

MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL EM CÉLULAS MADIN-DARBY BOVINE KIDNEY EXPOSTAS À MELITINA

ALESSANDRA GOULART TEIXEIRA¹; TONY PICOLI²; ANTÔNIO SÉRGIO VARELA
JÚNIOR²; RENATA NOBRE DA FONSECA²; RAUL HENRIQUE DA SILVA²;
GEFERSON FISCHER³

¹Universidade Federal de Pelotas – alegt5@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – picolivet@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – geferson.fischer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Dentre a complexa mistura de substâncias bioativas do veneno de abelhas, a melitina, composta por 26 aminoácidos, é o principal peptídeo bioativo e compreende 50% do peso seco do veneno (HABERMANN, 1972). Estudos *in vitro* demonstram que melitina possui toxicidade às células animais modificando diversos parâmetros de fisiologia destas, mas também apresenta propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (GLÄTTLI et al., 2006).

O cultivo de células *in vitro* é um modelo biológico simples que auxilia na obtenção de resultados rápidos e confiáveis. Além disso, é indispensável o uso de modelos *in vitro* para que modelos *in vivo* possam ser utilizados em menor quantidade para comprovação dos resultados, seguindo os princípios éticos de experimentação animal, contribuindo ao bem-estar dos animais (MIGITA, 2012).

As funções essenciais que a mitocôndria desempenha em células eucarióticas, através da participação na produção de energia (ATP), na produção de mensageiros pró - apoptóticos, além de sua contribuição genética a partir do DNA mitocondrial, levaram a utilização cada vez mais frequente desta organela para determinação da viabilidade e da saúde celular (PEREIRA et al., 2012).

O ensaio de redução do MTT (3- (4,5 dimetiltiazol-2yl)-2-5-difenil-2H tetrazolato de bromo) é um método amplamente difundido por ser de fácil execução e baixo custo. Porém, técnicas mais avançadas têm se feito cada vez mais presentes na rotina dos laboratórios por determinarem maior confiabilidade dos resultados. Sendo assim, este trabalho objetivou avaliar a atividade mitocondrial de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney) quando expostas à melitina, através de técnicas tradicionais como o ensaio de redução do MTT e técnicas de alta tecnologia como citometria de fluxo e microscopia confocal.

2. METODOLOGIA

Melitina foi obtida comercialmente (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO), ressuspendida em PBS estéril e armazenada a -20°C até o momento do uso.

Células MDBK foram cultivadas em placas de 96 cavidades de fundo chato com Meio Essencial Mínimo com sais de Eagle suplementado com antibióticos e 10% de soro fetal bovino. Após 24 horas de incubação em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, a monocamada celular apresentou confluência acima de 80%. Após, o meio foi cuidadosamente aspirado e melitina (diluída em E-MEM) foi transferida aos poços (100 µL/poço) nas diferentes concentrações (1 a 10 µg/mL) e as placas permaneceram em incubação durante 72 horas sob as condições supracitadas. Células mantidas em E-MEM, sem exposição à melitina, foram utilizadas como

controle. Após, as células foram submetidas ao ensaio de redução do MTT, segundo MOSMANN (1983). Os testes foram realizados com seis repetições.

As análises por citometria de fluxo foram realizadas no equipamento Attune Acoustic Focusing Cytometer® (Applied Biosystems) e os resultados foram analisados utilizando o programa Attune Cytometric Software v 2.1. A sonda fluorescente Hoechst 33342 (2 mM) foi utilizada para separação das populações celulares e foi detectada pelo fotomultiplicador VL1 (filtro 450/40). Vinte mil células foram analisadas por amostra com fluxo de 50 µL por segundo.

Para análise do potencial elétrico das membranas mitocondriais (PMM), células MDBK previamente cultivadas em placas de 96 cavidades foram expostas a 4 concentrações de melitina determinadas em etapa anterior (1,0 a 2,5 µg/mL) durante 72 horas, quando o corante fluorescente rodamina 123 (Rho123) (100nM) foi adicionado por uma hora. As células foram removidas das placas com auxílio da enzima tripsina e transferidas a microtubos para leitura. A fluorescência de Rho123 foi lida através do fotomultiplicador BL1 (filtro 530/30). Os dados expressos referem-se às porcentagens de células com baixo PMM.

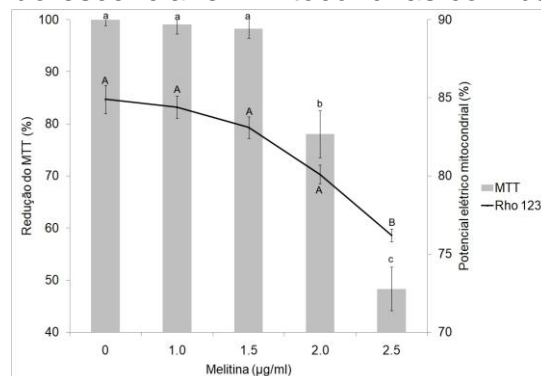
Para análise do PMM em microscopia confocal, células MDBK foram cultivadas sobre lamínula de vidro com espessura 0,13 mm em placas com 24 cavidades. Após estabelecimento da monocamada, as células foram expostas às mesmas 4 concentrações de melitina por 72 horas. Rho123 foi então adicionado aos poços por uma hora. Os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e as lamínulas retiradas dos poços da placa com auxílio de uma pinça e foram colocadas em lâmina para análise em microscopia confocal. Hoechst 33342 foi adicionado com o objetivo já citado. O equipamento utilizado foi o Microscópio Confocal Espectral Invertido de Varredura a Laser, Leica, TCS SP8. As fluorescências demonstradas nas microfotografias indicam células com baixo PMM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de redução do MTT é um teste amplamente utilizado com objetivo de determinar a viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (MOSMANN, 1983). Através do ensaio de redução do MTT, constatou-se que a concentração citotóxica para 50% dos cultivos celulares foi de 2,32 µg/ml de melitina para as células MDBK. Concentrações de melitina iguais ou menores de 1,5 µg/mL apresentaram atividade mitocondrial que não diferiram do controle de células ($p > 0,05$). As concentrações de melitina selecionadas para realização das análises em citometria de fluxo e microscopia confocal foram baseadas nessa etapa. Já a molécula da sonda fluorescente rodamina 123 é um cátion que se difunde pelo citoplasma celular e se concentra nas membranas mitocondriais ativas, quando elétrons são doados para a cadeia respiratória. Rho123, por sua vez, é reduzida ao receber um elétron (GILLAN et al., 2005). A Figura 1 demonstra os resultados comparativos da atividade da cadeia respiratória mitocondrial avaliada pela redução do MTT e do potencial elétrico de membrana mitocondrial avaliado por citometria de fluxo.

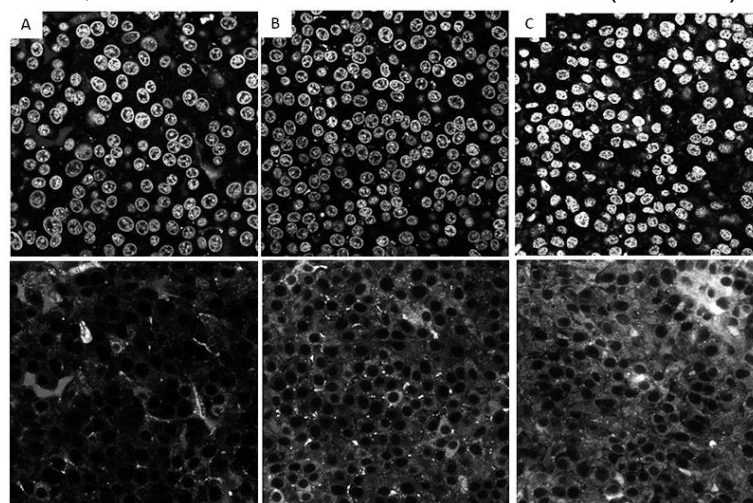
Ambos os testes apresentam resultados semelhantes e, embora a redução do MTT tenha demonstrado diferença estatística ($p < 0,05$) do controle na concentração 2 µg/ml e a fluorescência de Rho123 tenha demonstrado diferença do controle ($p < 0,05$) apenas na maior concentração, nota-se que há queda da função

mitocondrial nas duas avaliações a partir de 2 µg/ml. Os dados ainda podem ser confirmados através da avaliação do potencial de membrana mitocondrial pela microscopia confocal, utilizando o mesmo corante. Visualmente, observa-se maior potencial elétrico nas mitocôndrias do grupo controle e, conforme as células são expostas à melitina, diminui tal potencial. Esses dados são observados na Figura 2, que demonstra maior fluorescência em mitocôndrias com baixo potencial elétrico.



Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste LSD entre os grupos avaliados pela redução do MTT ($p < 0,05$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística pelo teste LSD entre os grupos avaliados por citometria de fluxo ($p < 0,05$).

Figura 1. Atividade mitocondrial de células MDBK expostas à melitina avaliada através da redução do MTT e potencial elétrico mitocondrial através de citometria de fluxo, utilizando fluoróforo Rodamina 123 (Rho123).



Coluna A- ausência de melitina, coluna B- melitina 1,5 µg/ml e coluna C- melitina 2,5 µg/ml. Linha superior, núcleos corados com Hoechst 33342, demonstrando viabilidade celular. Linha inferior, membranas mitocondriais coradas com baixo potencial elétrico coradas com rodamina 123.

Figura 2. Potencial elétrico de membrana mitocondrial de células MDBK expostas à melitina, microfotografias obtidas através de microscopia confocal.

A atividade mitocondrial pode ser erroneamente confundida como viabilidade celular em casos que a redução do MTT apresenta-se com percentual elevado e, no entanto, a mitocôndria trabalha gerando energia para a defesa celular frente a injúrias causadas em outras estruturas celulares. TEIXEIRA et al. (2016), descrevem alta atividade mitocondrial pelo teste MTT de células tratadas com apamina, porém, através de citometria de fluxo, as mesmas células encontravam-se em processos de apoptose induzida e até necrose. A função mitocondrial durante o processo de apoptose é controlada por proteínas da família Bcl-2. Uma delas, a proteína pró-apoptótica Bax pode inserir-se na membrana externa das mitocôndrias causando

permeabilização e liberando fatores apoptóticos como o citocromo c (HSU et al., 1997). Citocromo c, por sua vez, ativa a enzima caspase-3 que induz a fragmentação do DNA e outras alterações morfológicas correspondentes à morte celular apoptótica (JANICKE et al., 1998).

Houve forte correlação positiva entre o ensaio de redução do MTT e a avaliação do potencial elétrico da membrana mitocondrial ($r^2=0,92$, $p<0,01$), o que era esperado, uma vez que ambos os ensaios têm seus resultados baseados na atividade mitocondrial. Entretanto, reforçamos a importância de utilizar técnicas de alta tecnologia aliadas às convencionais, já que apresentam dados mais precisos e confiáveis.

4. CONCLUSÕES

Após análise dos resultados conclui-se que há forte correlação entre as técnicas que avaliam a atividade mitocondrial. Porém, encoraja-se a utilização de técnicas tradicionais aliadas à técnicas de última geração para maior confiabilidade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.

GLÄTTLI, A.; CHANDRASEKHAR, I.; VAN GUNSTEREN, W.F. A molecular dynamics study of the bee venom melittin in aqueous solution, in methanol, and inserted in a phospholipid bilayer. **European Biophysics Journal**, v.35, n.3, p.255-267, 2006.

HABERMAN, E. Bee and Wasp Venoms. **Science**, v.177, p.314-322, 1972.

HSU, Y.T.; WOLTER, K.G.; YOULE, R.J. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-x(L) during apoptosis. **Proceedings of the Nacional Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.3668-3672, 1997.

JANICKE, R.U.; SPRENGART, M.L.; WATI, M.R.; PORTER, A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.9357-9360, 1998.

MIGITA, N.A. **Cultivo celular *in vitro*: importância para a pesquisa biomédica e dimensão da problemática de autenticação de linhagens celulares**. Monografia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

PEREIRA, L.C.; PAZIN, M.; DORTA, D.J. Mitocôndria como Alvo para Avaliação de Toxicidade de Xenobiótico. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.25, p.1-14, 2012.

TEIXEIRA, A.G.; PICOLI, T.; FISCHER, G. Citotoxicidade da apamina sobre macrófagos da linhagem J774. In: **XXV CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UFPEL**, Pelotas, **Anais...**, 2016.