

# Efeito do cortisol em células leucêmicas K562

Marcelo de Oliveira Fonseca\*  
Newton Soares da Silva\*  
Cristina Pacheco Soares\*

862



O Mundo da Saúde, São Paulo - 2019;43(4): 854-869  
Efeito do cortisol em células leucêmicas K562 ...

## Resumo

Numerosos estudos descrevem efeitos causados pelo estresse no desenvolvimento, progressão e mau prognóstico de diversas patologias, como o câncer. Nas últimas décadas, pesquisadores tem investigado o papel dos hormônios associados ao estresse e à progressão do câncer. O cortisol é descrito como um hormônio do estresse primário do corpo humano. Estudos mostram uma correlação positiva dos níveis elevados de cortisol e a progressão do câncer. O aumento da proliferação celular e o aumento das espécies reativas de oxigênio que contribuem para o dano ao DNA, displasia e neoplasia são resultados de estresse prolongado onde o tecido torna-se insensível ao cortisol, o hormônio do estresse primário humano. Este estudo explora a influência do cortisol, um importante hormônio envolvido no estresse no desenvolvimento de células tumorais, particularmente em células humanas de leucemia mielóide crônica (K562). Células K562 foram expostas a concentrações crescentes de cortisol (hidrocortisona), por 24 ou 48 horas e a citotoxicidade (ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazol]) e os processos de morte celular (microscopia de fluorescência) foram investigados. Nossos dados mostram um papel considerável do cortisol não apenas na atividade mitocondrial, mas também nos processos de proliferação e morte apoptótica e necrótica nas células K562. Estes resultados demonstram a possível influência do estresse no desenvolvimento do tumor e demonstra que as células K562 podem ser adaptadas aos níveis de cortisol de acordo com o tempo.

**Palavras-chave:** Estresse. Hormônio. Cultura Celular. Câncer. Apoptose

## INTRODUÇÃO

Níveis fisiológicos de cortisol na circulação sanguínea, prejudicam a quimioterapia de câncer de próstata, pulmão, bexiga, renal, ovário e de mama triplo negativo (TNBC)<sup>1</sup>. Estudos clínicos tentam estabelecer a interação entre o diagnóstico de câncer e tratamento indicando que a supressão de emoções negativas como depressão, rejeição e deficiência de suporte social estão associadas à menor sobrevida<sup>2,3,4</sup>. Dados clínicos também

mostraram que o estresse induzido modula a progressão do câncer<sup>5</sup>. Além disso, os produtos neuro-hormonais derivados do estresse crônico influenciam a progressão do câncer de pele, mama, pulmão e cólon. Vários estudos sugerem que a tumorigênese humana faz parte de um processo em várias etapas<sup>6,7,8</sup>. Esses estágios sequenciais (mutagênicos químicos e físicos, infecção por certos patógenos virais ou bacterianos, constituintes dietéticos não

DOI: 10.15343/0104-7809.20194304854869

\*Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. São Paulo/SP, Brasil.  
E-mail: cpsoares@univap.br



genotóxicos e estresse) levam a alterações genéticas que causam alteração progressiva de células humanas normais em células malignas. A conversão de células normais para um estado canceroso parece requerer alterações genéticas e epigenéticas<sup>9</sup>.

A interleucina-6 (IL-6), uma citocina que desempenha importante papel na angiogênese e progressão tumoral<sup>10</sup>, tem sua produção aumentada por mediadores relacionados ao estresse<sup>11</sup>. No entanto, estudos correlacionando a concentração de cortisol em células da linhagem K562 (leucemia mielóide crônica) são ausentes. No presente trabalho avaliou-se o efeito do cortisol nas células de leucemia mielóide, analisando a viabilidade celular e o tipo de morte induzida por esse hormônio.

No presente estudo, propomos avaliar a influência do cortisol nas células tumorais, com base na influência do estresse como elemento positivo para o desenvolvimento ou resistência de células tumorais a tratamentos antineoplásicos, particularmente em células humanas de leucemia mielóide crônica (K562).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Cultura celular e tratamento com hidrocortisona

Células K562 (leucemia mielóide crônica - ATCC - CCL 243) obtidas do banco de células da Associação Técnica Científica Paul Ehrlich - Rio de Janeiro, RJ) foram cultivadas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) e 1 % antibiótico e antimicótico (Life Technologies), a 37 numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

As células em suspensão foram plaqueadas em 5x10<sup>4</sup> células/mL por poço em placas de 96 poços com DMEM suplementado com 10% de FBS. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para adesão das

células. Depois disto, as células foram tratadas com diferentes concentrações (0 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1,0 µM, 2,5 µM, 5,0 µM, 10 µM, 15 µM e 20 µM) de cortisol (hidrocortisona Sigma-Aldrich) durante 24 ou 48 h. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### Ensaio MTT

Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial analisando os cristais de formazana formados pela redução do sal de brometo de 3- (4,5- dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazio (MTT – Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). A redução do MTT ocorre principalmente nas mitocôndrias por meio de ações de desidrogenases mitocondriais presentes apenas em células metabolicamente ativas (células vivas), proporcionando medida de função mitocondrial<sup>12</sup>. Após exposição a hidrocortisona, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 0,5 mg / mL MTT (brometo de 3- (4,5- dimetiltiazolil-2) -2,5-difeniltetrazio) durante 1 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Ao precipitado de formazana adicionou-se 50 µl de DMSO (dimetil sulfóxido - Sigma) a cada poço e a placa foi mantida sob agitação durante 30 minutos para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da absorbância foi realizada no leitor de ELISA Spectra Count-Packard, comprimento de onda de 570 nm.

### Marcação com iodeto de Hoechst-Propidium para células apoptóticas

Hoechst 33342, trihidroclorido, triidratado (Thermo Fisher Scientific) corante de ácido nucleico, é um marcador permeável que emite fluorescência azul quando ligado a dupla fita de DNA. Este corante é frequentemente utilizado para distinguir núcleos picnóticos em células apoptóticas<sup>13</sup>. Após exposição a hidrocortisona, as células foram lavadas com PBS e incubadas com 1 µl de Hoechst 33342 e 1 µl de iodeto de propídio por 1 ml de suspensão de células e incubadas em gelo durante 20-30 min. Após incubação, as células marcadas foram analisadas por



microscopia de fluorescência (Leica DMIL) utilizando excitação dupla de filtro UV / 488 nm e a emissão de fluorescência foi medida a ~ 460 nm e > 575 nm. A população de células foi dividida em três grupos: células vivas (marcadas em azul), células em apoptose precoce (núcleo fragmentado marcado em azul), apoptose tardia (núcleo fragmentado, caracterizado em células cor-de-rosa e necróticas marcadas com núcleo vermelho inteiro).

## RESULTADOS

A atividade mitocondrial foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolol), que permite analisar a viabilidade celular por meio da atividade mitocondrial. De acordo com os resultados de MTT, a viabilidade das células K562, incubadas com concentrações crescentes de cortisol foi avaliada 24 e 48 horas após interação com o hormônio, apresentou redução significativa ( $p=0.01$ ) na atividade mitocondrial no período de 24 horas (Figura 1A). As concentrações de 0,5 a 20  $\mu\text{M}$  de cortisol, demonstram redução da atividade mitocondrial de aproximadamente 30 a 45%, respectivamente, quando comparada ao grupo controle. No entanto, no período de incubação de 48 h com cortisol, é possível observar uma recuperação altamente significativa ( $p<0,001$ ) da atividade metabólica das células, quando comparada ao grupo controle (Figura 1B). A atividade mitocondrial parece responder de forma adaptativa ao hormônio e seus efeitos, aumentando em 50% a atividade mitocondrial, nas dosagens de 0,25  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ . No período de 48 horas quando comparado ao grupo controle, as dosagens 10 e 15  $\mu\text{M}$  não apresentaram alteração significativa ( $p = 0,001$ ), a concentração de 20  $\mu\text{M}$  apresentou 21% de redução na

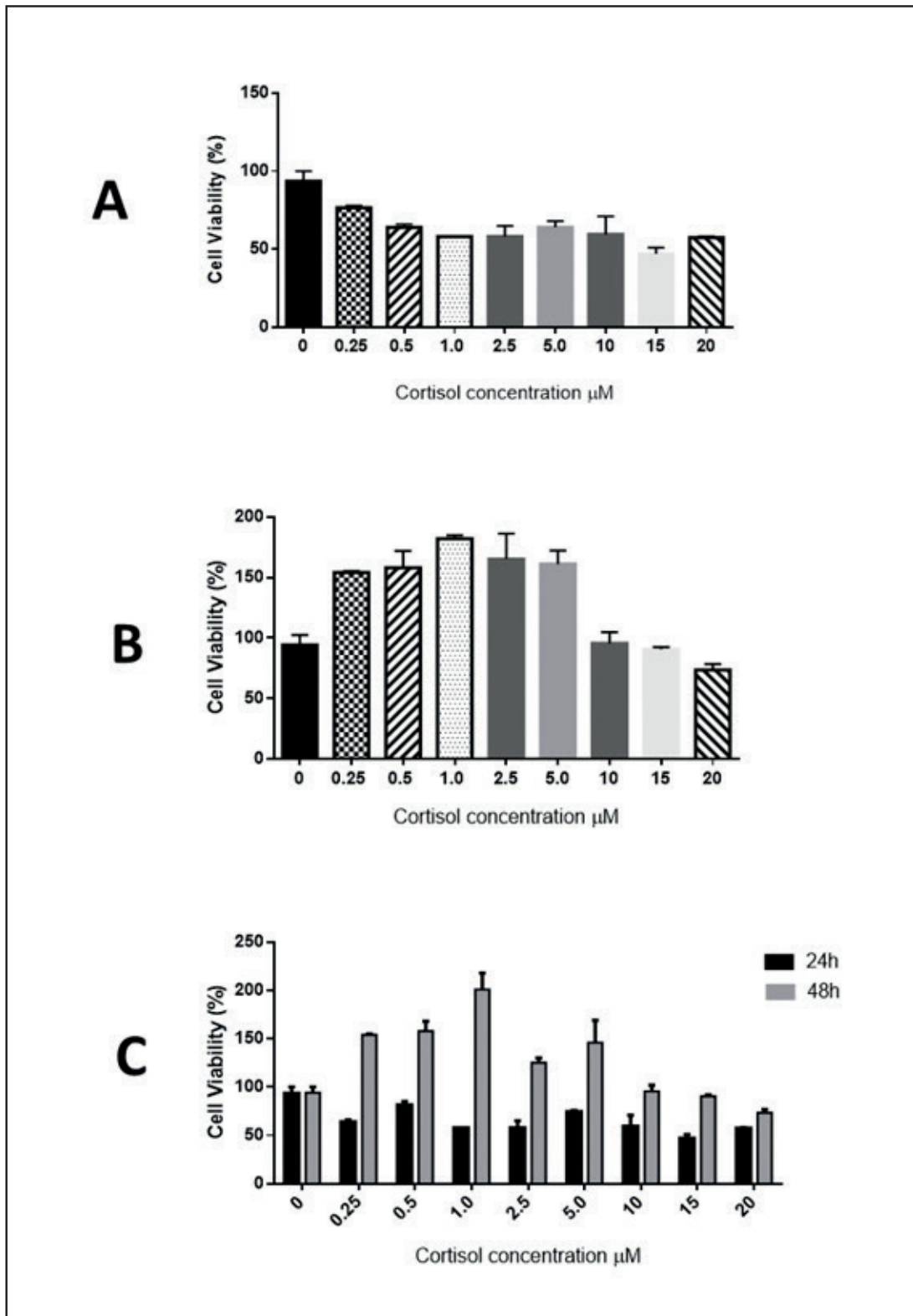
## Análise estatística

Os cálculos estatísticos foram realizados usando o software de análise de dados estatísticos GraphPad Prism® versão 6.0. Os dados foram comparados pela análise de variância seguida pelo teste de Tukey, definindo o nível de significância de 5% ( $p\leq 0,05$ ). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

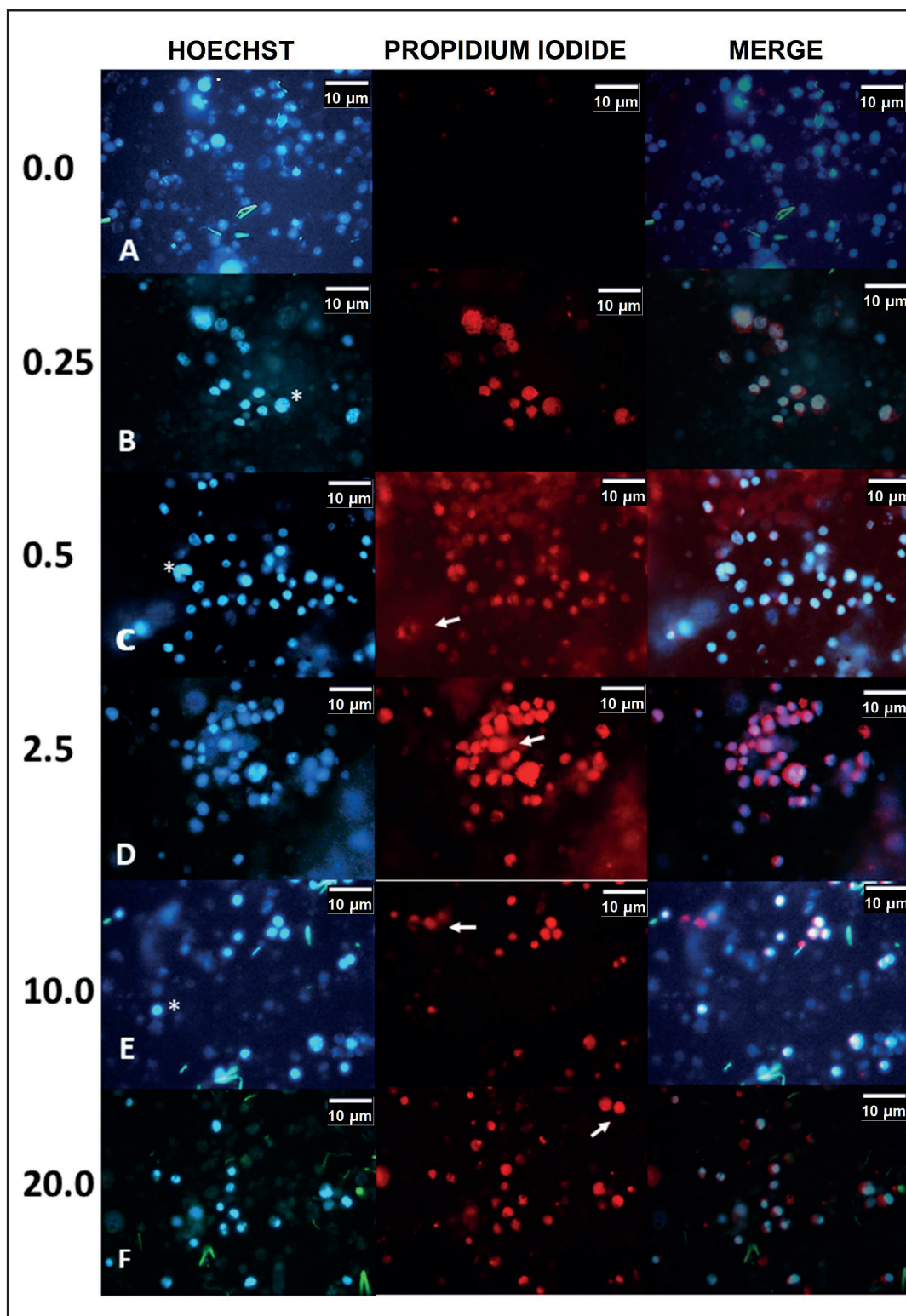
atividade mitocondrial quando comparado ao grupo controle (Figura 1C).

Quando os períodos de incubação são comparados, observa-se atividade mitocondrial significativa em 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 e 5  $\mu\text{M}$  48 horas grupos quando comparados grupos de 24 horas.

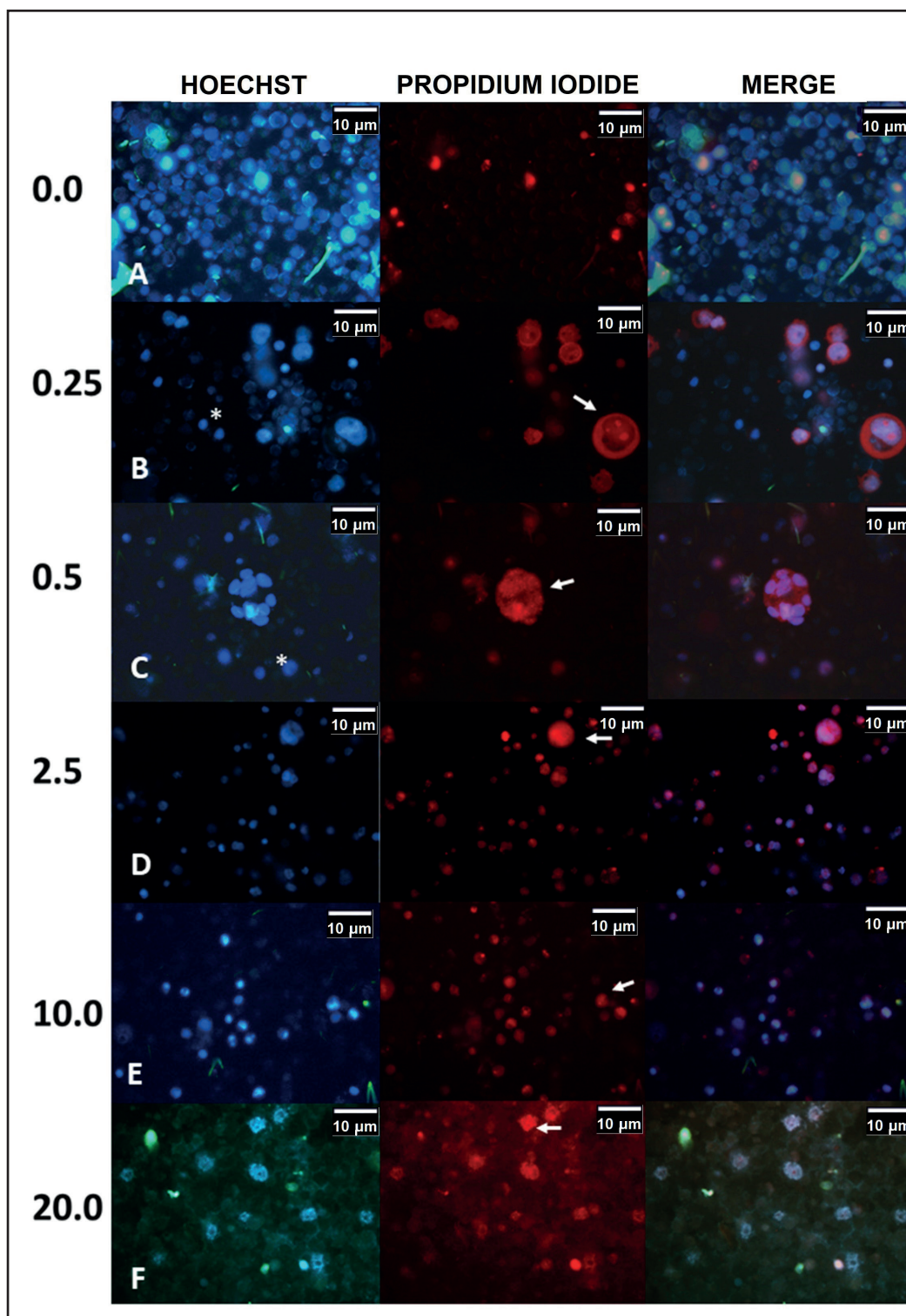
O crescimento tumoral apresenta equilíbrio entre proliferação e morte celular envolvendo mecanismos apoptóticos. Para determinar o tipo de morte induzida pelo cortisol, nas células incubadas com concentrações crescentes de hormônio nos períodos de 24 e 48 horas, as células foram marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propício. Quando comparada a concentração de 0.25  $\mu\text{M}$  (figura 2b) com o grupo de controle no período de 24 horas (figura 2a), os resultados mostram que esta concentração não acarreta danos ao núcleo da célula; no entanto, na mesma concentração após 48 horas (figura 3b) foi detectado início de apoptose nas células. Na concentração de 0.5  $\mu\text{M}$ , as células K562 exibiram morte por apoptose precoce e tardia em ambos os períodos de incubação (figura 2c-3c). Para a concentração de 2.5  $\mu\text{M}$  e superior, a apoptose precoce e tardia foram observadas para 24 e 48 h (figura 2d-3d).



**Figura 1**– Atividade metabólica no K562 após incubação com cortisol. A atividade metabólica foi avaliada após 24 (A) e 48 horas (B) da incubação com a concentração crescente da atividade metabólica do cortisol (A) para o ensaio MTT em células K562. A atividade metabólica comparativa das células após 24 e 48 horas de incubação com concentração crescente de cortisol (C).



**Figura 2-** Coloração com Hoechst e iodeto de propideo de células K562. Células K562 foram tratadas por 24h com concentração crescente de cortisol. Os núcleos marcados com Hoechst são azuis. O iodeto de propideo marca as células necróticas vermelhas. As células não tratadas demonstraram núcleos normais com coloração com Hoechst e sem indução de necrose com coloração com iodeto de propideo. Nas células apoptóticas, os núcleos são geralmente fragmentados e corados mais intensamente por causa da condensação do DNA. (\*). As células em necrose são coradas de vermelho (seta).



**Figura 3-** Coloração com Hoechst e iodeto de propideo de células K562. Células K562 foram tratadas por 48h com concentração crescente de cortisol. Os núcleos marcados com Hoechst são azuis. O iodeto de propideo marca as células necróticas vermelhas. As células não tratadas demonstraram núcleos normais com coloração com Hoechst e sem indução de necrose com coloração com iodeto de propideo. Nas células apoptóticas, os núcleos são geralmente fragmentados e corados mais intensamente por causa da condensação do DNA. (\*) As células em necrose são coradas de vermelho (seta).



## DISCUSSÃO

A ação do cortisol em células K562 foi avaliada pelo teste de MTT, para viabilidade celular e marcação com Hoechst 33342 e iodeto de propídio, para morte celular. Os resultados obtidos indicam que as células K562 incubadas com cortisol por 24 horas, apresentaram redução da atividade mitocondrial, indicando o efeito citotóxico nas células tumorais. No entanto muitas células sobreviveram a ação do cortisol e apresentaram aumento da atividade mitocondrial como observado no período de 48 horas de incubação. A marcação das células para avaliação de morte celular indica morte celular por apoptose intrínseca mediada pela atividade mitocondrial<sup>9</sup>, sugerindo que, entre outras causas, a morte celular por apoptose via mitocôndria pode ser iniciada pelo aumento das concentrações de corticosteroides no interior das células.

As células K562 foram significativamente resistentes a baixas doses de cortisol, enquanto concentrações superiores a 5  $\mu\text{M}$  foram consideradas citotóxicas, corroborando com os resultados obtidos em células-tronco neurais<sup>10</sup>. A população de células permaneceu praticamente inalterada apesar de um aumento de 20 vezes na concentração de cortisol. O cortisol é um imunomodulador que reduz a capacidade do sistema imunológico de detectar e responder às células tumorais<sup>11,14</sup>, atua nos mecanismos de reparo do DNA e modula a apoptose<sup>11,15,16</sup>.

Diversos estudos descreveram a importância dos glicocorticóides na progressão das células tumorais, ativando efeitos pró-apoptóticos ou inibindo a ação protetora de eventos apoptóticos. Tais propriedades dependem das variações da concentração de glicocorticóides, tempo de exposição e características do tecido<sup>17,18,19</sup>. É necessário ressaltar que os estudos com linhagem celular K562 tiveram a mesma adaptabilidade característica aos agentes causadores de lesão, que a análise em questão pode relacionar à provável adaptabilidade observada nas últimas concentrações de cortisol<sup>20</sup>. Assim como descrito para as células-tronco neurais, altas concentrações de cortisol são inibitórias, resultando em perda de viabilidade celular e proliferação através do processo de apoptose e necrose<sup>10</sup>. Sabe-se que os glicocorticóides inibem a diferenciação celular e o desenvolvimento de várias regiões sinápticas do cérebro<sup>21,22</sup>. Os dados apresentados nas imagens de fluorescência e campo claro de células K562 demonstraram que após 24 e 48 h de exposição, é possível ver o aparecimento de quadros de apoptose e necrose tardios. Da mesma forma, a morte celular observada pode estar relacionada às concentrações crescentes de cortisol e seu tempo de exposição. As mortes por necrose e morte por apoptose tardia são obtidas a partir de 5  $\mu\text{M}$  e no tempo de 48 horas.

## CONCLUSÃO

Este estudo demonstra que as células K562 podem adaptar-se aos níveis de cortisol de acordo com o tempo e de acordo com a concentração

e este fato desempenha um papel importante na ação de tratamentos para combater a ação do estresse no desenvolvimento do tumor.

---

**FINANCIAMENTO:** Este estudo foi financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo processo número 2009 / 15206-8 da - 2016 / 17984-1) e pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e CNPq (Bolsa produtividade em pesquisa processo nº 305920/2017-0)

## REFERÊNCIAS

1. Stringer-Reasor EM, Baker GM, Skor MN, et al. Glucocorticoid receptor activation inhibits chemotherapy-induced cell death in high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2015;138(3):656–662.
2. Reiche, E.M., Nunes, S.O., Morimoto, H.K. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncology* 2004; 5: 617-625.



3. Antoni, M.H., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W., Dhabhar, F.S., Sephton, S.E., Green, P., Stefanek, M., M., Sood, A.K. The influence of bio-behavioural factors on tumor biology: pathways and mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 2006; 6: 240-248.
4. Moreno-Smith, M., Lutgendorf, S.K., Sood, A.K. Impact of stress on cancer metastasis. *Future Oncol.* 2010; 6: 1863–1881.
5. Thaker, P.H., Han, L.Y., Kamat, A.A., Arevalo, J.M., Takahashi, R., et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. *Nature Medicine* 2006; 2: 939 – 944.
6. Armaiz-Pena, G.N., Lutgendorf, S.K., Cole, S.W., Sood, A.K. Neuroendocrine modulation of cancer progression. *Brain, Behavior, and Immunity* 2009; 23: 10–15.
7. Heikkilä, K., Ebrahim, S., Lawlor, D.A. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer* 2008; 44(7):937-945.
8. Bernabé, D.G., Tamae, A.C., Biasoli, E.R., Oliveira, S.H.P. Stress hormones increase cell proliferation and regulates interleukin-6 secretion in human oral squamous cell carcinoma cells. *Brain, Behavior, and Immunity* 2011; 25: 574-583.
9. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35(4): 495–516.
10. Abdanipour, A., Sagha, M., Noori-Zadeh, A., Pakzad, I., Tiraihi, T. In vitro study of the long-term cortisol treatment effects on the growth rate and proliferation of the neural stem/precursor cells. *Neurological Research* 2014; 37 (2), 117-124.
11. Duijts SF, Zeegers MP, Borne BV. The association between stressful life events and breast cancer risk: a meta-analysis. *Int J Cancer.* 2003;107(6):1023–9
12. Slater TF, Sawyer B, Strauli U . Studies on succina tetrazolium reductase system. III. Points of coupling of four different tetrazolium salts. *Biochim Biophys Acta* .1963; 77:383–93.
13. Can-Fang Wu, Nanette H. Bishopric, and Richard E. Pratt. Atrial Natriuretic Peptide Induces Apoptosis in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *The Journal of Biological Chemistry.* 1997; 272(23): 14860–14866.
14. Pufall MA. Glucocorticoids and cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2015; 872:315–33
15. Wu W, Pew T, Zou M, Pang D, Conzen SD. Glucocorticoid receptor-induced MAPK phosphatase-1 (MPK-1) expression inhibits paclitaxel-associated MAPK activation and contributes to breast cancer cell survival. *J Biol Chem.* 2005;280(6):4117–24
16. Moran TJ, Gray S, Mikosz CA, Conzen SD. The glucocorticoid receptor mediates a survival signal in human mammary epithelial cells. *Cancer Res.* 2000;60(4):867–72
17. Herr, I., Ucur, E., Herzer, K., Okouyo, S., Ridder, R., Krammer, P.H., von Knebel Doeberitz, M., Debatin, K.M. Glucocorticoid induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas. *Cancer Research* 2003; 63: 3112-3120.
18. Herr, I., Pfitzenmaier, J. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumours: implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases. *Lancet Oncology* 2006; 7:425-430.
19. Zhang, C., Beckermann, B., Kallifatidis, G., Liu, Z., et al. Corticosteroids induce chemotherapy resistance in the majority of tumour cells from bone, brain, breast, cervix, melanoma and neuroblastoma. *International Journal of Oncology* 2006; 29:1295-1301.
20. Cañedo, A.D., Santos, D.G., Chies, J.A.B., Kvitko, K., Nardi, N.B. Optimization of an electroporation protocol using the K562 cell line as a model: role of cell cycle phase and cytoplasmic DNAses. *Cytotechnology (Dordrecht)* 2006; v. 51, p. 141-148,
21. Numakawa, T., Adachi, N., Richards, M., Chiba, S., Kunugi H. 2013. Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: Reciprocal influence on the central nervous system. *Neuroscience* 2013; 239, Page 157.
22. Jauregui-Huerta, F., Ruvalcaba-Delgado, Y., Gonzalez-Castañeda, R., Garcia-Estrada, J., Gonzalez-Perez, O., Luquin, S. Responses of Glial Cells to Stress and Glucocorticoids. *Current Immunology Reviews* 2010; 6 (3): 195–204.