/j.bbabio.2017.01.004. Epub 2017 Jan 16.

Zimorski V., Ku C., Martin W.F. and Gould S.B. Endosymbiotic theory for organelle origins. Curr. Opin. Microbiol. 2014; 22: 38–48.