

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS CHO-K1 APÓS TRATAMENTO COM PROPIONATO DE TESTOSTERONA

*Ana Paula Marques de Mendonça Lopes, Karina Teixeira Naves,
Cristina Pacheco Soares, Newton Soares da Silva*

Laboratório de Cultura de Células; Laboratório de Biologia Celular e Tecidual - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - Universidade do Vale do Paraíba
Av. Shishima Hifumi 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos, SP, Brasil, nsoares@univap.br

Palavras-chave: esteróides, cultura celular, retículo, núcleo

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Resumo: Esteróides anabolizantes androgênicos são hormônios, com propriedades anabólicas e androgênicas, que tem como principal função o aumento da síntese protéica (ELASHOFF et al., 1991). Vários efeitos colaterais devido ao uso indiscriminado destes hormônios (WILSON, 1988) são verificados em estudos *in vivo*, entretanto poucos estudos são feitos em cultura de células. Este trabalho teve por objetivo verificar as alterações morfológicas ocorridas no retículo endoplasmático e no núcleo após tratamento com o hormônio Propionato de Testosterona, utilizando o método de microscopia de fluorescência. A linhagem celular utilizada foi a CHO-K1 (proveniente de ovário de hamster chinês) e várias doses e tempos diferentes de incubação com o hormônio. Depois da incubação as células foram marcadas com marcadores fluorescentes os quais foram DAPI e DioC₆(3) para núcleo e retículo, respectivamente e fotografadas. Como resultado pode-se observar comprometimento da membrana, fragmentação nuclear, formação de vesículas no retículo endoplasmático e perda da característica de rede do mesmo. Concluiu-se que a maior dose do hormônio é letal para a linhagem celular utilizada.

INTRODUÇÃO

Os esteróides Anabolizantes Androgênicos (EAA's) incluem a testosterona em sua forma natural e também seus inúmeros derivados sintéticos, entre eles a dihidrotestosterona, decanoato de nandrolona, cipionato de testosterona e propionato de testosterona. Essas drogas vêm sendo utilizadas principalmente por atletas e indivíduos que desejam aumentar a massa muscular (HAUPT, 1984). Contudo, essas drogas possuem vários efeitos prejudiciais ao organismo, como por exemplo, hipertrofia cardíaca (MELCHERT, 1995), dislipidemia, hipertensão arterial, hepatotoxicidade, hipertrofia prostática, atrofia testicular e ovariana (WADE, 1972). Os hormônios esteróides são capazes de produzir efeitos rápidos (com até 2 min) em vários tipos celulares (WEHLING, 1997). Estas respostas rápidas não são compatíveis com o mecanismo clássico de ação proposto para estes hormônios, no qual envolve a ligação a receptores intracelulares, processos de transcrição e síntese protéica (BEATO, 1989).

OBJETIVO:

Estudar as alterações morfológicas no núcleo e no retículo endoplasmático através de microscopia de fluorescência após tratamento com propionato de testosterona.

MATERIAL E MÉTODOS

Hormônio: Esteróide Anabolizante Androgênico Propionato de Testosterona dissolvido em óleo EDENOR EV 85 KR (Cognis, Brasil) e metanol para a concentração estoque de 1mM.

Linhagem celular: Células CHO-K1 (ovário de hamster chinês) foram cultivadas com meio HAM-F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂.

Microscopia de Fluorescência: Para análise em microscopia de fluorescência as células foram cultivadas em placas NUNC de 24 poços contendo lâminulas redondas estéreis. O número de células utilizado foi de 1 x 10⁵ células/ml em meio HAM-F12 com 10% SFB, incubadas "overnight" a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram incubadas com o propionato de testosterona nas concentrações de 50 e 100µM em meio de cultura, para o controle foi utilizado meio de cultura sem o hormônio. Os tempos de

incubação foram de 6h e 24h. Para a marcação do retículo endoplasmático retirou-se o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS para então serem marcadas. As lamínulas foram colocadas sobre uma gotinha do marcador DiOC₆, onde ficaram por 15 minutos. Em seguida foram lavadas e fixadas em 200µl de paraformaldeído (PA) a 4%, por 10 minutos. Após a marcação, material foi lavado e as lamínulas montadas em lâminas contendo n-propil-galato. Para a marcação do núcleo as células foram lavadas com PBS pré-aquecido e fixadas com paraformaldeído (PA) 4% por 10 minutos. Em seguida foram lavadas e marcadas com o marcador DAPI por 10 minutos. Após a marcação, o material foi lavado e as lamínulas foram montadas em lâminas contendo n-propil-galato. O material foi fotografado com o sistema fotográfico Leica MPS 30.

RESULTADOS

As fotomicrografias revelaram que as células incubadas com 50nM do hormônio nos tempos de 6 e 24 horas apresentavam vesículas no retículo endoplasmático e perda da característica de rede. Também pode-se perceber que houve perda da adesão celular e fragmentação nuclear. Além disso, as células perderam seu formato original (células alongadas) adquirindo um formato mais arredondado. As células incubadas com 100nM por 6 horas apresentaram stress celular, fragmentação nuclear, o que marca início de apoptose e o completo desaparecimento do retículo. No período de 24 horas houve perda da

adesão celular e comprometimento da integridade da membrana.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos concluiu-se que a dose de 50nM não causou tantos danos ao retículo endoplasmático como a dose de 100nM. Esta dose foi considerada letal para a célula. O mesmo foi observado no núcleo, ou seja, a dose de 100nM foi considerada letal para a linhagem celular utilizada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEATO, M. Gene regulations by steroid hormones. *Cell*. V. 56, p. 335-344, 1989.
- ELASHOFF, JD et al. Effects of anabolic-androgenic steroids on muscular strength. *Ann Intern. Med*, v. 115, p. 387-393, 1991.
- HAUPT, HA; ROVERE, GD. Anabolic steroids: a review of the literature. *AM. J. Sports Med.*, v. 12, p. 469-484, 1984.
- MELCHERT, RB; WELDER, AA. Cardiovascular effect of androgenis-anabolic steroids. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v. 27, p. 1252-1262, 1995.
- WADE, N. Anabolic steroids: doctors denounce them, but athletes aren't listening. *Science*, v. 176, p. 1399-1403, 1972.
- WEHLING, M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Ver. Physiol*. V. 59, p. 365-393, 1997.
- WILSON, JD. Androgen abuse by athletes. *Endocr. Rev.*, v. 9, p. 181-199, 1988.