

Padronização da Técnica para detecção de células senescentes proliferativamente através da atividade enzimática da β -galactosidase em tecido adiposo branco.

Helena Trevisan Schroeder¹, Paulo Ivo Homem de Bittencourt Jr.¹

¹ Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS. Porto Alegre - RS.

Contato: Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS. Rua Sarmiento Leite, 500 – 2º andar, lab. 02.

Telefone: 55-51 33083151; Fax : 55- 51 33084555; Email: fisiologia.celular@ufrgs.br; Web: www.ufrgs.br/fisiologia/fisiologiacellular

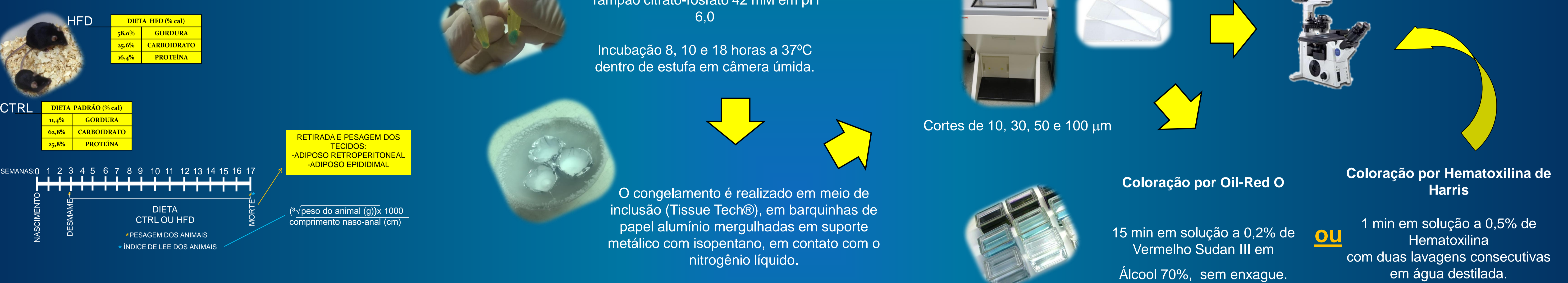
INTRODUÇÃO

O tecido adiposo branco (TAB) tem uma grande relação com o metabolismo energético, sendo também secretor de hormônios que podem agir na sinalização de fome e saciedade, bem como modular a resposta imune por liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas ações sistêmicas do TAB são acentuadas na obesidade, patologia que hipertrofia do TAB associada à infiltração de macrófagos inflamatórios. No meio intracelular, ocorre acúmulo de ácidos graxos, aumento de sinalização externa e disponibilidade de nutrientes, incrementando a produção proteica. Isso gera estresse de retículo endoplasmático, que, de forma inicial, seria resolvido por uma resposta a proteínas desdobradas (UPR), mas que, cronicamente, não pode ser resolvido e guiará a célula para a via de senescência proliferativa. Esta senescência tem um perfil próprio de secreção (SASP) que influenciará na disseminação de senescência a outras células e tecidos. Um marcador de senescência celular é a atividade da enzima β -galactosidase em pH 6,0, pela incubação do tecido ou célula com o substrato X-Gal, que, após clivagem, forma um precipitado azul dentro da célula.

OBJETIVOS

Padronizar a técnica para detecção da atividade ótima da enzima beta galactosidase em tecido adiposo branco de camundongos C57BL/6J.

MÉTODOS



RESULTADOS

Tabela 1: Média e Desvio Padrão da Média do Índice de Lee, dos pesos iniciais e finais de camundongos da linhagem C57BL/6J do tecido adiposo extraído dos grupos dieta padrão (CTRL) e tratados com dieta hiperlipídica (HFD) durante 14 semanas. * Diferença em relação ao controle de $p < 0,05$.

	Índice de Lee (g/cm) ± DPM	Peso inicial (g) ± DPM	Peso Final (g) ± DPM	Peso total Tec. Adiposo (g) ± DPM
CTRL	20,20 ± 1,93	7,30 ± 2,02	26,07 ± 0,87	0,43 ± 0,15
HFD	36,03 ± 5,27*	8,04 ± 2,85	35,13 ± 2,46*	1,75 ± 0,43*

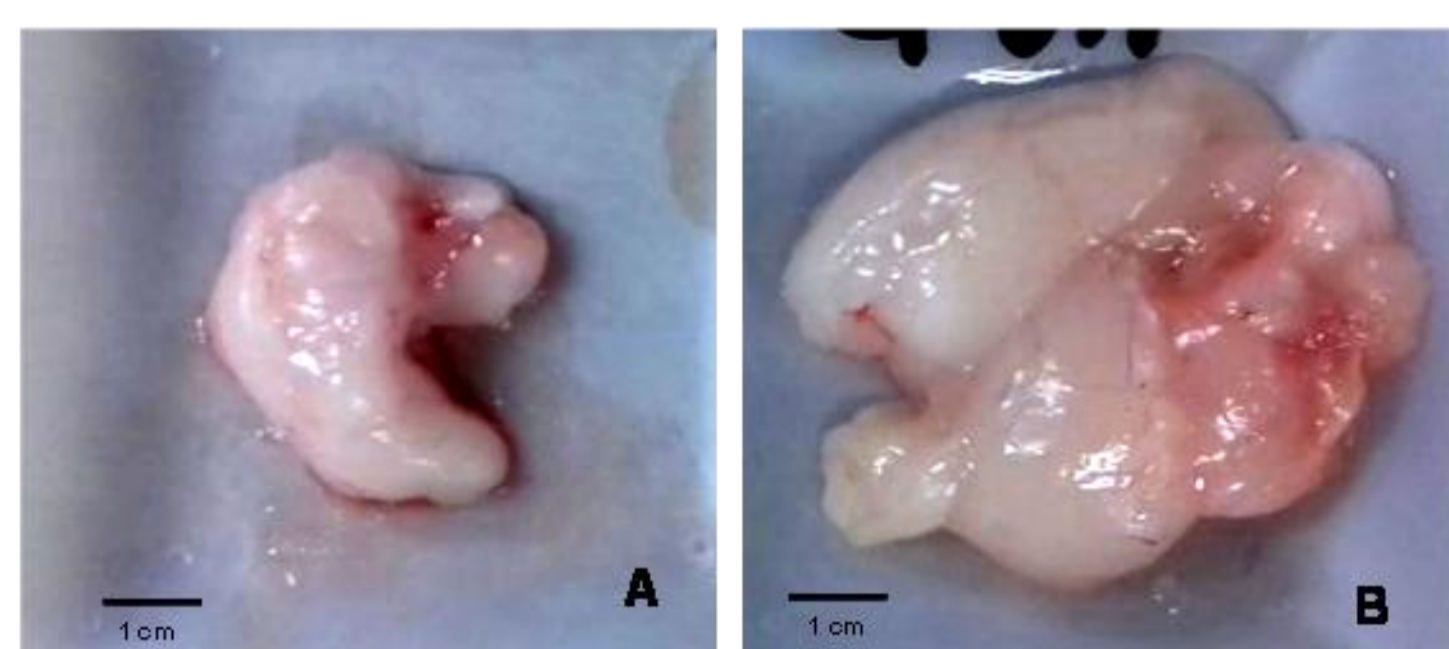


Figura 1: Análise macroscópica de tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal de camundongos da linhagem C57BL/6J. A- extraído dos grupo dieta padrão (CTRL) e B- extraído dos grupo com dieta hiperlipídica (HFD) durante 14 semanas.

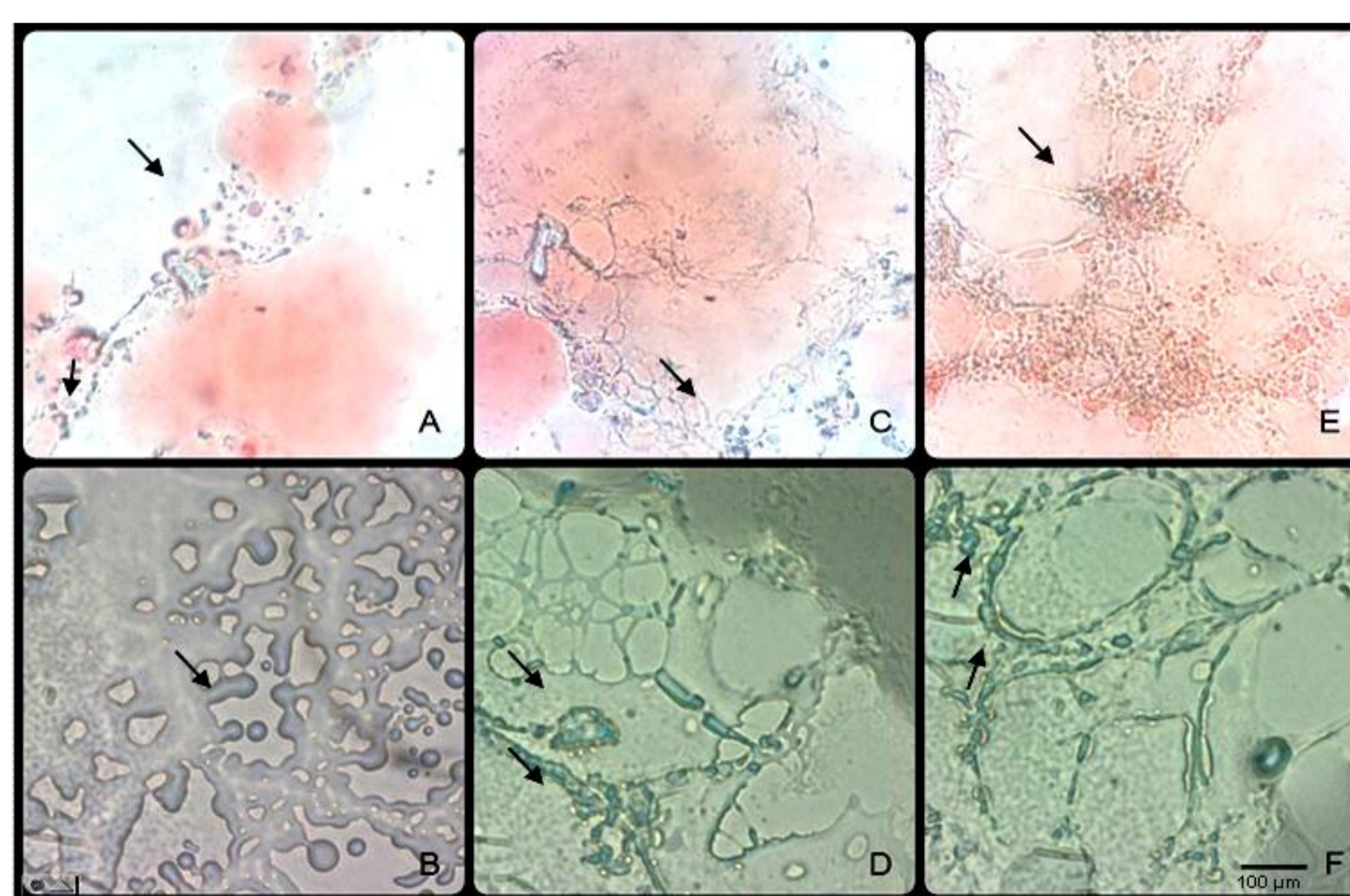


Figura 2: Análise microscópica de extravasamento ou não de precipitado formado pela atividade da enzima β -Gal de tecido adiposo branco retroperitoneal e epididimal de camundongos da linhagem C57BL/6J extraído dos grupos dieta padrão (CTRL) e tratados com dieta hiperlipídica (HFD) durante 14 semanas. Cortes na espessura de: A e B - 10 μ m incubados com X-Gal e corados por Oil Red O (A) ou não (B), apresentando precipitado extravasado; C e D - 30 μ m incubados com X-Gal e corados por Oil Red O (C) ou não (D), apresentando precipitado extravasado; E e F - 50 μ m incubados com X-Gal e corados por Oil Red O (E) ou não (F), com ausência de extravasamento de precipitado. Aumento de 400 X, escala de 100 μ m.

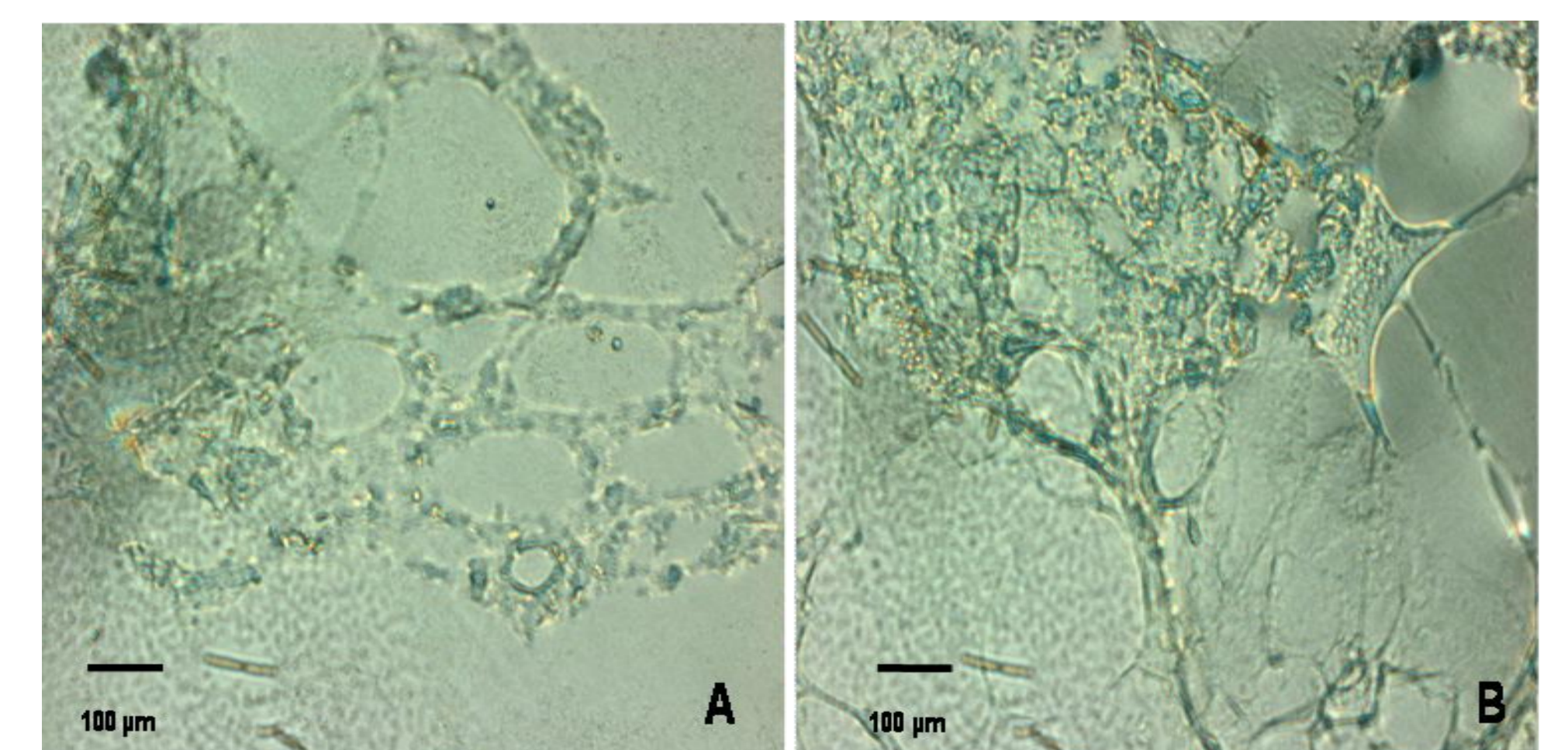


Figura 3: Tecido Adiposo branco sem coloração em 50 μ m, A- extraído dos grupos dieta padrão (CTRL), com menor formação de precipitado no interior das células; B - extraídos do grupo com dieta hiperlipídica (HFD) durante 14 semanas, evidenciando maior formação de precipitado no interior das células. Aumento de 400 X escala de 100 μ m.

CONCLUSÃO

A padronização da técnica para detecção de células senescentes através da atividade enzimática da β -Gal em tecido adiposo branco foi realizada em um modelo animal de obesidade bem consolidado e que respondeu como o esperado. O objetivo deste trabalho foi alcançado, visto que a literatura não apresenta protocolos reprodutíveis desta técnica para tecido adiposo integro. A padronização desta técnica também permitiu que se determinasse o melhor tempo de incubação da enzima com o substrato para obtenção do precipitado intracelular azul (entre 8 e 10 horas), bem como a espessura ideal do corte (50 μ m) e a coloração de fundo pra corar o citosol (Oil Red O), tornando-se um método barato e reprodutível para ser utilizado em estudos metabólicos como a obesidade e a senescência celular.

Apoio financeiro: