

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 Mugnol²

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

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 padronizados, 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), linhagem de leucemia mieloide crônica K562 e células de carcinoma espinocelular (SCC 9 e SCC 25) da língua. As mesmas foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) e Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e DMEM / Ham's Nutrient Mixture F12 (1:2), 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 de 5% de CO₂. Ao atingir confluência de 80%, foram montadas placas-teste

em triplicatas. Também foram montadas placas-teste com células mononucleares isoladas do sangue periférico com Histopaque® 1077. As linhagens celulares foram colocados em contato com os agentes indutores de morte celular selecionados (DMSO, H₂O₂, citocromo c, actinomicina D e doxorubicina), em diferentes concentrações. As placas foram incubadas e o sobrenadante coletado para realização dos testes de detecção de citocromo c por Elisa com anticorpo anti-citocromo c e dosagem de LDH por método enzimático utilizando kit comercial Sigma Aldrich® (catálogo MAK066) por espectrofotometria. As frações celulares das placas-teste foram submetidas 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 aderentes usou-se a fração celular aderida a placa e para células em suspensão uma segunda placa-teste realizada em duplicata para a coleta de sobrenadante. Foi analisado o mecanismo de morte por citometria de fluxo com os marcadores Anexina V FITC e PI.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as células de MLAC constatou-se que os agentes indutores de morte utilizados (DMSO, H₂O₂, Actinomicina D e Doxorubicina) 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).

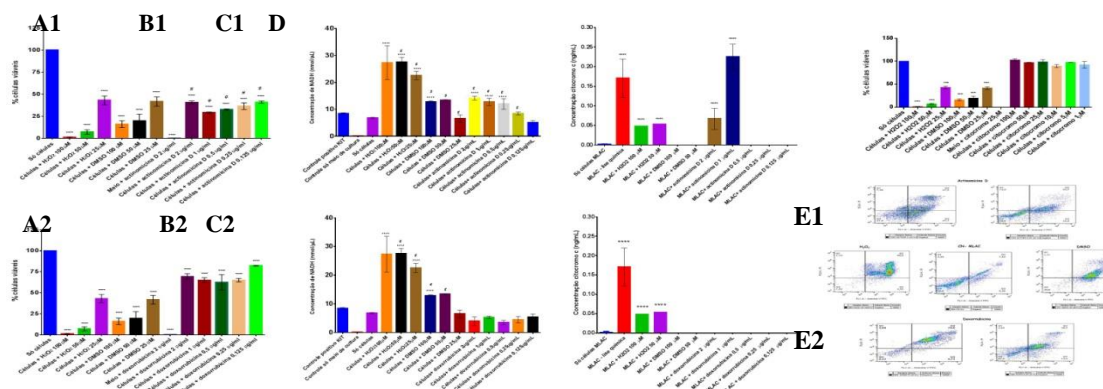


Figura 1. Células normais de músculo liso de aorta de coelho (MLAC). Incubação de $0,5 \times 10^6$ células/mL por 24 horas seguida da adição dos compostos controles-positivos (H₂O₂ e DMSO) e Actinomicina D e posterior incubação por 48 horas. 1- Actinomicina D e 2- Doxorubicina. (A) Teste de viabilidade celular por MTT. (B) Dosagem de LDH em sobrenadante coletado. (C) Quantificação de citocromo c pelo método de ELISA em sobrenadante coletado (D) citocromo c exógeno e (E) Citometria de fluxo com Anexina V-FITC e PI. 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 significativa 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. 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 A1) promoveu uma diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente com liberação de LDH (Figura 1 B1) para meio extracelular inversamente proporcional à viabilidade e

liberação de citocromo c (Figura 1 C1) nas maiores concentrações da droga. A doxorubicina (Figura 1 A2), que apresentou menor citotoxicidade, não induziu liberação significativa de LDH (Figura 1 B2), em relação ao controle só células e não apresentou citocromo c quantificável em nenhuma das condições testadas (figura 1 C2), o que evidencia que o processo pelo qual estas proteínas são liberadas para o meio extracelular não são concomitantes. O mecanismo de morte celular foi determinado por citometria de fluxo para células MLAC após 48 horas de incubação com os indutores de morte, sendo evidenciada uma dupla marcação de anexina V-FITC e PI, tanto para DMSO, H₂O₂, actinomicina D e doxorubicina indicando uma possível apoptose tardia.

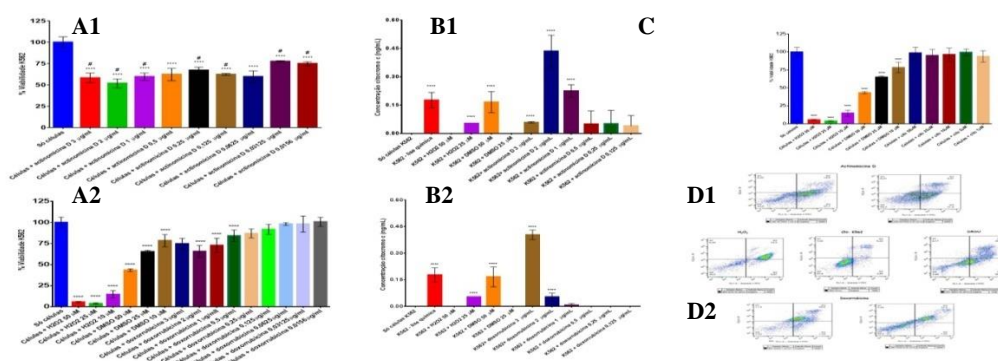


Figura 2. Células tumorais de leucemia mieloide crônica (K562). Incubação de $0,5 \times 10^5$ células/mL por 24 horas seguida da adição dos compostos controles-positivos (H₂O₂ e DMSO) e Doxorubicina e posterior incubação por 48 horas. 1- Actinomicina D e 2- Doxorubicina. (A) Teste de viabilidade celular por MTT. (B) Quantificação de citocromo c pelo método de ELISA em sobrenadante coletado (C) citocromo c exógeno e (D) Citometria de fluxo com Anexina V-FITC e PI. 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 significativa 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).

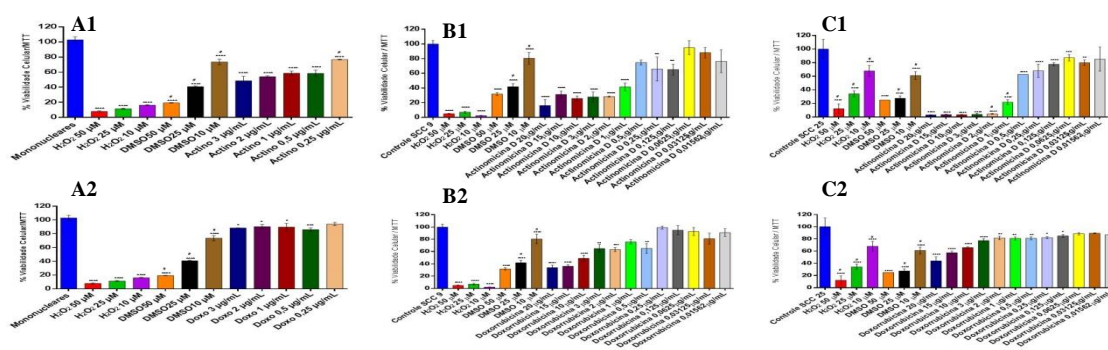


Figura 3. Teste de viabilidade celular por MTT. (A) Células normais de mononucleares isolados do sangue periférico humano. (B) Células de carcinoma espinocelular da língua SCC 9. (C) Células de carcinoma espinocelular da língua SCC 25. Incubação de 1×10^5 células/mL por 24 horas seguida da adição dos compostos (1) Actinomicina D e (2) Doxorubicina e posterior incubação por 24 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 (1) Actinomicina D e (2) Doxorubicina. 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).

Para células tumorais K562, SCC 9 e SCC 25 (Figura 2 e 3) os resultados obtidos para actinomicina D evidenciam que nas concentrações testadas houve redução da viabilidade celular, porém não dose-dependente. Para as células SCC 25 as maiores concentrações de actinomicina D tiveram efeito similar ao H₂O₂ na redução viabilidade celular. Para a doxorrubicina a redução da viabilidade só ocorreu nas maiores concentrações, sendo estes resultados indicativos, quando comparados aos empregando células normais Mononucleares (Figura 3 A2) e MLAC (Figura 1 A2) que a droga se mostra mais efetiva quando agindo sobre células tumorais. Os controles-positivos de morte (DMSO, H₂O₂) apresentaram efeitos citotóxicos em todas as linhagens testadas (Figura 1, 2 e 3) como esperado, havendo maior redução de viabilidade na presença de H₂O₂, assim como ocorreu nas células MLAC, com exceção das células SCC 25 que apresentou efeito dose-dependente. A ação do DMSO, por sua vez, promoveu menor redução da viabilidade sendo esta, entretanto, dose-dependente. Na linhagem tumoral testada K562 houve liberação de citocromo *c* ao meio extracelular tanto por ação da actinomicina D (Figura 2 B1) quanto da doxorrubicina (Figura 2 B2), 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. Para linhagem tumoral K562 ambos indutores de morte (DMSO, H₂O₂, actinomicina D e doxorrubicina) induziram, assim como nas células normais de MLAC, uma dupla marcação de anexina e PI, indicando uma possível apoptose tardia (Figura 2 D). Estes achados corroboram com dados encontrados até o presente momento.

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 marcador de injúria celular LDH, deve ser empregado com cautela, pois não necessariamente corresponde ao grau de dano sofrido e o nível de redução da viabilidade celular pós-tratamento com os indutores de morte celular. O citocromo *c* extracelular, por sua vez se mostrou mais específico em células tumorais do que em células normais. Os resultados obtidos permitem também pressupor que a determinação da presença e quantidade de citocromo *c* extracelular seja um potencial novo biomarcador do processo de morte celular. Os resultados obtidos por citometria de fluxo indicam fortemente morte celular tardiamente apoptótica induzida pelos dois quimioterápicos testados, porém ainda é necessário a inclusão de novas técnicas que corroborem para esta afirmação. 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 quando do citocromo *c* ao meio extracelular.

REFERENCIAS

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 Profª Drª Katia Cristina Ugolini Mugnol pela sua dedicação ao projeto e ao meu aprendizado, à Profª Drª Denise Costa Arruda, aos Prof.º Dr.º Dércio dos Santos Pinto Jr. e Fabio Daumas Nunes, da faculdade de Odontologia da USP, a Me. Fernanda Fernandes Miranda da Cunha e Drª Larissa de Oliveira Passos Jesus pela colaboração e aos amigos que contribuíram de alguma forma nesta realização.