

Padronização do uso da técnica de citometria de fluxo para avaliação de morte celular em cultura organotípica de hipocampo de ratos

**Bruna de Melo Menezes
 Christianne Gazzana Salbego**

Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Departamento de Bioquímica

INTRODUÇÃO

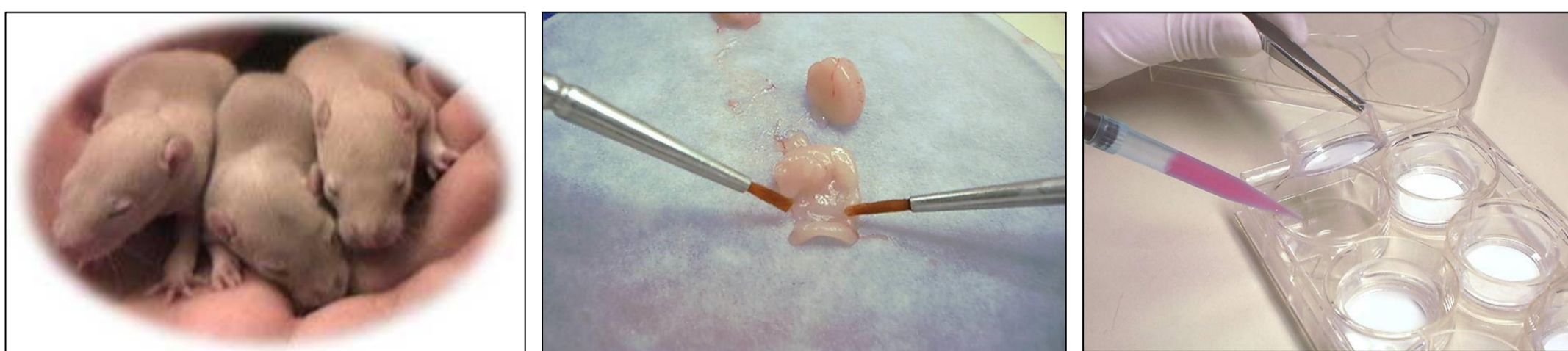
A morte celular pode se manifestar de várias formas e por isso, pode ser classificada através de diferentes critérios, por exemplo: critérios histológicos, enzimáticos, aspecto funcional ou características imunológicas. Utilizando o critério histológico, temos a apoptose e a necrose. A expressão apoptose é utilizada para descrever o arredondamento celular, retração de pseudópodes, redução do volume celular (picnose), condensação da cromatina, fragmentação do núcleo (cariorréxis), pouca ou nenhuma modificação estrutural das organelas citoplasmáticas e vesiculação da membrana plasmática. A necrose é caracterizada por aumento do volume celular, inchaço das organelas, ruptura da membrana plasmática e consequente perda do conteúdo intracelular.

A cultura organotípica trata-se de um método que mantém fatias de um determinado tecido em cultivo, sobre uma interface entre o ar e o meio de cultivo. Uma de suas principais características é manter a organização e a arquitetura do tecido como se dá *in vivo*, permitindo uma manipulação mais flexível do que em um método *in vivo* e uma redução significativa no número de animais utilizados.

A citometria de fluxo é uma das técnicas mais utilizadas para a avaliação de morte celular. Dessa forma, a padronização da morte celular em cultura organotípica de hipocampo de ratos através desta técnica é o objeto de estudo desse trabalho. Para isso, foram utilizados os indutores glutamato e estaurosporina como marcadores positivos de morte necrótica e apoptótica, respectivamente.

METODOLOGIA

Cultura organotípica de hipocampo de ratos Wistar machos (6-8 dias) durante 14 dias



Tratamento das fatias com Glutamato (5mM) e Estaurosporina (1µM) por 24 horas

Dissociação das fatias em tampão PBS contendo 1% de collagenase e 1% de DNase seguido de filtração

Análise da Morte Celular por Citometria de Fluxo com Anexina V e Iodeto de Propídio (FACS Calibur, BD Bioscience)

Quantificação através do software FCS EXPRESS 4 FLOW

As células foram classificadas em: células viáveis (Anexina V -/PI -), células em apoptose inicial (Anexina V +/PI -), células em apoptose tardia (Anexina V +/PI +), células em necrose (Anexina -/PI +)

RESULTADOS

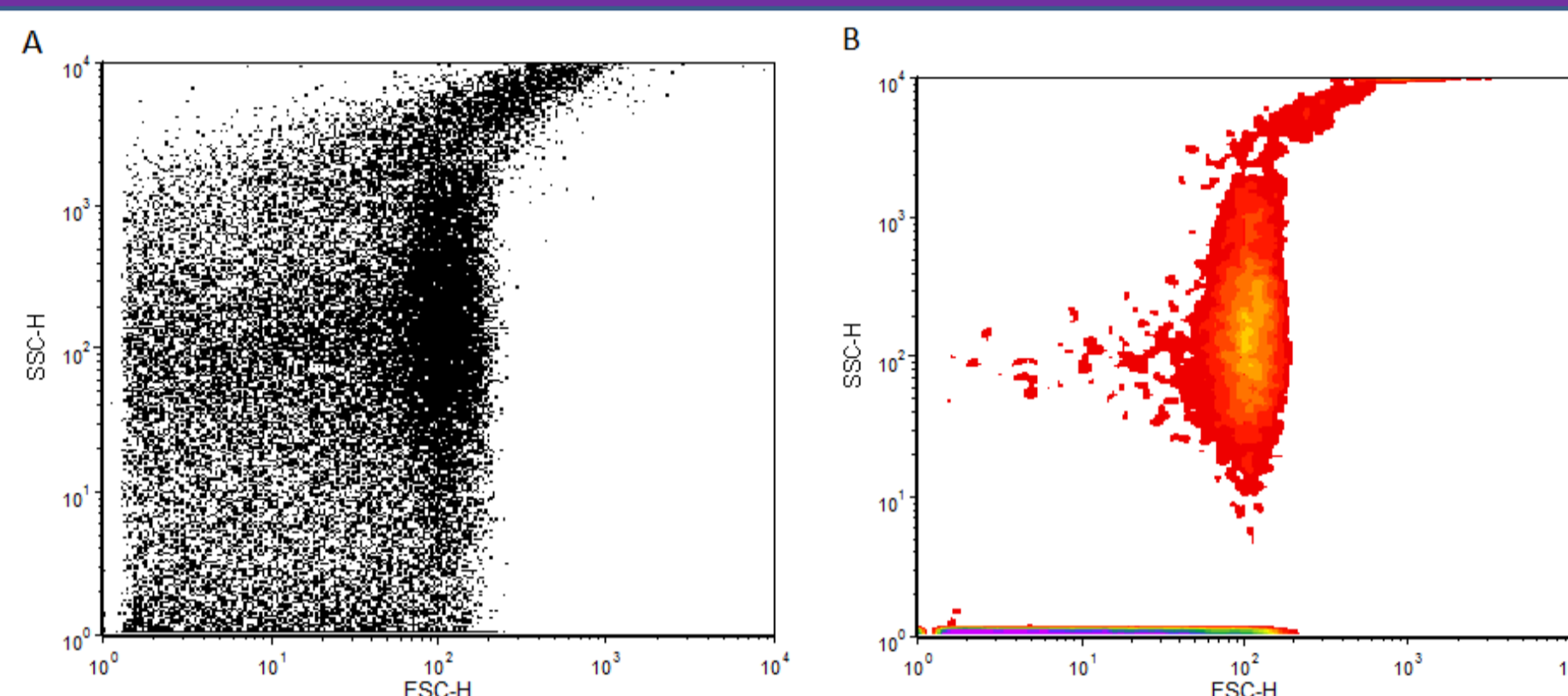


Fig. 1: Caracterização populacional de culturas organotípicas de hipocampo de ratos por citometria de fluxo. (A) Dot Plot de tamanho (FSC-H) x granulicidade (SSC-H). (B) Gráfico de densidade populacional.

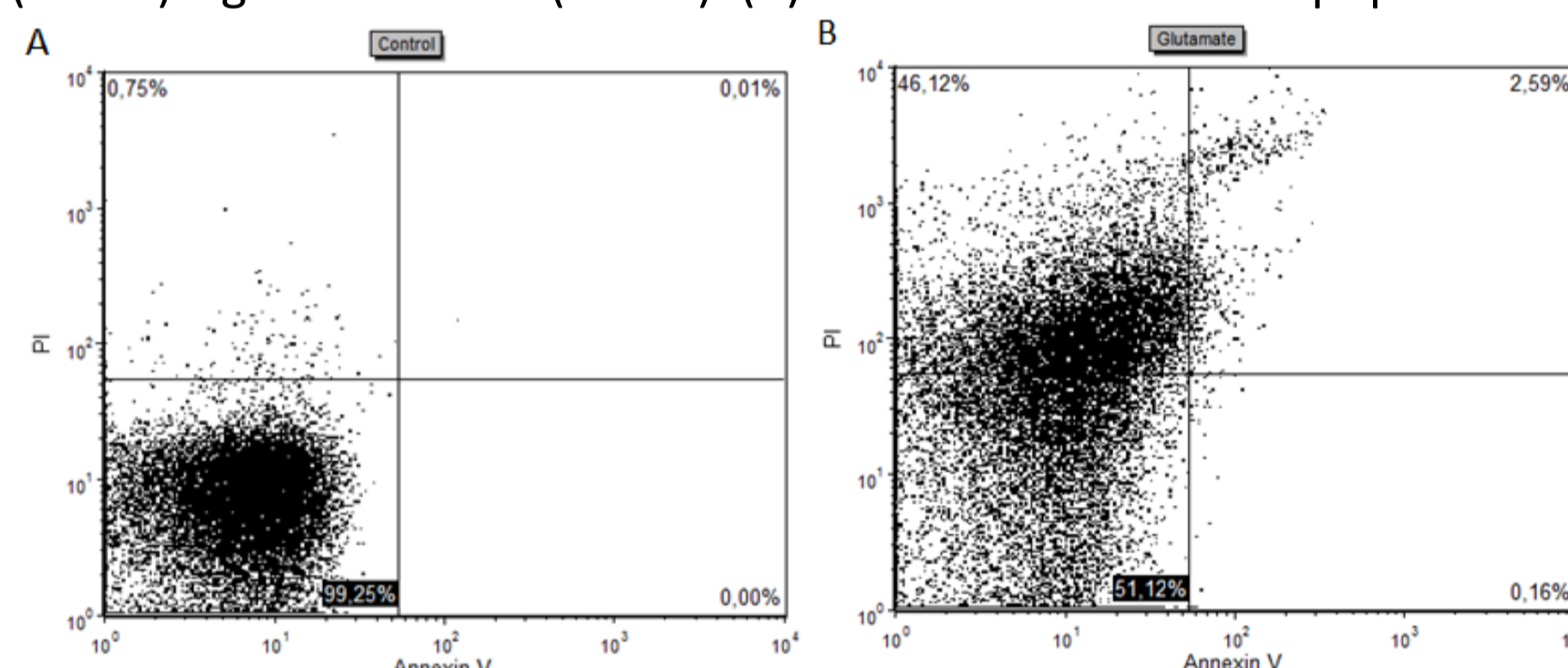


Fig. 2: Caracterização da morte celular por Anexina V/PI induzida por glutamato (5mM/24 h) em cultura organotípica de hipocampo de ratos (n=6).

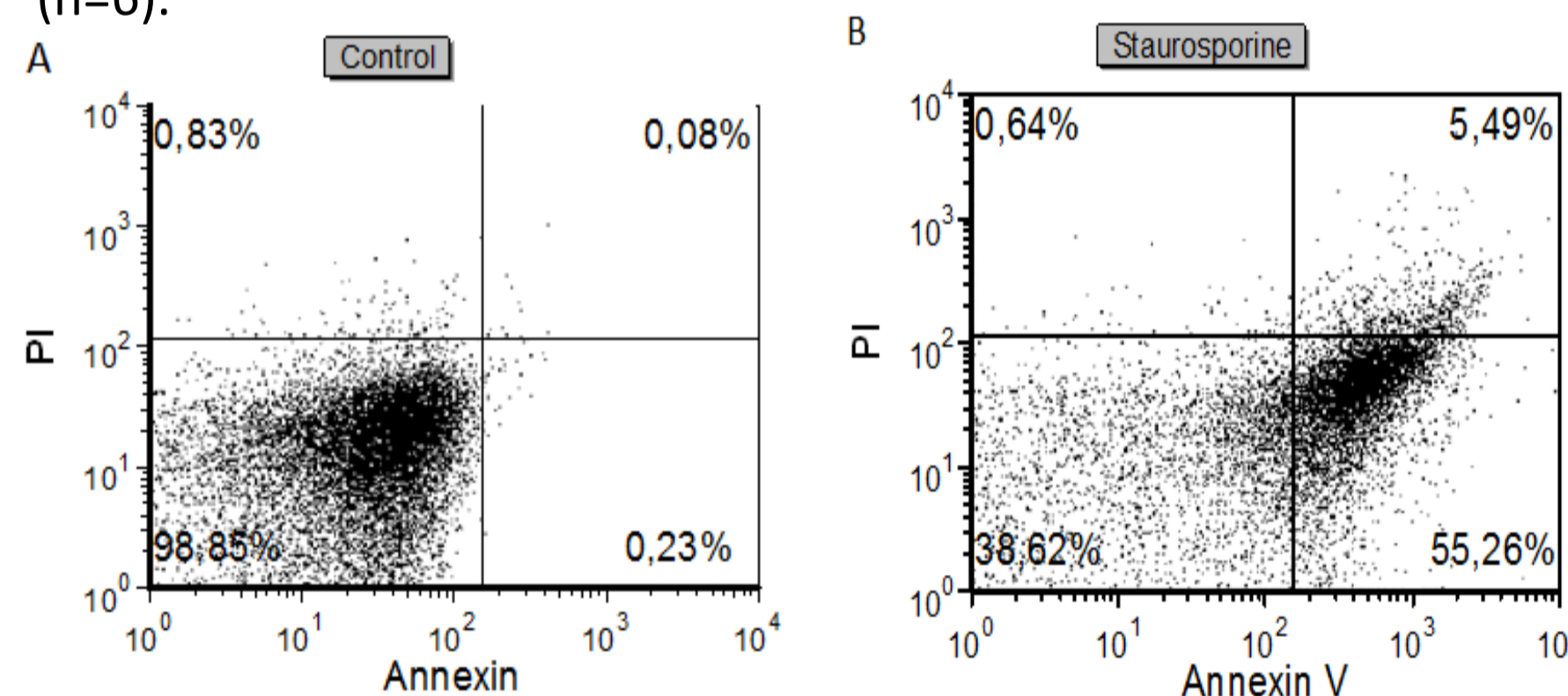


Fig. 3: Caracterização da morte celular por Anexina V/PI induzida por estaurosporina (1µM/24 h) em cultura organotípica de hipocampo de ratos (n=6).

CONCLUSÕES

A técnica de citometria de fluxo se mostrou um bom método para caracterização e quantificação da morte celular em fatias organotípicas hipocámpicas de ratos. A concentração de 5mM de glutamato por 24 h foi capaz de induzir significativa marcação com PI, indicando morte celular por necrose (Anexina-/PI+). Enquanto o tratamento das fatias com estaurosporina 1 µM durante 24 h resultou em uma significativa marcação com Anexina V indicando apoptose inicial (Anexina V+/PI-).

REFERÊNCIAS

- Canu, N et al. (2014) *Front Synaptic Neurosci.* 2014 Apr 21;6:9
 Darzynkiewicz, Z et al (1997) *Cytometry.* 1997 Jan 1;27(1):1-20
 Stoppini, L et al (1991) *J Neurosci Methods.* 1991 Apr;37(2):173-82
 Stahl, K et al (2009) *ScientificWorldJournal.* 2009 Aug 11;9:811-21
 Wlodkewicz, D et al (2013) *Curr Protoc Cytom.* 2013 Oct 9;66:Unit 9.42