

Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador laranja de acridina

Marcos Paulo Thomé¹, Guido Lenz^{1,2}

¹ PPGBCM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

² Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



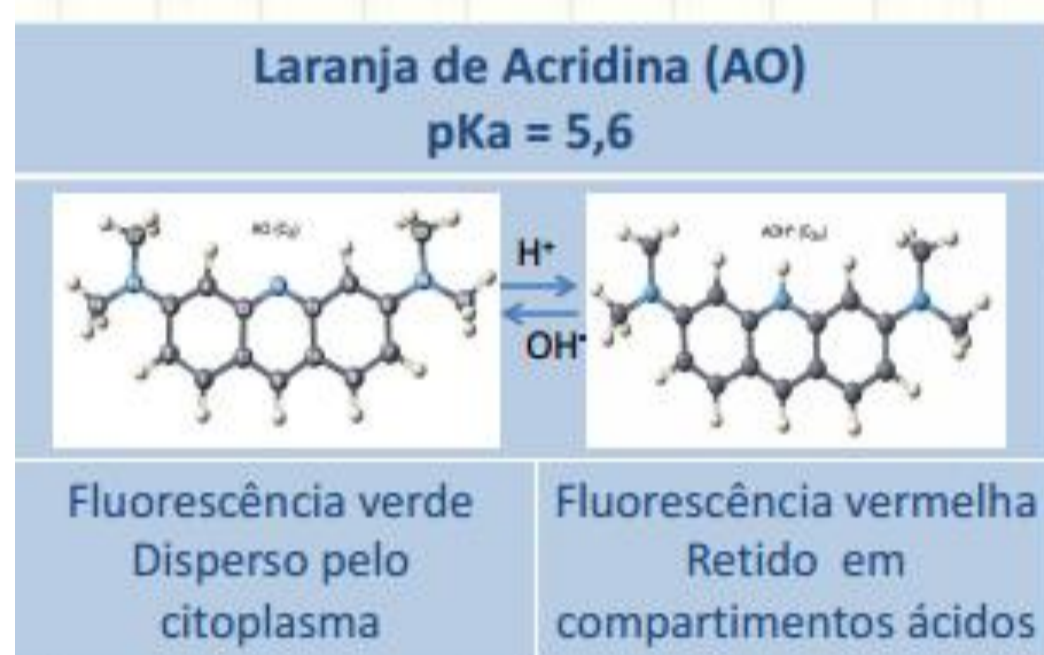
UFRGS
PROPEAQ

XXV SIC
Salão Iniciação Científica

CB - Ciências Biológicas

Introdução

Autofagia é um processo pelo qual os constituintes citoplasmáticos e organelas são direcionados para degradação por enzimas lisossomais. O processo autofágico inicia com o sequestro do material alvo por uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo, seguido da fusão do autofagossomo com o lisossomo para formar o autofagolisossomo, onde ocorre a completa digestão do material autofagocitado por hidrolases ácidas.



As características do corante laranja de acridina (AO) permitem o seu uso como marcador de autofagossomos maduros. A intensidade da fluorescência vermelha é proporcional ao grau de acidez. Com isso, o volume de compartimentos celulares ácidos pode ser quantificado.

A figura ao lado mostra a marcação de células da linhagem PC3 com AO, onde o citoplasma fluoresce verde, enquanto Organelas Vesiculares Ácidas (AVOs) fluorescem vermelho.

A quantificação da fluorescência é feita por citometria de fluxo.

Materiais e métodos

Células das linhagens U87 expressando estavelmente a proteína GFP-LC3 e U251 foram tratadas com Temozolomida, um agente alquilante que pode induzir autofagia, por três dias nas concentrações indicadas.

Ao final do tratamento, as células foram marcadas com AO 1µg/µL e a fluorescência foi quantificada por citometria de fluxo. A avaliação da proteína p62 e a conversão de LC3 foram feitas por Western Blot e a contagem de pontos verdes de GFP-LC3 foi feita com microscopia de fluorescência.

Resultados

O tratamento com TMZ na linhagem U251 provocou um aumento na porcentagem de células consideradas autofágicas pela quantificação com AO quando a análise é feita com o método de análise atualmente utilizado (que leva em conta somente a intensidade de fluorescência vermelha). Quando a análise é feita utilizando a limiar proposto (que considera a relação de fluorescências verde e vermelha) essa indução de autofagia não é observada. Da mesma forma, não foi observado aumento na conversão de LC3-I para LC3-II. O aumento da relação de LC3-II/I é um método bem estabelecido para mostrar indução de autofagia (Fig. 1).

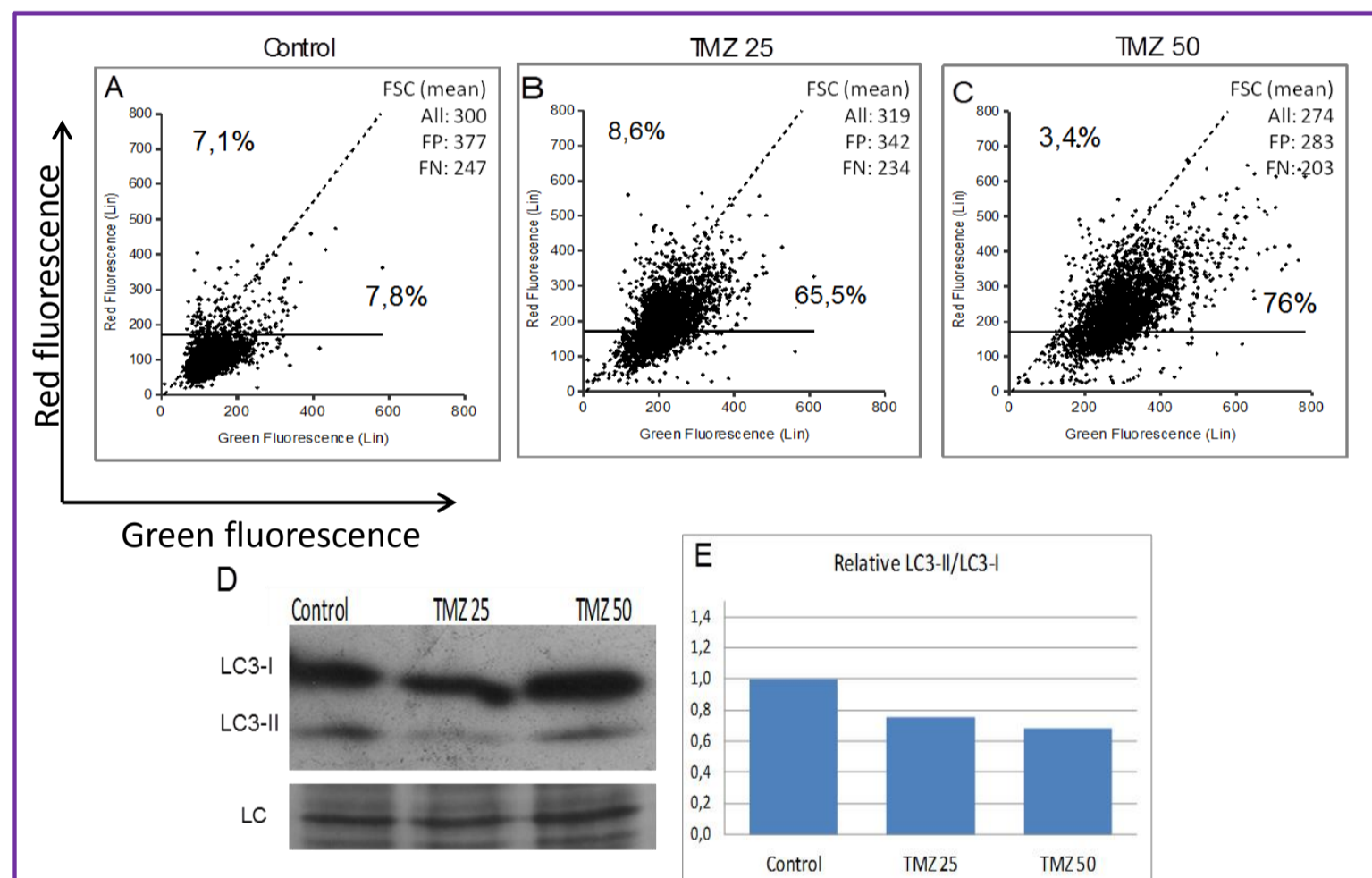
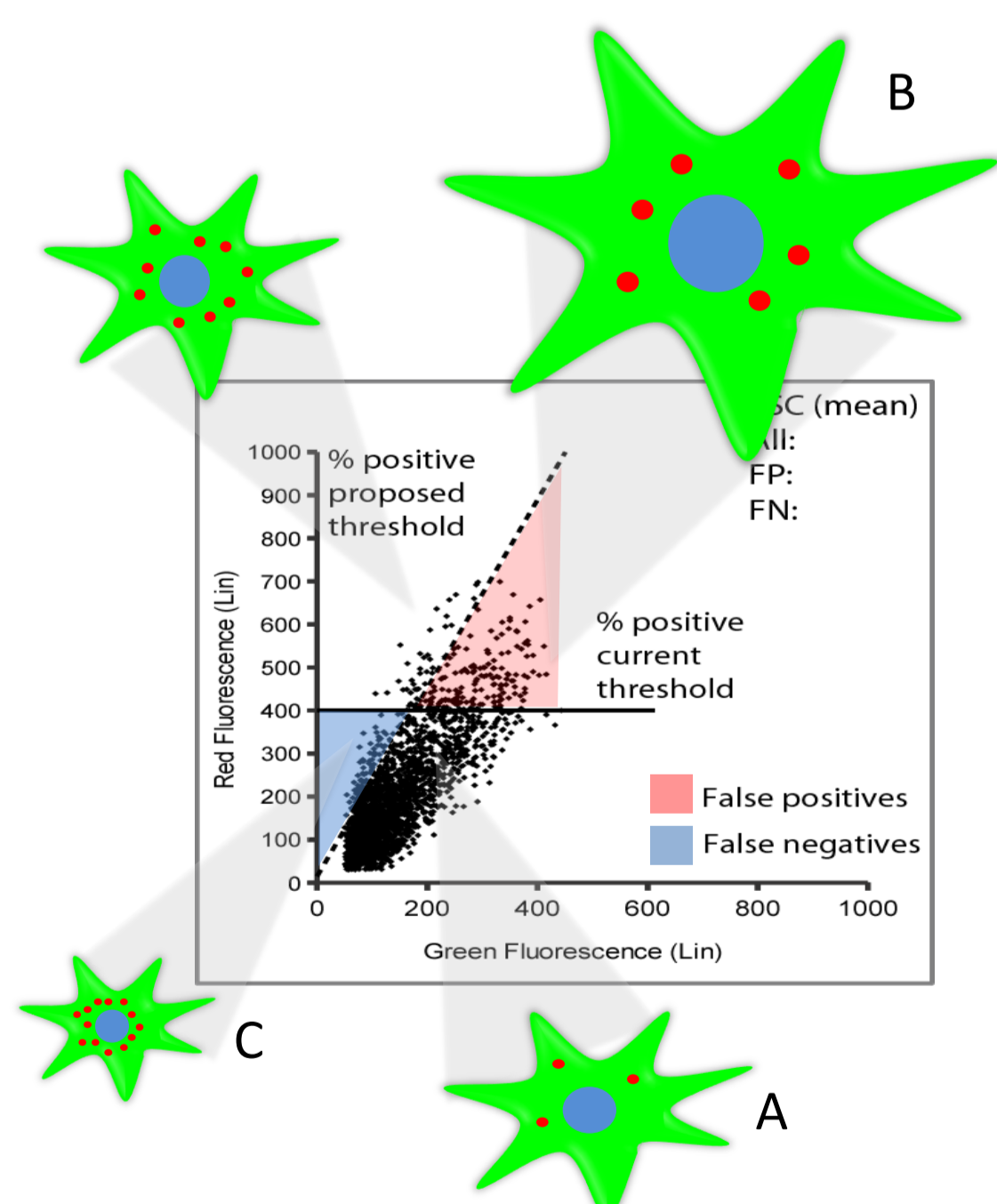


Figura 1: Avaliação da indução de autofagia na linhagem U251.

A, B e C: plotagens da quantificação de AVOs pela marcação com AO. D e E: Western Blot e quantificação da conversão de LC3-I em LC3-II.

Objetivos

O tamanho celular é controlado por inúmeros sinais e condições, tais como atividade de mTOR. Com isso, quando da análise da marcação com AO por citometria de fluxo não se deveria ser considerado somente a intensidade absoluta da fluorescência vermelha, uma vez que células menores irão incorporar uma menor quantidade da substância.



Uma célula passando da situação de A para B está com tamanho aumentado e, conseqüentemente, a intensidade de fluorescência verde e vermelha são maiores, porém a relação é mantida a mesma, significando que o nível de autofagia delas é mesmo; logo com o método atual ela seria um falso positivo. Já na situação de A para C a célula reduz o tamanho, porém em C possui uma razão de vermelho por verde muito maior, sendo um falso negativo no método atual.

Com isso, esse trabalho tem principalmente os objetivos de comparar os resultados do método de análise atual para quantificar a formação de AVOs com a marcação com AO com um novo método que permite a quantificação não somente da intensidade absoluta de fluorescência vermelha, mas a intensidade relativa da fluorescência vermelha e verde e propor o seu uso como método para a quantificação de AVOs.

Para a linhagem U87 a avaliação da indução de autofagia foi feita pela marcação com AO, contagem de pontos verdes de GFP-LC3 e Western Blot para as proteínas LC3 e p62 (os níveis de p62 estão aumentados quando a autofagia está inibida e diminuídos quando há atividade autofágica). Na tabela abaixo está apresentado as correlações entre os métodos utilizados, dentre eles levando em conta a quantificação de AO com a abordagem convencional (limiar perpendicular) e a proposta (inclinado). Observa-se que utilizando a abordagem proposta obtêm-se correlação mais fortes com os resultados obtidos pelos outros métodos.

	Conversão de LC3	GFP-LC3 puncta	p62
Conversão de LC3		0,93	0,81
GFP-LC3 puncta			0,96
Perpendicular	0,99	0,93	0,82
Inclinado	0,98	0,97	0,89

Discussão

A análise com a metodologia proposta, que considera a fluorescência vermelha relativa à verde, reduz os falsos positivos e falsos negativos considerados na metodologia convencional, que são situações em que as células apresentam intensidades de fluorescência vermelha menor ou maior pelo fato de possuírem tamanhos diferentes e, conseqüentemente, incorporarem diferente quantidade de AO e não propriamente por estarem mais ou menos autofágicas.



MODALIDADE DE BOLSA

