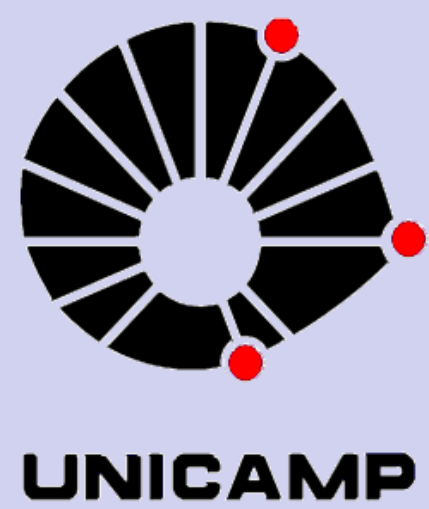


POLIPLÓIDIA E REMODELAÇÃO DA CROMATINA DE HEPATÓCITOS EM CAMUNDONGOS DIABÉTICOS E IDOSOS.

Silva, IS ; Ghiraldini, FG ; Mello, MLS.

DEPARTAMENTO DE ANATOMIA, BIOLOGIA CELULAR E FISILOGIA E BIOFÍSICA,
INSTITUTO DE BIOLOGIA, UNICAMP

Agências Financiadoras: PIBIC/CNPq e FAPESP
Palavras-Chaves: Cromatina - Hepatócitos - Poliploidia
ss.isabela@gmail.com



Introdução

A remodelação da cromatina e o aumento da poliploidia têm sido descritos em hepatócitos de camundongos diabéticos. No entanto, estas observações foram restritas a camundongos non-obese diabetic (NOD) sob uma única condição de hiperglicemia. Como a hiperglicemia afeta a sobrevivência e a longevidade, e as vias de sinalização relacionadas com a insulina são muito sensíveis à poliploidia no fígado, no presente estudo investigaram-se as mudanças na poliploidia e na remodelação da cromatina em hepatócitos de camundongos sob níveis crescentes de glicemia (NOD+) e normoglicêmicos idosos (BALB/c) por meio de análise de imagens.

Metodologia

Animais (camundongos fêmea)

- NOD normoglicêmicos com 8 semanas de idade, adultos jovens (glicemia: 90-100 mg/dL);
- BALB/c normoglicêmicos com 8 semanas de idade, adultos jovens (glicemia: 90-100 mg/dL);
- NOD com hiperglicemia moderada, adultos (glicemia: 200-400 mg/dL);
- NOD com hiperglicemia severa, adultos (glicemia: > 500 mg/dL);
- BALB/c normoglicêmicos com 56 semanas de idade.
- 3-6 espécimes por condição experimental

Topoquímica para DNA

Imprints de fígado fixados em etanol, ácido acético por 1 min.

Reação de Feulgen (4M HCl – 60 min - 25°C)

Análise de Imagens de células submetidas à reação de Feulgen.

- Equipamento Carl Zeiss Axiophot 2/Kontron e software Kontron KS400-3.
- Parâmetros: área nuclear, valores de média cinza/núcleos, desvio padrão dos valores totais densitométricos/núcleo (= SDtd), entropia (número de bits necessários para armazenar os valores densitométricos por imagem de núcleo) e energia (calculado a partir de histograma densitométrico).
- Valores de Feulgen-DNA (em unidades arbitrárias) = absorbâncias x área nuclear

Mnase

As diferenças na acessibilidade da cromatina foram avaliadas pelo ensaio Mnase de núcleos de hepatócitos isolados por ultracentrifugação com gradiente de sacarose. As amostras foram encubadas com MNase (Sigma®) por 10 min a 25°C. A reação foi interrompida com EGTA/EDTA a 4°C por 5 min seguido de extração de DNA e eletroforese em gel de agarose.

Estatística

Todos os cálculos e estatísticas foram realizadas com o software Minitab™ (USA).

Resultados

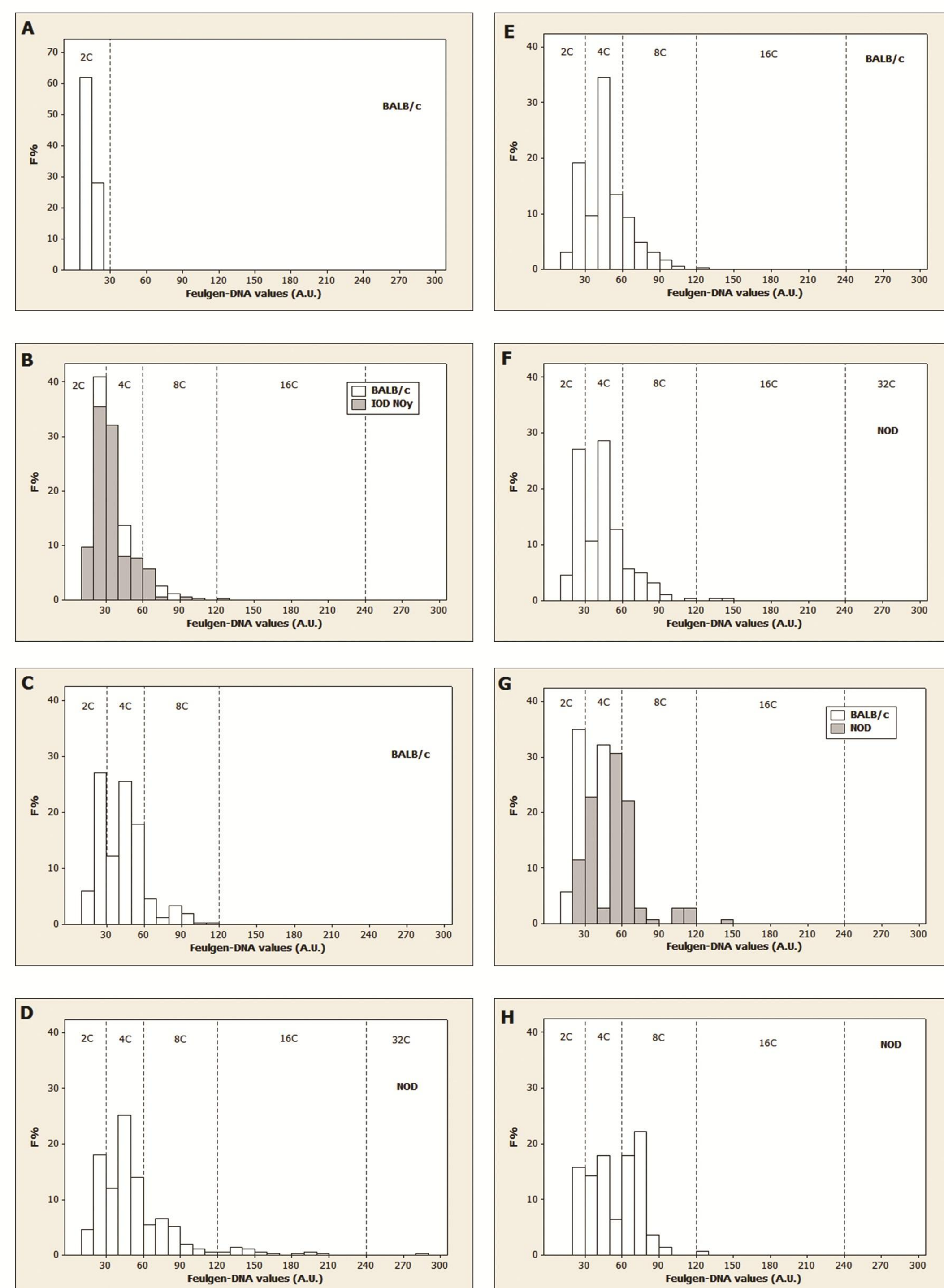


TABELA 1: Quantidades de Feulgen-DNA em hepatócitos de camundongos.

CELULAS	Idade dos animais (semanas)	Linhagem dos animais	Estado Glicêmico	No. de animais	Valores Feulgen-DNA Md	n
Linfócitos*	8	BALB/c	Normal	3	13.85	90
Hepatócitos	8	NOD	Normal	5	30.73 ^a	350
		BALB/c	Normal	5	30.31 ^a	350
	56	BALB/c	Normal	6	43.32 ^b	419
		NOD	Hiperglicemia moderada	3	51.75 ^c	140
	19-29	NOD	Normal**	3	56.28 ^c	140
			BALB/c	Normal**	3	37.52 ^d
	19-38	NOD	Hiperglicemia severa	5	45.82 ^e	350
			Normal***	4	42.32 ^b	280
		BALB/c	Normal***	5	44.96 ^f	350

* Controle da classe de DNA 2C; ** Animais com mesma idade do NOD com hiperglicemia moderada; *** Animais com mesma idade do NOD com hiperglicemia severa; A.U., unidades arbitrárias; Md, mediana; n, número de núcleos contados. Diferentes letras sobscritas (a-f) para a coluna Md e médias com diferença significativa para P_{0.05} (Mann-Whitney test).

TABELA 3: Parâmetros de imagem textual de manchas-Feulgen de hepatócitos.

Idade dos animais (semanas)	Linhagem dos animais	Estado Glicêmico	SDtd		Entropia		Energia	
			X	S	X	S	X	S
8	NOD	Normal	9.30 ^a	2.41	5.12 ^a	0.38	0.035 ^a	0.010
	BALB/c	Normal	10.69 ^b	3.22	5.29 ^b	0.43	0.032 ^b	0.011
56	BALB/c	Normal	11.67 ^c	2.78	5.45 ^c	0.37	0.028 ^c	0.009
	NOD	Hiperglicemia moderada	8.51 ^a	3.32	4.93 ^d	0.50	0.042 ^d	0.014
	NOD	Normal*	8.71 ^a	1.83	5.05 ^{a,d}	0.31	0.036 ^d	0.009
		BALB/c	Normal*	11.23 ^{b,c}	2.09	5.41 ^e	0.24	0.027 ^e
19-38	NOD	Hiperglicemia severa	11.71 ^c	3.91	5.40 ^{b,c}	0.53	0.029 ^{b,c}	0.013
		Normal**	11.16 ^{b,c}	2.93	5.37 ^{b,c}	0.41	0.030 ^{b,c}	0.011
	BALB/c	Normal**	12.85 ^d	2.80	5.57 ^e	0.34	0.025 ^e	0.008

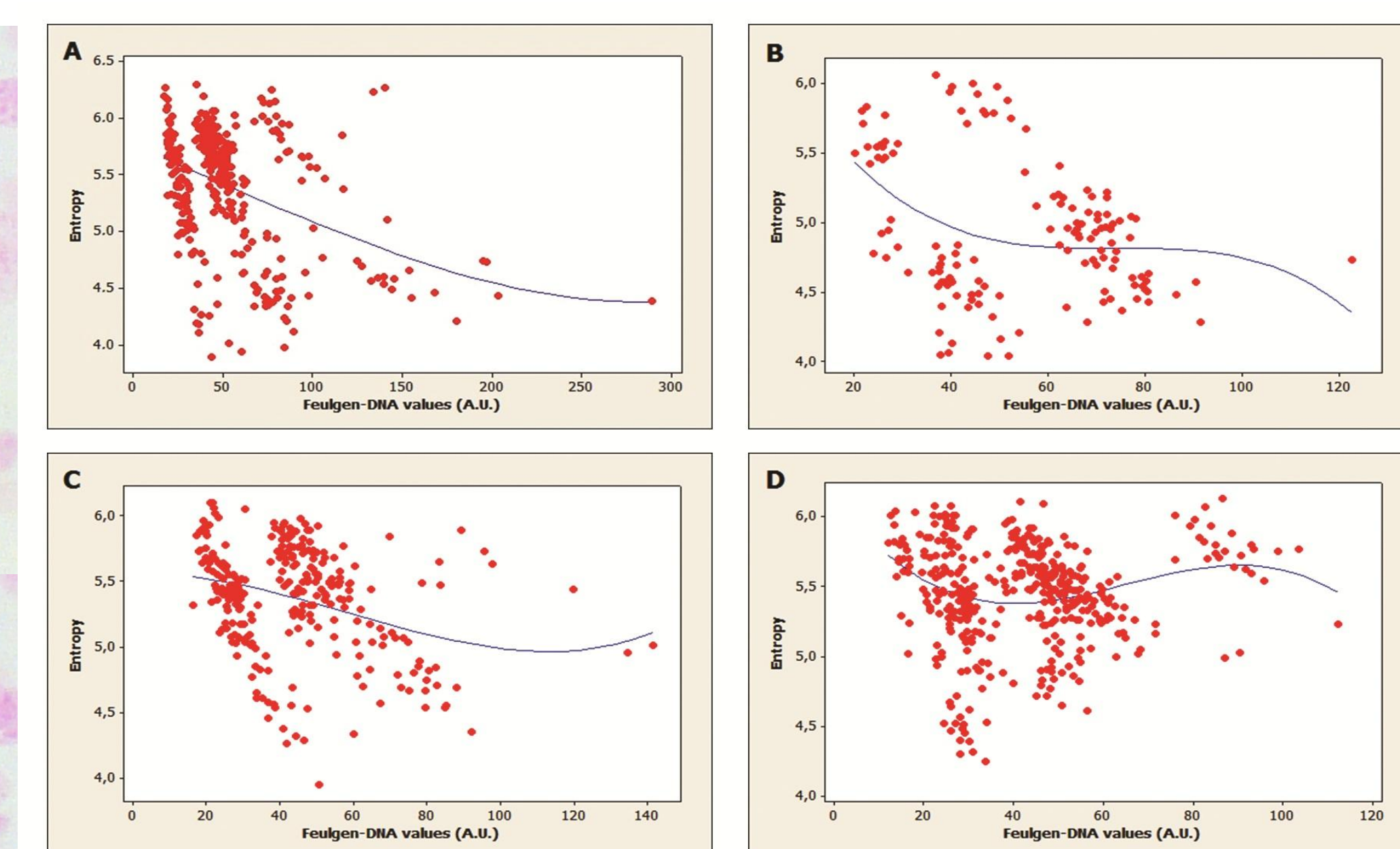
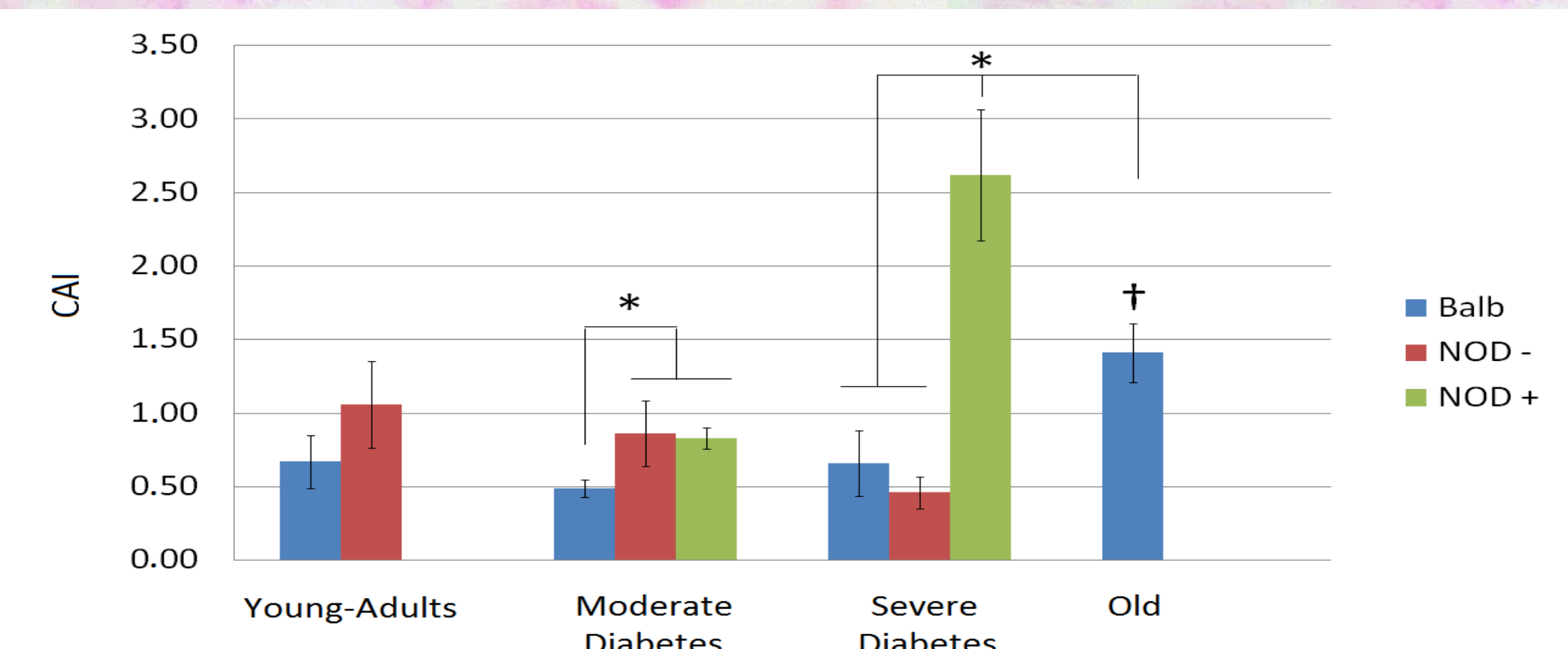
* Animais com mesma idade do NOD com hiperglicemia moderada; ** Animais com mesma idade do NOD com hiperglicemia severa; S, desvio padrão; X, média aritmética; no. de núcleos contados: o mesmo apresentado na Tabela 1. Diferentes letras sobscritas (a-f) para a coluna Md e médias com diferença significativa para P_{0.05} (Anova).

TABELA 2: Classes C de Feulgen-DNA em hepatócitos de camundongos.

CELULAS	Idade dos animais (semanas)	Linhagem dos animais	Estado Glicêmico	Frequências Relativas (%) de classes C de Feulgen-DNA				
				2C	4C	8C	16C	32C
Linfócitos*	8	BALB/c	Normal	100.	-	-	-	-
Hepatócitos	8	NOD	Normal	45.14	47.72	6.85	0.29	-
		BALB/c	Normal	32.94	55.61	11.44	-	-
	56	BALB/c	Normal	33.09	55.48	11.43	-	-
		NOD	Hiperglicemia moderada	15.71	38.58	45.00	0.71	-
	19-29	NOD	Normal**	11.43	56.43	31.43	0.71	-
			BALB/c	Normal**	40.72	57.86	1.42	-
	19-38	NOD	Hiperglicemia severa	22.57	51.14	20.85	5.15	0.29
			Normal***	31.78	52.14	15.35	0.73	-
		BALB/c	Normal***	22.28	57.71	19.72	0.29	-

* Controle da classe 2C de DNA; ** Animais com mesma idade do NOD com hiperglicemia moderada; *** Animais com mesma idade do NOD com hiperglicemia severa.

Ensaio MNase



Relação entre entropia nuclear e valores de Feulgen-DNA

A: NOD hiperglicemia severa; B: NOD hiperglicemia moderada; C: NOD normoglicêmico; D: BALB/c normoglicêmico idoso.

CONCLUSÃO

❖ O aumento da poliploidia e a diminuição na heterogeneidade de empacotamento e distribuição da cromatina ocorreram em camundongos NOD com hiperglicemia crescente. No início de suas vidas, as espécimes de NOD normoglicêmicos (mas não camundongos BALB/c) já apresentam uma tendência a desenvolver essas propriedades porém num grau menor, se comparado com hiperglicêmicos.

❖ Apesar de haver certas semelhanças na poliploidia em hepatócitos de camundongos diabéticos insulino-dependentes e idosos, sua supraorganização cromatínica, avaliada pela análise de imagens e acessibilidades da cromatina no ensaio Mnase, não é idêntica, o que pode ser devido a especificidades em sua maquinaria reguladora de genes e consequentemente em efeitos metabólicos.

