

EFEITO DO DERIVADO SINTÉTICO PROPIONATO DE TESTOSTERONA SOBRE AS MITOCÔNDRIAS DE CÉLULAS CHO-K1

Karina Teixeira Naves, Cristina Pacheco Soares, Newton Soares da Silva

Univap – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento – Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – Av. Shishima Hifumi 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos, SP, Brasil – karinat84@yahoo.com.br

Resumo - Os esteróides anabolizantes androgênicos são derivados sintéticos da testosterona, o principal hormônio sexual masculino e são substâncias utilizadas em grande quantidade por atletas e outros que desejam aumentar a massa muscular e o desempenho atlético (BAHRKE; YESSALIS, 2004). Devido ao uso indiscriminado destes hormônios diversos efeitos colaterais têm sido verificados em estudos *in vivo* (WILSON, 1998), entretanto pouco se sabe sobre o que acontece com a célula quando exposta a estes hormônios. O objetivo do estudo foi verificar o efeito do hormônio Propionato de Testosterona sobre as mitocôndrias através de microscopia óptica de fluorescência com a linhagem celular CHO-K1. Foram aplicadas diferentes concentrações do hormônio em períodos variados. Após a realização da incubação as células foram marcadas com a sonda fluorescente MitoTracker Orange™. Os resultados demonstraram que houve mudança na morfologia e um aumento considerável no número de organelas com a concentração de 100nM tanto em 6 quanto em 24 horas de incubação.

Palavras-chave: anabolizantes androgênicos, cultura celular, mitocôndria

Área do Conhecimento: Ciências Biológicas

Introdução

Os esteróides anabólicos androgênicos (EAAs) são substâncias utilizadas em grande quantidade por atletas e outros que desejam aumentar a massa muscular ou o desempenho atlético, mas que podem trazer conseqüências negativas para a saúde em longo prazo (WOOD, 2004).

Estes hormônios são amplamente utilizados em tratamentos de muitos distúrbios androgênicos (PASQUALOTTO et al, 2004). No entanto, diversos efeitos colaterais podem ser observados devido ao abuso por parte dos atletas, incluindo distúrbios endócrinos, hepáticos e cardiovasculares (MARAVELIAS et al, 2005).

Não há muita informação sobre o que acontece com a célula e suas estruturas internas quando expostas a estes agentes em grandes quantidades. Por isso, este trabalho objetiva estudar o efeito de um esteróide anabólico androgênico, o Propionato de Testosterona, nas mitocôndrias, organelas de extrema importância para a célula, através de microscopia óptica de fluorescência.

Metodologia

Hormônio: O hormônio utilizado foi o Esteróide Anabolizante Androgênico Propionato de Testosterona, derivado sintético da Testosterona (SP Farma Ltda, BR, Lote #020701), diluído em óleo EDENOR KV 85 - Cognis, Brasil – para uma

solução estoque a 1mM. A solução estoque a 1mM foi diluída em meio de cultura e metanol (Merck) (10µL de solução estoque, 10µL de 14 metanol e 980µL de meio) para que se pudesse obter uma concentração de Propionato de Testosterona a 10µM. A partir desta, foram realizadas mais duas diluições em meio de cultura para a obtenção das concentrações de 50 e 100nM, que foram as utilizadas nas células.

Linhagem celular: Células CHO-K1 (ovário de hamster chinês) foram cultivadas com meio HAM-F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico-antimicótico 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 lamínulas redondas estéreis. O número de células utilizado foi de 1 x 10⁵ células/mL em meio de cultura, incubadas "overnight" a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Foram analisados cinco (5) grupos de célula. Um grupo foi o controle. Neste, as células não tiveram contato com o hormônio, ou seja, receberam apenas meio de cultura. Um grupo foi incubado com o hormônio na concentração de 50nM durante 6 horas. Outro foi incubado com a concentração de 100nM durante 6 horas. Outro grupo foi incubado com a concentração de 50nM por 24 horas. Finalmente, o quinto grupo foi incubado com a concentração de 100nM por 24 horas. Após o período de incubação as células foram marcadas com 150µL da sonda fluorescente MitoTracker Orange™ na

concentração de 150 η M por 20 minutos. Em seguida foram lavadas com meio de cultura fresco e pré-aquecido para então serem fixadas com 200 μ L paraformaldeído a 3,7% (diluído também em meio de cultura sem soro) por 15 minutos. Após a marcação o material foi lavado, montado em lâminas contendo n-propil-galato e observado em microscópio de epifluorescência modelo Leica DMLB. As fotomicrografias foram feitas com o sistema fotográfico Leica MPS 30.

Resultados

As fotomicrografias revelaram um grupo controle apresentando quantidade e distribuição normais das mitocôndrias ao redor do núcleo e também ao longo do citoplasma como indica a seta (Figura 1a). Ao término de 6 horas de incubação com 50 η M do Propionato de Testosterona não houve mudanças significativas da quantidade e da distribuição das mitocôndrias em comparação com

o grupo controle (Figura 1b). Entretanto, com a concentração de 100 η M do hormônio é possível notar um aumento na fluorescência das mitocôndrias marcadas, o que pode indicar um aumento no número de organelas, as quais também apresentavam uma morfologia mais alongada, filamentosa como mostra a seta (Figura 1c). Com 24 horas as células controle apresentavam as mesmas características, ou seja, não houve mudanças significativas entre 6 e 24 horas. Ver seta (Figura 1d). Com 50 η M as mitocôndrias estavam espalhadas por todo o citosol. As setas mostram fragmentação nuclear (Figura 1e). Por fim, o grupo exposto à concentração de 100 η M mostrou uma grande quantidade de mitocôndrias alongadas, concentradas principalmente ao redor do núcleo, que estava fragmentado. Na periferia celular possuíam a forma de compridos filamentos (setas brancas). As setas verdes indicam fragmentação nuclear (Figura 1f).

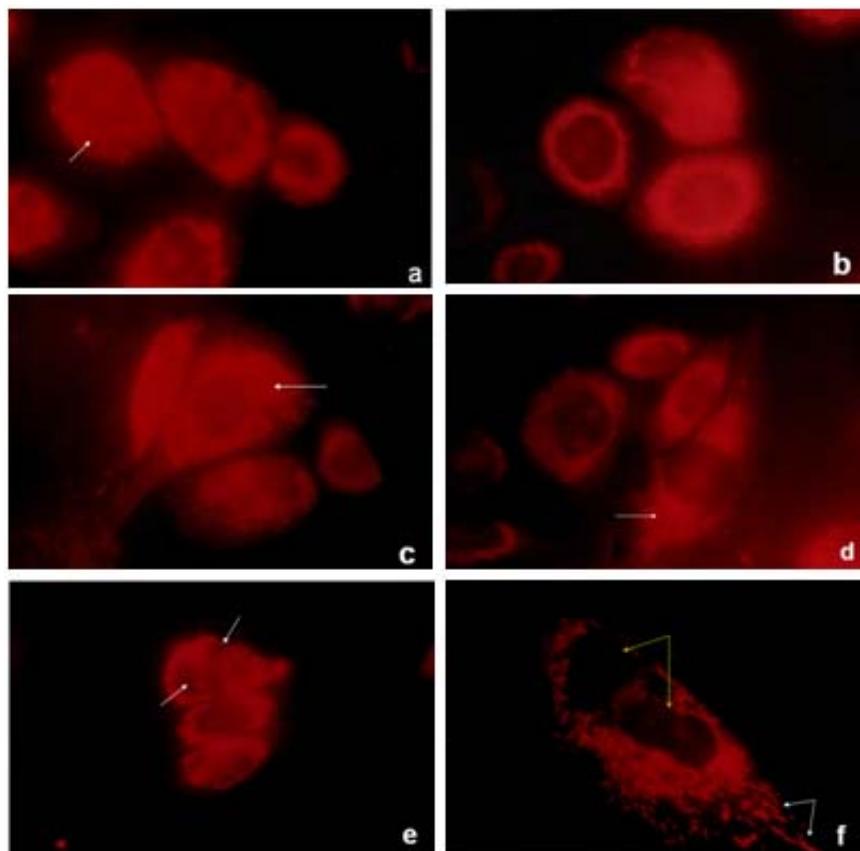


Figura 1 - Células CHO-K1 tratadas com Propionato de Testosterona e marcadas com MitoTracker Orange™. Fig.1a: controle. Fig.1b: Células tratadas com 50 η M do hormônio durante 6 horas. Fig. 1c: Células tratadas com 100 η M do hormônio durante 6 horas. Fig.1d: Grupo controle. Fig.1e: Células incubadas com 50 η M do hormônio durante 24 horas. Fig.1f: Células incubadas com 100 η M do hormônio durante 24 horas.

Discussão

A importância de se estudar os efeitos causados por esteróides anabólicos em cultura de células está no fato de que, desta maneira é possível observar quais estruturas são afetadas e qual a dimensão dos danos causados dentro da célula. Além disso, este tipo de estudo fornece dados que auxiliam na avaliação sobre as consequências para a vida da célula após a interação com o hormônio.

Para a visualização das mitocôndrias após o tratamento com o Propionato de Testosterona as células foram marcadas com MitoTracker Orange™. O MitoTracker Orange™ é um marcador molecular que se difunde através da membrana plasmática e se acumula em mitocôndrias ativas. Uma vez marcada com MitoTracker a célula pode ser fixada, diferente de outros corantes para mitocôndria. Isso faz com que o MitoTracker seja melhor para a visualização da estrutura da mitocôndria (POOT *et al*, 1996).

A figura 1c mostrou um aumento na fluorescência o que pode indicar um aumento no número de organelas, além disso, sua morfologia apresentava-se mais alongada. Segundo Alberts, *et al* (1997), as mitocôndrias estão localizadas nas regiões da célula onde a demanda de energia é maior; assim se deslocam de um lado a outro do citoplasma, para as zonas que necessitam mais de energia. Alberts *et al* (1999) também publicou que o número de mitocôndrias por célula pode ser regulado de acordo com a necessidade.

Em nossos estudos anteriores foi demonstrado que com a incubação de 100nM de propionato de testosterona durante 6h há presença de núcleos apoptóticos (dados não publicados), portanto, é muito provável que o aumento do número de organelas (principalmente ao redor do núcleo) tenha se dado pelo fato das mitocôndrias participarem ativamente do processo apoptótico. Também foi verificado que nos tempos de incubação de 6 e 24 horas, as células submetidas a 100nM possuíam mitocôndrias com aspecto filamentososo (Figuras 1c e 1f, respectivamente) diferente das mitocôndrias existentes nas células dos grupos controle e 50nM, de aspecto granular. Provavelmente as mitocôndrias adquiriram essa conformação devido à alta atividade em que se encontravam.

Conclusão

Com base nos resultados analisados, concluiu-se que o hormônio utilizado causou mudança na morfologia e um aumento considerável no número de organelas com a concentração de 100nM tanto em 6 quanto em 24 horas de incubação.

Referências

- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; *et al*. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto alegre: Artes Médicas, 1999.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; *et al*. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto alegre: Artes Médicas, 1997.
- BAHRKE, M.S.; YESSALIS, C.E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. **Curr. Opin. Pharm.** V.4, p.614-20, 2004.
- MARAVELIAS, C.; DONA, A.; STEFANIDOU, M.; SPILIOPOULOU, C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes: A constant threat. **Toxicol. Lett.** V.158, n.3, p.167-75, 2005.
- PASQUALOTTO, F.F.; LUCON, A.M.; HALLAK, J., *et al*. Risks and Benefits of Hormone Replacement Therapy in Older Men. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**. V.59, n.1, p.32-8, 2004.
- POOT, M.; ZHANG, Y.Z.; KRAMER, J.A. *et al*. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. **J. Histochem. Cytochem.** V.44, p.1363-72, 1996.
- WILSON, JD. Androgen abuse by athletes. **Endocr. Rev.**, v. 9, p.181-199, 1988.
- WOOD, R.I. Reinforcing aspects of androgens. **Physiol Behav.** V.83, p.279-289, 2004.