

Figura 1: Esquema ilustrativo mostrando que as células GRX, representativas das Células Estreladas Hepáticas (HSC), apresentam características intermediárias de ativação, podendo em cultura serem induzidas tanto para um fenótipo quiescente quanto para um mais ativado.

INTRODUÇÃO

A fibrose hepática é definida como sendo o resultado de dano contínuo ao fígado. As células estreladas hepáticas (HSC) participam ativamente deste processo. Uma vez ativadas, estas células modificam seu fenótipo quiescente lipocítico, caracterizado pela capacidade de armazenar vitamina A em gotas lipídicas, para um fenótipo miofibroblástico proliferativo, caracterizado pela perda das gotas lipídicas e pelas alterações do citoesqueleto celular relacionado ao aumento da expressão e rearranjo das fibras de α -actina de músculo liso (α -SMA), conforme ilustrado na figura 1. No estado ativado, as HSC também promovem uma alteração da matriz extracelular hepática promovendo o aumento da síntese de colágeno I (Col-1), característico das cicatrizes fibróticas.

Já foi demonstrado que a expressão de PPAR γ , um fator de transcrição relacionado à lipogênese, é alta em tecidos hepáticos normais, sobretudo nas HSC quiescentes. Por outro lado, em pacientes cirróticos em que a fibrose hepática está bem estabelecida, já foi demonstrado um aumento na expressão de Caveolina-1 (Cav-1), uma proteína capaz de regular vários comportamentos celulares tais como a proliferação celular.

A linhagem GRX é um tipo celular representativo de HSC em estado intermediário de ativação, podendo ser induzida tanto para um fenótipo quiescente quanto para um estado mais ativado. Em nosso laboratório estabelecemos duas linhagens de GRX, uma que superexpressa PPAR γ e outra que superexpressa Caveolina-1 para estudar o papel dessas duas proteínas sobre o estado de ativação das GRX.

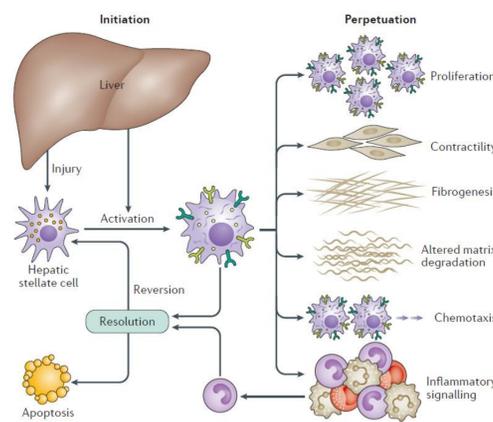


Figura 2: Esquema ilustrativo da ativação de HSCs.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi investigar a influência da expressão proteica do PPAR γ e da Cav-1 no estado de ativação das HSC, utilizando as linhagens GRX, GRX P γ e GRX^{EGFP-Cav}.

MATERIAIS E MÉTODOS

As células GRX^{EGFP-Cav} foram cultivadas em meio DMEM Low (1g/L de glicose), GRX P γ acrescido de 5% de soro fetal bovino. O aumento do conteúdo protéico do PPAR γ e da Cav-1 na GRX P γ e na GRX^{EGFP-Cav} foi confirmado através da técnica de *immunoblotting*. Nas células GRX^{EGFP-Cav} a quantificação da expressão das proteínas marcadoras do estado de ativação da HSC (α -SMA e Col-1) foi realizada por imunocitoquímica de fluorescência. A marcação do Col I e da α -SMA foi feita usando anticorpos primários correspondentes diluídos em solução de bloqueio (5% de albumina em PBS) na concentração de 1:500. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 647 diluído em solução de bloqueio na concentração de 1:1000. Para marcação do núcleo destas células, foi usado o corante fluorescente Hoechst 33342. Após as lavagens com PBS, as lâminulas foram dispostas sobre lâminas histológicas usando o meio de montagem *Fluormount*. As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência confocal FV1000 - Olympus no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS (CMM-UFRGS), deconvoluídas e analisadas pelo *software ImageJ* (National Institutes of Health, Rockville Pike, Bethesda, Maryland, EUA).

Nas células GRX P γ a quantificação foi feita por citometria de fluxo. As células foram tripsinizadas, ressuspensas em 200 mL de PBS, as proteínas foram reveladas usando-se os mesmos anticorpos específicos e analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA).

RESULTADOS

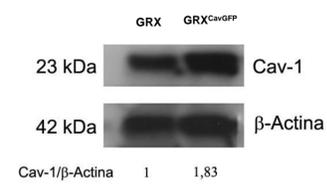


Figura 3: Imunoquantificação de Cav-1 e β -actina por Western Blot em células GRX e GRX^{EGFP-Cav}

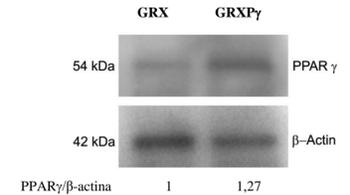


Figura 4: Imunoquantificação de PPAR γ e β -actina por Western Blot em células GRX e GRX^{P γ}

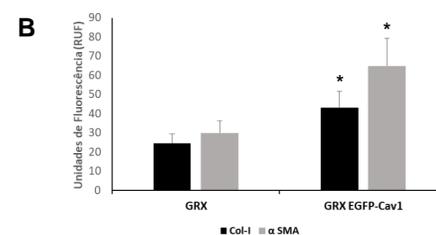
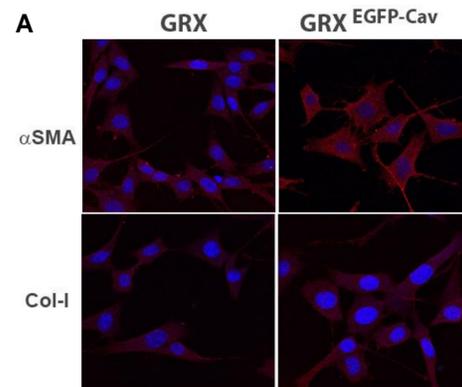


Figura 5: Expressão das proteínas Colágeno-I (Col-I) e alfa actina de músculo liso (α SMA) nas células GRX e GRX^{EGFP-Cav}: (A) imagens de microscopia confocal; núcleos revelados com Hoechst. Aumento de 600x. (B) Quantificação da fluorescência, conforme descrito em materiais e métodos.

Os resultados representam a média \pm DP; (*) $P < 0,05$, comparado com as células GRX

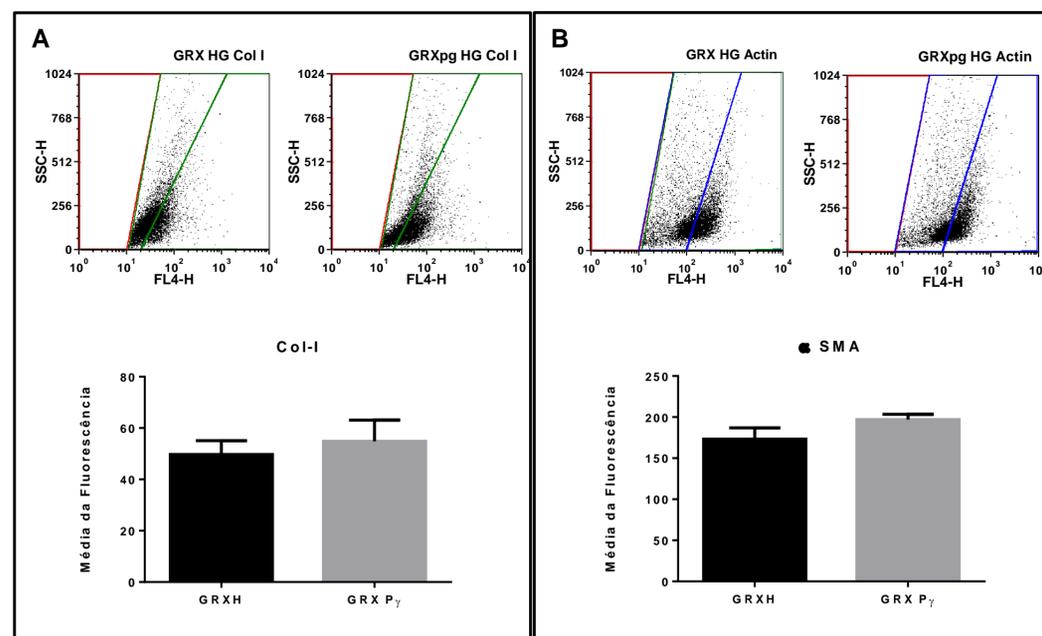


Figura 6: Expressão das proteínas Colágeno-I (Col-I) e alfa actina de músculo liso (α SMA) nas células GRX e GRX^{P γ} medidas por citometria de fluxo, conforme descrito em materiais e métodos. (A) Expressão de Col-I, (B) Expressão de α SMA. A quantificação pela intensidade da fluorescência. SSC-H, complexidade do citoplasma; FL4-H, Alexa flúor 647. Os resultados representam a média \pm DP.

CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

O significado da expressão de Cav-1 e PPAR γ em fígados normais e cirróticos é pouco conhecido. O aumento de α -SMA e Col-1 na linhagem GRX^{EGFP-Cav} sugere uma modulação dessa célula para o estado ativado miofibroblástico, que caracteriza danos no fígado. Por outro lado, não houve aumento da expressão desses marcadores de ativação nas células GRX^{P γ} , que por expressarem mais PPAR γ deveriam representar um estado mais quiescente das HSCs. Mais estudos estão sendo desenvolvidos com a finalidade de entender o efeito da super expressão das proteínas Cav-1 e PPAR γ nas células GRX, que são um modelo bem conhecido de HSC.