

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Henrique Beck Biehl

**Implantação de Técnicas para Avaliação da Dinâmica
Mitocondrial por Microscopia Confocal no Centro de
Microscopia Eletrônica da UFRGS.**

Porto Alegre, 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

Henrique Beck Biehl

**Implantação de Técnicas para Avaliação da Dinâmica
Mitocondrial por Microscopia Confocal no Centro de
Microscopia Eletrônica da UFRGS.**

Trabalho de conclusão do curso de
graduação como requisito parcial
para obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas.

Profesora Fátima Costa Rodrigues
Guma.
Orientadora

Porto Alegre, 2012

RESUMO

O microscópio confocal apresenta grande vantagem para o estudo de tecidos e células que requerem imagens em grande detalhamento com o controle dos diversos parâmetros de aquisição de imagem. As mitocôndrias são organelas celulares dinâmicas que possuem um ciclo complexo que envolve os processos de fissão, fusão e biogênese mitocondrial. O Resveratrol (RSV) é uma fitoalexina que tem sido utilizada para fins terapêuticos devido às evidências que mostram um possível efeito antioxidante nas células. A ativação das células estreladas hepáticas (*Hepatic Stellate Cells* - HSC) está relacionada com o aumento da proliferação e da produção de matriz extracelular que resulta no desenvolvimento da fibrose hepática. Em nossos trabalhos anteriores, 50 μ M de RSV induziu estresse oxidativo e morte celular em 24 horas de tratamento, efeito que foi atenuado em 120 horas. No presente trabalho, foram realizados tratamentos com concentrações crescentes de RSV (1, 10 e 50 μ M) em culturas de células da linhagem GRX, modelo de HSC. Através de diferentes técnicas de análise de imagens de microscopia confocal e utilizando diferentes marcadores fluorescentes, estudou-se a formação de espécies reativas de oxigênio, a relação entre massa mitocondrial *versus* sua atividade, alterações na morfologia dessa organela, sua distribuição celular e sua fagocitose (mitofagia). Pela quantificação da fluorescência do marcador DCF[®], evidenciou-se que doses crescentes de RSV induz um aumento de espécies reativas de oxigênio. Utilizando as sondas fluorescentes *Mito Tracker[®] Green* e *Mito Tracker[®] Orange*, que marcam, respectivamente, massa e potencial de membrana mitocondrial, foi possível atestar que a massa mitocondrial permanece constante, mas que a atividade dessa organela diminui com o aumento da dose de RSV. Da mesma forma, foi possível observar que o tratamento com RSV induziu alteração de morfologia e redistribuição das mitocôndrias ao longo do citoplasma da GRX, comparado ao grupo controle que apresenta mitocôndrias perinucleares. Pela análise de co-localização entre os marcadores *Mito Tracker[®] Green* e *LysoTracker[®] Red*, marcador de lisossomas, evidenciou-se que o RSV induziu mitofagia. As análises de imagens obtidas por microscopia confocal se mostraram úteis na avaliação do comportamento e resposta das mitocôndrias em relação às diferentes concentrações de RSV. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por meio de técnicas quantitativas, como citometria de fluxo e ensaios espectrofluorimétricos, e mostram que a microscopia confocal, associada às ferramentas de análise de imagens, também pode ser importante na obtenção de dados quantitativos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
1.1	Microscopia Confocal	5
1.2	Fatos a serem considerados na Microscopia Confocal	8
1.3	Dinâmica mitocondrial: modelo de estudo para utilização das técnicas de Microscopia Confocal	9
1.4	Célula estrelada hepática	11
1.5	Resveratrol	12
2	MATERIAL E MÉTODOS	13
2.1	Linhagem celular GRX e preparação das lâminas para microscopia Confocal	13
2.2	Tratamento com Resveratrol	13
2.3	Quantificação da massa <i>versus</i> atividade mitocondrial	14
2.4	Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio com DCFH-DA [®]	14
2.5	Colocalização entre mitocôndrias e lisossomos	15
2.6	Aquisição das imagens	15
2.7	Processamento e análise das imagens	15
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
3.1	Arquitetura Mitocondrial e Relação Massa X Atividade Mitocondrial	16
3.2	Medição de Espécies Reativas de Oxigênio	19
3.3	Mitofagia e colocalização	21
4	CONCLUSÃO	25
5	REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

1.1 Microscopia Confocal

O microscópio confocal possui muitos recursos que influenciam a qualidade e a natureza da imagem a ser adquirida. Por isso, é de grande importância saber utilizá-los adequadamente de modo a gerar imagens que transmitam a informação real da amostra analisada.

Para formar a imagem confocalizada, um ou mais feixes de *lasers* varrem a amostra no sentido linear horizontal ponto a ponto e de cima para baixo [1]. Os *lasers* excitam marcadores fluorescentes que então emitem luz num comprimento de onda acima e com energia abaixo do de excitação. Para cada *laser*, existe um canal relacionado na janela de visualização da imagem no *software* de aquisição. Cada canal apresenta a imagem da fluorescência excitada pelo *laser* correspondente. Os canais podem ser visualizados sobrepostos ou isolados. A luz emitida pela amostra se forma na objetiva, passa pelo *pinhole* e é coletada pela fotomultiplicadora. Essa fotomultiplicadora então amplia o sinal captado e gera uma matriz de elementos discretos chamados *pixels*. Portanto, uma imagem digital não representa perfeitamente o objeto visualizado, visto que cada *pixel* representa um segmento da área imaginada que, por sua vez, é contínua. Na investigação de estruturas muito pequenas, como as mitocôndrias, por exemplo, a quantidade de *pixels* gerados deve ser levada em conta porque o sinal do fóton emitido pode ser deslocado para se enquadrar em um ou outro *pixel* gerando, assim, uma descontinuidade que acarreta em erro na localização correspondente na imagem do verdadeiro local das estruturas sinalizadas.

O tamanho da imagem corresponde à quantidade de *pixels* que são gerados para formar a imagem do campo. Esses são variáveis de acordo com a livre escolha do operador do *software* de captura.

Quanto mais *pixels* em uma imagem, maior a correspondência do sinal capturado com o verdadeiro local de emissão. Para modificar a intensidade de fluorescência emitida pela amostra, se altera a potência do laser, a voltagem que alimenta a fotodetectora e a velocidade de varredura. Para não chegar a valores arbitrários quanto à intensidade de fluorescência, é utilizada uma ferramenta de visualização da saturação da luz da imagem. É possível regular a potência dos *lasers*, a voltagem (HV- do inglês *high voltage*), e o tempo de varredura para se manter a quantidade de fótons emitidos pela amostra dentro da capacidade de detecção da fotomultiplicadora.

A fotomultiplicadora trabalha em conjunto com a potência dos *lasers* para gerar uma imagem com sinal adequado, e pode operar no modo *photon counting* ou no modo análogo de acordo com a voltagem que a alimenta [2]. No modo *photon counting* a voltagem permanece fixa e no máximo da energia com que alimenta a fotomultiplicadora. Como a capacidade de detectar os fótons está aumentada ao máximo, os *lasers* ficam numa potência baixa, diminuindo o risco de perda da fluorescência (*photobleaching*) e garantindo o aumento do tempo para a aquisição de imagens. Entretanto, pela grande excitação do detector, podem aparecer sinais na imagem que não correspondem à fluorescência real. Esses sinais são conhecidos como *ruído* e, quanto maior a voltagem da fotodetectora, maior o nível de ruído. No modo análogo, a voltagem do detector é operada manualmente. Nesse caso, se faz um balanço entre a potência dos *lasers* e a voltagem. No entanto, pode haver o risco de ocorrer o *photobleach* da área visualizada devido à alta potência dos *lasers*, especialmente, quando o tempo de aquisição da imagem for demasiadamente grande, expondo os marcadores à luz excitatória até a perda da fluorescência.

A velocidade de varredura da imagem é o tempo que o *laser* fica iluminando um ponto do campo da imagem. Para gerar a imagem, a fotomultiplicadora faz uma média da fluorescência emitida em cada ponto durante o tempo em que esse foi iluminado.

Assim, quanto maior o tempo de varredura, maior a nitidez da imagem, pois os sinais que não pertencem à fluorescência da amostra são desconsiderados e não aparecem na imagem. Contudo, a velocidade de varredura não é o único item que determina o tempo de aquisição da imagem. É possível trabalhar com os *lasers* tanto simultaneamente quando em separado. Visto que muitos corantes e fluoróforos possuem um espectro de excitação e emissão amplo, quando visualizados juntos na amostra, podem ser estimulados por uma linha de *laser* que esteja operando para excitar outro marcador. Esse efeito conhecido como *crosstalk* pode ocorrer tanto durante a excitação quanto na emissão de marcadores fluorescentes diferentes, e é observado pela detecção da emissão de um fluoróforo através do canal fotomultiplicador do outro marcador. Isso pode ser um problema na interpretação das imagens, por exemplo, em estudos de co-localização e/ou estudos quantitativos. Para evitar esse fenômeno, separam-se os *lasers*, que passam a operar no modo sequencial. Cada *laser* operando sequencialmente aumenta o tempo de varredura da amostra em uma vez. Assim sendo, o tempo de aquisição da imagem é determinado pelo número de *lasers* operando sequencialmente, somado à velocidade de varredura e ao tamanho da imagem. Caso sejam feitas imagens ao longo do eixo z, o tempo total de aquisição da imagem será o somatório do tempo de aquisição de cada um dos planos focais.

Uma imagem ideal é aquela que não necessita de correções pós-aquisição. Entretanto, visto que há muitos fenômenos que podem dificultar ou até mesmo impedir uma correta análise da imagem, o processamento da imagem pode ser necessário. Isso implica no uso de *softwares* de processamento de imagens. Processar uma imagem significa modificar digitalmente seus valores de intensidade de fluorescência e reparar aberrações ópticas como difração e distorção da luz emitida pela amostra. Deve-se, porém, ter o máximo cuidado para não mascarar os valores da fluorescência de modo a alterar os resultados.

O processamento básico de uma imagem confocalizada é a alteração do *background* e a deconvolução. Para modificar o *background*, os *pixels* cujos valores de intensidade de fluorescência forem iguais ou maiores do que o valor assumido como do *background* (*tresholding*) são considerados como *pixels* do objeto imaginado e aqueles abaixo desse valor assumem a cor preta como não havendo fluorescência.

Co-localização é uma técnica analítica para investigar se duas moléculas ou estruturas estão compartilhando um mesmo espaço [3]. Sua análise pode ser feita de forma visual ao se observar a sobreposição das cores de ambas as estruturas formando uma terceira cor nas regiões de colocação. Pode-se também utilizar ferramentas estatísticas que determinam, por intermédio de coeficientes, quão colocados estão os objetos examinados.

Deconvolução é o processo de reverter digitalmente a distorção ótica que acontece devido a uma variação natural da magnificação da luz ao passar pela lente objetiva. Pelo fato do microscópio confocal possuir um *pinhole*, que permite que apenas a luz do foco chegue ao detector, a imagem sofre menos com esse efeito. Contudo, quanto menor for a estrutura visualizada maior a distorção da luz emitida por ela, especialmente se, para aquisição, a imagem for amplificada (*zoom*).

1.2 Fatos a serem considerados na utilização da microscopia confocal

Além dos marcadores fluorescentes, muitos elementos que podem existir na amostra e no seu entorno podem ser excitados e emitir luz que é captada pela fotomultiplicadora, gerando uma fluorescência que não corresponde à desejada. Esses sinais são o ruído, a autofluorescência e o *background*.

O ruído numa imagem confocalizada é um conjunto de *pixels* espalhados pela imagem que aparecem como sinal fluorescente, mas

que não são originados de uma estrutura determinada, como por exemplo, a membrana plasmática. Isso se deve, geralmente, ao pouco tempo de processamento da fotomultiplicadora quando é utilizada uma alta velocidade de varredura, e também a uma voltagem (HV) excessivamente alta. É possível evitar o ruído aumentando-se o tempo de exposição do laser e diminuindo o HV.

O *background* ou fluorescência de fundo aparece devido à autofluorescência da amostra ou a ligações não específicas dos marcadores fluorescentes a outras estruturas que não as quais deveriam se ligar. O *background* pode atrapalhar a visualização dos alvos marcados, caso a intensidade da sua fluorescência seja próxima ou até maior do que a intensidade dos objetos estudados.

A autofluorescência é uma propriedade natural que algumas substâncias orgânicas e inorgânicas tem de emitirem luz quando excitadas [4]. Esse brilho indevido pode interferir na análise da imagem assim como o *background*.

A primeira etapa para evitar o *background* ocorre na preparação do material. Conhecendo os comprimentos de onda emitidos pelos objetos com fluorescência indesejada se podem utilizar outros possíveis marcadores que emitam em comprimentos de onda diferente. Há ainda a utilização de métodos químicos e físicos para evitar a autofluorescência. Na aquisição da imagem, operar os *lasers* no modo sequencial contribui para não haver a excitação do material que origina a fluorescência de fundo. Na etapa de processamento da imagem, é possível corrigir digitalmente esse tipo de fluorescência com o uso de ferramentas oferecidas pelos programas de processamento de imagem.

Photobleach é a “queima” da fluorescência de um marcador. Uma molécula é fluorescente porque possui uma configuração de um ou mais átomos cujos elétrons da camada de valência, ao receberem energia do *laser*, passam para um nível de maior energia (excitação) [5]. Quando não há mais excitação pelo *laser*, esses elétrons retornam à sua camada original e liberam a energia que receberam na forma de luz (emissão). Entretanto, se a exposição a

luz for excessiva, esses elétrons acabam sendo removidos do orbital de maior energia não podendo retornar ao orbital de origem, impedindo a emissão de fluorescência. Para evitar o *photobleach* o ideal é trabalhar com os *lasers* em baixa potência e manter o tempo de aquisição da imagem dentro dos limites da capacidade da molécula fluorescente.

1.3 Dinâmica mitocondrial: modelo de estudo para utilização das técnicas de Microscopia Confocal

As mitocôndrias são organelas celulares dinâmicas que possuem um ciclo complexo que envolve os processos de fissão, fusão e biogênese mitocondrial. Da mesma forma, a autofagia de mitocôndrias, denominada mitofagia, é um processo que favorece a sobrevivência celular porque permite a remoção de organelas degeneradas que possam contribuir com a liberação de espécies reativas de oxigênio (danosas às estruturas celulares) ou com a indução de apoptose [6].

O conceito de dinâmica mitocondrial inclui o movimento das mitocôndrias ao longo do citoesqueleto, a regulação da arquitetura mitocondrial (morfologia e distribuição) e a conectividade mediada pelos processos de fusão/fissão [7]. Pelo fato das mitocôndrias estarem constantemente se fusionando e dividindo (fissão), um descontrole nesses processos leva a alterações na sua morfologia. A interrupção da fusão causa a fragmentação da morfologia tubular normal em pequenas mitocôndrias em forma de bastões ou esferas. Já a interrupção da fissão gera longos filamentos tubulares interconectados [8].

No início do século XX com os avanços da microscopia de campo claro e das técnicas de cultura de tecidos, surgiram as primeiras descrições confiáveis sobre as alterações morfológicas e na dinâmica das mitocôndrias em células vivas [9]. Posteriormente, vários estudos descreveram a fusão, a formação de redes de

mitocôndrias (*mitochondrial networks*) e de mega mitocôndrias em tecidos de mamíferos [10, 11]. De fato, a análise por microscopia em tempo real (*time-lapse*) usando sondas fluorescentes específicas para mitocôndrias, permitiram a visualização detalhada de alterações na estrutura das mitocôndrias compatíveis com os processos de fusão e fissão em células vivas (de leveduras a hepatócitos) [12]. Também já foi estabelecido que o número e a morfologia das mitocôndrias são controlados pela velocidade dos processos de fusão e fissão [13]. Estudos recentes também descreveram as alterações drásticas na morfologia mitocondrial durante os estágios iniciais da morte celular por apoptose, quando ocorre fragmentação das redes e remodelamento das cristas mitocondriais [14].

1.4 Célula estrelada hepática

As células estreladas hepáticas (do inglês *hepatic stellate cells* - HSC) representam entre 5 a 8 % do total das células hepáticas e desempenham um papel importante no armazenamento de vitamina A, além de regularem a renovação da matriz extracelular através do controle de secreção de metaloproteinases e de seus inibidores [15]. O dano crônico ao fígado resulta em um processo inflamatório e pró-oxidativo que leva a ativação das HSC que, nessa condição, contribuem para o processo fibrogênico hepático. As HSC ativadas mudam seu fenótipo e passam a apresentar uma alteração no conteúdo e arranjo do citoesqueleto (formam “fibras de estresse”), um aumento da taxa de proliferação, um desequilíbrio entre a síntese e degradação da matriz extracelular e, ainda, uma perda na capacidade de armazenamento de gotas lipídicas [16, 17]. A linhagem celular GRX foi estabelecida a partir de granulomas produzidos em fígados de camundongos C3H/HeN, induzidos através de infecção experimental com *Schistosoma mansoni*. A cultura primária de células desses granulomas gerou esta linhagem de células miofibroblastóides com características de células estreladas

hepáticas no estado ativado [18]. A linhagem celular permanente GRX foi considerada por Geerts [19] a primeira linhagem celular descrita capaz de mimetizar características da HSC.

1.5 Resveratrol

O Resveratrol (RSV) é uma fitoalexina produzida por aproximadamente 31 gêneros de plantas – incluindo uvas vermelhas, amendoins e ameixas – em resposta a estresses ambientais e às infecções patogênicas como, por exemplo, ataque de fungos [20-22]. Muitos estudos *in vivo* e *in vitro* mostram que o RSV pode ativar direta ou indiretamente a sirtuina 1 (SIRT1), proteína relacionada com efeitos benéficos em intervenções terapêuticas de inúmeras doenças crônicas [23]. Trabalhos recentes mostram que o tratamento com RSV e a consequente ativação da SIRT1 resulta na biogênese mitocondrial [18] e na regulação da dinâmica mitocondrial influenciada pela expressão da proteína desacopladora UCP2 [6]. Outros trabalhos mostraram que o tratamento com RSV induz a autofagia através da interação entre a SIRT1 e a ATG5 e ATG7, duas proteínas envolvidas na sinalização do processo de autofagocitose [23]. Já foi demonstrado que o RSV induz uma diminuição de viabilidade e aumento de dano celular na GRX devido a seu efeito pró-oxidativo em 24 horas de tratamento com doses até 50µM.

A microscopia confocal permite a visualização de estruturas intracelulares com maior detalhamento do que a microscopia de fluorescência. O microscópio confocal possui uma abertura (*pinhole*), variável em seu diâmetro, entre a objetiva e a fotomultiplicadora que controla a passagem de fótons emitidos pela amostra. Apenas a luz oriunda da região ou fatia ótica que está em foco passa pela abertura, sendo a luz relativa às regiões fora de foco impedida de chegar ao detector devido ao anteparo do *pinhole*. Via software que controla o equipamento é possível modificar o diâmetro do *pinhole*, a potência do laser a incidir na amostra, a

voltagem da fotomultiplicadora, quantos *pixels* a serão originados na imagem, o tempo de varredura do laser na amostra, entre outros parâmetros de aquisição de imagem. As objetivas são motorizadas, e podem fazer imagens ao longo do eixo z da amostra. O microscópio confocal apresenta grande vantagem para o estudo de tecidos e células que requerem imagens em grande detalhamento com o controle dos diversos parâmetros de aquisição de imagem.

O presente estudo se propõe a mostrar como as ferramentas de aquisição e processamento das imagens podem ser utilizadas para a avaliação da dinâmica mitocondrial por microscopia confocal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Linhagem celular GRX e preparação das lâminas para microscopia Confocal

A linhagem celular GRX foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (HUCFF, UFRJ, RJ) e cultivada em DMEM[®] (Invitrogen[®], Inc., Carlsbad, CA, USA) suplementado com 5% Soro Fetal Bovino (Invitrogen[®], Inc., Carlsbad, CA, USA) sob atmosfera de CO₂ a 37°C. As células (3×10^4) foram semeadas sobre lamínulas circulares preparadas e esterilizadas por autoclave, colocadas em placas de 12 poços.

2.2 Tratamento com Resveratrol

O Resveratrol (Sigma-Aldrich[®], Inc., Saint Louis, MO, EUA) foi dissolvido em etanol (Merck[®], Darmstadt, Alemanha) em solução estoque de 100 mM e diluído sequencialmente em DMEM[®] (Invitrogen[®], Inc., Carlsbad, CA, USA) até as concentrações finais de uso: 1, 10 e 50µM. As células foram tratadas em

semiconfluência, com as doses mencionadas e com meio nos controle, por 24 horas.

2.3 Quantificação da massa *versus* potencial de membrana mitocondrial

Após o tratamento com RSV por 24 horas, as células foram incubadas por 30 minutos com meio DMEM[®] (Invitrogen[®], Inc., Carlsbad, CA, USA) sem soro contendo entre 75, 100 e 200nM de *MitoTracker[®] Green FM* (Molecular Probes[®], Inc. Eugene, OR, EUA), *MitoTracker[®] Orange CMTMRos* (Molecular Probes[®], Inc. Eugene, OR, EUA) (MTO), ou ambas as sondas juntas. As células foram lavadas em PBS tamponado (pH 7,4) e fixadas com paraformaldeído por aproximadamente 15 minutos a 4-8°C. As lamínulas foram retiradas das placas e montadas em lâminas num período que variou entre 2 a 3 horas antes da análise. A distância entre o local onde as células foram tratadas e o local onde se situa o microscópio confocal, associado ao problema em fixar células incubadas com MTG, exigiu um teste que envolveu a fixação celular utilizando 1,2 ou 4 % de paraformaldeído. Avaliado os resultados, ficou estabelecido, por fim, que a dose de incubação de MTO e MTG seria 200nM. Da mesma forma, a concentração de paraformaldeído utilizada foi 2%.

2.4 Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio com DCFH-DA[®]

Após 24 horas de tratamento com resveratrol, as células foram incubadas no escuro com 8µM de DCFH-DA[®] (Molecular Probes[®], Inc. Eugene, OR, EUA) e 2,5µg/mL de *Hoechst[®]33258* (Invitrogen[®], Inc., Carlsbad, CA, USA), um marcador fluorescente nuclear que é excitado e emite em 352/461nm respectivamente, em meio DMEM[®] sem soro por 30 minutos à 37°C. As células foram então lavadas em PBS tamponado e fixadas com paraformaldeído

2% por aproximadamente 15 minutos a 4-8°C. As lamínulas foram retiradas das placas e montadas em lâminas em um período que variou entre 2 a 3 horas antes da análise no microscópio confocal.

2.5 Colocalização entre mitocôndrias e lisossomos

Após o tratamento com RSV por 24 horas, as células foram incubadas por 30 minutos com meio DMEM[®] sem soro contendo entre 200nM de *MitoTracker[®] Green FM*, 100nm de *LysoTracker[®] Red* (Molecular Probes[®], Inc. Eugene, OR, EUA) ou ambas as sondas juntas. As células foram lavadas em PBS tamponado e fixadas com paraformaldeído 2% por aproximadamente 15 minutos a 4-8° C. As lamínulas foram retiradas das placas e montadas em lâminas em um período que variou entre 2 a 3 horas antes da análise no microscópio confocal.

2.6 Aquisição das imagens

As imagens foram obtidas por microscopia confocal utilizando o equipamento *FluoView[™] FV1000* (Olympus[®] Inc. Tóquio, Japão) pelo componente de aquisição do *software FluoView[®]* (Olympus[®] Inc. Tóquio, Japão) com a objetiva UPLSAPO 60X O NA:1.35 e as linhas de *lasers* de excitação de 405, 473 e 559nm. Foram escolhidas áreas aleatórias das lâminas e todas as imagens foram feitas ao longo do eixo z das células. As imagens foram adquiridas no modo sequencial.

2.7 Processamento e análise das imagens

As imagens foram processadas e analisadas pelo *software FluoView[®]* (Olympus[®] Inc. Tóquio, Japão) e *ImageJ* (National Institutes of Health, Rockville Pike, Bethesda, Maryland, EUA), um programa de domínio público.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Arquitetura Mitocondrial e Relação Massa X Potencial de Membrana Mitocondrial

Pela dupla marcação das mitocôndrias com os sondas fluorescentes *MitoTracker*[®] *Green FM* (MTG) e *MitoTracker*[®] *Orange CMTMRos* (MTO) foi possível acessar a distribuição e a morfologia mitocondrial, medindo, respectivamente, a massa e a atividade da organela no momento em que as células GRX foram fixadas. O MTG é um marcador mitocondrial com uma excitação máxima de 490nm e emissão máxima em 516nm. Esse se torna fluorescente apenas quando se encontra no ambiente dos lipídios de membrana da mitocôndria na célula viva, sendo utilizado para localização e medição da massa mitocondrial independente do potencial de membrana dessa organela. Esse fato resulta em um nível de *background* consideravelmente alto na célula uma vez que a sonda tende a se espalhar pelo citoplasma. O MTO é um marcador mitocondrial que se excita ao máximo em 554nm e emite no máximo em 576nm. É bem retido após fixação com paraformaldeído, sendo dependente da ocorrência do potencial de membrana para se acumular nessas organelas.

Para averiguar a distribuição e morfologia das mitocôndrias nas GRX foi feita uma análise visual das imagens obtidas com os dois canais sobrepostos (**figura 1**). As células controle apresentaram mitocôndrias com formato pontual e localizadas de maneira perinuclear. Já nas células tratadas com 1, 10 e 50 μ M de resveratrol (RSV), constatou-se uma mudança na rede mitocondrial, que se apresentou distribuída ao longo de todo o citoplasma. Ficou evidenciado pelas imagens que o resveratrol 50 μ M induz uma mudança na morfologia das mitocôndrias e na arquitetura da rede mitocondrial.

A relação massa *versus* potencial de membrana das mitocôndrias foi estabelecida pela quantificação da fluorescência de ambos os

corantes no *software FluoView*[®]. Em cada célula da imagem foi traçada uma Região de Interesse (do inglês *Region of Interest - ROI*) na forma de um traço sobre uma região perinuclear em que se encontravam mitocôndrias (**figura 2.a**). Todas as ROI possuíam o mesmo tamanho. Os valores da quantificação da fluorescência foram obtidos pela ferramenta de medição do *software FluoView*[®]. Essa ferramenta dá o valor da média da fluorescência da ROI para cada canal. Com esses valores se faz uma média do somatório das médias das ROI das imagens de cada grupo experimental, obtendo-se um valor de fluorescência média.

A **figura 2.b** apresenta um gráfico da quantificação da fluorescência média emitida por ambos os *MitoTracker*[®] em resposta ao tratamento com as diferentes concentrações de resveratrol. A análise do gráfico mostrou que tratamento com RSV não alterou a massa mitocondrial, mas sugere que o potencial de membrana dessas organelas diminui com o aumento da concentração de RSV.

Para visualizar a localização e densidade das mitocôndrias mais precisamente, a aquisição das imagens no eixo z foi muito importante, pois a diferença da intensidade da fluorescência entre uma organela e outra pode estar no fato dessas ocuparem diferentes planos de foco dentro do volume do citoplasma. Com a aquisição no modo *photon counting*, utilizando os *lasers* em baixas potências, procurou se evitar o *photobleach*. O modo sequencial permitiu adquirir as imagens dos canais do MTG e MTO de forma separada, evitando um possível *crosstalk* que acarretaria em erro na quantificação da fluorescência. Esse erro aconteceria por haver mais fluorescência do que deveria sendo captada em um determinado canal, pelo fato dos dois marcadores estarem emitindo fótons numa mesma faixa de comprimento de onda. Houve um grande *background* na marcação com MTG, dificultando a identificação visual das mitocôndrias somente pela análise imagem captada. Esse problema foi contornado pela visualização do canal do MTG junto ao canal do MTO, que por apresentar baixo nível de

background, facilitou a identificação das mitocôndrias a observação da sua morfologia.

Resultados prévios obtidos por citometria de fluxo e espectrofluorimetria indicaram que a massa mitocondrial aumenta conforme aumenta a concentração de RSV. No presente estudo ficou evidenciado que a massa permanece a mesma. Entretanto, não há discrepância entre os resultados dessas análises. A citometria de fluxo e a espectrofluorimetria mostraram o aumento da massa mitocondrial pela leitura da fluorescência total da célula no comprimento de onda emitido pelo MTG. A investigação da intensidade da fluorescência no canal do MTG ficou comprometida pelo alto nível de *background* causado pela fixação das células. No entanto, foi possível a análise das imagens porque todas as amostras (controle e tratadas) foram preparadas nas mesmas condições, com a mesma concentração de paraformaldeído e de MTG. Além disso, as imagens foram adquiridas com os mesmos parâmetros. Assim, a intensidade do *background* foi considerada igual, na média, para todas as imagens. Como a ROI foi traçada como uma linha, o que se mediu foi a massa das mitocôndrias como estruturas unitárias e não a massa total dessas organelas no citoplasma. Por esse método de análise de imagens, foi mostrado que a massa das mitocôndrias individualmente não sofre mudanças relevantes com o aumento da concentração do RSV.

A quantificação da fluorescência do MTO por espectrofluorimetria e a avaliação da atividade mitocondrial por citometria de fluxo, através da marcação com a sonda JC-1, confirmaram o resultado da análise das imagens, mostrando que há uma queda na atividade mitocondrial, com o aumento da concentração de RSV.

Demonstramos com isso que a microscopia confocal pode ser utilizada como uma técnica complementar para avaliação da atividade de membrana e quantificação da massa mitocondrial de uma célula.

3.2 Medição de Espécies Reativas de Oxigênio

Para avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio utilizou-se o DCFH-DA[®], composto derivado da fluoresceína. Após penetrar nas células por difusão passiva, os grupos acetatos são hidrolisados por esterases e o DCF livre é oxidado tornando-se fluorescente. Seu pico de excitação é em aproximadamente 500nm e o de emissão em torno de 530nm. Assim como a fluoresceína, o DCF também apresenta grande suscetibilidade ao *photobleach*, por isso as imagens foram feitas no modo *photon counting*. Os parâmetros de aquisição foram os mesmos para todas as imagens, tendo sido tomado como padrão para aquisição, os dados de aquisição das imagens das células tratadas com 50 μ M de RSV que, segundo resultados preliminares, apresentaram maior fluorescência por produzirem mais espécies reativas de oxigênio.

Foi realizada a quantificação da fluorescência pelo software *FluoView*. Em cada célula foi traçada uma Região de Interesse (ROI) circular e adjacente ao núcleo (**figura 3.a**). Pela ferramenta de medição do programa se obteve a média da fluorescência daquela área. Com os valores da quantificação de cada célula foi feita uma média da intensidade de fluorescência do DCF para cada grupo experimental, que estão representados no gráfico da **figura 3.b**. Pela análise do gráfico, a intensidade da fluorescência do DCF aumenta de maneira dose-dependente, indicando que o RSV induz um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos por citometria de fluxo e espectrofluorimetria.

Para este estudo, foi importante a quantificação da fluorescência via ferramenta de análise digital. Apenas uma avaliação visual não

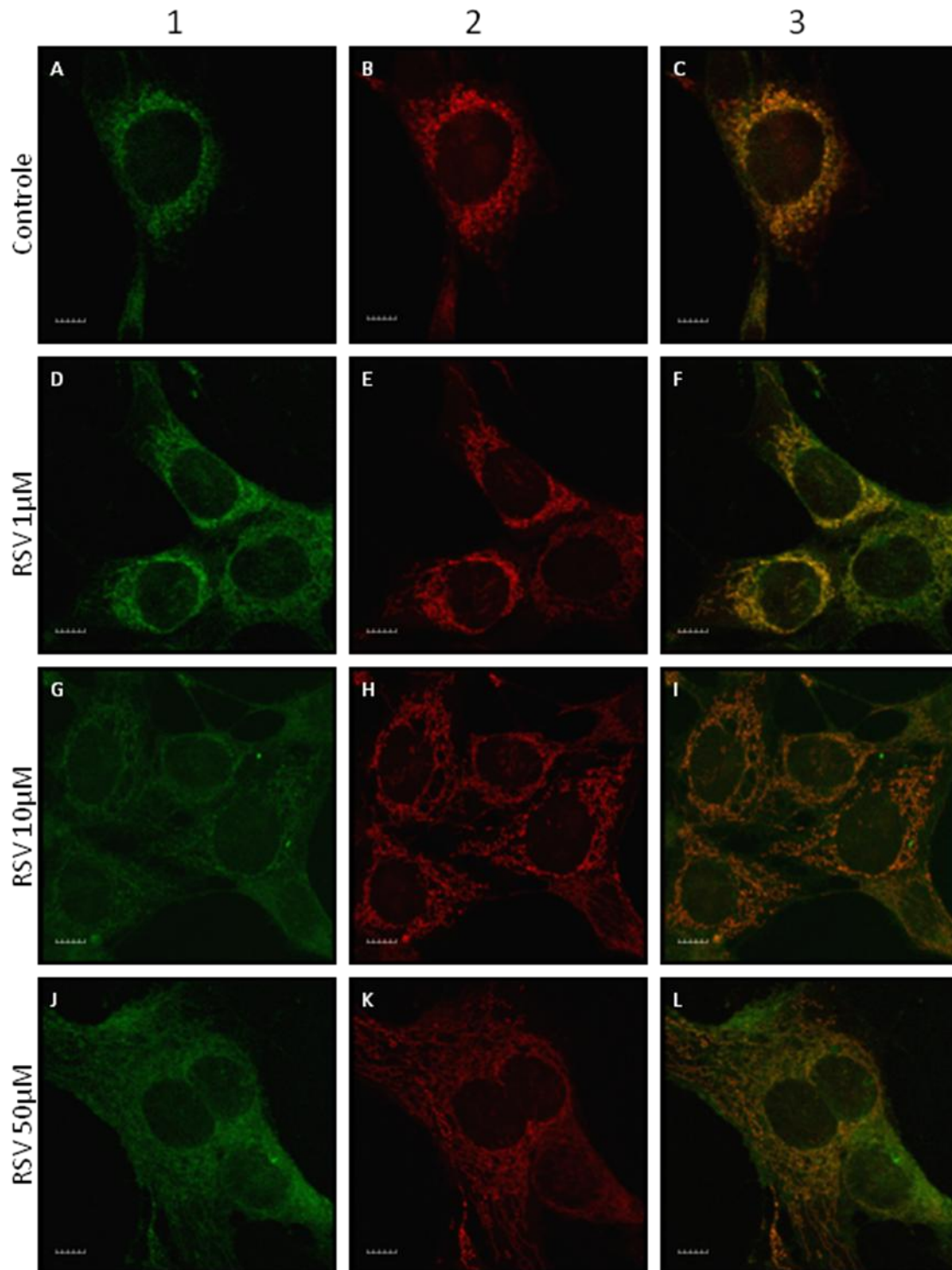


Figura 1. Coluna 1 apresenta as imagens no canal do *MitoTracker[®]Green*. Coluna 2 apresenta as imagens no canal do *MitoTracker[®]Orange*. Coluna 3 apresenta a sobreposição de ambos *MitoTracker[®]*. Imagens de A-C: células controle. D-F células tratadas com resveratrol (RSV) 1µM. G-I: células tratadas com RSV 10µM. J-L: células tratadas com RSV 50µM. Escala representa 10µm.

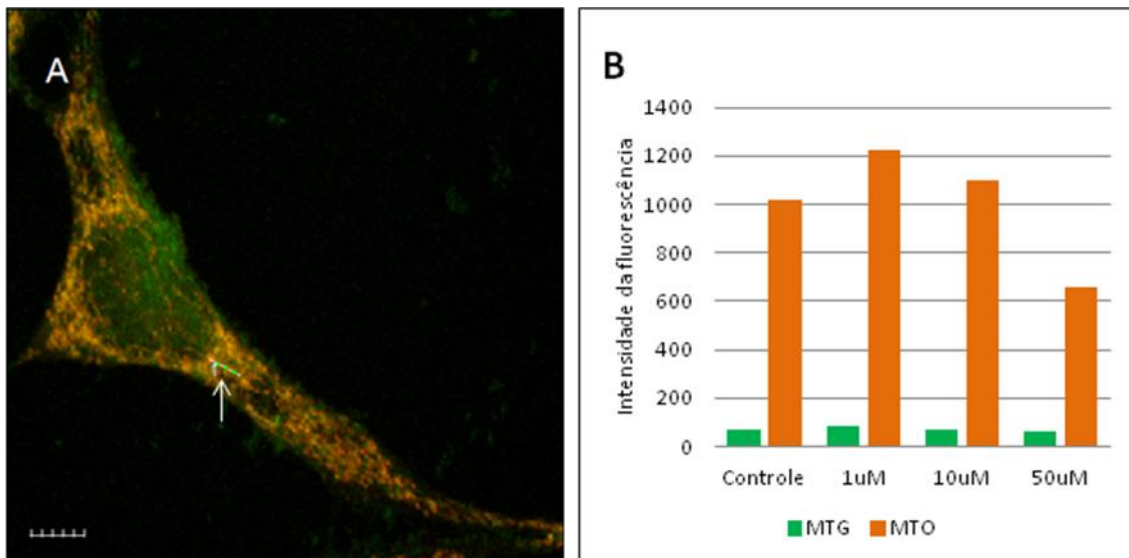


Figura 2. Imagem A: Seta indica a Região de Interesse (ROI) escolhida na célula para a quantificação da fluorescência. Escala representa 10 μ m. Imagem B: gráfico das médias da fluorescência das ROI para *MitoTracker*[®]Green (MTG) e *MitoTracker*[®]Orange (MTO).

seria confiável pelo fato de se estar quantificando a fluorescência de uma área. A área, diferente de uma linha ou ponto, que são discretos, pode apresentar mais *pixels* com discrepância entre si quanto à intensidade de fluorescência. Portanto, é necessária uma avaliação metodológica mais apurada como a quantificação digital da fluorescência.

3.3 Mitofagia e co-localização

Para verificar a ocorrência de mitofagia e se há o aumento desse processo conforme o aumento da dose de resveratrol foram utilizados as sondas *MitoTracker*[®] Green FM (MTG) e *Lysotracker*[®] Red DND-99 (LYS) para a análise de colocalização. O LYS é um corante fluorescente com grande seletividade para a marcação de organelas ácidas em células vivas, em específico, lisossomas. Possui boa retenção após fixação com paraformaldeído e tem como comprimento de onda de excitação e emissão 577/590nm, respectivamente. O MTG foi utilizado com o propósito de marcar

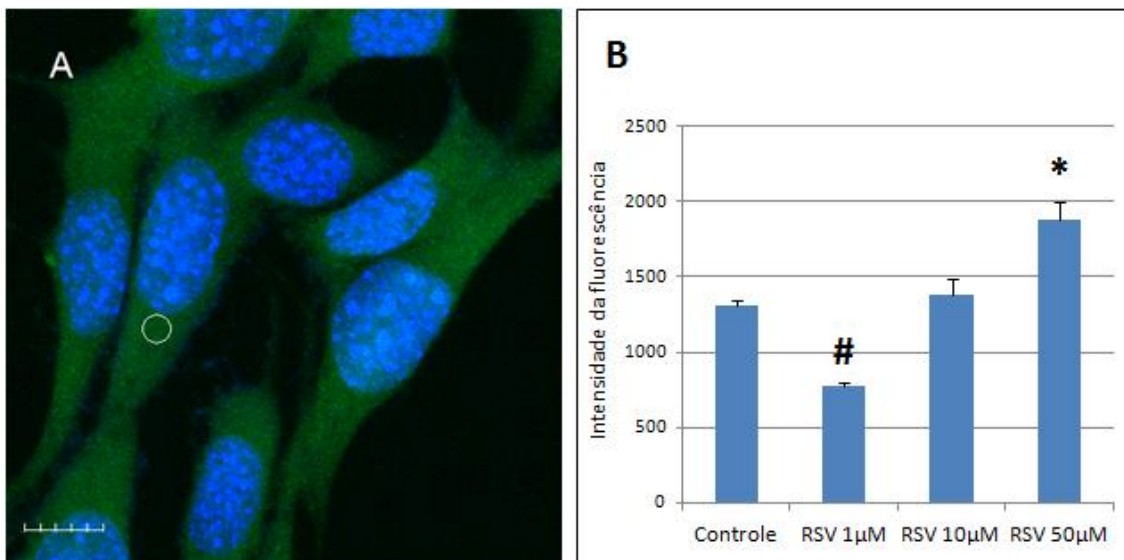


Figura 3. Imagem A: círculo representa a Região de Interesse (ROI) feita na região perinuclear de cada célula da imagem para a quantificação da fluorescência. Em azul estão marcados os núcleos com *Hoescht* e em verde a marcação do DCF. A escala representa 10µm. Imagem B: Gráfico das médias da fluorescência das ROI para o DCF.

as mitocôndrias por possuir seu espectro de excitação e emissão diferente do LYS.

Sabendo que as mitocôndrias e lisossomas são estruturas muito pequenas para a análise por microscopia ótica, foi feita uma deconvolução das imagens que foram tomadas. A calculadora Nyquist (Huygens Core[®]) foi utilizada para determinar o comprimento e volume que cada *pixel* deveria ocupar na imagem a ser adquirida. Essa ferramenta é importante quando se deseja estudar colocalização porque define o tamanho ideal da imagem para corresponder com a área visualizada. Entretanto, o tempo de aquisição de imagem ficou muito alto, acarretando em possível *photobleach*. Por isso, foi utilizado o modo de aquisição *photon counting*.

Para realizar a deconvolução foi utilizado o *software ImageJ*. Primeiro foi definido o *thresholding* de cada canal ao acertar um valor mínimo de fluorescência que correspondesse ao das estruturas analisadas. Após, foi calculado o PSF (do inglês *Point Spread Function*), que é o valor que corresponde ao ponto formador da imagem ideal. Com o valor do PSF, foi realizada a deconvolução

que recuperou a fluorescência dos *pixels* correspondentes antes de sofrerem aberração pela difração da lente objetiva.

Com a imagem deconvoluída, obteve-se maior nitidez para diagnosticar a localização das mitocôndrias e lisossomos. Como o MTG não permanece bem retido nas mitocôndrias após a fixação com paraformaldeído, um sinal de *background*, cuja intensidade de fluorescência se equiparava com a das mitocôndrias, impediu que fosse possível o uso de coeficientes estatísticos.

Para averiguar, então, a presença colocalizada de mitocôndrias e lisossomos, utilizou-se o método de colocação baseada em objeto pela ferramenta de colocação do *software FluoView*. Primeiramente foi inferido um novo valor de *thresholding*. Esse valor foi obtido através do gráfico da intensidade de fluorescência de um canal por ele mesmo. Junto ao gráfico aparece a imagem dos canais da fluorescência e um novo canal que corresponde a uma máscara de *thresholding*. Um eixo do gráfico ficou estabelecido como tendo intensidade zero. Pelo outro eixo, foi encontrado o valor de *thresholding* para a estrutura visualizada no canal. Conforme o eixo do gráfico de *thresholding* se moveu, a máscara do terceiro canal delineava os *pixels* correspondentes àquela intensidade na imagem. Desse modo, foi encontrado o valor de *thresholding* ao serem visualizadas as organelas pela máscara.

Foi encontrado para ambos os canais o valor do *thresholding*. Em um terceiro gráfico, semelhante aos anteriores, porém um canal pelo outro, foi adicionado o valor do *thresholding* respectivo de cada canal. Uma nova máscara apareceu na imagem relativa aos *pixels* colocalizados. Foram extraídos apenas dessa máscara os *pixels* colocalizados e gerada uma imagem dos canais colocalizados (**figura 4**).

As células do grupo controle e as tratadas com RSV 1 μ M praticamente não apresentam colocação entre as mitocôndrias e lisossomos, apresentando basicamente ruído e o restante do *background* cuja intensidade de fluorescência foi igual ou superior

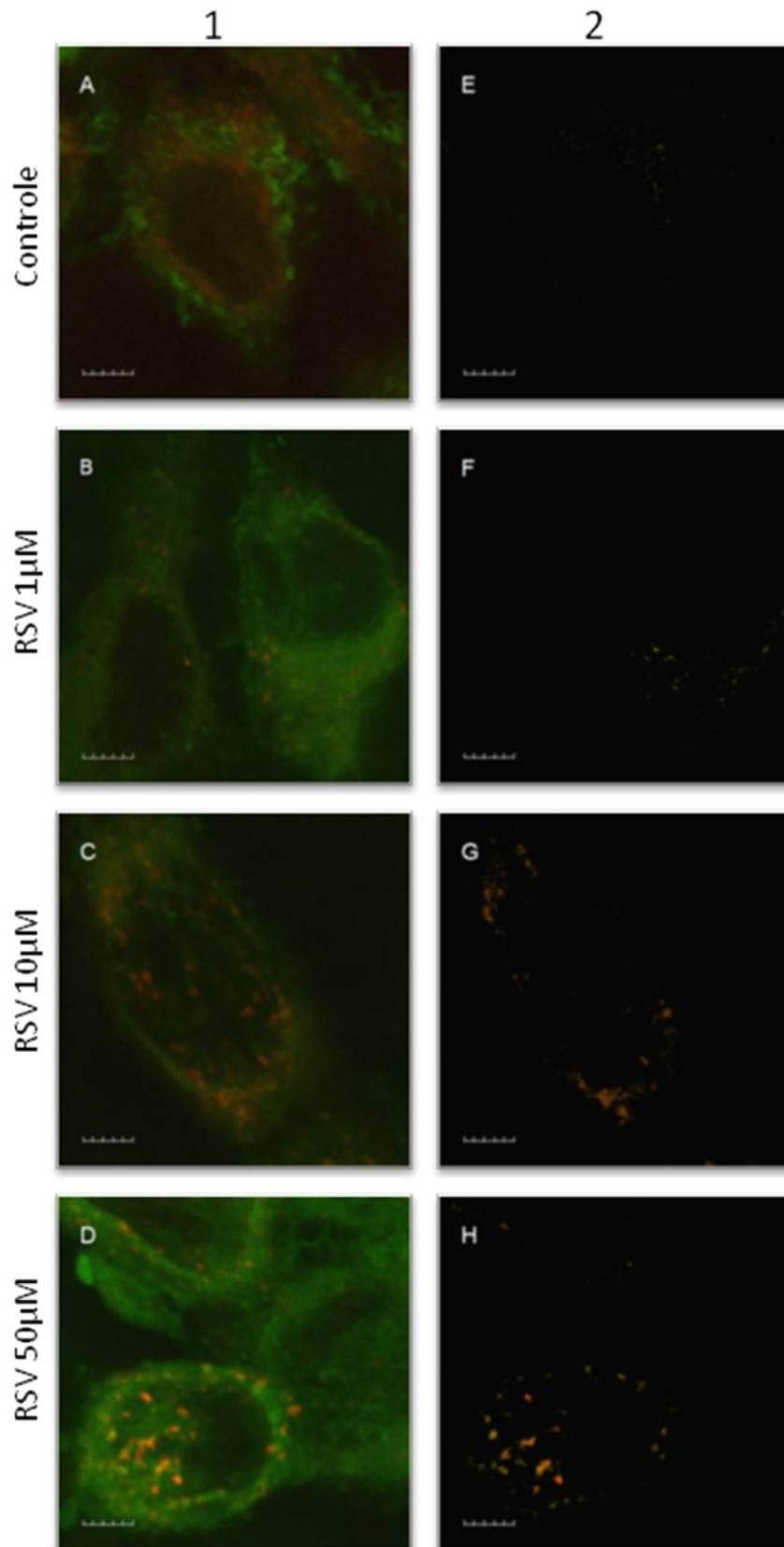


Figura 4. Coluna 1 apresenta as imagens antes de serem deconvoluídas. Coluna 2: respectivas imagens após deconvolução e extração do *thresholding* para colocalização. Imagens com *zoom* de 5x e a escala representa 5µm.

ao valor de *thresholding*. Nas células tratadas com RSV 10 e 50 μ M apareceram regiões de colocalização que indicaram a mitofagia.

A colocalização baseada em objeto foi uma alternativa à falta de coeficientes estatísticos. Essa ausência foi devida ao *background* do MTG ter apresentado um nível de fluorescência muito alto e pela diferença na morfologia das organelas. Essa ferramenta permitiu avaliar a presença/ausência de mitofagia visualmente, utilizando o método de escolha do *thresholding* para isolar os *pixels* colocalizados.

4 CONCLUSÃO

A microscopia confocal é uma técnica que pode ser aplicada para diversos fins de análise, tanto quantitativos quanto qualitativos. Pode complementar os resultados obtidos por outros métodos de estudo.

Mesmo sendo um método de estudo eficiente, a microscopia confocal requer cuidados no preparo das amostras e na aquisição das imagens.

Apesar de estarem disponíveis *softwares* de melhoramento de imagem, o cuidadoso preparo da amostra e a padronização de técnicas de aquisição de imagens sempre é o ideal. Porém, a utilização de *softwares* de processamento de imagem é um recurso eficaz para a obtenção de informações que sem os quais seriam perdidas devido a efeitos óticos ou problemas no preparo da amostra.

Através das técnicas utilizadas de aquisição de imagens pelo microscópio confocal, processamento e análise de imagens, foi possível avaliar a dinâmica das mitocôndrias em resposta às diferentes concentrações de resveratrol.

Pelas imagens ficou evidente que o resveratrol é capaz de modificar a dinâmica das mitocôndrias, especialmente quando utilizado na concentração de 50 μ M.

5 REFERÊNCIAS

- [1] PADDOCK, Stephen W.. An Introduction to Confocal Imaging. In: PADDOCK, Stephen W.. *Confocal Microscopy: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, 1999. Cap. 1, p. 1-34.
- [2] LAKOWICZ, Joseph R.. Instrumentation for Fluorescence Spectroscopy: 2.6 Photomultiplier Tubes. In: LAKOWICZ, Joseph R.. *Principles of Fluorescence*. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006. Cap. 2, p. 44-49.
- [3] BOLTE, S.; CORDELIÈRES, F. P.. A guided tour into subcellular analysis in light microscopy. *Journal Of Microscopy*, West Sussex, v. 224, p.213-232, 03 dez. 2006.
- [4] PADDOCK, Stephen W.. An Introduction to Confocal Imaging: Autofluorescence. In: PADDOCK, Stephen W.. *Confocal Microscopy: Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, 1999. Cap. 1, p. 24.
- [5] LAKOWICZ, Joseph R.. Quenching of Fluorescence. In: LAKOWICZ, Joseph R.. *Principles of Fluorescence*. 3. ed. Baltimore: Springer, 2006. Cap. 8, p. 278-327.
- [6] YOULE, R.J. & NARENDRA, D.P. Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews* 12:9–14, 2011.
- [7] LIESA, M. et al. Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease *Physiol Rev* 89: 799–845, 2009.
- [8] CHEN, H. & CHAN, D.C. Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human Molecular Genetics*, 14: R283–R289, 2005.
- [9] LEWIS, M.R. & LEWIS, W.H. Mitochondria in tissue culture. *Science* 39:330–333, 1914.
- [10] BRANDT, J.T. et al. Structure of rat-liver mitochondria: re-evaluation. *Biochem Biophys Res Commun* 59: 1097–1103, 1974.
- [11] ASANO, M. et al. H. Induction of megamitochondria in mouse hepatocytes by nialamide. *J Electron Microsc* 26: 141–144, 1977.
- [12] KARBOWSKI, M. & YOULE, R.J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 10: 870–880, 2003.
- [13] BEREITER-HAHN, J. & VOTH, M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc Res Tech* 27: 198–219, 1994.
- [14] BATALLER, R. & BRENNER, D.A. Liver Fibrosis, *J. Clin. Investigation*, 115(2): 209-218, 2005.
- [15] HAUTEKETEE, M.L. & GEERTS, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. *Virchows Archives*. 430, 195-207, 1997.
- [15] FRIEDMAN, S.L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, and integrated cellular response to tissue injury. *Journal of Biological Chemistry*. 275, 2247-2250, 2000.

- [16] BOROJEVIC, R. et al. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In vitro Cellular Development Biology* 21, 382–390, 1985.
- [17] GEERTS, A. History, heterogeneity, developmental biology. And functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin. Liver Dis.* 21: 311-335, 2001.
- [18] SIGNORELLI, P. & GHIDONI, R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16, 449-466, 2005.
- [19] DE LA LASTRA, C.A. & VILLEGAS, I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanism and clinical implications. *Biochemical Society Transactions* 35, 1156-1161, 2007.
- [20] PERVAIZ, S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *The FASEB journal* 17, 1975-1985, 2003.
- [21] CHUNG, S. et al. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys.* 501: 79-90, 2010.
- [22] CSISZAR, A. et al. Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297:H13-H20, 2009.
- [23] MORSELI et al. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J. Cell Biol.* 4:515–629, 2011.