



Evento	Salão UFRGS 2013: SIC - XXV SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFRGS
Ano	2013
Local	Porto Alegre - RS
Título	Nova abordagem para análise de autofagia com o marcador Laranja de acridina
Autor	MARCOS PAULO THOMÉ
Orientador	GUIDO LENZ

Autofagia é um processo de degradação intracelular amplamente distribuído entre eucariotos, responsável pela degradação de proteínas envelhecidas e de organelas. Constituintes citoplasmáticos são sequestrados em organelas de dupla membrana, os autofagossomos, que posteriormente se fundem com os lisossomos onde ocorre a degradação do conteúdo autofagocitado por hidrolases ácidas. Esse mecanismo tem sido implicado em vários processos patológicos e fisiológicos, incluindo o *turnover* de proteínas e organelas, resposta a privação de nutrientes e morte celular. Laranja de acridina é um marcador acidotrópico cujas características permitem seu uso como marcador de autofagossomos maduros. Apresenta fluorescência verde ao ser incorporado pela célula e, ao ficar retido em compartimentos ácidos, é protonado e passa a emitir fluorescência vermelha, sendo esta fluorescência proporcional ao grau de acidez, permitindo assim, que tanto o número de células autofágicas quanto a intensidade de autofagia, inferida pela avaliação do volume de compartimentos celulares ácidos, possam ser quantificados por citometria de fluxo, sendo um fácil método de triagem para avaliação de autofagia. O atual método de quantificação leva em consideração a fluorescência vermelha absoluta, mas esta fluorescência pode aumentar com o aumento do tamanho celular, produzindo falsos positivos e a diminuição do tamanho celular poderia produzir falsos negativos. Considerando que a fluorescência verde pode ser usada para inferir o tamanho celular, propomos uma quantificação que leva em conta a razão de fluorescência vermelha pela verde como forma de aprimorar a avaliação da indução de autofagia. Utilizamos neste trabalho as linhagens celulares de glioma U251 e U87 tratadas com Temozolomida, um agente alquilante indutor de autofagia nestas células. A marcação com laranja de acridina foi detectada por citometria de fluxo e a quantificação da indução de autofagia foi realizada utilizando o software WinMDI 2.9 e OpenOffice.org 3.4.0. Para a validação dos níveis de autofagia foram usados imunodeteção da conversão de LC3-I em LC3-II e degradação de p62 e ensaio de formação de GFP-LC3 *puncta* por microscopia de fluorescência. Demonstramos que, em comparação com a abordagem usual de análise de laranja de acridina, os dados obtidos através da nova abordagem de quantificação apresentam maior correlação com os dados obtidos pelos outros métodos bem estabelecidos em autofagia. O refinamento da metodologia de análise dos dados de laranja de acridina proposto aqui deve permitir um maior uso da ferramenta na análise de autofagia.