

INTRODUÇÃO

As células estreladas hepáticas (HSC) se diferenciam do fenótipo lipocítico (quiescente) para o fenótipo miofibroblástico (ativado) em reação a estímulos inflamatórios e oxidativos [1]. A linhagem permanente GRX, representativa das HSC, apresenta o fenótipo miofibroblástico [2]. O resveratrol (RSV) é um polifenol conhecido por seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios [3]. Trabalhos anteriores no nosso laboratório mostraram que o RSV induziu um efeito pro-oxidativo que acarretou na modulação da atividade da superóxido dismutase (SOD), além de promover um aumento de massa mitocondrial. Este trabalho avaliou a dinâmica e a morfologia mitocondrial nas GRX tratadas em doses crescentes de 0,1 a 50 μM de RSV por 24h.

MATERIAIS E MÉTODOS

❖ As células GRX foram cultivadas em meio DMEM pH 7,4, suplementado com 5 % de Soro Fetal Bovino; e mantidas sob atmosfera úmida com 5 % de CO₂. O resveratrol foi diluído em 20 μL de etanol e posteriormente diluído sequencialmente até as concentrações de 1, 10 e 50 μM de RSV. As células GRX foram tratadas por 24h.

❖ Para obtenção das imagens de fluorescência, as células GRX foram cultivadas sobre lamínulas, tratadas com RSV, incubadas por 20 minutos com as sondas Mitotracker Green e Mitotracker Orange, e posteriormente fixadas com paraformaldeído 4%. As imagens foram obtidas em Microscópio Confocal (MC)

❖ Para análise morfológica mitocondrial da célula GRX, foram obtidas imagens de Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

❖ Para a avaliação de tamanho celular (Forward Scattering-FSC) e de complexidade citoplasmática (Side Scattering-SSC), as células foram tripsinizadas e ressuspensas em PBS para análise em citômetro de fluxo.

RESULTADOS

Resultados preliminares, usando MTG como marcador, mostraram que o tratamento com RSV a partir da menor dose induziu aumento de massa mitocondrial [SIC 2010]. Imagens de MC mostraram que as células GRX não tratadas, marcadas com MTG e MTO, apresentaram maior concentração de mitocôndrias na região perinuclear. As células tratadas com RSV apresentaram mitocôndrias distribuídas no citoplasma e com morfologia alterada, o que pode indicar uma alteração na relação fissão/fusão desta organela [Figura1]. Imagens de MET mostraram que o tratamento com 50 μM de RSV induziu aumento no tamanho das mitocôndrias e o surgimento de um maior número de autofagossomas [Figura2]. A análise por citometria de fluxo mostrou que o tratamento com RSV induziu aumento da complexidade citoplasmática, o que pode estar relacionado com o aumento do tamanho mitocondrial e com o maior número de autofagossomas [Figura3].

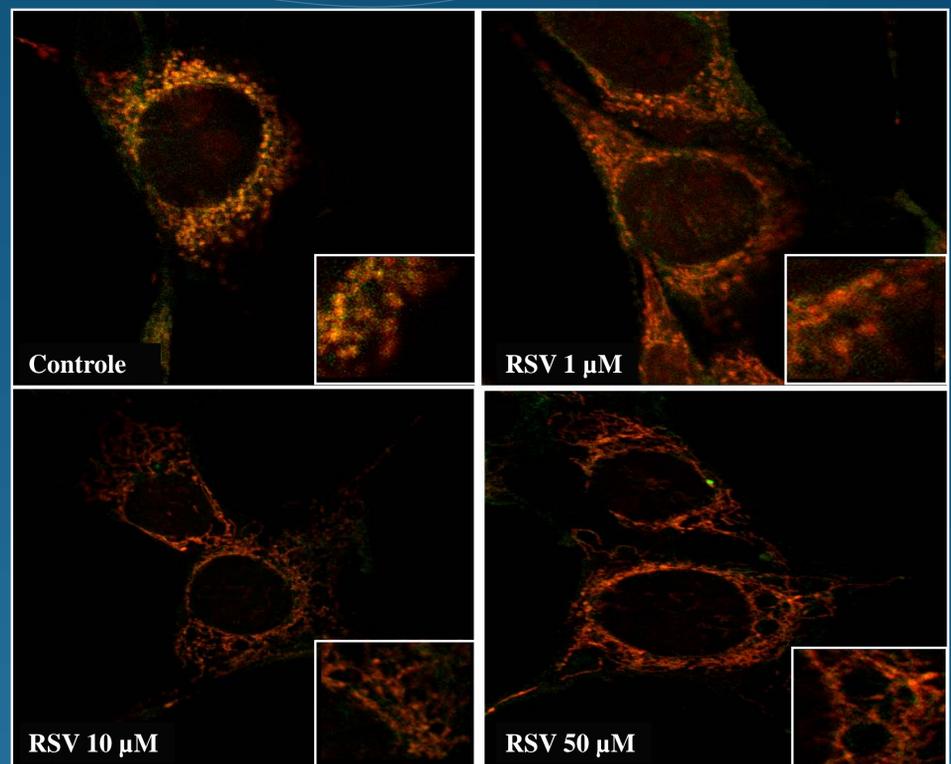


Figura 1: Resveratrol promove mudanças na rede citoplasmática mitocondrial. Os grupos controle apresentaram mitocôndrias na região perinuclear das células GRX. Os grupos tratados apresentam mudanças na morfologia [em destaque] e na distribuição mitocondrial no citoplasma.

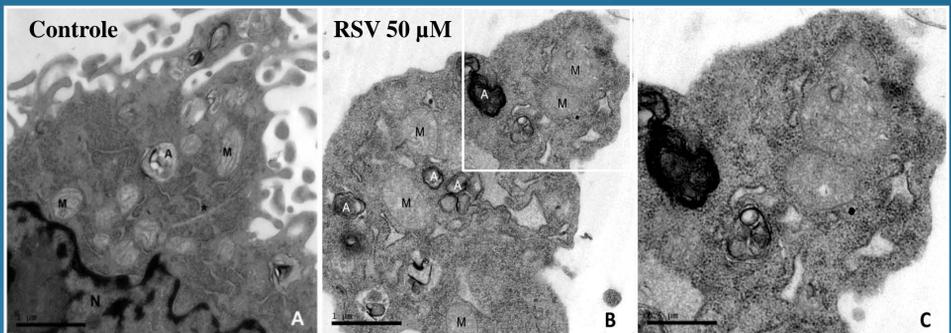


Figura 2: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. [A] Células controle. [B] As células tratadas com 50 μM de RSV apresentaram mitocôndrias com morfologia alterada e tamanho aumentado, além de um aumento no número de autofagossomas. [C] Amplificação da região destacada em [B]. (N) Núcleo (M) Mitocôndrias; (A) Autofagossomas.

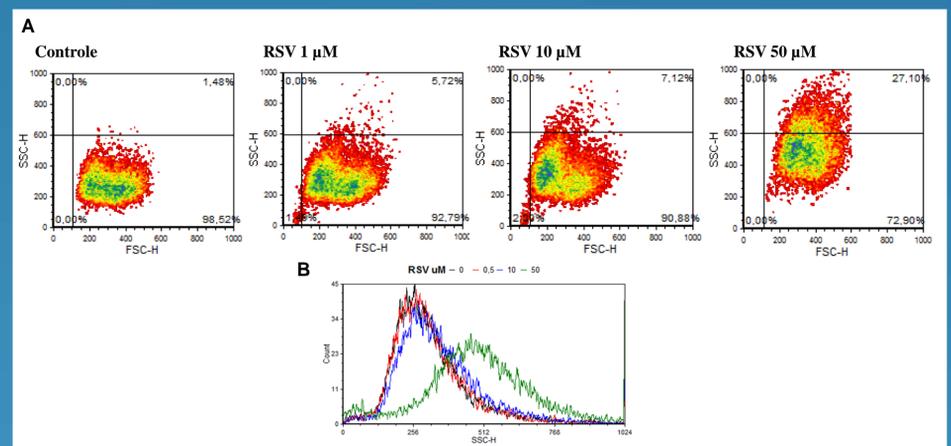


Figura 3: Análise de tamanho celular e complexidade citoplasmática. (A) As células tratadas com RSV apresentaram um aumento de granulosidade dependente da dose, que reflete uma alteração de complexidade citoplasmática (SSC-H). (B) Histograma representando a heterogeneidade citoplasmática mais evidente no tratamento com 50 μM de RSV.

CONCLUSÕES

- ❖ As imagens obtidas por MC mostraram que o tratamento com RSV por 24h induziu alteração na distribuição das mitocôndrias.
- ❖ A alteração morfológica de mitocôndrias e o aumento de autofagossomas, observados em imagens de MET, foram evidentes nas células tratadas com 50 μM de RSV.
- ❖ Análises por citometria de fluxo mostraram um aumento significativo da complexidade celular da GRX tratadas com 50 μM de RSV, que podem estar relacionadas com o aumento de tamanho das mitocôndrias e ao aumento de autofagossomas.
- ❖ Mais estudos estão em andamento para elucidar e complementar esses primeiros resultados.

REFERÊNCIAS

- [1] FRIEDMAN S.L. *Gastroenterology*. 134(6):1655-69, 2008.
- [2] BOROJEVIC R. *et al. In Vitro Cell Dev Biol*. 21(7):382-90, 1985.
- [3] DE LA LASTRA *et al. Biochem Soc Trans*, 2007. 35(5): 1156-60.