

Universidade do Vale do Paraíba
Instituto de Pesquisa & Desenvolvimento

MARYELEN DOMINGUES RUSTON

***ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR PROPIONATO DE
TESTOSTERONA EM CULTURA DE CÉLULAS CHO-K1***

São José dos Campos, SP.

2008

MARYELEN DOMINGUES RUSTON

***ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR PROPIONATO DE
TESTOSTERONA EM CULTURA DE CÉLULAS CHO-K1***

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Newton Soares da Silva

São José dos Campos, SP.

2008

R937a

Ruston, Maryelen Domingues

Alterações Morfológicas induzidas por Propionato de Testosterona em Cultura de Células CHO-K1 / Maryelen Domingues Ruston; Orientador: Newton Soares da Silva. São José dos Campos, 2008.

1 disco laser: color.

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2008.

1. Cultura de células 2. Testosterona 3. Esteroides 4. Técnicas de Cultura de Células I. Silva, Newton Soares da, Orient. II. Título

CDU: 615.831

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo fotocopiadores ou transmissão eletrônica, desde que citada a fonte.

Assinatura:

Maryelen Ruston

Data:

São José dos Campos, 4 / 12 / 2008

MARYELEN D. RUSTON

**“ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR PROPIONATO DE
TESTOSTERONA EM CULTURA DE CÉLULAS CHO-K1”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. **FÁBIO VIEIRA DOS SANTOS** (UNIVAP)

Prof. Dr. **NEWTON SOARES DA SILVA** (UNIVAP)

Prof^a. Dra. **TATIANA DE SOUZA DA CUNHA** (UNIFESP)

Prof^a. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 06 de novembro de 2008.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me ajudaram na sua realização, a todos aqueles que sejam compartilhando seus conhecimentos, ou um simples gesto, um simples sorriso, me ajudaram tornar esse grande sonho, em realidade.

Obrigada por existirem, e serem tão importantes em minha vida...

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, por todos os momentos maravilhosos que ele me proporcionou, sempre iluminando meus passos e me guiando pela vida.

Ao Prof. Dr. Newton Soares da Silva, obrigada por me aceitar como orientanda, tema pelo qual tenho tido intenso interesse em pesquisar e estudar. A ele presto a minha homenagem e apresento os sinceros agradecimentos pela compreensão frente à minha ansiedade e a presteza em esclarecer todas as minhas dúvidas nunca se furtando em apresentar importantes observações para o desenvolvimento de nosso estudo.

À Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, por ter sempre me recebido em seu laboratório com disponibilidade e ao apoio técnico prestado por ela.

Aos meus pais Luiz Carlos Domingues e Aparecida Maria Domingues, que me ensinaram a ter fé, esperança e dignidade, incentivando-me a realizar todos objetivos em minha vida.

Ao meu irmão Wallace Domingues por cada palavra amiga, e por estar todo tempo ao meu lado.

Ao meu marido Rodrigo Ruston, pelo amor e sua compreensão.

A minha amiga Aline Helena Araujo Machado, por ter compartilhado seus conhecimentos e ter me acompanhado, por todas as dicas e seu apoio.

A todos os amigos de laboratório pela amizade e companhia.

*"A vida passa e abre caminhos que não são
percorridos em vão".*

Frida Khalo – O diário de Frida Khalo

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS INDUZIDAS POR PROPIONATO DE TESTOSTERONA EM CULTURA DE CÉLULAS CHO-K1

Resumo

Esteróides Anabólicos Androgênicos (EAA) representam um grupo de compostos naturais e sintéticos formados pela Testosterona e seus derivados. São drogas de uso exclusivo na medicina, para o tratamento de diferentes doenças, embora venha sendo usado indiscriminadamente para aumentar o rendimento físico e proporcionar hipertrofia muscular. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade do hormônio Propionato de Testosterona *in vitro*. A linhagem celular utilizada foi a CHO-K1, proveniente de Ovário de Hamster Chinês. As células CHO-K1 foram incubadas com o hormônio Propionato de Testosterona em diferentes concentrações (50 e 100nM) durante 6 ou 24 horas. Após a incubação, as células foram analisadas através do Teste MTT (analisa a viabilidade celular por meio da Atividade Mitocondrial) e de marcadores fluorescentes específicos para núcleo (DAPI), mitocôndria (Mitotracker), retículo endoplasmático (DiOC₆(3)) e citoesqueleto (Faloidina TRITC). Através da atividade mitocondrial observamos que doses menores do esteróide anabólico não causaram alterações significativas, quando comparada com doses maiores. Os resultados com as sondas fluorescentes mostraram danos significativos nas organelas em estudo, bem como retração citoplasmática, alteração na distribuição e estrutura dos filamentos de actina no citoesqueleto, formação de vesículas e perda da característica de rede no retículo endoplasmático.

Palavras-chaves: Esteróides Anabólicos Androgênicos, Propionato de Testosterona, Cultura de Células, Hormônio, Citotoxicidade.

MORPHOLOGICAL ALTERATIONS INDUCED BY TESTOSTERONE PROPIONATE IN CELLS CULTURE CHO-K1

ABSTRACT

Androgenic anabolic steroids (EAA) represent group of natural and synthetic compounds formed by testosterone and its derivations. They are drugs for exclusive medical use, for the treatment of different diseases, however they have also been used for an increase of physical performance and muscle gaining. The aim of this research has been to asses the citotoxicity of the Testosterone Propionate Hormone *in vitro*. The cell line used has the CHO-K1, coming from the Chinese Hamster's Ovary. The CHO-K1 cells were incubated with the Testosterone Propionate Hormone in different dosages (50 and 100nM) during the period of 6 or 24 hours. After the incubation, the cells were analyzed employing the MTT assay (which analyses the cell viability by means of mitochondrial activity) and through fluorescent markers specific to the nucleus (DAPI) mitochondria (Mitotracker), endoplasmatic reticulum (DIOC₆(3)) and cytoskeleton (Phalloidin TRITC). Through the mitochondrial activity we could observe that smaller dosages of the anabolic steroid not cause significant alterations on the organelles, as well as, cytoplasmic retraction, alterations in the distribution and structure of the actin filaments of the cytoskeleton and formation of vesicles on the endoplasmatic reticulum.

Key-words: Androgenic Anabolic Steroid, Testosterone Propionate, Cell Culture, Hormone, Cytotoxicity.

Lista de ilustrações

Figura 1: Estrutura Química Propionato de Testosterona	18
Figura 2: Gráfico que expressa a viabilidade celular após a incubação com diferentes tempos e concentrações do hormônio anabolizante Propionato de Testosterona.É baseado na redução do sal MTT (<i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]</i>).	27
Figura 3 Células CHO-K1, com retículo endoplasmático marcado com DioC6(3).....	28
Figura 4: Células CHO-K1, após marcação DAPI para núcleo.	29
Figura 5: Células CHO-K1, mitocôndrias após marcação, com o marcador molecular Mitotracker.	31
Figura 6: Células CHO-K1 , técnica microscopia de fluorescência, utilizando Faloidina Triet como marcador.GRUPO A:Grupo controle, observa-se a distribuição e a estrutura dos filamentos de actina.	32

Lista de abreviaturas e siglas

µg - micrograma

µl - microlitro

µM - micromolar

ADP - Adenosina – Difosfato

AIF - Fator de Indução da Apoptose (apoptosis inducing factor)

ANOVA - Análise de Variância

APAF – Fator ativador de apoptose

AR - Receptor Andrógeno

ATP - Adenosina - Trifosfato

CA - Cálcio

CHO - Linhagem de células de ovário de hamster chinês

CO₂ - Dioxido de Carbono

DAPI - 4',6- diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride

DHEA - Diidroepiandrosterona

DHEAS - Diidroepiandrosterona sulafatada

DHT - Diidrotestosterona

DIOC6(3)-3,3' - dihexyloxacarbocyanine iodide

DMSO - Dimetil Sulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EAA - Esteroide Anabolico Androgênico

mM - milimolar

MTT - 3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]

nm - nanômetros

PA - Paraformaldeído

PBS - Salina tampão fosfato (*phosphate buffered saline*)

Ph - Potencial Hidrogeniônico

PHEM - Salina tampão

RE - Retículo Endoplasmático

RNA - Ácido Ribonucléico

RPM - Rotações Por Minuto

SFB - Soro Fetal Bovino

SHBG - Globulina ligada ao Hormônio Sexual

TRITC - Tetranetil Rodamina Isotiocianato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVO GERAL	15
1.1.2 Objetivo específico	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Testosterona	17
2.1.1 Analógo sintéticos da Testosterona	17
2.1.2 Mecanismos de ação da Testosterona	18
2.2 Efeitos fisiológicos.....	19
2.3 Indicações terapêuticas	19
2.4 Organelas celulares postuladas como alvos no processo de morte celular.....	20
2.4.1 Núcleo	21
2.4.2 Mitocôndria	21
2.4.3 Citoesqueleto	21
2.4.4 Retículo endoplasmático	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Linhagem celular:.....	23
3.2 Hormônio:	23
3.3 Crescimento e manutenção da cultura celular CHO-K1:.....	23
3.4 Teste da atividade mitocondrial de células CHO-K1 incubadas com o Propionato de Testosterona em diferentes concentrações:.....	23
3.5 Microscopia de Fluorescência utilizando-se marcadores específicos para diferentes organelas celulares:	25
3.5.1 Marcação para núcleo:.....	25
3.5.2 Marcação para mitocôndria:.....	25
3.5.3. Marcação para citoesqueleto:.....	25
3.5.4 Marcação do retículo endoplasmático:.....	26
3.5.5 Montagem das lâminas e registro do material:	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Teste de citotoxicidade através da técnica de MTT (atividade mitocondrial)	27
4.2 Microscopia de Fluorescência.....	28
4.2.1 Retículo Endoplasmático:	28
4.2.1 Núcleo	29
4.2.2 Mitocôndria	30
4.2.4 Citoesqueleto	31
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS	39
APENDICE A: Descrição de preparação de experimentos	44

1 INTRODUÇÃO

Os esteróides Anabólicos Androgênicos representam um grupo de compostos naturais e sintéticos formados a partir da testosterona ou um dos seus derivados ⁽¹⁾, cuja indicação terapêutica clássica está associada a situações de hipogonadismo e quadros de deficiência do metabolismo protéico. Além disso, é responsável pela diferenciação sexual masculina, pelas características sexuais secundárias e potência sexual ⁽²⁾. Atuando sobre os receptores androgênicos, modulam tanto efeitos anabólicos quanto androgênicos ⁽³⁾.

As ações da Testosterona e dos andrógenos correlatos podem ser divididas em duas categorias principais: efeitos androgênicos, relacionados com a função reprodutora, e efeitos anabólicos, que dizem respeito à estimulação do crescimento e maturação dos tecidos não reprodutores. Assim os mecanismos intracelulares semelhantes, via um único tipo de receptor, participam destas duas categorias de efeitos, não havendo, portanto a possibilidade de dissociá-los. ^(4,5).

Estudos demonstram que altas doses de EAA podem acarretar vários efeitos adversos como atrofia do tecido testicular (homem) e mamário (mulher), mudanças subcelulares dos hepatócitos, peliose hepática, hiperplasia hepatocelular e carcinomas, condições atribuídas principalmente em administração dos esteróides 17-alquilados ⁽⁶⁾. De forma complementar, os efeitos deletérios na função neuronal ⁽⁷⁾, alteração do metabolismo glicídico e do perfil tireóideo (diminuição do T3, T4, TSH, TBG), alterações renais, tais como elevação da creatina (tumor de Wilms) ^(8,9), também são relacionados ao uso dos EAA.

O uso dos EAA foi declarado ilegal pelos setores governamentais desportivos nacionais e internacionais, embora ainda sejam utilizados por atletas e outros usuários sem prescrição médica, oferecendo sério risco à saúde ^(10, 5, 11).

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar *in vitro* o efeito do Propionato de Testosterona em doses subclínicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do Propionato de Testosterona em cultura de células CHO-K1;
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas induzidas pelo Propionato de Testosterona em células CHO-K1 empregando marcadores específicos para núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e citoesqueleto.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Testosterona

A Testosterona, nos seres humanos é o androgênio mais importante, secretado pelos testículos sendo produzido numa taxa de 8 mg/dia. Cerca de 95% desse hormônio é produzido pelas células de Leydig e apenas 5% pelas glândulas supra renais. Em mulheres, a Testosterona é secretada pelos ovários e glândulas supra renais, sendo que quase 50% da testosterona secretada (0,25mg/dia) é sintetizada extraglandularmente, onde a androstenediona produzida pela supra renal é convertida em Testosterona⁽¹²⁾. As concentrações no plasma são de 15-65 ng/dl em mulheres e 300-1000 ng/dl em homens⁽⁹⁾.

A testosterona é basicamente transportada no plasma por proteínas plasmáticas como albumina e a proteína ligadora de andrógeno (SHBG – Sex hormone binding globulin). 2% da testosterona sérica encontra-se livre, 30% ligada a SHBG e 68% ligada a albumina e outras proteínas⁽¹³⁾.

Todos os esteróides anabolizantes sintéticos e semi-sintéticos comercializados são derivados da Testosterona^(14,15).

2.1.1 Análogos sintéticos da Testosterona

A Testosterona é o andrógeno natural com maior potência biológica no homem (exceto a DHT que é 2,5 vezes mais ativa). Porém, sofre rápida degradação quando administrada por via oral ou intramuscular, sendo pouco útil para terapia⁽¹⁶⁾. Sendo assim, muitos análogos sintéticos foram estudados quanto à sua utilidade terapêutica, por apresentarem maior potência biológica ou degradação mais lenta que a testosterona. Entre os análogos sintéticos obtidos por esterificação da molécula da testosterona na posição 17 beta hidroxí destacam-se cipionato, o enantato, o undecanoato e o propionato de Testosterona. Quanto maior o radical introduzido na posição 17 b-hidroxí, maior é a meia vida biológica⁽²⁾.

Entre todos análogos sintéticos da testosterona disponíveis, os ésteres na posição 17b-hidroxí são os únicos a serem metabolizados, permitindo a monitorização bioquímica da

terapêutica por meio de dosagens da testosterona plasmática. A testosterona formada é metabolizada pela mesma via do hormônio natural ⁽¹³⁾.

Os derivados sintéticos da testosterona podem ser administrados tanto na forma oral quanto na forma injetável, além de outras formas farmacêuticas de administração como pellets, implantes (via parenteral) e via transdérmica ⁽²⁾. Os esteróides anabólicos mais utilizados por via oral incluem a oximetazona, a oxandrolona, a metandrostenolona e o estanozolol. Os injetáveis podem ser o decanoato de nandrolona, o felinpropionato de nandrolona e o propionato de testosterona ⁽¹¹⁾.

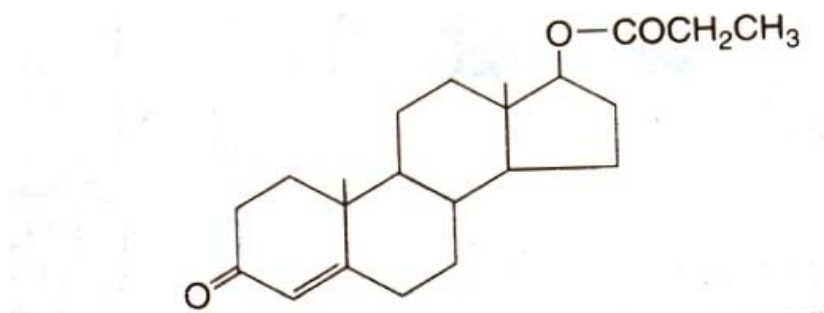


Figura 1: Estrutura Química Propionato de Testosterona
Fonte: (16).

2.1.2 Mecanismos de ação da Testosterona

A testosterona é um hormônio esteroide lipossolúvel, podendo atravessar livremente as bicamadas lipídicas que constituem a membrana plasmática. Assim a testosterona entra na célula por difusão passiva e se liga ao receptor andrógeno (AR) localizado no citoplasma ⁽³⁾. O receptor andrógeno é um receptor intracelular, membro da família de receptores esteroidais nucleares e codificados por um gene no cromossomo X ^(17,18).

Após a ligação do hormônio, o complexo AR/hormônio, sofre uma mudança conformacional, translocando-se para o núcleo celular. No núcleo ocorre dimerização e interação direta com a maquinaria de transcrição basal e/ou com várias proteínas co-ativadoras, aumentando a transcrição do gene alvo a ser regulado. Ocorre assim síntese de RNA mensageiro, que é transportado para o citoplasma e dirige a síntese protéica e outras mudanças celulares que constituem ação androgênica ⁽¹³⁾.

2.2 Efeitos fisiológicos

Os andrógenos virilizam o trato urogenital do embrião masculino. Se a síntese fetal é deficiente, ou ação androgênica é ineficaz nos tecidos alvo, o fenótipo genital pode ser feminino ou ambíguo. Na puberdade, têm papel importante na espermatogênese; no adulto são importantes para manter a libido, massa e força muscular, distribuição lipídica, massa óssea, eritropoese, crescimento prostático, crescimento de pelos, e espermatogênese ⁽¹⁾. A ginecomastia (síndrome da feminização) ocorre quando o hormônio em questão é utilizado para obtenção dos efeitos anabólicos ⁽¹³⁾.

Altas doses de testosterona no homem adulto suprimem a liberação de gonadotrofinas e causam atrofias dos órgãos sexuais acessórios masculinos. A testosterona é capaz de estimular a eritropoese, estimulando a formação de eritropoetina ⁽³⁾.

Os efeitos anabólicos acontecem pela ação em receptores andrógenos presentes em tecidos como musculatura esquelética. Embora não sejam esclarecidos, os benefícios no desenvolvimento muscular atlético são usados e abusados por atletas e treinadores esportistas para melhora da capacidade. Além do efeito anabólico, há ainda o efeito anti-catabólico, o que é importante para o aumento da massa muscular, efeito que se dá pelo bloqueio dos efeitos catabólicos induzidos por glicocorticóides, que são excretados em resposta ao estresse ou melhora na ingestão de proteínas, e ao aumento da retenção de nitrogênio ^(13,1).

2.3 Indicações terapêuticas

Devido à rápida degradação da testosterona quando administrada por via oral ^(19,20), vem sendo desenvolvidos análogos sintéticos desse hormônio que apresenta grande utilidade terapêutica nos seguintes casos:

Hipogonadismo: Pode ser causado por desordens dos testículos, hipófise ou hipotálamo. A deficiência de testosterona pode estar relacionada com disfunção das células de Leydig, secreção insuficiente de LH ou GNRH. Diagnósticos clínicos, testes laboratoriais, permitem que a terapia hormonal se inicie ⁽²¹⁾. O uso de testosterona e análogos no tratamento de doenças crônicas associadas ao catabolismo é bem estudado em HIV/AIDS, por causa da significativa proporção dessa população ter hipogonadismo ⁽⁹⁾.

Os esteróides estão entre as principais drogas para o tratamento da endometriose ⁽²²⁾, da síndrome de Turner ⁽²³⁾ e tratamento da disfunção sexual após a menopausa ⁽²⁴⁾.

Na menopausa, os esteróides têm demonstrado prevenir perda óssea (osteoporose) e aliviar os sintomas do climatério tão eficientemente quanto uma convencional terapia de reposição hormonal ^(25,26).

Estes esteróides também são utilizados com sucesso no tratamento de adolescentes com problemas de crescimento ⁽²⁷⁾, e idosos com deficiência androgênicas. Desta forma, estudos vêm sendo realizados para o seu uso como meio de contracepção ⁽²⁰⁾.

Em pacientes com queimaduras graves há um significativo decréscimo dos níveis de testosterona ⁽²⁸⁾ podendo os efeitos anabólicos dos esteróides anabólicos androgênicos exercer uma importante função no ganho de peso e recuperação desses pacientes ^(29, 30, 31).

Anorexia e baixo peso são também comumente ocorrências em pacientes com câncer ⁽³²⁾ contribuindo para deficiência andrógena ⁽³³⁾. A terapia de EAA no câncer pode, além de diminuir a perda de massa corporal magra devido ao catabolismo intenso, resultar em outros benefícios como aumento dos níveis de hemoglobinas e do volume das células sanguíneas vermelhas, já que pacientes com câncer são anêmicos devido a má nutrição ou os efeitos de doenças crônicas ⁽³⁴⁾.

Por aumentarem a eritropoiese, os EAA podem também ser utilizados no tratamento de anemias por falência da medula óssea, mielofibrose e anemia aplástica ^(35,36). Numerosos estudos sugerem que andrógenos estimulam eritropoese por mecanismo direto e indireto ⁽¹³⁾.

Em níveis fisiológicos os andrógenos estão envolvidos na diferenciação neuronal, neuroproteção, desenvolvimento e sobrevivência de células neuronais ⁽⁷⁾.

2.4 Organelas celulares postuladas como alvos no processo de morte celular

Experimentos com células em cultura representam uma importante ferramenta para caracterizar os eventos que possibilitam às células superar o controle normal, identificar bases genéticas e os processos fenotípicos que estão envolvidos na transformação celular ⁽³⁷⁾.

Através de células em cultura é possível estudar o comportamento celular considerando a proliferação cinética ou a biossíntese de diversos componentes da matriz extracelular ⁽³⁸⁾.

Por meio da cultura celular também é possível avaliar os efeitos de determinados tratamentos em organelas de interesse através da utilização de sondas fluorescentes que marcam especificamente o que se quer estudar, como por exemplo:

2.4.1 Núcleo

O núcleo da célula eucariótica é extremamente complexo, tanto estruturalmente quanto em relação a sua atividade biológica, quando comparado ao nucleóide relativamente simples dos procariotos ⁽³⁹⁾. É ele quem contém a informação genética. Está envolto por uma membrana interna e outra externa, que contém poros para o transporte de substâncias entre o núcleo e o citoplasma ⁽⁴⁰⁾.

No compartimento nuclear localizam-se os cromossomos, cada um formado por uma única molécula de DNA combinada com numerosas proteínas, diversas classes de RNA, a saber, o mensageiro, o transportador e o ribossômico e o nucléolo, onde se localizam os genes dos RNA ribossômico ⁽⁴¹⁾.

2.4.2 Mitocôndria

São estruturas cilíndricas com cerca de 3µm de largura e 0,5µm de diâmetro, que possuem duas membranas, uma interna formada por uma série de reentrâncias (cristas mitocondriais) delimitando o que se chama de matriz mitocondrial, e uma externa, que está separada da membrana interna por um espaço chamado intermembranoso. 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 ⁽⁴²⁾.

Essas organelas contêm seu próprio DNA e RNA e um sistema completo de transcrição e tradução incluindo ribossomos, o que lhes permite sintetizar algumas de suas próprias proteínas ⁽⁴³⁾.

Sua principal função é a produção de energia em forma de ATP (Adenosina-trifosfato) que é obtida através da transferência da energia existente nas ligações químicas das moléculas que suprem ao ADP (Adenosina-difosfato). Isso se dá através de três processos: descarboxilação oxidativa, ciclo do ácido cítrico (ou de Krebs) e fosforilação oxidativa ⁽⁴¹⁾.

2.4.3 Citoesqueleto

O citoesqueleto desempenha papel crucial na sustentação celular e alterações em sua estrutura podem influenciar as interações adesivas das células ⁽⁴⁴⁾.

Esta rede é composta por filamentos de actina, microtúbulos e filamentos intermediários que, por sua vez, são formados por subunidades quimicamente distintas, actina, tubulina e proteínas classificadas como proteínas de filamentos intermediários ⁽⁴⁵⁾.

Este complexo de elementos fibrilares tem sido reconhecido como importante fator na mediação da sinalização dependente e independente de adesão ^(46,47). Em particular, mudanças na organização do citoesqueleto de actina resultam em alteração na fosforilação de resíduos de Tirosina de inúmeras proteínas sinalizadoras localizadas na região de adesão focal ⁽⁴⁸⁾.

2.4.4 Retículo endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) foi descoberto quando a microscopia eletrônica foi introduzida nos estudos das células. As primeiras micrografias mostraram um componente reticular que não atingia a membrana plasmática – daí os termos “retículo” e “endoplasmático”. É dividido em 2 setores que se diferenciam pela presença ou ausência de ribossomos em sua face citosólica. São denominados respectivamente retículo endoplasmático liso e retículo endoplasmático rugoso ⁽⁴¹⁾.

A função central desta organela é a biossíntese de lipídios e proteínas. Sua membrana é o sítio de produção de todas as proteínas transmembranas e lipídios para a maioria das organelas da célula, incluindo o próprio RE, o aparelho de Golgi, lisossomos, endossomos, vesículas secretoras e membrana plasmática ⁽⁴³⁾. O objetivo é suprir demandas funcionais, renovar membranas desgastadas pelo envelhecimento ou ainda duplicá-las antes da divisão celular ⁽⁴¹⁾. Além disso, o RE está envolvido no processo de homeostase do Ca^{+2} ⁽⁴⁹⁾.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagem celular

A linhagem celular utilizada neste trabalho, CHO-K1 (ATCC CCL-61 American Type Culture Collection, Rockville, MD) derivada de Ovário de Hamster Chinês adulto, foi adquirida da Associação Técnica Científica Paul Ehrlich (UFRJ-RJ, Brasil).

3.2 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) a uma solução estoque de 1mM. A solução estoque 1mM foi diluída em meio de cultura HAM-F12 e Metanol (Merck) (10μL de solução estoque, 10μL de metanol e 980μL de meio) para que se pudesse obter uma concentração de Propionato de Testosterona a 10μM. A partir desta foram preparadas as concentrações de 50 e 100nM que foram utilizadas em todos os experimentos.

3.3 Crescimento e manutenção da cultura celular CHO-K1

Partindo-se inicialmente de uma ampola de congelamento (NALGENE®) contendo células CHO-K1 estocadas em nitrogênio líquido, foi preparada uma garrafa de cultura de 25cm² (TPP, Switzerland), contendo 1mL de cultura de células ($\sim 10^4$ células/mL), mais 2 mL de meio de cultura HAM-F12 enriquecido com 10% soro fetal bovino (GIBCO BRL). A garrafa foi então incubada em estufa com controle automático de temperatura (37°C) e pressão de CO₂ (5%) (Forma Specific). O crescimento celular foi devidamente acompanhado por meio de observação em microscópio invertido Olympus CK40 e as células subcultivadas pelo processo de tripsinização. O repique das células foi realizado quando havia a formação de uma monocamada confluenta.

3.4 Teste da atividade mitocondrial de células CHO-K1 incubadas com o Propionato de Testosterona em diferentes concentrações

Neste estudo e nos seguintes foram utilizados 6 grupos: Grupo Controle 6 horas (somente células); Grupo Controle 24 horas (somente células); Grupo 50nM por 6 horas

(células incubadas com 50nM de Propionato de Testosterona por 6 horas); Grupo 50nM por 24 horas (células incubadas com 50nM de Propionato de Testosterona por 24 horas); Grupo 100nM por 6 horas (células incubadas com 100nM de Propionato de Testosterona por 6 horas); Grupo 100nM por 24 horas (células incubadas com 100nM de Propionato de Testosterona por 24 horas);

Para a avaliação da atividade mitocondrial através da técnica MTT as células CHO-K1 foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 5×10^4 células/mL em placas de 96 poços, contendo meio de cultura HAM-F12 suplementado com 10% de SFB e incubadas por uma noite para adesão a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. No dia seguinte, foi adicionado às células, o Hormônio Propionato de Testosterona, nas concentrações de 50 e 100nM. As células foram incubadas na presença do hormônio Propionato de Testosterona durante 6 ou 24 horas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Após incubação, a atividade mitocondrial foi avaliada pela análise baseada na redução do sal 3-[(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) solúvel em água para o formazan, insolúvel e de cor roxa, produto das desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas. Para tal, os poços foram lavados com PBS, em seguida foi adicionado o MTT diluído em PBS na concentração de 0,5mg/mL. As placas foram então incubadas por 1 hora a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos através da adição do solvente orgânico Dimetil Sulfóxido (DMSO) e mantidos 30 minutos sob agitação. Após este período foi efetuada a leitura das placas no leitor de Elisa Spectracount (Packard, USA) utilizando filtro de 570nm. Os dados obtidos foram tratados de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Atividade Mitocondrial: } \frac{(\text{Absorbância de Células Tratadas} - \text{Absorbância do Branco})}{(\text{Absorbância de Células Controle} - \text{Absorbância do Branco})} \times 100$$

Os resultados foram plotados no programa Origin (Origin 7.0 SRO, Origin Lab Corporation, Northampton, MA 01060 USA) com média e desvio padrão de 6 amostras (grupos controle 6 e 24 horas, Propionato de Testosterona na concentração 50nM por 6 e 24 horas e Propionato de Testosterona na concentração 1000nM por 6 e 24 horas) em triplicata. Os testes estatísticos utilizados foram ANOVA e o Friedman.

3.5 Microscopia de Fluorescência utilizando-se marcadores específicos para diferentes organelas celulares

Para todas as marcações, as células foram tripsinizadas e plaqueadas a uma densidade de 5×10^5 células/mL em placas de 24 poços (TPP, Switzerland) contendo lamínulas estéreis, com meio de cultura HAM-F12 suplementado com 10% de SFB e incubadas por uma noite para adesão a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. No dia seguinte, foram adicionadas às células o hormônio Propionato de Testosterona, diluído nas concentrações de 50 e 100nM durante 6 ou 24 horas a 37°C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Este experimento foi realizado em duplicata.

3.5.1 Marcação para núcleo:

A condensação da cromatina e a fragmentação do núcleo foram estudadas através da coloração com DAPI, que é um marcador específico para o núcleo, possibilitando a visualização do processo mitótico celular.

Após os procedimentos previamente descritos, as células CHO-K1 foram fixadas com Paraformaldeído 4% (diluído em tampão PHEM 0,1M) por 10 minutos, lavadas com o referido tampão e marcadas com DAPI (4', 6' - diamidino, 2' phenylindole - Molecular Probes) na concentração 0,03μM durante 10 minutos.

3.5.2 Marcação para mitocôndria:

Após os procedimentos previamente descritos, as células CHO-K1 foram marcadas com MitoTracker Orange™ na concentração de 150nM por 20 minutos, lavadas com meio de cultura fresco e pré-aquecido (37°C) e fixadas com Paraformaldeído 3,7% (diluído em meio de cultura sem soro) por 15 minutos.

3.5.3. Marcação para citoesqueleto:

Após os procedimentos previamente descritos, as células CHO-K1 foram fixadas em Paraformaldeído 4% com 0,1% Triton X100 em PBS a 37°C por 15 minutos, lavadas com PBS e marcadas com Faloidina TRITC (500 μg/mL) por 30 minutos a temperatura ambiente.

3.5.4 Marcação do retículo endoplasmático

Após os procedimentos previamente descritos, as células CHO-K1 foram marcadas com DioC₆(3) (1mg.mL⁻¹) por 15 minutos, lavadas com PBS e fixadas em Paraformaldeído 4% por 10 minutos.

3.5.5 Montagem das lâminas e registro do material

Após cada marcação, as lamínulas foram montadas sobre lâminas contendo N-propil galato e então vedadas com esmalte em sua periferia. Foram feitas fotomicrografias do material em Microscópio de Epifluorescência modelo Leica DMLB com sistema fotográfico MPS-30, utilizando-se os filtros ultravioleta, verde e azul.

4 RESULTADOS

4.1 Teste de citotoxicidade através da técnica de MTT (atividade mitocondrial)

Os resultados obtidos após o teste de citotoxicidade pelo método MTT (figura 2) mostraram que o período compreendido entre 6 e 24 horas, ao qual as células foram submetidas à concentração de 50nM, não causou alterações significativas à viabilidade celular. Com 6 horas o número de células viáveis estava em torno de 80%. Entretanto o número de células vivas aumentou significativamente chegando atingir 50% acima do controle (calculado como 100%) em 24 horas.

Os resultados demonstraram que a maior concentração utilizada (100nM), foi a que causou maiores alterações às células, em ambos os tempos de exposição. Observamos que após 6 horas de tratamento com o esteróide anabolizante, em contraste com as células que receberam 50nM, houve uma queda da viabilidade celular com valores em torno de 57%. O mesmo foi observado com as células que foram expostas por 24 horas.

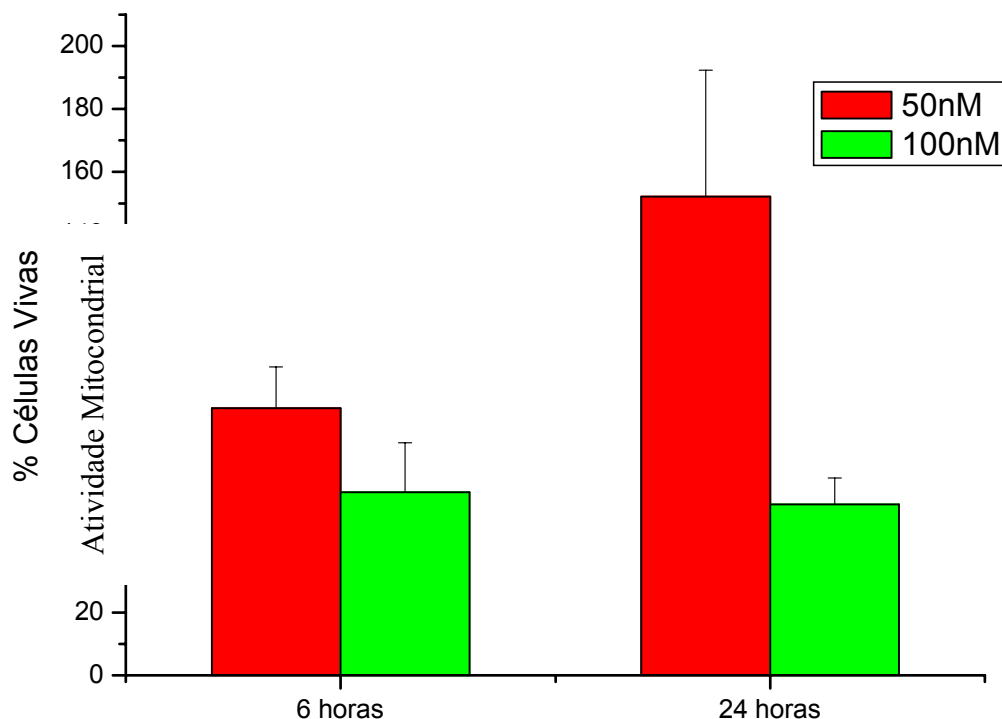


Figura 2: Atividade mitocondrial, após incubação com diferentes concentrações do hormônio anabolizante Propionato de Testosterona, por diferentes períodos de tempo, avaliada pelo teste MTT (3-[(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]).

4.2 Microscopia de Fluorescência

4.2.1 Retículo Endoplasmático

Através da análise das fotomicrografias obtidas após a marcação do retículo endoplasmático, verificou-se que as células do grupo controle estavam bem espalhadas e com o retículo endoplasmático se estendendo na forma de uma rede tubular ao longo de todo o citosol (Figura A).

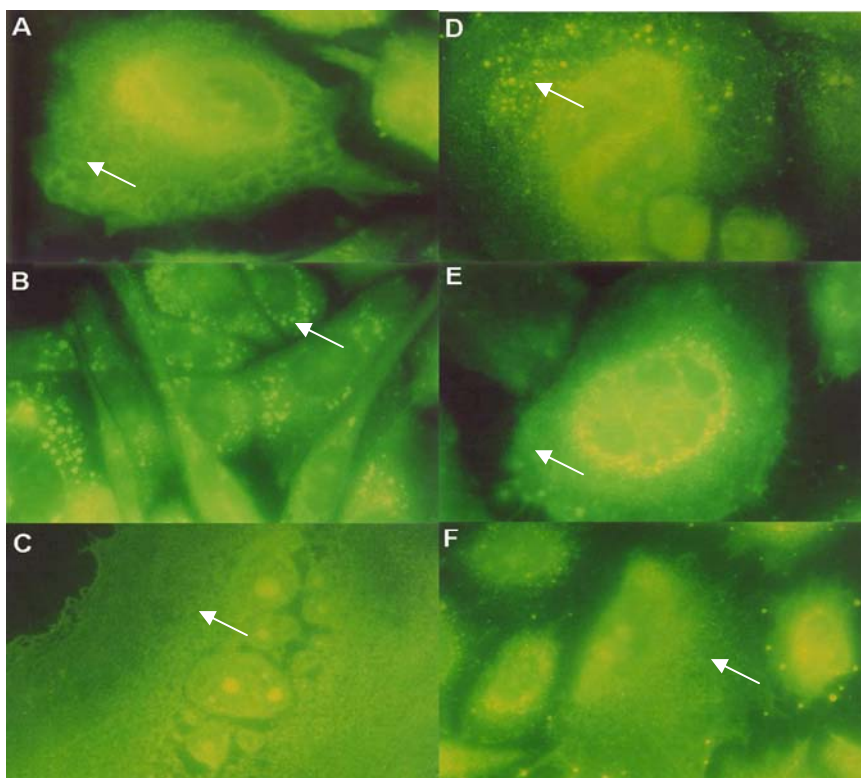


Figura 3: Células CHO-K1, com retículo endoplasmático marcado com DioC₆(3). Grupo A: Células do grupo controle, 6 horas. Em volta de todo núcleo está o retículo endoplasmático (RE). A seta indica a distribuição desta organela em forma de uma rede tubular. Grupo B: Células tratadas com 50nM de Propionato de Testosterona durante 6 horas. As setas indicam a presença de vesículas no citoplasma no lugar do retículo endoplasmático. A característica de rede tubular não é mais vista facilmente. GRUPO C: Célula tratada com 100nM de Propionato de Testosterona durante 6 horas. Esta concentração causou a completa vesiculação do retículo endoplasmático (seta). GRUPO D: Células do grupo controle, 24 horas. Verifica-se a distribuição normal desta organela, sem alterações morfológicas. GRUPO E: Células tratadas com 50nM de Propionato de Testosterona durante 24 horas. O retículo endoplasmático se tornou uma imensa quantidade de pequenas vesículas (seta). GRUPO F: Células tratadas com 100nM de Propionato de Testosterona durante 24 horas, também nesta concentração, é possível verificar a completa vesiculação do retículo endoplasmático (seta). Aumento: 1000X.

Após 6 horas de incubação com o Propionato de Testosterona, na concentração de 50nM do hormônio, notou-se a presença de vesículas no citoplasma e o início da perda da característica de rede (Figura B).

Com a concentração de 100nM do hormônio, verificou-se stress celular e perda da adesão, além da retração celular (Figura C). Após 24 horas, embora as células do grupo controle ainda apresentassem-se bem espalhadas, íntegras e com o retículo distribuído por todo o citosol em forma de rede, as células incubadas com a concentração de 50nM do hormônio não apresentavam o retículo distribuído uniformemente, em vez disso, onde estaria esta típica distribuição encontrou-se um grande número de vesículas no citoplasma (Figura E). Com a concentração de 100nM do hormônio, verificou-se stress celular, perda da adesão e comprometimento da integridade da membrana (Figura F).

4.2.1 Núcleo

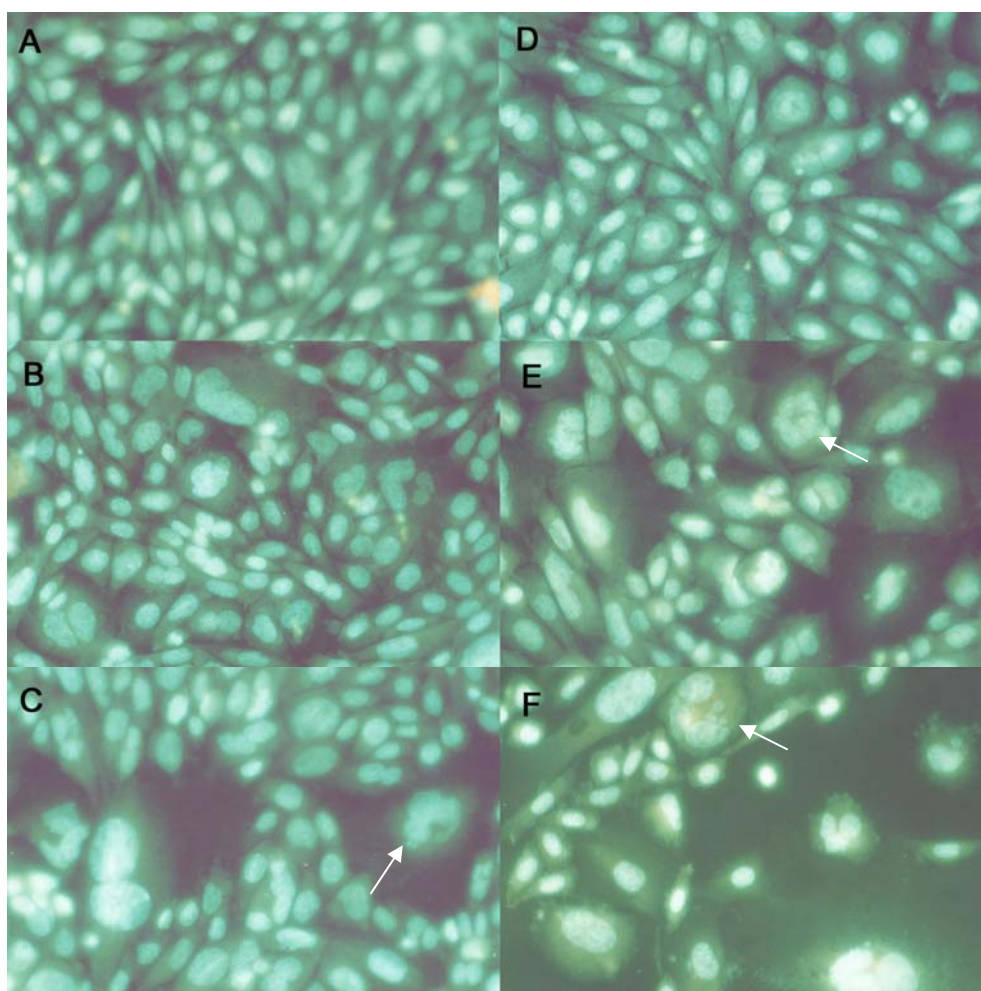


Figura 4: Células CHO-K1, após marcação DAPI para núcleo. GRUPO A: Grupo Controle, 6 horas, os núcleos apresentam-se íntegros e com formato acompanhando o da célula. GRUPO B: Células tratadas com 50nM do hormônio Propionato de Testosterona durante 6 horas. Os núcleos continuam íntegros. GRUPO C: Células tratadas com 100nM de Propionato de Testosterona durante 6 horas, observa-se presença de corpos apoptóticos (seta). GRUPO D: Grupo controle, 24 horas, também não se verifica nenhuma alteração no núcleo, permanecendo íntegro. GRUPO E: Células tratadas com 50nM de Propionato de Testosterona durante 24 horas, é possível notar núcleos com características apoptóticas, assim como os núcleos do Grupo F, tratados com 100nM de Propionato de Testosterona. Aumento: 400X.

Após a análise das fotomicrografias foi observado que as células do grupo controle apresentavam-se bem espalhadas com formato alongado, o núcleo íntegro e acompanhando o formato da mesma (Figura A). Após 6 horas de exposição à concentração de 50nM do Propionato de Testosterona, as células não apresentaram alterações significativas quanto à integridade do núcleo (Figura B). Ao contrário do que observamos as células expostas na concentração de 100nM, estas perderam o formato inicial, houve também uma alteração quanto à forma dos núcleos de alongados para redondos e algumas células apresentaram perda de adesão (Figura C).

Após 24 horas de incubação as células do grupo controle não apresentavam diferenças. Em contrapartida as células incubadas com a concentração de 50nM do hormônio perderam o formato original. Nesta concentração é possível observar a presença de núcleo com características apoptóticas (Figura E), o que também foi verificado nas células expostas a concentração de 100nM. Nesta última concentração, no entanto, o número de células contendo núcleos com características apoptóticas era maior.

4.2.2 Mitocôndria

Após a marcação das mitocôndrias, as fotomicrografias foram analisadas e revelaram um grupo controle apresentando distribuição normal das mitocôndrias ao redor do núcleo e também por todo o citoplasma (Figura 5A).

Ao término de 6 horas de incubação com 50nM do Propionato de Testosterona não houve mudanças significativas na distribuição das mitocôndrias em comparação ao grupo controle (Figura 5 B).

Após 24 horas os grupos de 50nM e 100nM do hormônio, apresentaram retração citoplasmática e as mitocôndrias se encontram com aspecto globular (Figura 5E e 5F). Entretanto após o tempo de 6 horas o grupo exposto a 100nM do hormônio, apresentou mitocôndrias com uma morfologia mais alongada, filamentosa (Figura 5C); com 24 horas as células controle apresentavam as mesmas características, ou seja, não houve mudanças significativas entre 6 e 24 horas (Figura 5A, 5D).

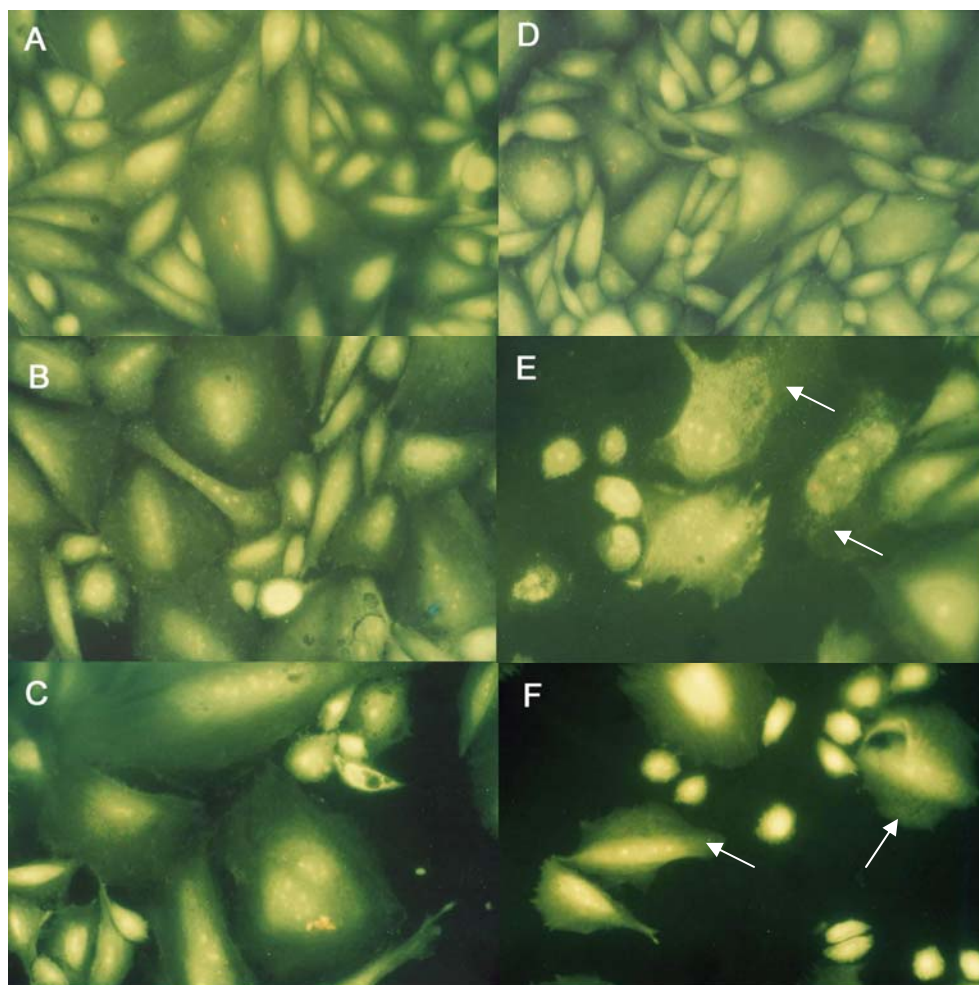


Figura 5: Células CHO-K1, mitocôndrias após marcação, com o marcador molecular Mitotracker. GRUPO A: Células do grupo controle, as mitocôndrias distribuem-se principalmente ao redor do núcleo e também por todo o citoplasma. GRUPO B: Células que receberam 50nM do Propionato de Testosterona durante 6 horas; estas células não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. GRUPO C: Células tratadas com 100nM de Propionato de Testosterona durante 6 horas; observam-se mitocôndrias ao redor do núcleo e com aspecto filamentosos. GRUPO D: Grupo controle, após 24 horas, estas células se mantiveram íntegras. GRUPO E: Células tratadas com 50nM de Propionato de Testosterona após 24 horas, nota-se a modificação quanto a forma da mitocôndria para globular. GRUPO F: Células tratadas com 100nM de Propionato de Testosterona após 24 horas; neste grupo é possível observar a retração citoplasmática além forma da mitocôndria de filamentosos para globular. Aumento: 400X.

4.2.4 Citoesqueleto

A distribuição e estrutura dos filamentos de actina, após o tratamento com Propionato de Testosterona foram acompanhadas através da técnica de microscopia de fluorescência, utilizando Faloidina TRITC como marcador. A distribuição e organização dos filamentos de grande parte das células do grupo de controle (Fig. 6A) obedeceram a um mesmo padrão. É possível observar uma distribuição homogênea dos filamentos por todo o citoplasma celular.

Em contrapartida as células submetidas ao tratamento com Propionato de Testosterona, na concentração de 50nM no tempo 24 horas e na concentração de 100nM nos tempos de 6 e 24 horas demonstraram alterações significativas na distribuição dos filamentos de actina.

Posterior ao tratamento das células com o Propionato de Testosterona no tempo de 6 horas na concentração de 100nM do hormônio, observou-se uma redução dos filamentos de actina na região central da célula.

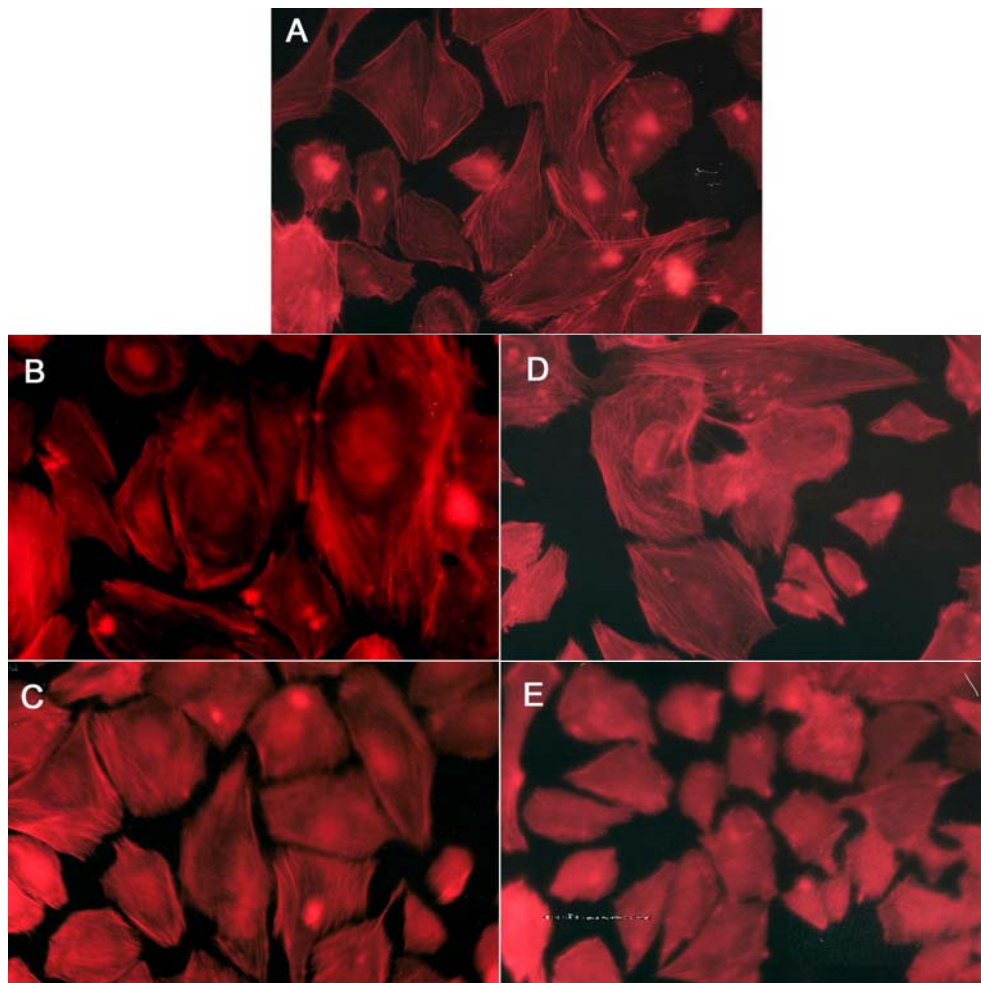


Figura 6: Células CHO-K1, técnica microscopia de fluorescência, utilizando Faloidina TRITC como marcador. GRUPO A: Grupo controle, 24 horas, observa-se a distribuição homogênea da estrutura dos filamentos de actina por todo o citoplasma. GRUPO B: Células após o tratamento com 50nM de Propionato de Testosterona durante 6 horas; os filamentos de actina se encontram mais na periferia das células em relação ao grupo controle. GRUPO C: Células tratadas com 100nM de Propionato de Testosterona, após 6 horas, é possível notar também os filamentos de actina mais na periferia das células. GRUPO D: Células foram tratadas com 50nM de Propionato de Testosterona, durante 24 horas, observamos retração citoplasmática, assim como na distribuição dos filamentos. GRUPO E: Nesse grupo as células receberam 100nM de Propionato de Testosterona é possível observar total retração citoplasmática, além da distribuição dos filamentos de actina na periferia das células. Aumento: 400X.

No período de 24 horas na concentração de 100nM do hormônio as células apresentaram marcação reduzida, principalmente na região central. Nessas células as fibras de estresse são encontradas na periferia celular. Do mesmo modo as células incubadas por 24 horas na concentração de 100nM do hormônio Propionato de Testosterona demonstraram uma desorganização do citoesqueleto, porém acompanhada de retração celular com forte marcação na região cortical.

Ao analisar os grupos controle (Figura A) e o grupo exposto a 100nM após 24 horas de exposição do hormônio (Figura E) foi perceptível a retração celular além da distribuição na periferia das células dos filamentos de actina.

Os dados obtidos evidenciaram o citoesqueleto como sendo alvo do hormônio Propionato de Testosterona causando alterações severas na estrutura e distribuição dos filamentos de actina de células CHO-K1, além da retração celular. Consequentemente acarreta danos à organização interna, estabilidade mecânica e estrutural das células.

5 DISCUSSÃO

Os esteróides Anabólicos Androgênicos, incluindo Propionato de Testosterona, são utilizados além de suas indicações terapêuticas, por atletas interessados em melhorar o desempenho esportivo e não atletas interessados em melhorar a força física e aparência ⁽⁵⁰⁾. Porém, o uso indiscriminado dos esteróides anabólicos androgênicos pode acarretar sérios danos à saúde, tais como lesão hepática, icterícia colestática, necrose avascular de cabeça femoral, ansiedade, euforia, acne, alopecia, hepatite, atrofia testicular, entre outros ⁽³⁾.

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 das alterações causadas à 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.

Sendo assim, este estudo foi desenvolvido com o intuito de se observar a citotoxicidade ocasionada às células CHO-K1 após interação com o hormônio Propionato de Testosterona.

Através dos resultados obtidos com o teste de citotoxicidade, utilizando o método de redução do sal MTT pode-se verificar que o Propionato de Testosterona influenciou na atividade mitocondrial através da redução da reação com as desidrogenases mitocondriais. Estrada e colaboradores (2006) observaram esse decréscimo da atividade mitocondrial usando 10 μ M de testosterona em células neuronais ⁽⁷⁾.

O grupo de células que recebeu 50nM do hormônio apresentou elevada atividade mitocondrial com 24 horas de incubação (Figura 2). Isto se deve ao fato de que a testosterona e seus derivados promoverem o aumento da síntese protéica que é dependente da atividade mitocondrial.

Através da ligação do hormônio com proteínas intracelulares na membrana celular, há a formação de um complexo hormônio receptor que é translocado a sítios de ligação na cromatina. Essa ligação irá promover transcrição de genes, que levará à produção de mRNA, resultando no aumento da síntese protéica ⁽²⁰⁾. Este aumento de síntese protéica pode estar relacionado também com o maior número de divisões celulares, elevando o número de células viáveis. Isso mostra que num primeiro momento o hormônio exerce um efeito estimulatório para esta linhagem (até 24 horas de exposição). Em contra partida as fotomicrografias obtidas após a marcação de DAPI (núcleo) e DioC₆(3) (retículo endoplasmático) (Figuras 4D e 5D, respectivamente) mostram que nas mesmas 24 horas com 50nM de concentração, há a

presença de núcleos apoptóticos e perda da característica de rede tubular do retículo endoplasmático. Portanto, apesar do aumento do número de células, muitas delas apresentam danos devido à presença do hormônio.

Welder e colaboradores descreveram em 1995 que a concentração de 100 μ M de Propionato de Testosterona durante 4 horas de exposição exerceu efeitos tóxicos sobre a cultura primária de células de miocárdio utilizada em seu experimento.

Para a análise de estruturas celulares como o núcleo, o retículo endoplasmático e as mitocôndrias foram utilizados marcadores moleculares específicos para cada uma destas organelas, a saber, DAPI, DioC6(3) e MitoTracker Orange, respectivamente. As fotomicrografias das marcações com DAPI e Mitotracker, ambos após incubação com concentração de 50nM do hormônio por 6 horas (Figuras 4B, 5B respectivamente), corroboraram com o resultado obtido pelo teste de atividade mitocondrial. Nesta concentração o núcleo e as mitocôndrias não apresentaram diferenças significativas em comparação com o grupo controle. Visto que até 24 horas o hormônio exerceu um efeito estimulatório, os núcleos tinham o aspecto normal assim como as mitocôndrias, que mostravam quantidade e distribuição semelhantes ao grupo controle.

Através das fotomicrografias obtidas através do marcador DAPI, foi possível verificar a presença de núcleos apoptóticos, em células submetidas à concentração de 100nM em 6 horas de exposição (Figura 4C). Porém o período decorrido por 24 horas mostrou-se mais prejudicial. Neste período, ambas as concentrações (50 e 100nM), promoveram o aparecimento de células apresentando núcleos apoptóticos (Figuras 4E, 4F). O mesmo foi observado por Zaugg e colaboradores⁽⁵²⁾, em seu estudo com miócitos ventriculares de rato adulto no qual demonstraram que esteróides anabólicos androgênicos podem induzir processo de morte celular por apoptose.

Utilizando-se o marcador MitoTracker Orange™ pode-se observar que em 6 horas com 100nM de concentração (Figura 5C), as mitocôndrias apresentaram diferenças em comparação com os grupos anteriores (controle e 50nM, Figuras 5A, 5B respectivamente). As mitocôndrias estavam com uma distribuição maior ao redor do núcleo. Esta mesma característica também foi constatada nas concentrações de 50 e 100nM durante 24 horas (Figuras 5D e 5F). Como foi evidenciada a presença de núcleos apoptóticos neste período. Provavelmente a disponibilidade das mitocôndrias ao redor do núcleo se deve ao fato do evento apoptótico estar acontecendo, já que esta organela desempenha um papel fundamental para a realização deste processo.

Segundo Alberts ⁽⁴²⁾, 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 ⁽⁴³⁾ também afirma que o número de mitocôndrias por célula pode ser regulado de acordo com a necessidade. 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 e também para suprir a demanda de energia para que a célula pudesse metabolizar o hormônio.

Os resultados obtidos com as fotomicrografias de retículo endoplasmático revelaram uma grande quantidade de vesículas após exposição a 50nM de propionato de testosterona por 6 horas.

Como já descrito, os hormônios esteróides anabólicos possuem a propriedade de aumentar a síntese de proteínas. Para isso esses hormônios induzem a transcrição de genes, o que resulta na produção de mRNA. Tal mRNA será traduzido em proteína no retículo endoplasmático rugoso. Após a tradução, as recém sintetizadas proteínas serão exportadas para seus devidos fins através de vesículas. Isso explica a presença destas estruturas na figura (3B). Com 100nM, porém, a característica de rede inicialmente presente (figura 3C), foi perdida, o que pode significar que o aumento demasiado de síntese protéica foi prejudicial de acordo com o maior tempo de exposição ao hormônio. A figura 3C revelou que o retículo endoplasmático se tornou uma grande quantidade de pequenas vesículas, provavelmente devido à alta demanda de exportação das proteínas recém sintetizadas.

Com 24 horas de exposição a 100nM foi possível notar o desaparecimento do retículo endoplasmático (figura 3F). Devido à alta atividade a que foi submetida, induzida pelo hormônio, esta organela sofreu stress que resultou na perda da integridade de suas características morfológicas.

O retículo endoplasmático é um compartimento celular singular que está simultaneamente envolvido nos processos de síntese de proteínas e homeostase do Ca^{2+} ⁽⁵³⁾. Diversas funções celulares são reguladas por alterações na concentração do Ca^{2+} intracelular ⁽⁵⁴⁾. Szalai e colaboradores ⁽⁵⁵⁾, demonstraram evidências em seu trabalho indicando que mudanças na homeostase do cálcio intracelular também desempenham um papel na modulação da apoptose. A abertura do PTP (“permeability transition pore”) é controlada pelo Ca^{2+} , entre outras substâncias. Pulsos de Ca^{2+} ou a liberação de Ca^{2+} induzida pelo IP3 (trifosfato de inositol) resultam na abertura do PTP, liberação de citocromo *c*, ativação das caspases e apoptose nuclear em células expostas a estímulos pró-apoptóticos. O Ca^{2+} pode ativar varias enzimas hidrolíticas, incluindo lipases, proteases e nucleases ⁽⁵⁶⁾. Desta maneira, é

possível que os danos causados ao retículo endoplasmático pelo Propionato de Testosterona tenham permitido a saída de Ca^{2+} do interior para o citosol onde pode ter participado do processo apoptótico demonstrado nos resultados obtidos com a marcação do núcleo.

Um estudo feito por Zaugg e colaboradores ⁽⁵²⁾, utilizando miócitos ventriculares de rato adulto, demonstrou que esteróides anabólicos androgênicos podem induzir processo de morte celular por apoptose. Tal mecanismo de morte celular foi também observado por Estrada e colaboradores ⁽⁷⁾, os quais realizaram um estudo com doses elevadas de Testosterona em células neuronais e observaram apoptose.

6 CONCLUSÃO

A concentração de 50nM do hormônio esteróide anabolizante Propionato de Testosterona causou um efeito estimulatório até 24 horas de exposição nesta linhagem celular em relação à viabilidade celular indicada pelo teste MTT (atividade mitocondrial). Porém a concentração de 100nM do hormônio foi considerada citotóxica para linhagem utilizada por causar morte em mais de 50% das células inicialmente viáveis.

A organização e a estrutura dos filamentos de actina se mostraram comprometida após a interação com o hormônio Propionato de Testosterona.

O esteroide anabolizante Propionato de Testosterona causou um aumento da atividade mitocondrial e mudança na morfologia desta organela com a concentração de 100nM tanto em 6 quanto 24 horas.

Para retículo endoplasmático a concentração que mais causou danos foi a de 100nM para ambos os tempos de incubação, assim como também para o núcleo, que apresentou características que sugerem apoptose.

REFERÊNCIAS

1. LISE, M.L.Z.; SILVA, T.S.G.; FERIGOLO, M.; BARROS, H.M.T. O abuso de esteróides anabólicos androgênicos em atletismo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.45, n.4, p.364-370, 1999.
2. SRINIVAS-SHANKAR, U.; WU, F.C. Drugs Insight: Testosterone preparations. **Nat. clin. pract. urol.**, v. 3, p.653-665, 2006.
3. NASROLLAH, T.; SHARIDI, M.D. A Review of the Chemistry, Biological Action, Clinical Applications of Anabolic- Androgenic Steroids. **Clin. therap.**, v.23, n.9, p.1355-1390, 2001.
4. BERNE, R.M.; LEVY, M.N. As glândulas reprodutoras. In: BERNE, R.M.; LEVY, M.N. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2000. cap.52, p.910-956.
5. CUNHA, T.S.; CUNHA, N.S.; MOURA, M.J.C.S.; MARCONDES, F.K. Esteróides Anabólicos Androgênicos e sua relação com a prática desportiva. **Rev. bras. ciênc. farm.**, v.40, n.2, p.165-179, 2004.
6. STIMAC, D.; MILLIC, S.; DINTINJANA, R.D.; KOVAC, D.; RISTIC, S. Androgenic/Anabolic Steroid-Induced toxic hepatitis. **J. clin. gastroenterol.**, v.35, n.4, p.350-352, 2002.
7. ESTRADA, M.; VARSHNEY, A.; EHRLICH, E.B. Elevated Testosterone Induces Apoptosis in Neuronal Cells. **J. biol. chem.**, v. 281, n.35, p.25492-25501, 2006.
8. O'SULLIVAN, A.J.; KENNEDY, M.C.; CASEY, J.H.; DAY, R.O.; CORRIGAN, B.; WODAK, A.D. Anabolic Androgenic Esteroids: medical assessment of present, past and potential users. **Med. j. austr.**, v.173, p.323-327, 2000.
9. BASARIA, S.; WAHLSTROM, J.T.; DOBS, A.S. Anabolic- androgenic steroid therapy in the treatment of chronic diseases. **J. clin. endocrinol. metab.**, v.86, n.11, p.5108-5117, 2001.
10. PARSSINEN, M.; SEPPALA, T. Steroid use and long term health risks in former athletes. **Sports med.**, v.32, n.2, p.83-94, 2002.
11. 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.167-175, 2005.

12. DORNAS, C.W.; NAGEM, J.T.; OLIVEIRA, T.T. Considerações sobre os efeitos do uso de esteróides anabólicos androgênicos. **Rev. bras. farm.**, v.87, n.1, p.3-8, 2006.
13. DELUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S. Farmacologia Endócrina. **Farmacol. integ.**, v.9, p.627- 633, 2007.
14. GAPHERY, NA. Performance - enhancing drugs. **Orthop. clin. north. am.**, v.26, p.433-42, 1995.
15. WILSON, J.D. Androgen abuse by athletes. **Endroc. rev.**, v.9, p.181-199, 1988.
16. GOODMAN, GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**; 9 ed, p.1074, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
17. TILEY, W.D.; MARCELLI, M.; WILSON, J.D.; MCPHAUL, M.J. Characterization and expression of cDNA encoding the human androgen receptor. **PNAS**, v.86, n.1, p.327-331.
18. FELDKOREN, B.I.; ANDERSSON, S. Anabolic-androgenic steroid interaction with rat androgen receptor in vivo and in vitro: A comparative study. **J. steroid. biochem. mol. biol.**, v.94, n.5, p.481-487, 2005.
19. RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.490-502, 2003.
20. 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.
21. GUYTON, A.C.; HALL-JOHN, E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 ed, cap.80, p.917-919, 1997.
22. HALBE, H.W.; NAAKAMURA, M.S.; DA-SILVEIRA, G.P.; CARVALHO, W.P.C. Updating the clinical experience in endometriosis - the Brazilian perspective. **Braz. j. obstet. gynaecol.**, v.12, p.17-21, 1995.
23. HAEUSLER, G.; FRISCH, H.; SCHIMITT, K.; BLÜMEL, P.; PLÖCHL, E.; ZACHMANN, M.; WALDHÖR, T. Treatment of patients with Ullrich Turner

syndrome with conventional doses of growth hormone and the combination with IGFBP-3 concentrations. **Eur. j. pediat.**, v.154, p.437-444, 1995.

24. SIMON, J.A. The Role of testosterone in the treatment of hypoactive sexual desire disorder in postmenopausal women. **Menop. manag.**, v.12, p 7-11, 2005.
25. BERNING, B.; BENNINK, H.J.; FAUSER, B.C. Tibolone and its effects on bone: a review. **Climact.**, v.4, n.2, p.120-136, 2001.
26. KLOOSTERBOER, H.J. Tibolone: a steroid with a tissue-specific mode of action. **J. Steroid. biochem. mol. biol.**, v.76, p.231-238, 2001.
27. WILSON, D.M.; MC-CAULEY, E.; BROWN, D.R.; Dudley, R. Oxandrolone therapy in constitutionally delayed growth and puberty. **Pediatr.**, v.96, n.6, p.1095-1100, 1995.
28. DOLECEK, R.; DVORACEK, C.; JEZEK, M.; KUBIS, M.; SAJNAR, J.; ZÁVADA, M. Very low serum testosterone levels and severe impairment of spermatogenesis in burned male patients. Correlations with basal levels of DSH, LH, and PRL after LHRH and TRH. **Endocrinol. exp.**, v.17, p.33-45, 1983.
29. HART, D.W.; WOLF, S.E.; RAMZY, P.I.; CHINKES, D.L.; BEAUFORD, R.B.; FERRANDO, A.A.; WOLFE, R.R.; HERNDON, D.N. Anabolic effects of oxandrolone after severe burn. **Ann. surg.**, v 233, p.556-564, 2001.
30. DEMLING, R.H.; ORGILL, D.P. The anticatabolic and wound healing effects of the testosterone analog oxandrolone after severe burn injury. **J. crit. care.**, v.15, p.12-17, 2000.
31. DEMLING, R.H.; DE-SANTI, L. Oxandrolone induced lean mass gain during recovery from severe burns is maintained after discontinuation of the anabolic steroid. **Burns**, v.29, p.793-797, 2003.
32. TISDALE, M.J. Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations. **Nutrit.**, v.13, p.1-7, 1997.
33. TODD, B.D. Pancreatic carcinoma and low serum testosterone; a correlation secondary to cancer cachexia? **Eur. j. surg. oncol.**, v.14, p.199-202, 1988.

34. CUNNINGHAM, G.R.; SILVERMAN, V.E.; THOMBY, J.; KOHLER, P.O. The potential for an androgen male contraceptive. **J. clin. endocrinol. metab.**, v.49, p.520-526, 1979.
35. MULLIGAN, K.; SCHAMBELAN, M. Anabolic treatment with GH, IGF-I, or anabolic steroids in patients with HIV-associated wasting. **Intern. j. cardiol.**, v.85, n.1, p.151-159, 2002.
36. PAVLATOS, A.M.; FULTZ, O.; MONBERG, M.J.; PHARM, A.V. Review of oximetholone: a 17 alpha-alkylated anabolic-androgenic steroid. **Clin. ther.**, v.23, p.789-801, 2001.
37. VILELA, M.J.; MARTINS, M.L.; MENDES, R.L. ; SANTOS, A.A. Determinação de padrões de crescimento de células em cultura. **J. bras. patol. méd. lab.**, v.39,n.1, p.67-72, 2003.
38. KEIRA, S.M.; FERREIRA, L.M.; GRAGNANI, A.; DUARTE, I.S.; SANTOS, I.A.N.; Modelo experimental para cultura de fibroblastos. **Acta cir. bras.**, v.19, p.11-16, 2004.
39. LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995.
40. PASSARGE, E. **Genética. Texto e Atlas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
41. DE-ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
42. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997.
43. ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J. **Fundamentos da Biologia Celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.
44. KORB, T.; SCHLÜTER, K.; ENNS, A.; SPIEGEL, H.U.; SENNINGER, N.; NICOLSON, G.L.; HAIER, J. Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. **Exp. cell. res.**, v.299, p.236-247, 2004.
45. JANMEY, P.A. The cytoskeleton and cell signaling component localization and mechanical coupling. **Physiol. rev.**, v.78, n.3, p.763-781, 1998.

46. NOJIMA, T.; MORINO, N.; MINURA, T.; HAMASAKI, K.; FURUYA, H.; SAKAI, R.; SATO, T.; TACHIBANA, K.; MORIMOTO, C.; YAZAKI, Y.; HIRAI, H. Integrin-mediated cell adhesion promotes tyrosine phosphorylation of p 130 Cas, a SRC homology 3- containing molecule having multiple SRC homology 2- binding motifs. **J. biol. chem.**, v.270, p.15398-15402, 1995.

47. CAZAUBON, S.; CHAVEROT, N.; ROMERO, A.; GIRAULT, J.A.; ADAMSON, P.; STRSBERG, A.D.; COURAUND, P.O. Growth factor activity of endothelin-1 in primary astrocytes mediated by adhesion-dependent and independent pathway. **J. neurosc.**, v 17, p 6203-62012, 1997.

48. THAMILSELVAN, V.; BASSON, A.D. The role of the cytoskeleton in differentially regulating pressure- mediated effects malignant colocyte focal adhesion signaling and cell adhesion. **Carcinogen.** v.26, n.10, p.1687-1697, 2005.

49. PATIL, C.; WALTER, P. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. **Curr. opin. cell biol.**, v.13, n.3, p.349-355, 2001.

50. WOOD, R.I. Reinforcing aspects of androgens. **Physiol. behav.**, v.83, p.279-289, 2004.

51. WELDER, A.A.; ROBERTSON, J.W.; FUGATE, R.D.; MELCHERT, R.B. Anabolic- Androgenic Steroid-Induced Toxicity in Primary Neonatal Rat Myocardial Cell Cultures. **Toxicol. appl. pharm.**,v.133, p.328-342, 1995.

52. ZAUGG, M.; JAMALI, N.Z.; LUCCHINETTI, E.; XU, W.; ALAM, M.; SHAFIQ, S.A.; SIDDIQUI M, A.Q. Anabolic-androgenic steroids induce apoptotic cell death in adult rat ventricular myocytes. **J. cell physiol.**, v.187, n.1, p.90-95, 2001.

53. POOT, M.; ZHANG, Y.Z.; KRAMER, J.A.; Wells, K.S.; JONES, L.J.; HANZEL, D.K.; LUGADE, A.G.; SINGER, V.L.; HAUGLAND, R.P. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. **J. histochem. cytochem.**, v.44, p.1363-1372, 1996.

54. POZZAN, T.; RIZZUTO, R.; VOLPE, P.; MELDOLESI, J. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. **Physiol. rev.**, v74, n.3, p.595-636, 1994.

55. SZALAI, G.; KRISHNAMURTHY, R.; HAJNÓCZIKI, G. Apoptosis driven by IP3-linked mitochondrial calcium signals. **EMBO j.**, v.18, n.22, p.6349-61, 1999.

56. SANTELLA, L.; CARAFOLI, E. Calcium signaling in the cell nucleus. **FASEB**, v.11, p.1091-1109, 1997.

APENDICE A: Descrição de preparação de experimentos

Meio de Cultura

O meio de cultura utilizado foi o F-12 Nutrient Mixture (HAM), dissolvido em 1L de água ultrapura em um béquer. Este meio possui em sua composição básica L-Glutamina, como não contém bicarbonato de sódio em sua composição, foi adicionado 1,176g de bicarbonato de sódio no momento do preparo, sob agitação. O pH foi medido e acertado para 7,2. A conservação foi em câmara fria de 2° a 8°C. A suplementação foi realizada com soro fetal bovino (SFB) a 5%.

Soro Fetal Bovino

O soro fetal bovino é utilizado na complementação dos meios de cultura. Em sua composição básica encontra-se insulina, hormônios e fatores de crescimento. A solução estoque adquirida Gibco BRL é pré-aquecida a 56°C em seguida estocada em frascos num volume de 10mL cada. A conservação é feita em freezer a -20°C.

Tampão Fosfato

Para o preparo da solução “A” foi adicionado 2,76g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific) em 100mL de água destilada e deixado sob agitação até que formasse uma mistura homogênea, o mesmo ocorreu com a solução B, onde foi adicionado 5,36g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fisher Scientific) em 100mL de água destilada. A solução tampão é uma mistura entre duas soluções “A e B” (33 mL de solução A + 67 mL de solução B) (pH 7,1).

Salina Tampão Fosfato (PBS)

Para 1L foi misturado 100mL de tampão fosfato 0,1M em 900mL de água destilada. Sob agitação, adicionou-se 9g de NaCl.

Tampão PHEM

Em 500 mL de água destilada são dissolvidos 10,36 g de Pipes, (pH 6,8); 3,25g de Hepes; 1,9g de EDTA e 0, 27g de MgCl_2 .

Tripsina

Para 100mL de tripsina foram dissolvidos 0,1g de Tripsina (Gibco BRL) (0,1%) e 0,05g de EDTA (Analyticals) (0,05%) em 100mL de PBS.

MTT (Sigma)

Para o preparo do MTT (3-[(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide]) 5mg de MTT foi diluído em 1mL de PBS para obter uma solução estoque de 5mg/mL^{-1} . O MTT foi mantido no escuro a -20°C .

Paraformaldeído 10%

Para a preparação do PA foi aquecido 80mL de tampão fosfato 0,2M até 65°C . A seguir adicionou-se 10g de Paraformolaldeído (Sigma®). A solução, sob constante agitação, foi clareada pela adição de hidróxido de sódio 2M. Após o resfriamento, completou com tampão fosfato 0,2M até 100mL obtendo-se uma solução de PA a 10%.

MitoTracker Orange™

Foi preparada uma solução estoque a 1mM com a dissolução do MitoTracker Orange™ CMTMRos em dimetil sulfóxido (DMSO). A partir desta solução estoque, foi preparada uma solução na concentração de 150nM, diluindo-se a solução estoque em meio de cultura HAM-F12.

DioC6(3)

O DioC6(3), (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide), foi preparado a partir de uma solução estoque à 100mg.mL^{-1} para uma concentração final de 1mg.mL^{-1} , que foi a utilizada no experimento.

DAPI

Para o preparo deste marcador molecular na concentração de $0,03\mu\text{M}$, foram diluídos $0,06\mu\text{L}$ de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) em $200\mu\text{L}$ de PBS. A solução foi devidamente armazenada ao abrigo da luz.

n-propil-galato

O n-propil-galato foi preparado numa concentração a 0,02M. Foram dissolvidos 4,24 g de n-propil-galato em 10mL de PBS aquecido a 37°C . Após a dissolução foram adicionados 90 ml de glicerina.