



PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UMA CÉLULA COM MÚLTIPLAS FLUORESCÊNCIAS

Luiza Cherobini Pereira, Guido Lenz

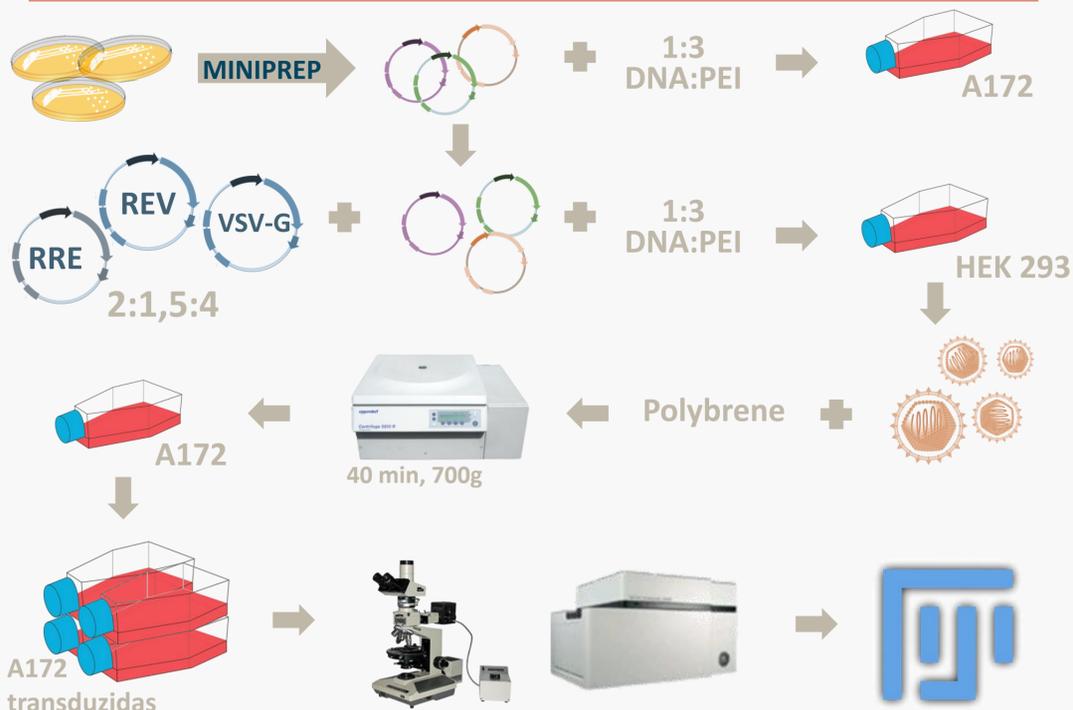
INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios no estudo do câncer é o desenvolvimento de resistência a tratamentos que está fortemente relacionada à heterogeneidade tumoral, na qual células são fenotípica e geneticamente diferentes entre si dentro de uma mesma massa tumoral. Nesse cenário surgiram as análises de células únicas como sequenciamento, imunofluorescência e citometria de fluxo, que são frequentemente utilizadas, porém envolvem preparo trabalhoso de amostras e uso de reagentes e equipamentos caros. Uma alternativa são as co-marcações celulares, onde diferentes proteínas são marcadas e analisadas por microscopia de fluorescência, possibilitando a correlação de efeitos biológicos e o acompanhamento de células individuais.

OBJETIVO

Desenvolvimento e validação de célula com co-marcações fluorescentes nucleares e citoplasmáticas.

METODOLOGIA

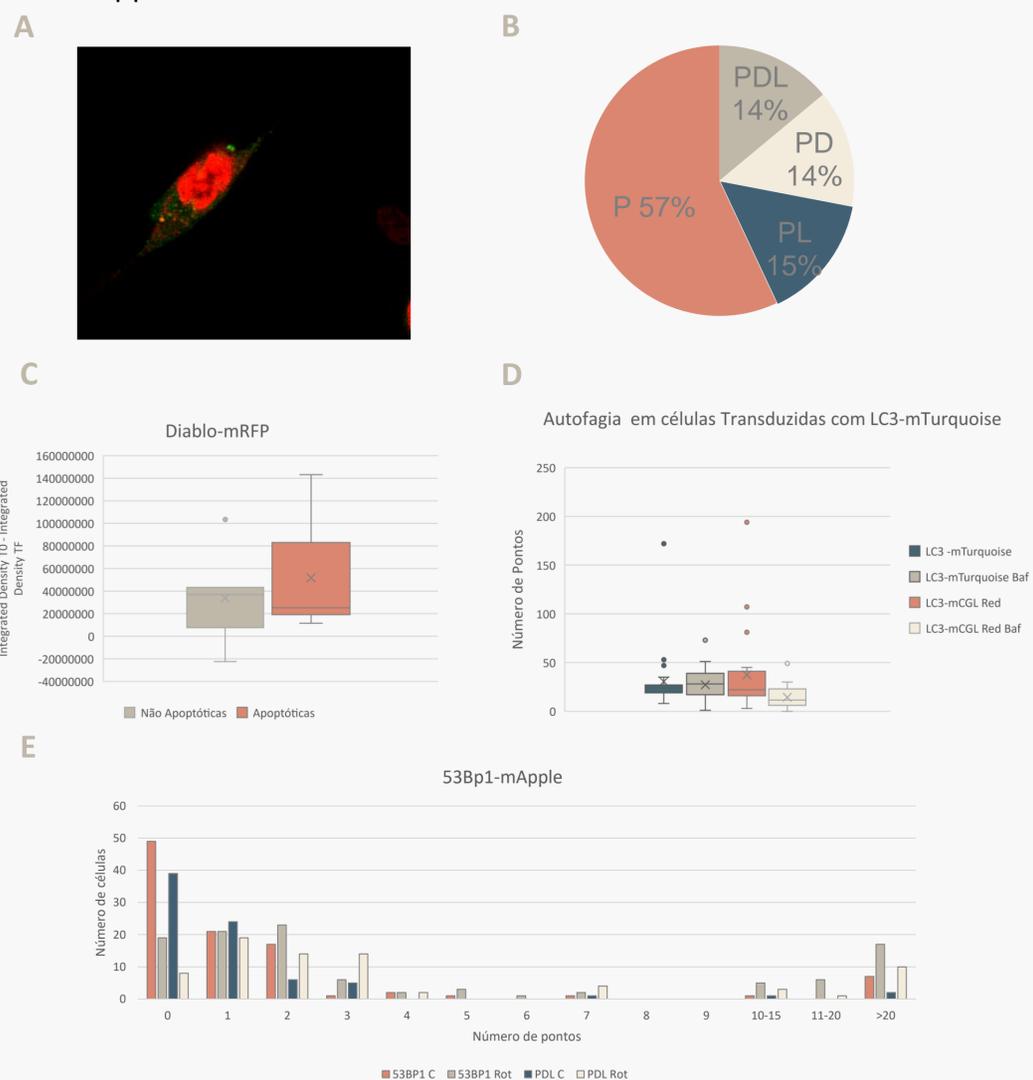


CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foram produzidas células de glioma da linhagem A172 triplamente marcadas com eficiência de 14%. As diferenças nas taxas de expressão das proteínas 53bp1 e Diablo geraram dificuldades na análise pois a emissão da primeira sempre se fez mais presente e em maior intensidade. O comprimento de onda escolhido para a proteína mTurquoise dificultou a obtenção de imagens pois a proteína era vista em mais de um filtro de fluorescência. A comparação do marcador LC3-Turquoise com o marcador já estabelecido LC3-mCGL não evidencia diferenças entre os mesmos e análise de diablo-mRFP1 destaca a ineficiência no uso do mesmo como marcador de apoptose. O marcados 53BP1-mApple pôde ser utilizado para marcar dano tanto em células com uma marcação como em células triplamente marcadas, apresentando mesmo perfil de resposta.

RESULTADOS

Para avaliar a eficiência dos marcadores, foram aferidos os processos de apoptose, marcada por Diablo-mRFP, autofagia pelo LC3-mTurquoise em comparação ao LC3-mCGL e dano nuclear, marcado por 53BP1.Apple



Legenda. **A)** células triplamente transduzidas com LC3-mTurquoise, Diablo-mRFP1 e 53BP1-mApple. **B)** Eficiência das transduções, onde: P = 53BP1, PL = 53BP1+LC3, PD = 53BP1+Diablo e PDL= 53BP1+Diablo+ LC3. **C)** Variação da fluorescência medida pela Densidade Integrada do diablo no tempo 0 e após 19 horas do tratamento com rotenona (rot) 3µM. **D)** Avaliação de autofagia através da contagem dos pontos ciano e vermelho antes e após tratamento com Bafilomicina A1 100nM por 2h. **E)** Avaliação de quebras de fita dupla através da contagem de pontos de 53BP1 em células simples e triplas antes e após tratamento com rotenona 3µM por 19 horas.