

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

Marta Verônica da Silva Queiroz Nascimento¹; Katia Cristina Ugolini Mugnolo².

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail:romário.s2.marta@hotmail.com¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: katiac@umc.br²

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 e tumorais em cultura por DMSO, H₂O₂, actinomicina D, doxorubicina e citocromo *c* exógeno.

METODOLOGIA

Para o desenvolvimento do projeto foram cultivadas células de músculo liso de aorta de coelho (MLAC) e linhagem de leucemia mileoide crônica K562. As mesmas foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, respectivamente, ambos suplementado com 10% 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 para ambas as linhagens celulares foram colocadas em contato com os agentes indutores de morte celular selecionados (DMSO, H₂O₂,

citocromo *c*, actinomicina D e doxorrubicina), em diferentes concentrações. As placas foram incubadas por 48 horas e o sobrenadante coletado para realização dos testes de detecção de citocromo *c* por Elisa com anticorpo anticitocromo *c* e dosagem de LDH por método enzimático utilizando kit comercial Sigma Aldrich® (catálogo MAK066) por espectrofotometria. A fração celular foi submetida 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, sendo que para células MLAC usou-se a fração celular aderida a placa e para células K562 em suspensão uma segunda placa-teste realizada em duplicata para a coleta de sobrenadante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as células de MLAC constatou-se que os agentes indutores de morte utilizados (DMSO, H₂O₂, Actinomicina D e Doxorrubicina) promoveram diferentes níveis de redução da viabilidade celular e do perfil de liberação de LDH e citocromo *c* para o meio extracelular, o que pode ser um indicativo de que mecanismos diferentes estejam envolvidos no processo de morte celular, bem como que os marcadores pesquisados (LDH e citocromo *c* extracelular) sejam liberados em momentos diferentes do processo (Figura 1 e 2).

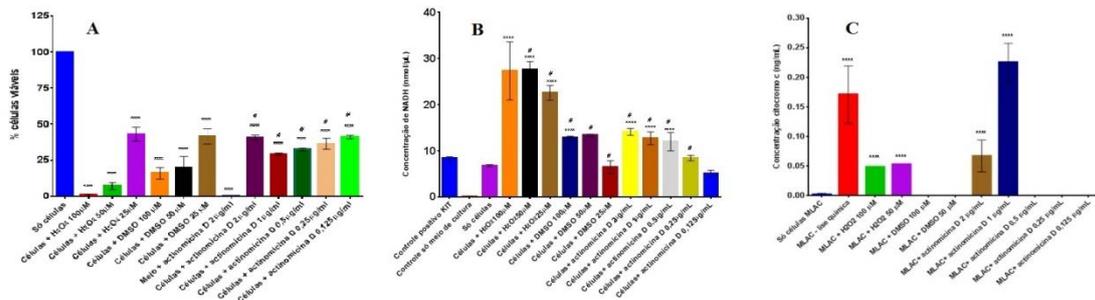


Figura 1. Células normais de músculo liso de aorta de coelho (MLAC). Incubação de $0,5 \times 10^6$ células/mL por 24 horas seguida da adição dos compostos controles-positivos (H₂O₂ e DMSO) e Actinomicina D e posterior incubação por 48 horas. (A) Teste de viabilidade celular por MTT. (B) Dosagem de LDH em sobrenadante coletado. (C) Quantificação de citocromo *c* pelo método de ELISA em sobrenadante coletado. 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. O sinal # representa que há diferença estatisticamente significante entre as amostras sinalizadas, uma em relação à imediatamente anterior. Todos os dados foram tabulados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

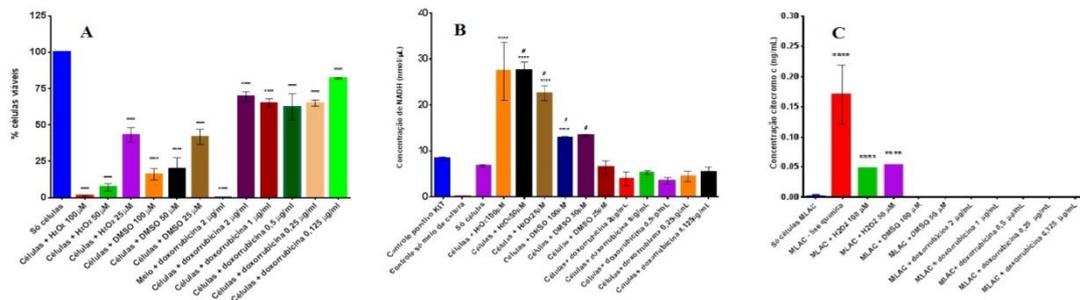


Figura 2. Células normais de músculo liso de aorta de coelho (MLAC). Incubação de $0,5 \times 10^6$ células/mL por 24 horas seguida da adição dos compostos controles-positivos (H₂O₂ e DMSO) e Doxorrubicina e posterior incubação por 48 horas. (A) Teste de viabilidade celular por MTT. (B) Dosagem de LDH em sobrenadante coletado. (C) Quantificação de citocromo *c* pelo método de ELISA em sobrenadante coletado. 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. O sinal # representa que há diferença estatisticamente significante entre as amostras sinalizadas, uma em relação à imediatamente anterior. Todos os dados foram tabulados utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Tanto DMSO quanto o H₂O₂ induziram redução da viabilidade celular e liberação de LDH de maneira dose-dependente, porém com valores mais significativos para H₂O₂. Estes indutores de morte promovem a morte celular sabidamente por necrose, um evento bem elucidado, tendo como principal característica a liberação de LDH para

meio extracelular. O marco diferencial dos resultados aqui apresentados foi demonstrar que houve também neste mesmo evento a liberação de citocromo *c* para meio extracelular. Para os quimioterápicos testados os resultados de quantificação de citocromo *c* corroboraram os resultados obtidos de viabilidade celular e liberação de LDH. A Actinomicina D (Figura 1) promoveu uma diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente com liberação de LDH para meio extracelular inversamente proporcional à viabilidade e liberação de citocromo *c* nas maiores concentrações da droga. A Doxorrubicina (Figura 2), que apresentou menor citotoxicidade, não induziu liberação significativa de LDH em relação ao controle só células e não apresentou citocromo *c* quantificável em nenhuma das condições testadas, o que evidencia que o processo pelo qual estas proteínas são liberadas para o meio extracelular não são concomitantes. Para células tumorais (K562) os resultados obtidos para Actinomicina D (Figura 3 A) evidenciam que nas concentrações testadas houve redução da viabilidade celular, porém não dose-dependente. Para a Doxorrubicina (Figura 3 B) a redução da viabilidade só ocorreu nas maiores concentrações, sendo estes resultados indicativos, quando comparados aos empregando células normais MLAC que a droga se mostra mais efetiva quando agindo sobre células tumorais. Os controles-positivos de morte (DMSO, H₂O₂) apresentaram efeitos citotóxicos, como esperado, havendo maior redução de viabilidade na presença de H₂O₂, assim como ocorreu nas células MLAC. A ação do DMSO, por sua vez, promoveu menor redução da viabilidade sendo esta entretanto, dose-dependente.

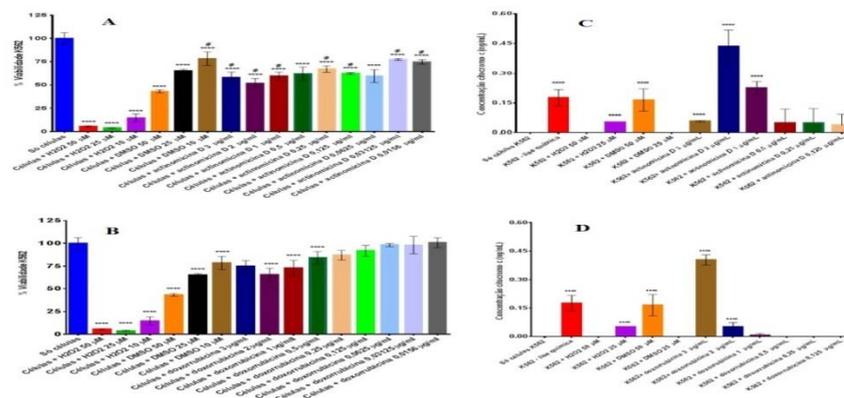


Figura 3. Células tumorais de leucemia mieloide crônica (K562). Teste de viabilidade celular por MTT. Incubação de $0,5 \times 10^6$ células/mL por 24 horas seguida da adição dos compostos (A) Actinomicina D e (B) Doxorrubicina e posterior incubação por 48 horas. Leitura dos valores de absorbância após 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. Quantificação de citocromo *c* pelo método de ELISA em sobrenadante coletado na presença e ausência de agentes indutores de morte celular (C) Actinomicina D e (D) Doxorrubicina. 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).

Na linhagem tumoral testada houve liberação de citocromo *c* ao meio extracelular tanto por ação da Actinomicina D (Figura 3 C) quanto da Doxorrubicina (Figura 3 D), porém para esta última foi quantificável apenas nas maiores concentrações de doxorrubicina. Para actinomicina D detectou-se a presença de citocromo *c* extracelular em todas as concentrações testadas. Para os controles-positivos houve liberação de citocromo *c* tanto na presença de H₂O₂, quanto de DMSO. Em ambas as linhagens testadas, o acréscimo de citocromo *c* exógeno ao meio de cultura não induziu redução da viabilidade celular, contrariando trabalhos publicados (RENZ et. al., 2001) que afirmavam efeito citotóxico desta proteína quando nas mesmas condições.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que diferentes drogas quimioterápicas induzem a diferentes graus de redução da viabilidade celular nas células normais e tumorais apresentadas neste estudo. Os resultados expostos aqui permitem inferir que existem mecanismos diferentes envolvidos na liberação de citocromo *c* (proteína intramitocondrial de 12 kDa) e de LDH (proteína citosólica de 140 kDa) para o meio extracelular. O LDH, rotineiramente empregado como marcador de injúria celular, deve ser empregado com cuidado, pois pode não expressar corretamente o grau de dano sofrido e o nível de redução de viabilidade celular pós-tratamento com indutores de morte celular. O citocromo *c* extracelular, por sua vez, demonstrou ser mais específico como marcador de redução de viabilidade em células tumorais do que em células normais. Os resultados obtidos até o momento permitem também pressupor que a determinação da presença e quantidade de citocromo *c* extracelular seja um potencial novo biomarcador do processo de morte celular. 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 que permitam evidenciar os mecanismos envolvidos na liberação tanto do LDH quanto do citocromo *c* ao meio extracelular.

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.** 12ª 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.** 7ª 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 AO CNPQ E UMC PELA BOLSA CONCEDIDA, À UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES PELA OPORTUNIDADE DE PARTICIPAR DO PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, À PROF^A DR^A KATIA CRISTINA UGOLINI MUGNOL PELA SUA DEDICAÇÃO AO PROJETO E AO MEU APRENDIZADO, À PROF^A DR^A DENISE COSTA ARRUDA PELA COLABORAÇÃO ESPECIAL E AOS AMIGOS QUE CONTRIBUÍRAM DE ALGUMA FORMA NESTA REALIZAÇÃO.