

QUANTIFICAÇÃO DE CITOCROMO *c* EXTRACELULAR A PARTIR DE INDUÇÃO DE APOPTOSE EM CÉLULAS NORMAIS EM CULTURA

Marta Verônica da Silva Queiroz Nascimento¹; Prof^a Dr^a Katia Cristina Ugolini Mugnol².

Estudante do Curso de Farmácia (Bacharelado); e-mail: romário.s2.marta@hotmail.com ¹
Professora da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: katiac@umc.br ²

Área do Conhecimento: Bioquímica

Palavras-chave: Citocromo *c*; Apoptose; Neoplasia

INTRODUÇÃO

O citocromo *c* é uma hemoproteína intramitocondrial, presente na face externa da membrana interna mitocondrial, que tem como papel principal o transporte de elétrons na cadeia respiratória, especificamente entre os complexos III e IV. Porém, sabe-se hoje que desenvolve também papel importante na via intrínseca do processo de morte celular apoptótica. Quando liberado para o citosol, associa-se com a proteína Apaf-1 e caspase-9 formando um complexo chamado apoptossomo, que por sua vez promove a ativação em cadeia de outras enzimas e processos que culminam com a morte celular (GRIVICICH et. al., 2007; MURPHY, 2010). Um mecanismo apoptótico desregulado pode levar ao desenvolvimento de várias patologias, dentre elas a neoplasia, o que tem estimulado o estudo deste processo na tentativa de controle de combate da doença. Estudos como o de Renz (2001) e Barzicks (2005), trouxeram dados para uma possível nova aplicação dos estudos envolvendo citocromo *c*. Eles demonstraram que o citocromo *c* pode vir a ser um importante biomarcador no acompanhamento de pacientes sob terapia antitumoral, já que em determinadas condições, ainda pouco elucidadas, parte do citocromo *c* citosólico passa para o meio extracelular e, conseqüentemente, pode ser detectado no plasma. Baseado nestas descobertas é possível pensar em sua utilização como marcador na monitorização dos processos terapêuticos antitumorais, possivelmente associado a outros já padronizadas, dentre eles o mais comum que é a lactato desidrogenase (LDH).

OBJETIVOS

Quantificar citocromo *c* e lactato desidrogenase (LDH) extracelulares provenientes da indução de morte de células normais em cultura por DMSO, H₂O₂, actinomicina D e doxorubicina.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do projeto foram utilizadas nesta primeira fase células normais em cultura, mais especificamente células aderentes de músculo liso de aorta de coelho (MLAC). As mesmas foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 40% de soro fetal bovino e *pool* de antibióticos (penicilina e estreptomicina) e com crescimento promovido à 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Ao atingir confluência de 80%, foram montadas placas-teste em triplicatas onde 100 µL da suspensão de células com densidade de 0,5x10⁶ células/mL foram colocados em contato com os agentes selecionados para o teste (DMSO, H₂O₂, citocromo *c*, actinomicina D e doxorubicina), em diferentes concentrações. As placas foram

incubadas por 24 horas e o sobrenadante coletado para realização dos testes de detecção de citocromo *c* por eletroforese SDS-Page e dosagem de LDH por espectrofotometria utilizando kit comercial Sigma Aldrich® (catálogo MAK066). A fração celular aderida às placas foi submetida na sequência ao ensaio de viabilidade celular por MTT (3-[4,5dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) e as leituras de absorbância obtidas em leitor de placas ELx800 em comprimento de onda de 570 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise dos testes de viabilidade celular por MTT (Figura 1) demonstram que os diferentes agentes indutores de morte utilizados promoveram diferentes níveis de queda de viabilidade celular e diferentes perfis na concentração de LDH no meio extracelular (Figura 2). Tanto o DMSO quanto o H₂O₂, utilizados no experimento como controles-positivo de morte celular, promoveram queda na viabilidade celular de modo dose-dependente. Quando comparados aos resultados de dosagem de LDH (Figura 2) nota-se que paralelamente à queda na viabilidade celular houve também aumento proporcional na concentração de LDH no meio extracelular. Já a adição de diferentes concentrações de citocromo *c* ao meio demonstrou que o mesmo não exerce qualquer efeito sobre a viabilidade celular e sobre a concentração de LDH, permanecendo todos os valores próximos aos dos controle-negativo utilizado no teste (só células). Este resultado vai contra o que alguns autores referiram (RENZ et. al., 2001), onde citam que a presença de citocromo *c* extracelular promoveria algum nível de efeito citotóxico que poderia estar associada ao desenvolvimento de patologias quando liberado em excesso na corrente sanguínea. Já os resultados obtidos quando do contato das células com diferentes concentrações de actinomicina D e doxorubicina, dois agentes quimioterápicos utilizados na rotina terapêutica antitumoral, demonstraram que, mesmo os dois sendo agentes considerados pela maioria dos autores como indutores de apoptose (GOODMAN & GILMAN, 2012), têm níveis diferentes de efeito, nas condições testadas, sobre a viabilidade celular e a liberação de LDH. A actinomicina D promoveu redução de viabilidade celular 50% superior à promovida pela doxorubicina, nas mesmas concentrações e condições testadas. Entretanto, mesmo ambas tendo reduzido a viabilidade celular, somente para a actinomicina D houve liberação de LDH para o meio extracelular. Para a doxorubicina, os valores de LDH permaneceram os mesmos que para o controle-negativo. Isto demonstra que existem diferenças no mecanismo de indução de morte celular e diferente resposta da linhagem utilizada a classes distintas de quimioterápicos. Quando analisamos a liberação de citocromo *c* utilizando a técnica de SDS-Page (figura não mostrada), foi possível determinar a presença desta proteína no meio extracelular em todas as situações em que houve diminuição da viabilidade celular em relação à amostra-controle. Tanto as amostras às quais foram adicionados DMSO e H₂O₂ quanto as que receberam doxorubicina e actinomicina D apresentaram banda condizente com citocromo *c*, tendo sido utilizados como referência tanto o padrão de peso molecular comercial quanto amostras de citocromo *c* purificado e em três concentrações distintas. A quantidade de citocromo *c* detectada foi inferior a 10 µM para todos os sistemas testados, sendo que os valores reais para cada um serão obtidos a partir da realização de dosagem anticorpo-específica pelo método ELISA, que é parte integrante da segunda fase deste projeto. Preliminarmente, já podemos dizer que a liberação de citocromo *c* para o meio extracelular não acompanhou a liberação de LDH em todos os sistemas, o que demonstra que é possível que tenhamos nesta proteína mitocondrial um marcador específico para processos que não possam ser demonstrados a partir da quantificação apenas de LDH.

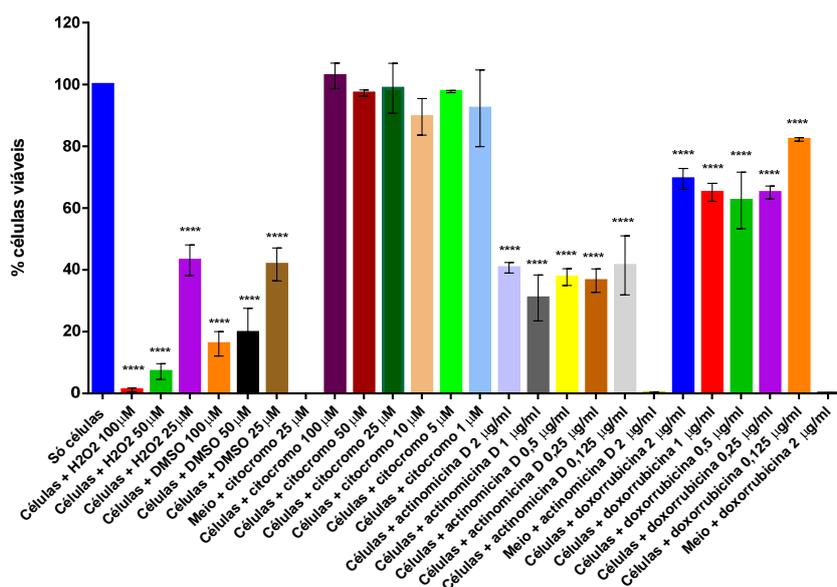


Figura 1. Teste de viabilidade celular por MTT. Incubação de $0,5 \times 10^6$ células/mL por 24 horas seguida da adição dos compostos e posterior incubação por 48 horas. Leitura dos valores de absorvância após dissolução dos cristais de formazam realizadas em 570 nm. Transformação em percentual de viabilidade considerando-se o controle “só células” como representativo de 100% de viabilidade. Análise estatística realizada por one-way ANOVA, com valor de $p < 0,05$, sendo que os símbolos dispostos no gráfico (*) representam o nível de significância estatística da amostra em relação ao controle, sendo (*) o mínimo e (****) o máximo. Todos os dados foram tabulados utilizando o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

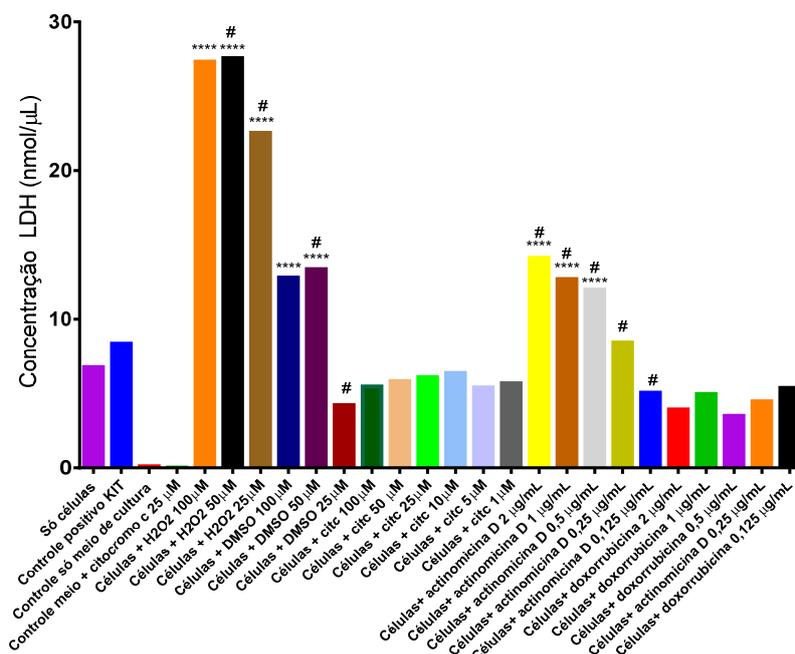


Figura 2. Dosagem de LDH em sobrenadante coletado de células cultivadas na presença e ausência de agentes indutores de morte celular. Análise estatística realizada t-student considerando valor de $p < 0,05$, sendo que os símbolos dispostos no gráfico (*) representam o nível de significância estatística da amostra em relação ao controle, sendo (*) o mínimo e (****) o máximo. O sinal # representa que há diferença estatisticamente significativa entre as amostras sinalizadas, uma em relação à imediatamente anterior. Não são apresentadas barras de erro pois o gráfico foi construído com as médias das leituras de cada amostra em dois diferentes tempos de reação. Todos os dados foram tabulados utilizando o *software* GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que diferentes drogas quimioterápicas induzem a diferentes graus de redução da viabilidade celular bem como de liberação de

citocromo *c*, uma proteína intramitocondrial, e LDH, uma proteína citosólica. Demonstramos que o LDH, tradicionalmente utilizado como um marcador de injúria celular, deve ser empregado com este fim com cuidado, pois pode não expressar corretamente o grau dano sofrido e o nível de viabilidade celular presente. Os resultados até o momento permitem também pressupor que a determinação da presença e quantidade de citocromo *c* extracelular seja um potencial novo biomarcador deste processo. Requer-se, entretanto, ampliação dos estudos tanto em células normais quanto em células tumorais, bem como a aplicação de técnicas de maior sensibilidade e especificidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARCCZYK, K.; KREUTER, M.; PRYUMA, J.; BOOY, E.P.; MADDIKA, S.; GHAVAMI, S.; BERDEL, W.E.; ROTH, J.; LOS, M. **Serum cytochrome c indicates *in vivo* apoptosis and can serve as prognostic marker during cancer therapy.** International Journal Cancer, 116: 167-173, 2005.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica.** 12^a edição. MacGraw-Hill Interamericana do Brasil, 1712-1715 p, 2012.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. **Apoptosis: programmed cell death.** Revista Brasileira de Cancerologia; 53(3): 335-343, 2007.

MURPHY, Kenneth. **Imunobiologia de Janeway.** 7^a edição. p.249. Artemed, 2010.

RENZ, Andrea; BERDEL, Wolfgang E.; KREUTER, Michael; BELKA, Claus; SCHULZE-OSTHOFF, Klaus; and LOS, Marek. **Rapid extracellular release of cytochrome c is specific for apoptosis and marks cell death *in vivo*.** The American Society of Hematology. BLOOD, 1, VOLUME 98, NUMBER 5, SEPTEMBER, 2001.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à CNPq pela bolsa concedida, à Universidade de Mogi das Cruzes pela oportunidade de participar deste projeto, à Prof^a Dr^a Katia Cristina Ugolini Mugnol pela sua dedicação ao projeto e ao meu aprendizado.