

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Análise ultraestrutural de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hADSC) durante a diferenciação adipogênica: interações entre as gotas lipídicas citoplasmáticas e outras organelas.

MOEMA QUEIROZ VIEIRA

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Porto Alegre, 2013

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica

Análise ultraestrutural de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo (hADSC) durante a diferenciação adipogênica: interações entre as gotas lipídicas citoplasmáticas e outras organelas.

MOEMA QUEIROZ VIEIRA

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas ICBS – Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Porto Alegre 2013

“Existem mais coisas entre o núcleo e a membrana citoplasmática do que sonha a nossa vã filosofia.”

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que torcem por mim e ajudam diariamente a traçar meu caminho de mãos dadas.

Muito Obrigada meus queridos:

Prof^a- Fátima Guma,

Chris Lopes (Mammy),

Leo Meira (por tudo!!!),

Sílvia Terra,

Bruno Vieira,

Vó Maria,

Tia Tina,

Lab-21

CME,

Gaia,

Maria Rita e Régis.

Familiares e amigos que não citei por falta de tempo, espaço e paciência.

E a todos que colaboram todos os dias para eu ser uma pessoa melhor, com risadas, conversas, discussões ou silêncio...

SUMÁRIO

PARTE I

| | |
|---|-----------|
| I.1 RESUMO..... | 7 |
| I.2 ABSTRACT..... | 8 |
| I.3 LISTA DE ABREVIATURAS..... | 9 |
| I.4 INTRODUÇÃO..... | 11 |
| <i>I.4.1 Tecido Adiposo.....</i> | <i>11</i> |
| <i>I.4.2 Células-Tronco Mesenquimais (MSC).....</i> | <i>12</i> |
| <i>I.4.3 Células-Tronco Mesenquimais Humanas Derivadas de Tecido Adiposo (hADSC).....</i> | <i>15</i> |
| <i>I.4.4 Gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC).....</i> | <i>16</i> |
| <i>I.4.5 GLC e outras organelas celulares.....</i> | <i>20</i> |
| <i>I.4.6 Caveolas.....</i> | <i>23</i> |
| I.5 OBJETIVOS..... | 27 |
| <i>I.5.1 Objetivo geral.....</i> | <i>27</i> |
| I.5.2 Objetivos específicos..... | 27 |

PARTE II

| | |
|--|-----------|
| II.1 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 30 |
| <i>II.1.1 Cultivo celular.....</i> | <i>30</i> |
| <i>II.1.1.1 ADSC humana (hADSC).....</i> | <i>30</i> |
| <i>II.1.1.2 Linhagem celular 3T3-L1.....</i> | <i>30</i> |
| <i>II.1.2 Ensaios de diferenciação adipogênica.....</i> | <i>31</i> |
| <i>II.1.2.1 hADSC.....</i> | <i>31</i> |
| <i>II.1.2.2 Linhagem celular 3T3-L1.....</i> | <i>32</i> |
| II.1.3 Immunoblotting..... | 32 |
| II.1.4. Microscopia Eletrônica..... | 33 |
| II.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 35 |
| II.2.1 Coloração das gotas lipídicas citoplasmáticas com Oil Red O..... | 35 |
| II.2.2 Expressão proteica da Perilipina-1 e Caveolina-1..... | 35 |
| II.2.3 Ultraestrutura das hADSC indiferenciadas..... | 36 |
| II.2.4 Ultraestrutura das hADSC diferenciadas 7 e 21 dias..... | 38 |
| II.2.5 Comparação ultraestrutural entre pré-adipócitos 3T3-L1 e hADSC diferenciadas durante 21 dias..... | 42 |
| II.2.6 Caveolas e diferenciação adipogênica..... | 43 |
| II.2.7 GLC e interações com outras organelas..... | 48 |

PARTE III

| | |
|-------------------------|----|
| III.1 CONCLUSÕES..... | 52 |
| III.2 PERSPECTIVAS..... | 54 |

REFERÊNCIAS..... 55

LISTA DE FIGURAS..... 61

PARTE I

I.1 RESUMO

As células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo, do inglês *human adipose-derived stem cells* (hADSC), são células progenitoras que residem entre adipócitos e armazenam lipídios neutros, principalmente triglicerídeos e ésteres de colesterol (TG e EC), em gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC), contribuindo para o *turnover* do tecido adiposo. As GLC são organelas que desempenham um papel crucial na homeostasia energética e no metabolismo dessas células. Caveolas são invaginações de 50-100 nm que foram inicialmente caracterizadas por microscopia eletrônica. A forma e a organização estrutural das caveolas deve-se a proteínas específicas da família das caveolinas (caveolina-1, -2 e -3) que se associam em oligômeros para formar cavidades/invaginações na membrana plasmática. A função das caveolinas na formação das GLC está relacionada com a captação de ácidos graxos e seu metabolismo, e a relação existente entre estes dois componentes celulares parece ser crucial para manutenção da homeostasia celular. Muitas organelas que são funcionalmente conectadas ao metabolismo de lipídeos são encontradas justapostas as GLC. Distinções morfológicas observadas reforçam diferenças que podem existir na maneira pelas quais as GLC interagem com outras organelas em adipócitos. Sítios de contatos entre membranas, do inglês *membrane contact sites* (MCS), são descritos para muitas organelas e parecem funcionalmente importantes nos processos de interações entre as GLC e outras organelas celulares. O presente trabalho avaliou as diferenças ultraestruturais entre hADSC diferenciadas ou não para pré-adipócitos, comparando com células 3T3-L1. Também foram avaliadas, através de microscopia eletrônica de transmissão, as interações das GLC com outras organelas celulares durante a diferenciação adipogênica, pois apesar de sua importância no metabolismo energético e em várias doenças, as GLC são pouco compreendidas como organelas celulares. De fato, o tamanho, a composição e a regulação das GLC variam consideravelmente entre organismos e tipos celulares. A complexidade das interações das GLC com outras organelas também varia consideravelmente em adipócitos e não adipócitos. Este trabalho mostrou a importância de estudos que visam esclarecer como as GLC são formadas, modificadas e reguladas. Através destes estudos poderemos ter uma melhor compreensão acerca da relação existente entre o acúmulo excessivo de lipídios no organismo e a chamada síndrome metabólica (obesidade, diabetes e aterosclerose).

Palavras chaves: Análise ultraestrutural, células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo; caveolas; gotas lipídicas citoplasmáticas; MCS.

I.2 ABSTRACT

Human adipose-derived stem cells (hADSC) are progenitor cells that reside between adipocytes, store neutral lipids, especially triglycerides and cholesterol esters (TG and CE) into cytoplasmic lipid droplets (CLD), contributing to the turnover of the adipose tissue. The CLD are organelles that play a crucial role in energy homeostasis and cell metabolism. Caveolae are invaginations of 50-100 nm that were initially characterized by transmission electron microscopy. The shape and structural organization of caveolae are held by specific proteins of the family of caveolins (caveolin-1, -2 and -3) that associate to form oligomers in cavities/invaginations on the plasma membrane. The caveolin functions on the CLD development are related to the fatty acid uptake and its metabolism. The relationship between these cell components seems to be pivotal for the cellular homeostasis maintenance. Many organelles that are functionally connected to lipid metabolism are found juxtaposed to the CLD. Morphologic distinctions reveal the differences that may exist in the way through which the CLD interact with other organelles within adipocytes. The membrane contact sites (MCS) have been described for many organelles and seems to be functionally important in the interaction processes with CLD. This work evaluated the ultrastructural differences between hADSC differentiated or not to pre-adipocyte compared to the 3T3-L1 cells. It was also evaluated through transmission electron microscopy, the CLD interactions to the others cellular organelles in hADSC during adipogenesis induction because, despite its importance in energy metabolism and in various diseases, the CLD are poorly understood as cell organelles. Indeed, the size, composition and regulation of CLC vary considerably between organisms and cell types. The complexity of CLD interactions with other organelles also ranged considerably between adipocytes and undifferentiated. This work showed the importance of studies that aim the clarify how the CLD are formed, modified and regulated. Through these studies it is possible to get a better understanding of the relationship between the excessive accumulation of body lipids and the metabolic syndrome (obesity, diabetes and atherosclerosis)

Keywords: Caveolae; caveolin; cytoplasmic lipid droplets; human adipose-derived stem cells (hADSC); ultrastructural analysis

I.3 LISTA DE ABREVIATURAS

Cav-1 – Caveolina-1

hADSC – Células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo

HSC – Células-tronco Hematopoiéticas

MSC – Células-tronco mesenquimais

ERGIC – Compartimento Intermediário-RE/Golgi

DMT2 – *Diabetes Mellitus* tipo 2

EC – Ésteres de Colesterol

CTP – Fosfocolina-citidil-transferase

GLC – Gotas lipídicas citoplasmáticas

ISCT – *International Society for Cellular Therapy*

IBMX – Isometilbutilxantina

LAM – Membranas Associadas a Gotas Lipídicas

PMAM – Membranas Associadas à Membrana plasmática

MAM – Membranas Associadas às Mitocôndrias

LERMIT- Membranas Associadas às Gotas Lipídicas, Retículo Endoplasmático e Mitocôndrias

eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial

RE – Retículo Endoplasmático

MCS – Sítios de Contato de Membranas

TG – Triglicerídeos

CFU-F – Unidades Formadoras de Colônia de Fibroblastos

EC- Ésteres de Colesterol

ADRP- Proteína Relacionada com a Diferenciação Adipogênica

TIP47- Tail-Interacting Protein of 47 kDa

DAG- Diacilgliceróis

MAG- Monogliceróis

GPCR- Receptores Acoplados a Proteínas G

RTKs- Receptores Tirosina Cinases

I.4 INTRODUÇÃO

I.4.1 Tecido Adiposo

O tecido adiposo deriva da camada mesodérmica do embrião e possui desenvolvimento tanto pré como pós-natal (Gimble, Katz et al. 2007). Ele é um tecido complexo que consiste de adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células de músculo liso, células endoteliais, monócitos/macrófagos residentes e linfócitos. Os adipócitos maduros exibem um acúmulo de lipídios unilocular e multilocular (Gimble, Katz et al. 2007; Locke, Windsor et al. 2009).

Com a descoberta da leptina em 1994 e da adiponectina em 1995, se iniciaram os estudos sobre a função endócrina do tecido adiposo e dos mecanismos que ligam a adiposidade com a manutenção das outras funções do organismo. O atualmente chamado “órgão adiposo” inclui múltiplos depósitos lipídicos com localizações anatômicas distintas (Fantuzzi e Mazzone 2007). Entre as funções desse tecido, que inclui o controle da liberação de glicerol, ácidos graxos, leptina e adiponectina pelos adipócitos, está a liberação da maioria das adipocinas inflamatórias por macrófagos residentes e células-tronco mesenquimais de tecido adiposo (Trayhurn, Wang et al. 2008).

Tanto o excesso quanto a falta de tecido adiposo tem consequências deletérias para o funcionamento do organismo. A habilidade do tecido adiposo se expandir por hipertrofia e hiperplasia (recrutamento e diferenciação de precursores adiposos) é crítica na prevenção das comorbidades relacionadas com a obesidade, caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, que pode chegar a 70% da massa corporal em indivíduos obesos. Este estado patológico

é associado com o aumento do risco de doenças cardiovasculares, *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), hipertensão arterial e alguns tipos de câncer (Fantuzzi 2005; Yarak e Okamoto 2010). Em todo o mundo, a incidência de indivíduos com sobrepeso e obesidade tem crescido com velocidades alarmantes. Diversos fatores contribuem para esta epidemia, incluindo a genética, a epigenética e o comportamento. A obesidade é a maior evidência da existência de células-tronco dentro do tecido adiposo. Modelos *in vivo* de adipogênese sugerem que os adipócitos maduros são células terminais, diferenciadas, com capacidade limitada para a proliferação e replicação (Cornelius, MacDougald et al. 1994). Portanto, uma população de células-tronco dentro do tecido adiposo é importante e acaba sendo responsável por substituir adipócitos maduros durante a vida de um indivíduo.

1.4.2 Células-Tronco Mesenquimais (MSC)

O termo mesênquima descreve os tecidos de origem mesodérmica embrionária que formam os sistemas músculo-esquelético, sanguíneo, urogenital e o tecido conjuntivo (incluindo a derme) (Prockop 1997; Beyer Nardi e da Silva Meirelles 2006; Sethe, Scutt et al. 2006). No entanto, as células sanguíneas derivam de uma população distinta de células-tronco hematopoiéticas, (*Hematopoietic Stem Cells – HSC*) que se encontram presentes na medula óssea, o que confere ambiguidade ao termo mesenquimal. Na prática, as células-tronco mesenquimais, (*Mesenquimal Stem Cells – MSC*) são um grupo heterogêneo de células estromais, não hematopoiéticas, multipotentes e capazes de se diferenciar *in vivo* e *in vitro* em

linhagens celulares mesodérmicas e não mesodérmicas como: adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócitos, neurônios e astrócitos (Figura 1) (Giordano, Galderisi et al. 2007).

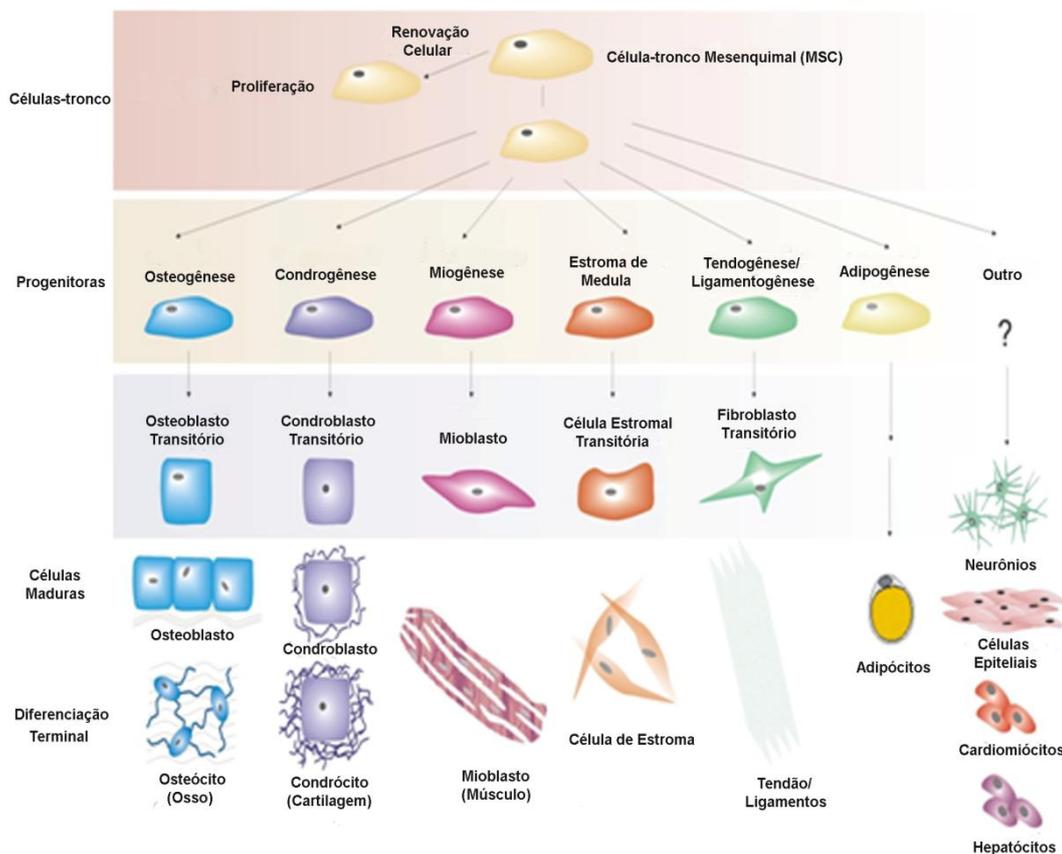


Figura 1. Potencial de diferenciação em múltiplas linhagens das MSC (Traduzido de Caplan e Bruder 2001).

As MSC possuem capacidade de auto-renovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado. Essa característica proporciona uma reposição tecidual constante e quando necessário, após sinais do microambiente, essas células dão origem a progenitores comprometidos que gradualmente integram o tecido (Beyer Nardi e da Silva Meirelles 2006). O modelo não exclui a existência de células-tronco tecido específico, entretanto, se sugere que a aparente diversidade de uma porção de células-tronco pós-natal pode ser atribuída a MSC locais que se comportam

como células-tronco tecido específicas. Sendo assim, acredita-se que células-tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo, principalmente, quando estas sofrem lesão ou dano (Fodor 2003).

A medula óssea é uma das fontes mais conhecidas e bem estudadas tanto de HSC como de MSC. O microambiente da medula óssea provê elementos que suportam hematopoiese e homeostase óssea. Este microambiente inclui uma população heterogênea de células: os macrófagos, os fibroblastos, os adipócitos, os osteócitos, as células endoteliais e as células reticulares. Estas populações do estroma são mantidas por uma população de células-tronco mesenquimais (Prockop 1997; Pittenger, Mackay et al. 1999). Assim, a medula óssea é o único órgão conhecido onde duas populações de células-tronco adultas (hematopoética e mesenquimal) não só co-existem, mas cooperam entre si (Bianco, Riminucci et al. 2001).

As propriedades das células-tronco mesenquimais de medula óssea foram descritas primeiro em 1968 por Friedenstein, que padronizou o isolamento e caracterizou estas células como clonogênicas e aderentes em cultura de monocamada e as denominou CFU-F - Unidades Formadoras de Colônia de Fibroblastos (Friedenstein, Chailakhyan et al. 1974). Pesquisas subsequentes descreveram as MSC de medula óssea humana e murina e células similares têm sido isoladas de diferentes espécies e tecidos adultos, tais como: cordão umbilical, tecido adiposo, fígado, pâncreas, rim, membrana sinovial, pele, líquido amniótico, placenta, polpa dentária (Keating 2006).

Células isoladas da medula e de outras fontes são amplamente denominadas tronco mesenquimais. Entretanto, o reconhecimento das propriedades biológicas dessa população parece não encontrar um critério

geral aceito para atividade de célula-tronco, gerando uma denominação científica inadequada e potencialmente confusa para o público leigo. O termo célula-tronco mesenquimal (MSC) deve ser usado somente quando os critérios, estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, do inglês *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), para caracterizar uma MSC sejam demonstrados (Horwitz, Le Blanc et al. 2005). Os critérios que caracterizam as MSC são: (1) aderência ao plástico sob condições padrão de cultura; (2) expressão de CD105, CD73, CD90; (3) perda da expressão da CD45, CD34, CD14b, CD79 ou CD19 e HLADR; (4) apresentar capacidade de diferenciação para osteoblasto, adipócito e condrócito *in vivo*.

1.4.3 Células-Tronco Mesenquimais Humanas Derivadas de Tecido Adiposo (hADSC)

Em humanos, as células-tronco mesenquimais do tecido adiposo são facilmente obtidas por cirurgia de lipoaspiração, um método menos invasivo do que a punção da medula óssea utilizada para retirada de células-tronco mesenquimais de medula óssea. Estas células progenitoras residem entre adipócitos contribuindo para o *turnover* do tecido adiposo. Por terem essas características e funções são denominadas células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo, do inglês *human adipose-derived stem cells* (hADSC) (Yarak e Okamoto 2010).

As hADSC são diferentes quanto sua morfologia e função imunológica de outras MSC. Estima-se que a quantidade de hADSC no tecido adiposo seja maior do que as células-tronco presentes no estroma de medula óssea. Da

mesma maneira, a taxa de proliferação das hADSC é maior e a quantidade dessas células no tecido adiposo é constante (Kern, Eichler et al. 2006). Após lipoaspiração e isolamento, as hADSC podem ser mantidas em cultura com várias fases de crescimento, sem passagem, por mais de um mês. Durante esse período, logo depois da segunda semana, há um aumento de síntese proteica e conseqüentemente da expressão de proteínas de superfícies. Dessa forma, as hADSC são classificadas de acordo com a presença de antígenos específicos que são igualmente presentes em outras MSC. No entanto, essas células não expressam antígenos hematopoéticos (Zhu, Liu et al. 2008).

1.4.4 Gotas Lipídicas Citoplasmáticas (GLC)

Células eucarióticas armazenam lipídios neutros, principalmente triglicerídeos e ésteres de colesterol (TG e EC), em gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC) recobertas por uma monocamada de lipídios anfipáticos associados a proteínas. As GLC atuam como reservatórios de energia e de precursores de lipídios de membrana. A relação existente entre o acúmulo excessivo de lipídios no organismo e a chamada síndrome metabólica (obesidade, diabetes e aterosclerose) mostra a importância de estudos que visam esclarecer como as GLC são formadas, modificadas e reguladas (Ohsaki, Cheng et al. 2009). Embora vários tipos celulares apresentem GLC, os adipócitos se distinguem pela quantidade de lipídios que podem armazenar e pela rapidez que liberaram essas moléculas para serem usadas por outros órgãos (Rosen e MacDougald 2006).

Durante anos, as GLC foram ignoradas na investigação em biologia celular presumivelmente porque elas eram vistas como organelas inertes com pouca relevância funcional. Apesar das GLC estarem relacionadas com diversos processos celulares, o conhecimento acerca da sua biologia ainda é incompleto e, por vezes, controverso (Reue 2011; Walther e Farese 2012). A descoberta de proteínas de revestimento da superfície das GLC foi importante para o estudo dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa organela. A perilipina, a adipofilina ou ADRP (*adipocyte differentiation-related protein*) e a TIP47 (*tail-interacting protein of 47 kDa*) são as principais proteínas encontradas em associação com a superfície das GLC. Essas proteínas são conhecidas pela sigla PAT. A perilipina e a ADRP são proteínas constitutivas, enquanto a TIP47 é uma proteína solúvel no citoplasma, que é recrutada para a GLC quando ácidos graxos estão sendo esterificados e armazenados nas gotas como TG (Ohsaki, Cheng et al. 2009). Em macrófagos, as proteínas PAT são integrais de membrana plasmática e formam domínios especializados associados às GLC (Robenek, Hofnagel et al. 2006). Vários estudos também mostram a presença de caveolinas e de flotilinas na superfície das GLC (Ortegren, Yin et al. 2006; Rajendran, Le Lay et al. 2007; Blouin, Le Lay et al. 2008). Estas proteínas estão relacionadas com a organização da membrana plasmática e com a endocitose.

A biossíntese da maioria dos fosfolipídios presentes nas GLC ocorre principalmente no Retículo Endoplasmático (RE). Além de lipídios e das proteínas PAT a superfície das GLC pode conter outras proteínas associadas como, por exemplo, a Rab18 e a Fosfolina-citidil-transferase (CTP), uma

enzima que limita a taxa de síntese da fosfatidilcolina (Figura 2) (Farese e Walther 2009).

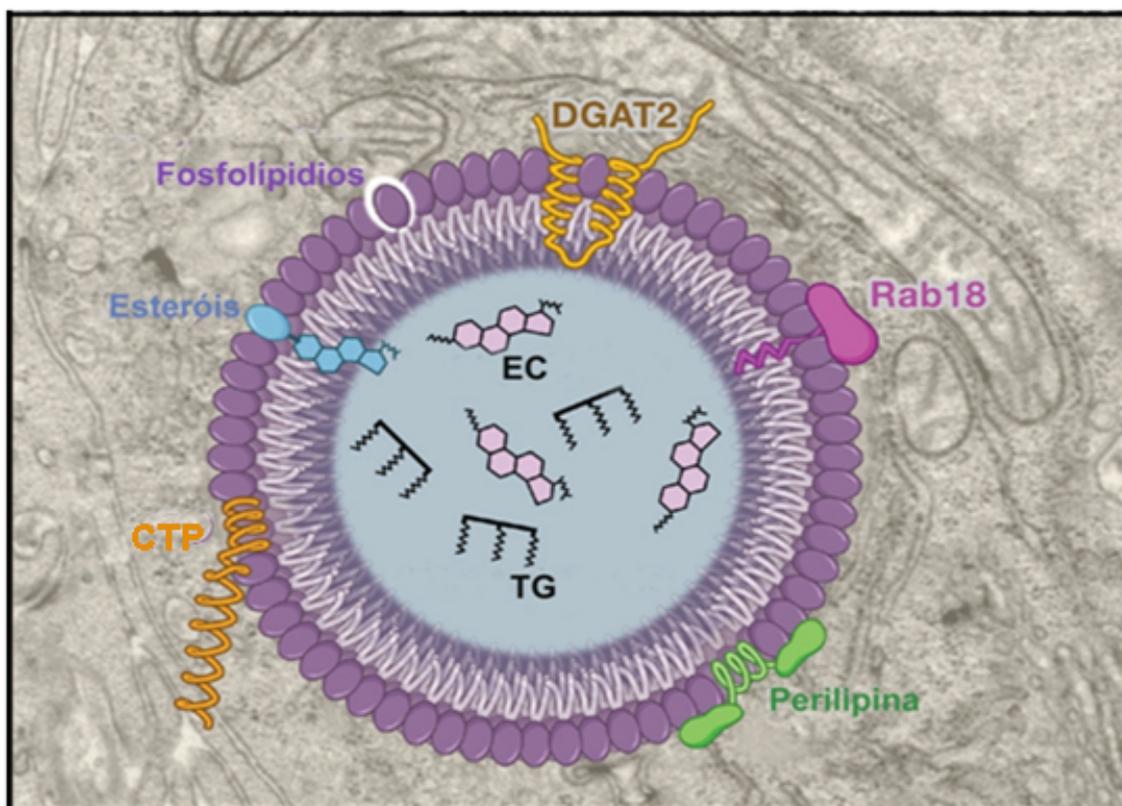


Figura 2. Anatomia da gota lipídica citoplasmática mostrando os principais componentes da sua superfície e núcleo. CTP: Fosfolina-citidil- transferase, DGAT2: Diglicerídeo-acil-transferase 2 (Adaptado de Farese e Walther 2009).

A síntese de TG que é incorporado pelas GLC é geralmente coordenada com o crescimento da gota. Esta síntese ocorre principalmente através da via do glicerolfosfato no RE (Farese e Walther 2009). De fato, essas evidências sustentam o modelo mais aceito atualmente, pelo qual a formação da GLC ocorre no RE. Baseado nessa idéia, os TG são sintetizados no RE e liberados entre os folhetos da bicamada lipídica da membrana dessa organela. Quando os TG se acumulam, formam a gota lipídica, que é lançada para o citoplasma por meio de um processo de brotamento (Figura 3) (Walther e Farese 2012). No entanto, a maneira na qual os TG sintetizados pelo RE e direcionadas para

compor o núcleo do que seria o precursor das GLC não é completamente esclarecido, assim como ainda não está claro o direcionamento das GLC dentro da célula ou qual a mecânica do “brotamento”. Além do RE, as GLC também podem se desenvolver através de fusão entre duas gotas lipídicas menores já existentes no citoplasma (Yarak e Okamoto 2010).

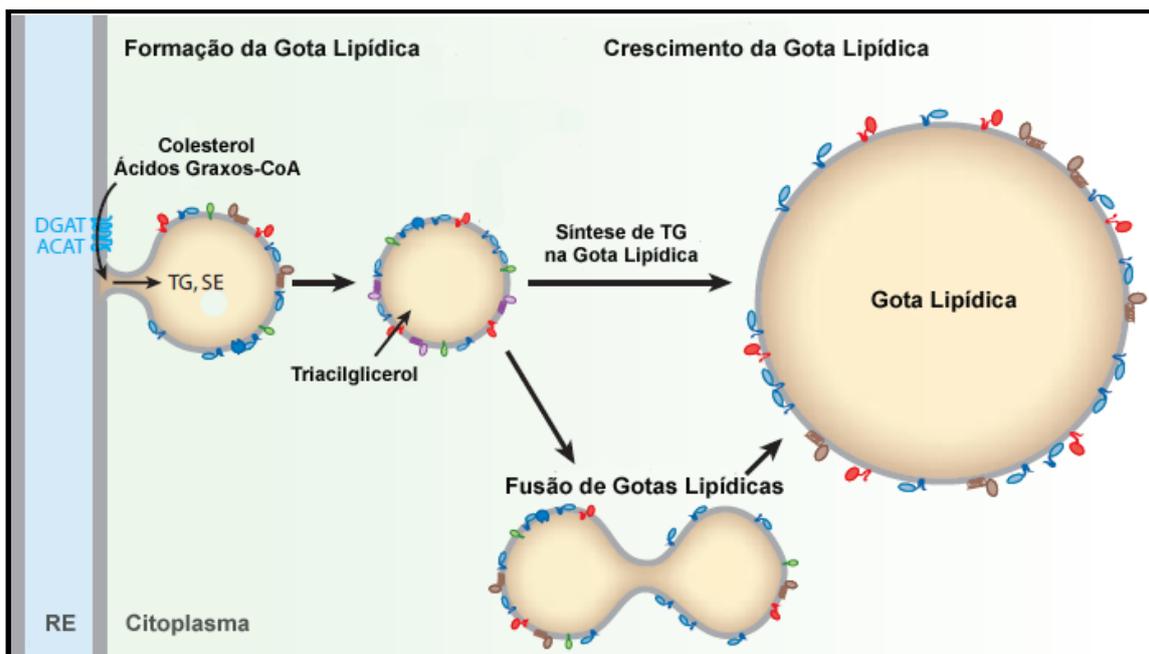


Figura 3. Modelo da formação da gota lipídica no Retículo Endoplasmático e liberação para o citoplasma. Esse modelo é atrativo porque explica a origem da monocamada lipídica que recobre a superfície de GLC e associa sua formação com o local onde se encontram as enzimas de síntese de lipídios neutros, o RE (Traduzido de Walther e Farese 2012).

Muitos estudos mostraram que as GLC são estruturas heterogêneas. Essas características são relativas a variações de tamanho, localização ou proteínas associadas a essas organelas, e dependem do tipo celular ou tecido. Esse fato sugere que subpopulações de GLC tenham funções especializadas quanto ao armazenamento de lipídios ou metabolismo celular (Ducharme e Bickel 2008).

1.4.5 GLC e outras organelas celulares

Muitas organelas que são funcionalmente conectadas ao metabolismo de ácidos graxos incluindo o RE (Ozeki, Cheng et al. 2005; Turro, Ingelmo-Torres et al. 2006), endossomos (Liu, Bartz et al. 2007), mitocôndrias (Cushman 1970; Sturmey, O'Toole et al. 2006) e peróxissomos (Schrader 2001; Binns, Januszewski et al. 2006) são encontradas justapostas as GLC. Distinções morfológicas observadas reforçam diferenças fundamentais que podem existir na maneira pela quais as GLC interagem com outras organelas em adipócitos (Murphy, Martin et al. 2009).

Ácidos graxos liberados das GLC através da hidrólise de triglicerídeos podem ser usados por outras organelas de diversas maneiras, tais quais: substrato para geração de ATP durante a β -oxidação em mitocôndrias e peróxissomos (Murphy 2001; Binns, Januszewski et al. 2006), biossíntese de fosfolípidos no RE (van Meer, Voelker et al. 2008), efluxo para superfície celular para aceptores como HDL ou serem incorporados em lipoproteínas no RE e secretados para fora da célula (Murphy e Vance 1999). Inversamente, ácidos graxos que finalmente serão incorporados em GLC podem entrar na célula pelo sistema endossomal, através de proteínas transportadoras localizadas na superfície celular ou pela síntese “de novo” no citosol (Murphy, Martin et al. 2009).

As associações das GLC com outras organelas através da justaposição da superfície da GLC com a membrana da organela pode não ser suficiente para o transporte eficiente de lipídeos (Suzuki, Shinohara et al. 2011).

Organelas de células eucarióticas podem se conectar através de tráfego vesicular, que envolve a liberação de vesículas em direção a outra organela alvo ou através de contatos entre membranas das duas organelas (Figura 4). Proteínas que transferem lipídeos no citoplasma funcionam através dos MCS - sítios de contato entre membranas (do inglês *membrane contact site- MCS*), participando de processos de hemi fusão entre organelas (Levine e Loewen 2006). MCS tem sido descritos para muitas organelas e são denominados, MAM para membranas associadas a mitocôndrias (do inglês *mitochondrial-associate membrane*), LAM para membranas associadas a gotas lipídicas (*lipid droplet-associate membrane*) (Ozeki, Cheng et al. 2005), PMAM para membranas associadas à membrana plasmática (*plasma-membrane associate membranes*) (Lebiedzinska, Szabadkai et al. 2009) e ainda, LERMIT para membranas associadas às gotas lipídicas, retículo endoplasmático e mitocôndrias (Lipid droplets-ER-mitochondria association) (Issop, Rone et al. 2013). Os sítios de contato de membrana parecem fornecer um canal para a troca não vesicular de proteínas e mobilização de lipídeos por lipases específicas que degradam triglicerídeos (TG) em diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) ou em ácidos graxos livres e glicerol (Ozeki, Cheng et al. 2005).

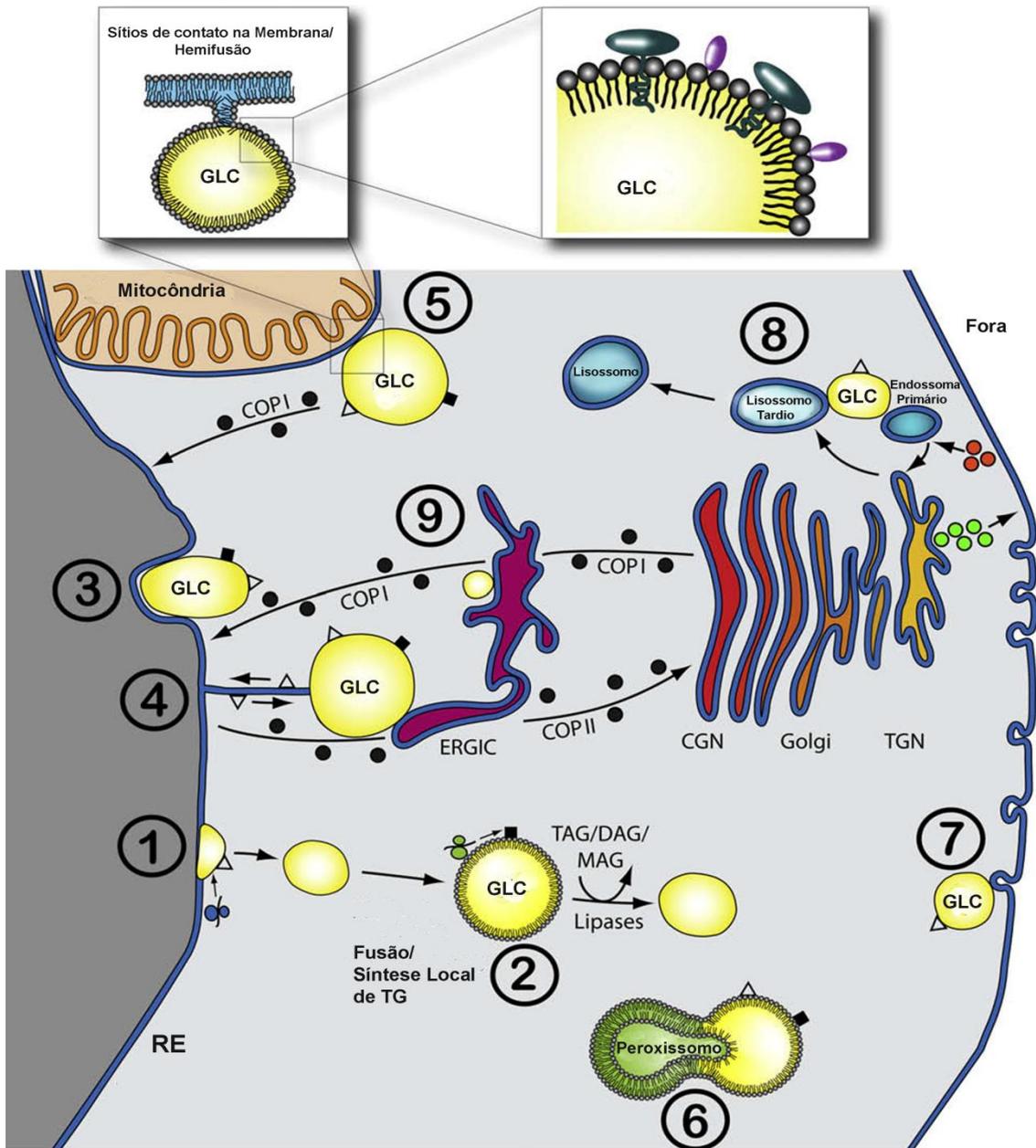


Figura 4. Interações das GLC e outras organelas. A biogênese das GLC ocorre via processos de brotamento (1) ou deposição de TG em estruturas em formato de copo no RER (3). Modelos alternativos da biogênese de GLC incluindo: brotamento vesicular e migração de micelas e pontes entre membranas conectando o RER as GLC (4) favorecendo a troca não vesicular de proteínas e lipídeos. GLC crescem por fusão homotípica e síntese localizada; estoques lipídicos são eventualmente remobilizados por lípases específicas pela quebra de TG (2). Regiões conhecidas como MAM (5) (detalhes no texto acima). Interações entre GLC e peróxissomos (6). Maquinaria do tráfico vesicular fortemente conectadas as GLC (9). GLC podem interagir com endossomos recentes ou tardios (8) bem como caveólas em adipócitos (7). (Traduzido de *Lebiedzinska, Szabadkai et al. 2009*).

1.4.6. Caveolas

Caveolas foram inicialmente caracterizadas morfologicamente por microscopia eletrônica. Trata-se de invaginações de 50-100 *nm*, similares a um tubo, localizadas próximas ou na membrana das células. Estas organelas estão presentes na maioria dos tipos celulares e nos diferentes tecidos dos mamíferos, sendo particularmente abundantes em células musculares e adipócitos (Parton e Simons 2007).

A forma e a organização estrutural das caveolas deve-se a proteínas específicas da família das caveolinas (caveolina-1, -2 e -3), que se associam em oligômeros para formar cavidades/invaginações na membrana (Figura 5). As caveolas são ricas em colesterol e esfingolípídios e, por não serem planares, são consideradas uma sub-família dos rafts lipídicos (Chini e Parenti 2004). Estas organelas participam de vários papéis na fisiologia celular, servindo de plataforma para diferentes caminhos de sinalização tais como: pinocitose, transcitose e endocitose independente de clatrina. Da mesma forma, as caveolas atuam como sensores de estresse mecânico (Parat e Riggins 2012), participam da homeostase do colesterol, de rotas de transdução de sinais, migração celular e controle do ciclo e da polaridade celular (Goetz, Lajoie et al. 2008).

Em contraste com as vesículas revestidas de clatrina, COPI e COPII, acredita-se que as caveolas, devido a sua composição lipídica, participem das vias endocíticas sem necessidade da formação de revestimento protéico citosólico. As caveolas, com seu carregamento, se destacam da membrana plasmática utilizando a proteína dinamina. As moléculas que entram na célula

através das caveolas evitam os endossomos e lisossomos, e com isso ficam protegidas da exposição a pH baixo e as hidrolases lisossomais (Alberts, Johnson et al. 2010).

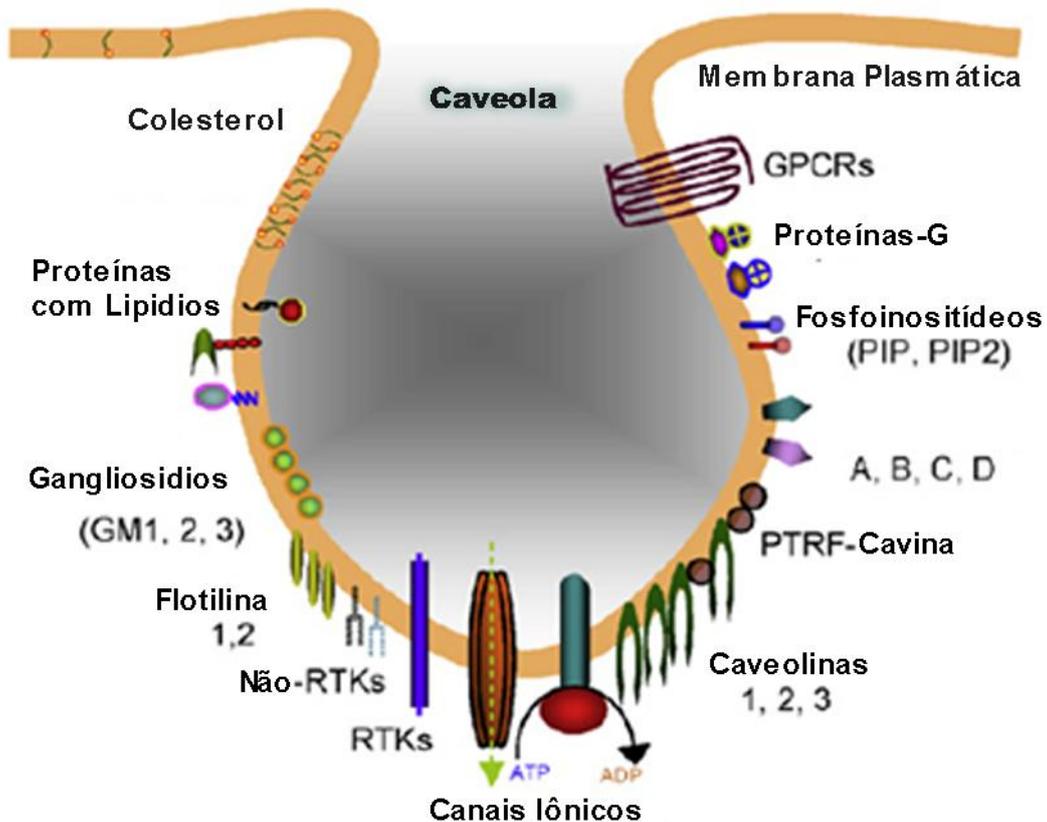


Figura 5. Imagem ilustrativa de uma caveola com seus componentes (Traduzido de Pani e Singh 2009).

As principais proteínas estruturais das caveolas, as caveolinas, são uma família de proteínas que tem uma porção hidrofóbica que se insere na membrana no lado citosólico, sendo a mais importante a caveolina -1 (Cav-1) (Parat e Riggins 2012). Por serem proteínas integrais de membrana, as caveolinas não se dissociam das vesículas. Após a endocitose: elas são liberadas nos compartimentos alvo e mantidas em domínios especiais nas membranas. As caveolinas estabilizam esses domínios de membrana,

contribuindo para a manutenção de proteínas residentes nas caveolas. A presença dessa proteína e a sua ligação com o colesterol na membrana plasmática força a bicamada lipídica a curvar-se para dentro, formando as caveolas (Nelson e Cox 2007).

A expressão de Cav-1 é suficiente e necessária para dirigir a formação morfológica das caveolas (Cohen, Razani et al. 2004). Esta proteína é sintetizada no retículo endoplasmático e transportada até o complexo de Golgi, em um processo dependente de COPII (Goetz, Lajoie et al. 2008). A inserção na membrana da Cav-1 ocorre via maquinaria clássica do retículo endoplasmático, resultando nas caveolas.

O domínio estruturante (do inglês “scaffolding”) da Cav-1 contém 20 aminoácidos (resíduos 82-101) onde se ligam numerosas moléculas sinalizadoras, que incluem: Src cinases, receptores de crescimento, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), proteínas G e receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Goetz, Lajoie et al. 2008). Sendo assim, a Cav-1 é capaz de mediar interações protéicas. Este domínio estruturante tem um duplo papel, atuando no ancoramento de várias proteínas, e como elemento regulatório capaz de inibir ou aumentar as atividades de vias de sinalizações protéicas (Cohen, Razani et al. 2004).

Além de ser encontrada na membrana plasmática, a Cav-1 pode estar presentes em mitocôndrias, gotas lipídicas, grânulos de células secretórias exócrinas e peroxissomos. A Cav-1 existe também na forma solúvel, nomeada de proteína citosólica, ou associada com produtos secretórios. A Cav-1 também está envolvida no tráfego intracelular de colesterol, lipogênese e lipólise (Mastrodonato, Calamita et al. 2011). Em células da linhagem de pré-

adipócitos 3T3-L1, a Cav-1 faz parte da superfície das GLC. Nestas células, a associação da Cav-1 com as GLC se dá na fase final da diferenciação para adipócitos e é um processo regulado pela Src-cinase (Blouin, Le Lay et al. 2008).

A presença das caveolinas parece ser funcionalmente importante, porque fibroblastos embrionários obtidos de camundongos *knockout* para caveolina não formam gotas lipídicas. Além disso, esses camundongos têm defeitos na lipólise (Cohen, Razani et al. 2004) e durante a regeneração hepática, acumulam menos lipídios nos hepatócitos (Fernandez, Albor et al. 2006). A função das caveolinas na formação das GLC parece estar relacionada com a captação de ácidos graxos e seu armazenamento. A expressão de mutantes negativos para caveolina-3 ou a destruição das caveolas pelo uso de β -ciclodextrina, que liga e retira esteróides da membrana, inibem a captação de ácidos graxos de cadeia longa (Pohl, Ring et al. 2002).

I.5.OBJETIVOS

I.5.1 Objetivo Geral

Com base no exposto anteriormente, consideramos importante analisar as alterações na ultraestrutura das GLC que acompanham a diferenciação adipogênica das hADSC. Esclarecer as relações entre as síndromes metabólicas e a diferenciação morfológica em um modelo celular humano e verificar quais as diferenças existentes entre as células indiferenciadas e diferenciadas para pré-adipócitos e as relações das GLC com outras organelas celulares.

I.5.2 Objetivos Específicos

- a) Verificar se ocorre aumento da expressão das proteínas relacionadas com o acúmulo de lipídeos, caveolina-1 e Perilipina-1 nas hADSC's indiferenciadas e diferenciadas durante 21 dias (tempo máximo de diferenciação utilizado).
- b) Comparar as alterações ultraestruturais das hADSC's não diferenciadas e diferenciadas para pré-adipócitos durante 7 e 21 dias de cultivo em meio de diferenciação adipogênico.
- c) Comparar as alterações morfológicas das hADSC's diferenciadas para pré-adipócitos durante 21 dias com a ultraestrutura de uma linhagem celular de pré-adipócitos 3T3-L1 que já é bem descrita na literatura.

d) Analisar detalhes de especializações da membrana plasmática nas hADSC's diferenciadas por 21 dias, como, por exemplo, na quantidade de caveolas e sítios de contato entre membranas (MCS) das GLC com outras organelas.

PARTE II

II.1 MATERIAIS E MÉTODOS

II.1.1 Cultivo Celular

II.1.1.1 ADSC humana

Utilizamos a linhagem de hADSC PT-5006 obtida da LONZA-USA. A linhagem PT-5006 é fornecida com certificado de pureza, de capacidade de auto-renovação e de diferenciação em diversos tipos celulares. Além disso a LONZA garante que as células expressam os marcadores específicos de células tronco mesenquimais: CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 e CD166 e que são negativas para CD31, CD45 e CD14 (Schaffler, Landfried et al. 2007). As células obtidas foram descongeladas e ressuspensas em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). As culturas foram expandidas e congeladas novamente para manutenção dos estoques do nosso laboratório. As células foram armazenadas em ampolas de congelamento e mantidas em nitrogênio líquido até serem novamente descongeladas para os experimentos. Durante o cultivo, as células foram mantidas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e utilizadas em diferentes tipos de passagens.

II.1.1.2 Linhagem Celular 3T3-L1

A linhagem celular 3T3-L1 (CCL-92.1) foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC). Esta célula é um pré-adipócito que foi originalmente

desenvolvido por expansão clonal de células murinas do camundongo Suíço albino (Green e Meuth 1974). Devido seu potencial para diferenciação de fibroblastos em adipócitos, esta linhagem tem sido utilizada em mais de 5000 mil publicações sobre adipogênese e bioquímica de adipócitos (Poulos, Dodson et al. 2010). Durante o cultivo, as células foram mantidas em DMEM suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB) em garrafas de cultura mantidas em estufa à 37° C com 5% de CO₂ e utilizadas em diferentes tipos de passagens.

II.1.2 Ensaios de Diferenciação adipogênica

II.1.2.1 ADSC humana

Para a diferenciação adipogênica, as células semi confluentes foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB em coquetel adipogênico contendo 10 µM de insulina, 1 µM de dexametasona , 200 µM de indometacina e 0,5 µM de isometilbutilxantina (IBMX) por 7, e 21 dias (Zuk, Zhu et al. 2002). Escolhemos os 21 dias como tempo limite de diferenciação devido a grande quantidade de GLC observadas por microscopia ótica.

A diferenciação foi acompanhada por observação diária em microscópio de contraste de fase e pela coloração das gotas lipídicas citoplasmáticas com *Oil Red O*.(Figura 6)

II.1.2.2 Linhagem Celular 3T3-L1

Para a diferenciação adipogênica, as células semi confluentes foram cultivadas em DMEM suplementado com 10% de SFB em coquetel adipogênico contendo 10 μ M de insulina e 0,5 μ M de isometilbutilxantina (IBMX). Após 48 horas de cultivo o meio foi trocado por DMEM suplementado com 15% de SFB contendo somente insulina 5 μ g/mL durante 5 dias como limite de tempo máximo de diferenciação para estas células pois diferentemente das hADSC as 3T3-L1 não param de proliferar durante a diferenciação. A diferenciação foi acompanhada por observação diária em microscópio de contraste de fase e pela coloração das gotas lipídicas citoplasmáticas com *Oil Red O* (dados não mostrados)

II.1.3 Immunoblotting

A expressão proteica de perilipina 1 e caveolina -1, relacionadas com o desenvolvimento das GLC e a diferenciação adipogênica, foi analisada por *immunoblotting*. As hADSC indiferenciadas e diferenciadas durante 21 dias foram lisadas em tampão Tris-HCL (pH 6.8) contendo 2% de SDS, 10% de glicerol e β -mercaptoetanol (tampão de Laemmli). As proteínas de cada amostra foram separadas por SDS-PAGE em gel 10%, e transferidas para membranas de nitrocelulose (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham, USA). As membranas foram posteriormente incubadas por 16 horas com anticorpo policlonal *rabbit* anti-perilipina 1 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) seguido de incubação com anticorpo secundário

conjugado com peroxidase *anti-rabbit-IgG* (Santa Cruz Biotechnology); ou incubadas por 16 horas com anticorpo policlonal *mouse anti-caveolina-1* (Santa Cruz Biotechnology) seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase *anti-mouse-IgG* (Santa Cruz Biotechnology). As proteínas marcadas foram detectadas pela reação de quimioluminescência produzida por luminol (ECL - PerkinElmer Life Sciences, CA, USA) em filmes de raio X. Para análise da expressão da proteína constitutiva usando o anticorpo policlonal *mouse anti-β Actina* (Santa Cruz Biotechnology), as membranas tiveram as marcações anteriores removidas por *stripping* com NaOH 1M. A densidade das bandas foi quantificada usando o software Alpha Ease FC software (Genetic Technology Inc, FL, USA).

II.1.4 Microscopia Eletrônica

Para a análise ultraestrutural foram utilizadas culturas indiferenciadas e induzidas para diferenciação, com 70% a 80% de confluência. Após a tripsinização os *pellets* obtidos foram ressuspensos na densidade de aproximadamente 1×10^6 células/mL para os processos de fixação (Peters e Hunziker 2001).

As células foram fixadas como descrito por Karnovsky (Karnovsky 1965): paraformaldeído 8%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH-7,4 por um período mínimo de 4 horas em temperatura ambiente seguido de pós fixação em tetróxido de ósmio 1% tamponado e desidratado em séries ascendentes de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). O *pellet* celular foi submetido aos processos de pré-embebição em misturas de 25%, 50% e 75%

entre resina epóxi (Araldite Durcupan ACM-Fluka) e acetona 100%. A inclusão dos *pellets* foi feita com resina pura dentro de todos tipo *ependorf* em estufa 60°C durante 72 horas para polimerização. Os cortes foram obtidos com 100nm de espessura por ultramicrotomia e depositados em grades de cobre com 300 *mesh*. As grades contendo os cortes foram submetidas aos processos de contrastação com acetato de uranila aquosa 2% e citrato de chumbo (Reynolds 1963). As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS) em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1200 EX II, Jeol.

II.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

II.2.1 Coloração das gotas lipídicas citoplasmáticas com *Oil Red O*

A diferenciação foi acompanhada por observação diária em microscópio de contraste de fase e pela coloração das gotas lipídicas citoplasmáticas com *Oil Red O*.

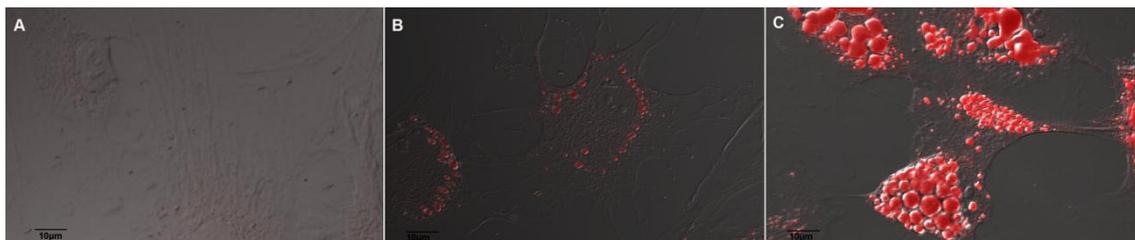


Figura 6. **A-** hADSC indiferenciadas; **B-** pré-adipócitos 7 dias; **C-** pré-adipócitos 21 dias.

II 2.2 Expressão proteica da *Perilipina-1* e *Caveolina-1*

A diferenciação adipogênica das hADSC foi acompanhada pela alteração da morfologia e pelos níveis de expressão das proteínas *Perilipina-1* e a *Caveolina-1*. Essas proteínas por suas características e relações com o metabolismo das GLC, devem ter sua expressão aumentada nas células diferenciadas para adipócitos. Como esperado, o imuno conteúdo das duas proteínas está aumentado nas células tratadas com o coquetel de diferenciação por 21 dias (Figura 7).

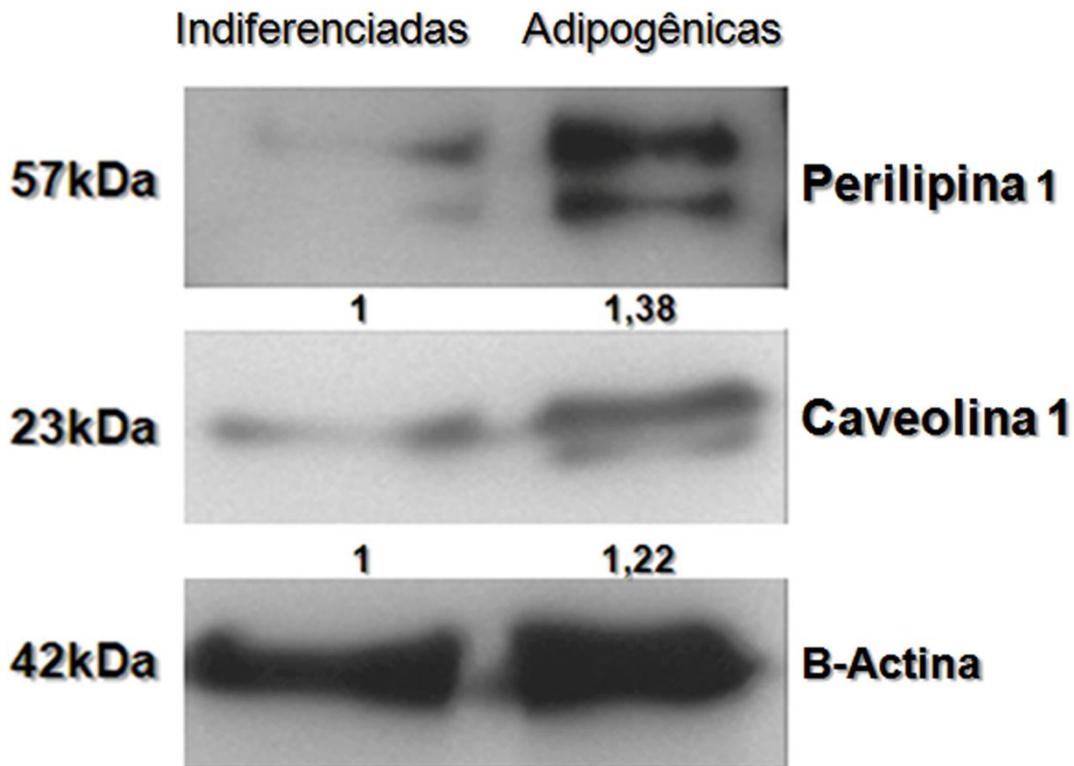


Figura 7. Expressão proteica da Perilipina 1 e da Caveolina 1 por *Immunoblotting*. As hADSC foram tratadas por 21 dias com o coquetel de diferenciação adipogênico. As células tratadas apresentam aumento no imuno conteúdo das duas proteínas (38% para Perilipina 1 e 22% para Caveolina 1).

II.2.3 Ultraestrutura das hADSC indiferenciadas

As hADSC indiferenciadas apresentam o citoplasma compacto, com baixa diversidade de organelas celulares (Figura 8A). O retículo endoplasmático rugoso (RER) aparece em forma de cisternas extremamente desenvolvidas sugerindo que estas células possuem alta capacidade de síntese proteica (Figura 8 C e D).

As mitocôndrias são pequenas e distribuídas de maneira aleatória no citoplasma. Observamos vacúolos autofágicos ou autofagossomos no citoplasma de algumas células, muitas vezes contendo material elétron denso,

sugerindo que as hADSC não diferenciadas estão renovando constantemente seu conteúdo citoplasmático (Figura 8 B,C e D).

As células também foram analisadas em altas magnificações na tentativa de observar os MCS e especializações da membrana plasmática. Dessa maneira, foi possível notar que estas células não apresentam especializações de membrana evidentes e que há pouco contato entre suas organelas.

Análises comparativas das hADSC com outras MSC demonstraram que estas células não são diferentes quanto a sua morfologia e fenótipo imunológico (Kern, Eichler et al. 2006). Da mesma maneira, a análise da ultraestrutura das hADSC demonstra que estas células não possuem estruturas especializadas, o que pode estar relacionado com o fato dessas células estarem somente em um estado proliferativo e não comprometidas com a diferenciação.

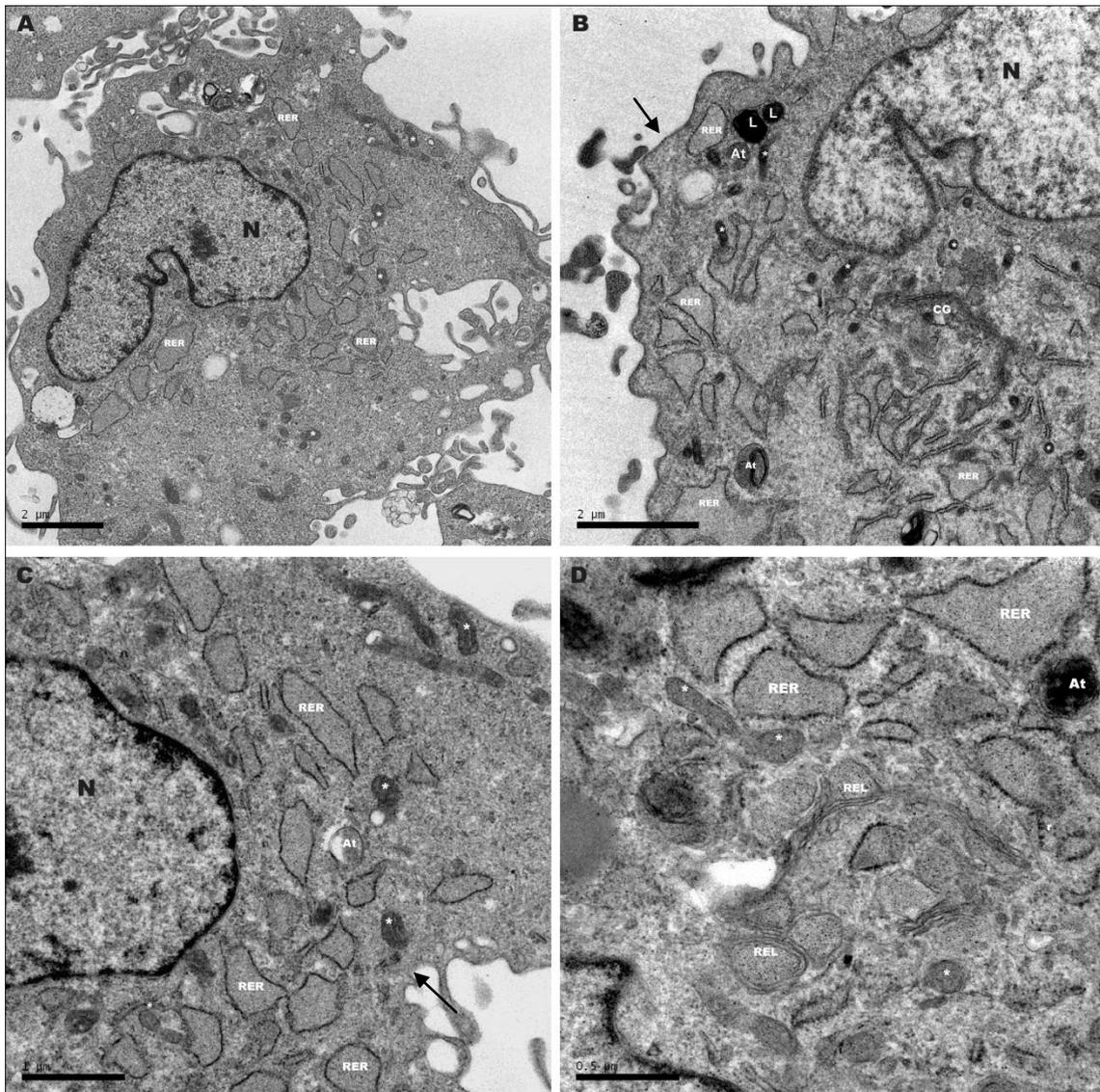


Figura 8. hADSC indiferenciadas. **A**-10.000X; **B**-15.000X; **C**- 25.000X e **D**- 50.000X. Retículo Endoplasmático Rugoso (RER); Retículo Endoplasmático Liso (REL); Autofagossomos (At); Núcleo(N); Mitocôndrias (asteriscos); Membrana Plasmática (setas)

II.2.4 Ultraestrutura das hADSC diferenciadas 7 e 21 dias

As hADSC tratadas com o coquetel de diferenciação adipogênica por 7 e 21 dias apresentaram características muito diferentes das células indiferenciadas. De fato, essas células passam a apresentar numerosas GLC de diferentes tamanhos e o citoplasma é composto por diversas organelas (Figura 9). Ocasionalmente é possível observar processos de fusão entre duas

ou mais gotas lipídicas bem como íntimas associações destas com outras organelas citoplasmáticas (Figura 9 B e C).

Em hADSC com tempo de diferenciação de 7 dias, as GLC são menores e aparecem distribuídas próximas da membrana plasmática, associadas umas as outras ou individualizadas. Há uma grande quantidade de ribossomos livres e de RER nessas células, que aparecem um pouco menos vacuolizados do que nas células indiferenciadas (Figura 12). As mitocôndrias são maiores e também mais numerosas (Figura 9D). Muitas dessas organelas foram encontradas em processos de fusão e fissão mitocondrial (Figura 9B), o que pode estar relacionado com o fato de que a diferenciação adipogênica altera a demanda energética dessas células. Da mesma maneira, durante este período de diferenciação parece haver um aumento no número de vacúolos autofágicos que pode estar relacionado com o aumento do processo de remodelamento do citoplasma que acompanha a diferenciação adipogênica (Figura 9D).

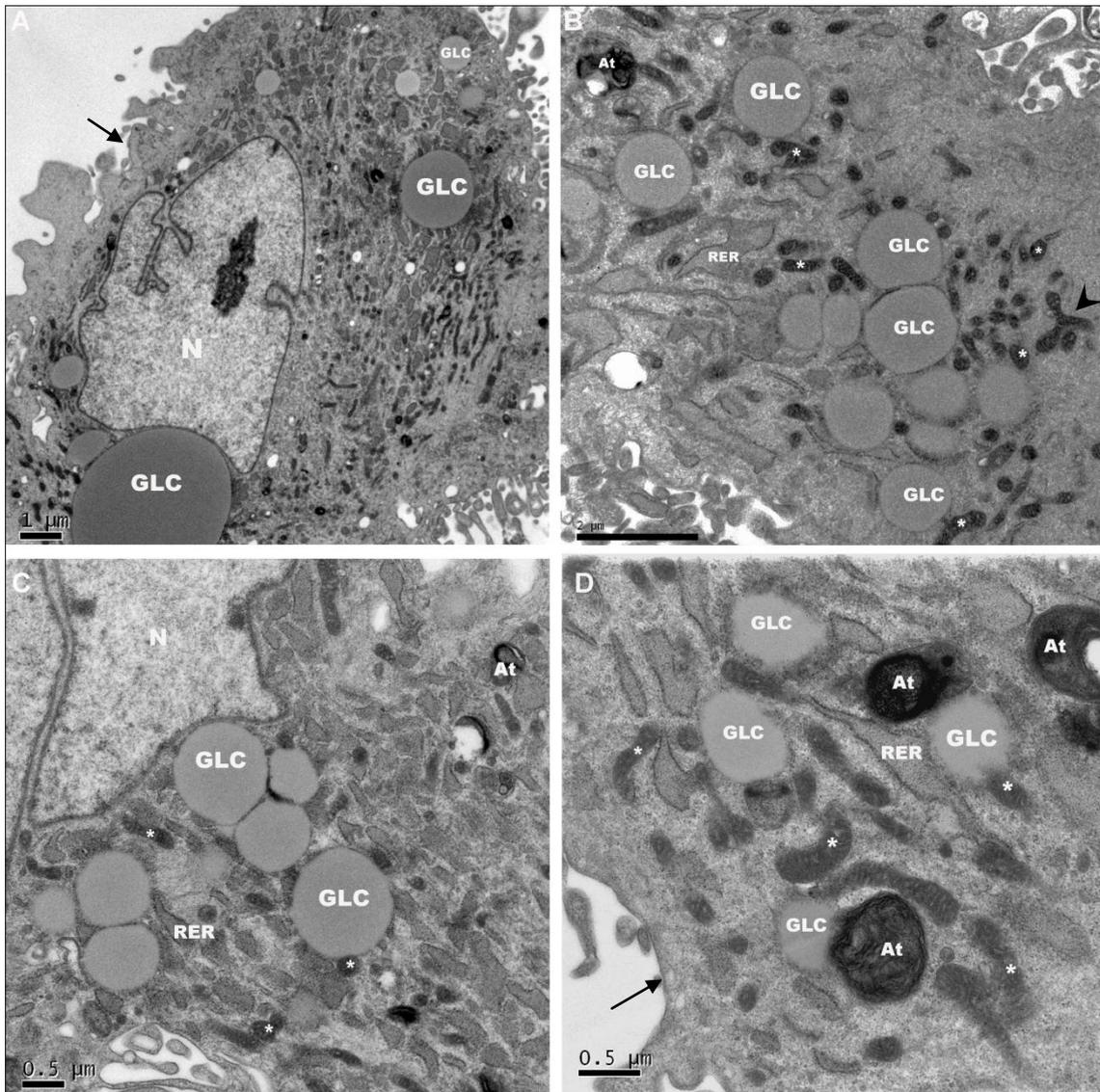


Figura 9. hADSC diferenciadas 7 dias. **A-**10.000X; **B-**15.000X; **C-** 20.000X e **D-** 30.000X. Retículo Endoplasmático Rugoso (RER); Retículo Endoplasmático Liso (REL); Autofagossomos (At) ;Núcleo(N) ; Mitocôndrias (asteriscos); Membrana Plasmática (setas), Fissão Mitocondrial (cabeça de seta); Gotas Lipídicas Citoplasmáticas (GLC).

As hADSC com tempo de diferenciação de 21 dias apresentam GLC maiores e mais perinucleares, aparecendo por vezes associadas umas as outras ou como uma grande gota lipídica (Figura 10). Nessas células também foi possível observar um aumento significativo do número de mitocôndrias e de RER associados com as GLC (Figura 10C). Também observamos estruturas elétricas justapostas as GLC, identificadas como peróxissomos por Binns *et al*,

2006 (Binns, Januszewski et al. 2006) (Figura 16). Em altas magnificações, notamos diversos tipos de MCS que serão discutidos em detalhes mais adiante (Figura 16).

Considerando todas essas informações, sugerimos que o aumento, a variedade e o número de organelas celulares, torna a célula diferenciada mais eficaz nos processos de absorção de ácidos graxos, colesterol, síntese de triglicerídeos e ésteres de colesterol envolvidos com o metabolismo de adipócitos.

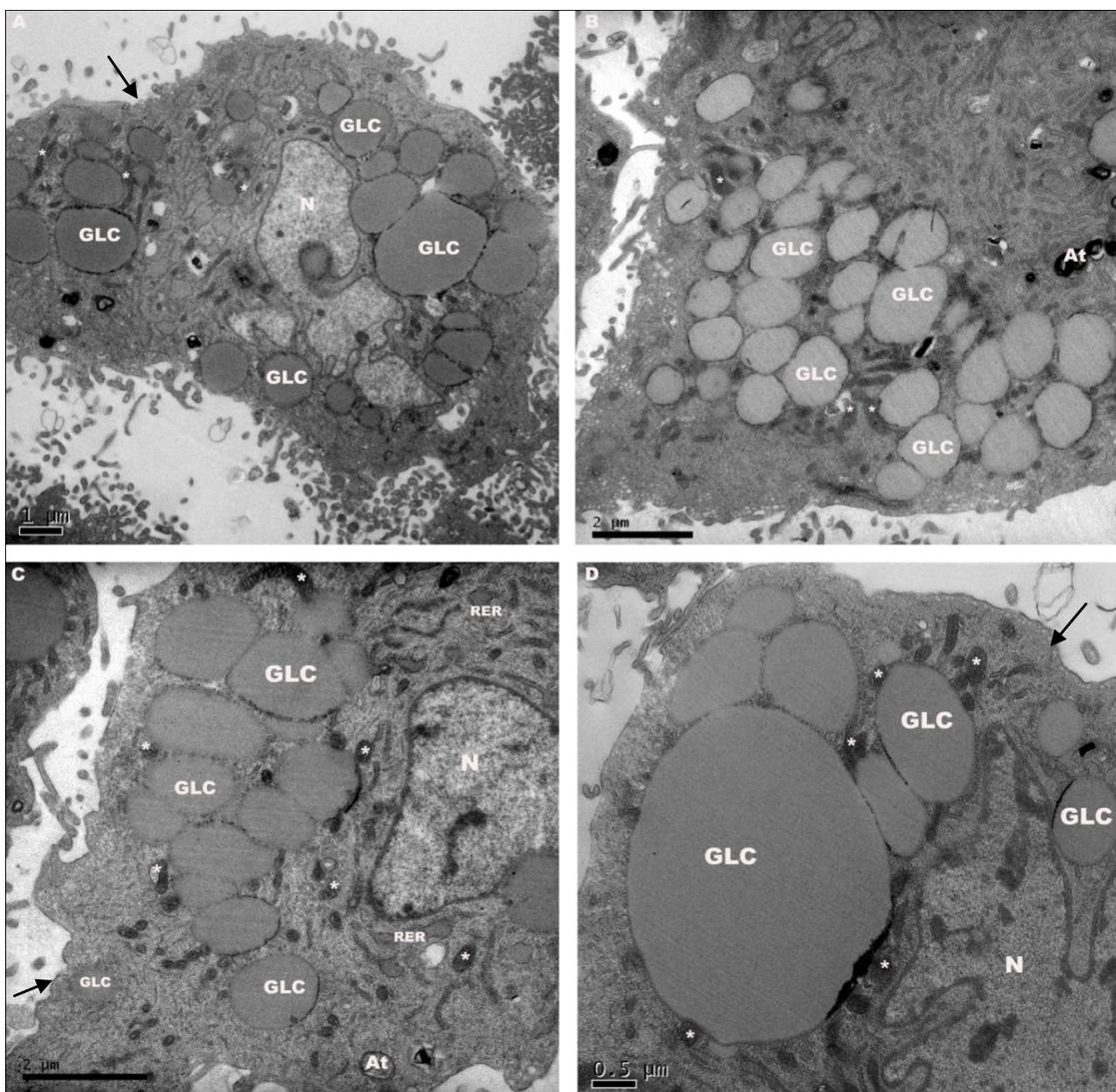


Figura 10 hADSC diferenciadas 21 dias. **A**-10.000X; **B**-12.000X; **C**- 7500X e **D**- 20.000X. Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER); Reticulo Endoplasmático Liso (REL); Autofagossomos (At); Núcleo(N); Mitocôndrias (asteriscos); Membrana Plasmática (setas), Gotas Lipídicas Citoplasmáticas (GLC).

II.2.5 Comparação ultraestrutural entre pré-adipócitos 3T3-L1 e hADSC diferenciadas durante 21 dias

A linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 é caracterizada por exibir atividades enzimáticas envolvidas na biossíntese de triglicerídeos aumentadas de 50 a 100 vezes durante a diferenciação adipogênica (Kuri-Harcuch e Green 1977) e são responsivas a agonistas β -adrenérgicos (Rubin, Lai et al. 1977). Além disto, estas células são o único modelo de pré adipócitos já descrito ultraestruturalmente (Novikoff, Novikoff et al. 1980), trabalho que é utilizado como referência até os dias atuais.

As células diferenciadas 3T3-L1 exibem grandes gotas lipídicas citoplasmáticas que se mostram elétron lucentes quando comparadas com as hADSC diferenciadas (Figura 11). Essas gotas lipídicas elétron lucentes são circundadas pelo RER. Muitas vezes foi possível observar fragmentos do RER dentro das GLC, interação que não é nítida nas hADSC (Figura 11 B,C e D). As 3T3-L1 possuem organelas extremamente desenvolvidas como retículo endoplasmático liso (REL), complexo de Golgi (CG), mitocôndrias (M) e vacúolos (V), que em conjunto com as GLC foram denominadas por Novikoff e colaboradores de “constelações” (Figura 11A e B) (Novikoff, Novikoff et al. 1980).

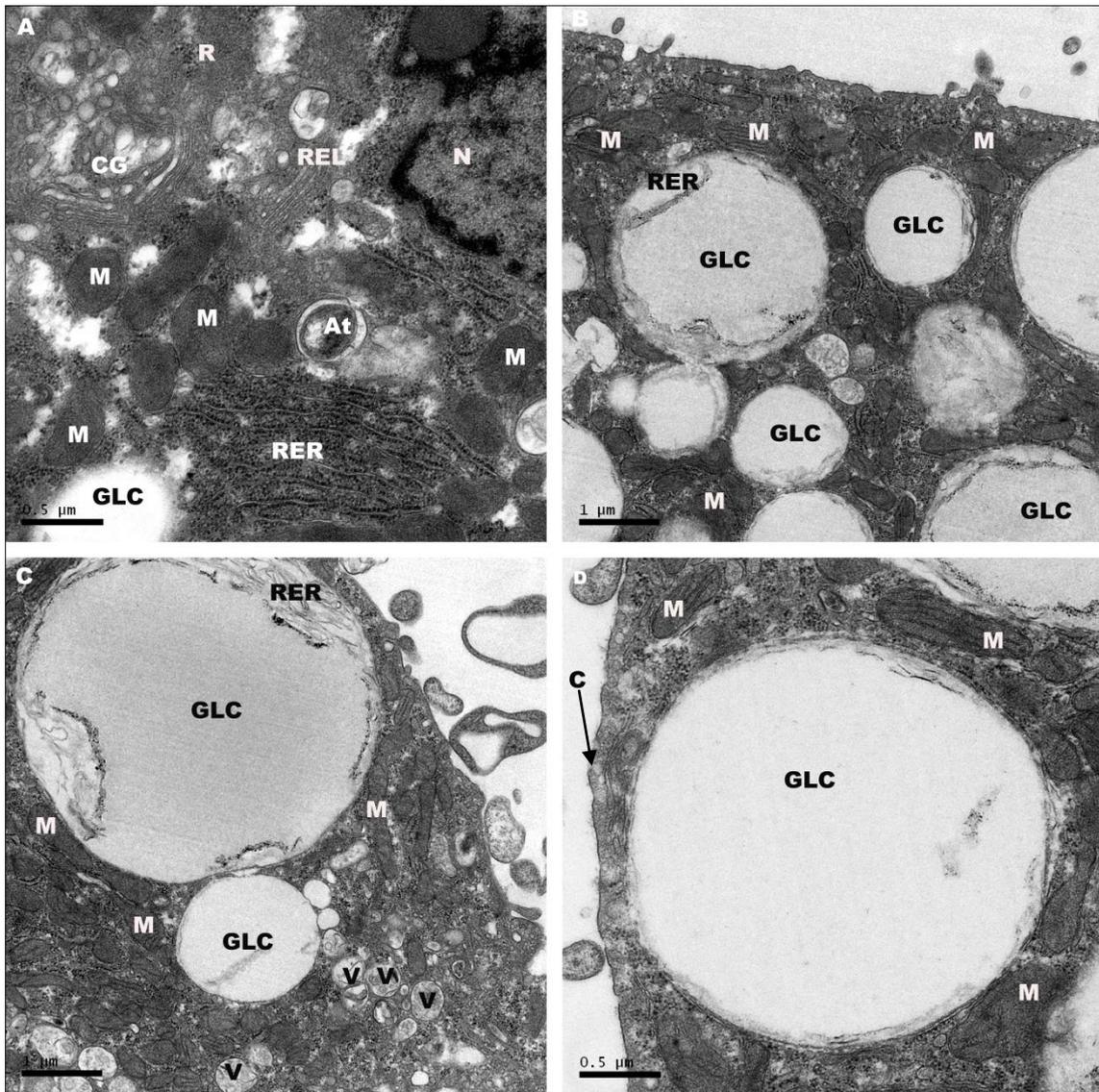


Figura 11. Pré-adipócitos 3T3-L1. **A**-50.000X; **B**-20.000X; **C**- 20.000X e **D**- 30.000X. Retículo Endoplasmático Rugoso (RER); Retículo Endoplasmático liso (REL);complexo de golgi (CG) Autofagossomos (At) ;Núcleo(N) ; Mitocôndrias (M); Membrana Plasmática (setas),Gotas Lipídicas Citoplasmáticas (GLC); Caveólas (C); Vacúolos (V).

II.2.6 Caveolas e diferenciação adipogênica

Em ambos os períodos de diferenciação foi possível observar o aumento do número de caveolas na membrana plasmática. No entanto, apenas em 21 dias de diferenciação ocorre um aumento de invaginações tridimensionais da membrana plasmática, que formam estruturas semelhantes à “rosetas” (Novikoff, Novikoff et al. 1980). O aumento no número de caveolas parece estar

associado ao tempo de diferenciação adipogênica, uma vez que estas estruturas são extremamente abundantes em adipócitos e estão relacionadas com a regulação dos estoques lipídicos nestas células (Murphy, Martin et al. 2009). Segundo Parton, (Parton e Simons 2007) o aumento na densidade de caveolas, bem como dos níveis de expressão da caveolina-1 está envolvido, principalmente, com os processos de regulação do metabolismo do colesterol e transdução de sinais em adipócitos e não adipócitos.

Durante a diferenciação adipogênica, a membrana plasmática deve aumentar sua área de superfície para metabolizar os lipídeos absorvidos de forma mais eficaz (Parton e Simons 2007). A propriedade mais intrigante e importante das caveolas é sua propriedade mecano-sensorial: estas estruturas possuem a habilidade de sentir as mudanças na tensão superficial da membrana plasmática devido ao fluxo de TG, respondendo fisicamente a estas mudanças e coordenando as transduções de sinais intracelulares necessárias para remodelação celular (Vogel e Sheetz 2006).

Quando observadas ao microscópio eletrônico de transmissão, as caveolas aparecem como invaginações similares a uma “taça” (Figuras 12,13 14 e 15) e quando cortadas transversalmente, é possível observar o perfil circular da superfície da caveola (Figuras 14 e 15)..

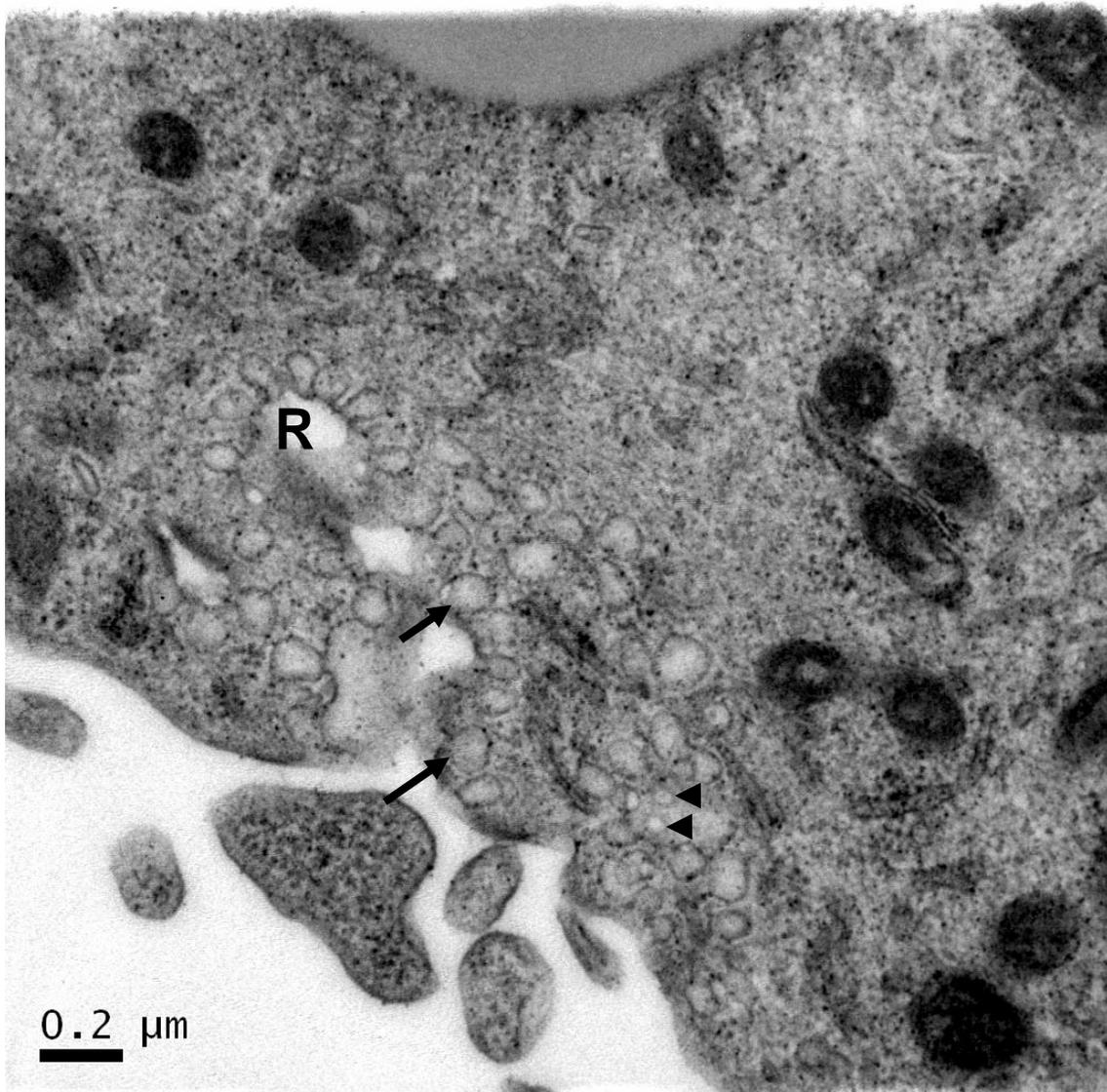


Figura 12. hADSC diferenciadas por 7 dias. 50.000x. Membrana plasmática contendo caveólas (setas); caveólas cortadas perpendiculares ao plano de corte (ponta de seta); invaginações da da membrana plasmática formando estruturas tipo “rosetas” (R).

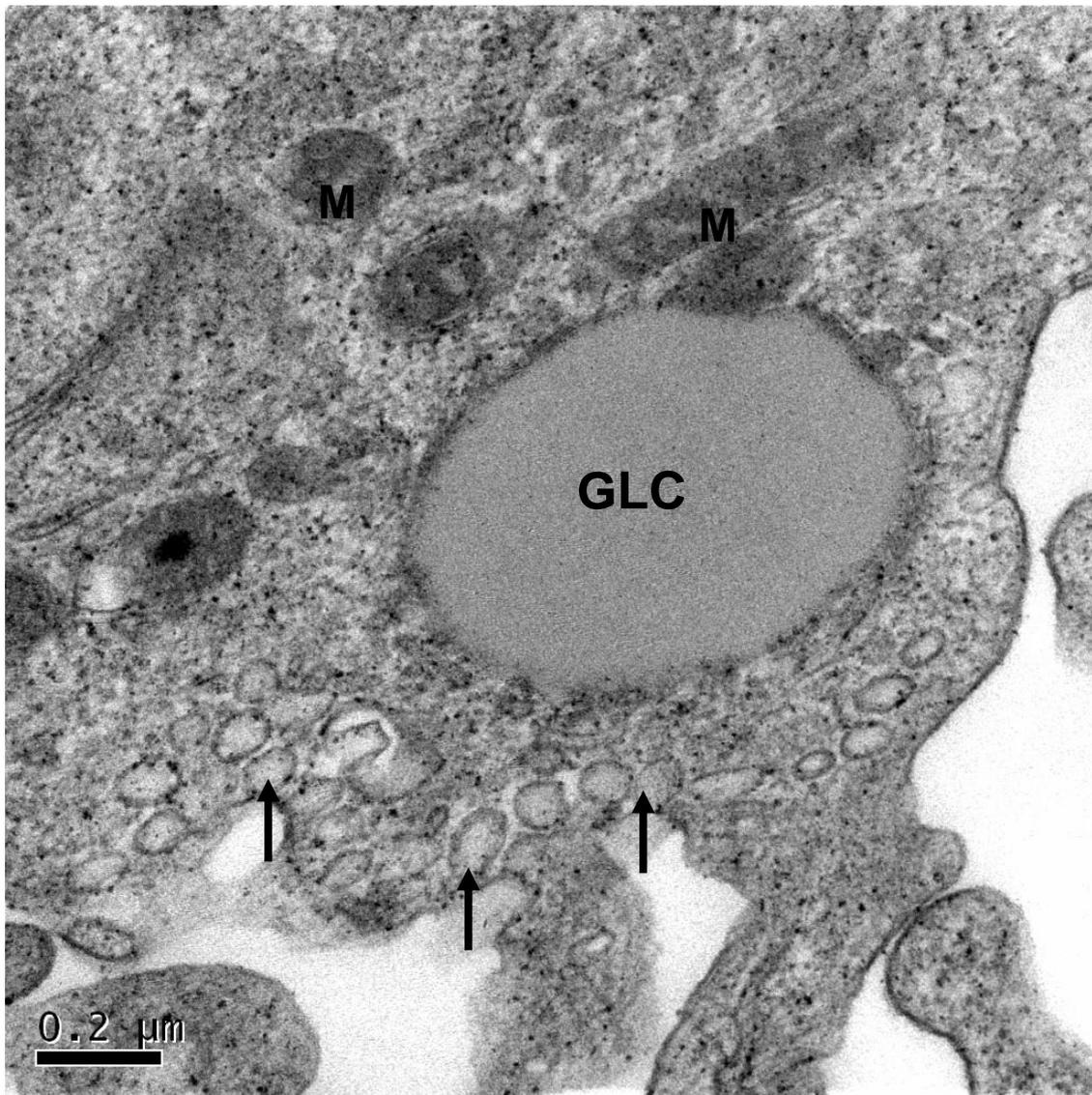


Figura 13. hADSC diferenciadas por 7 dias. 75.000x. Membrana plasmática contendo caveólas (setas); Gotas Lipídicas Citoplasmáticas (GLC); Mitocondria (M)

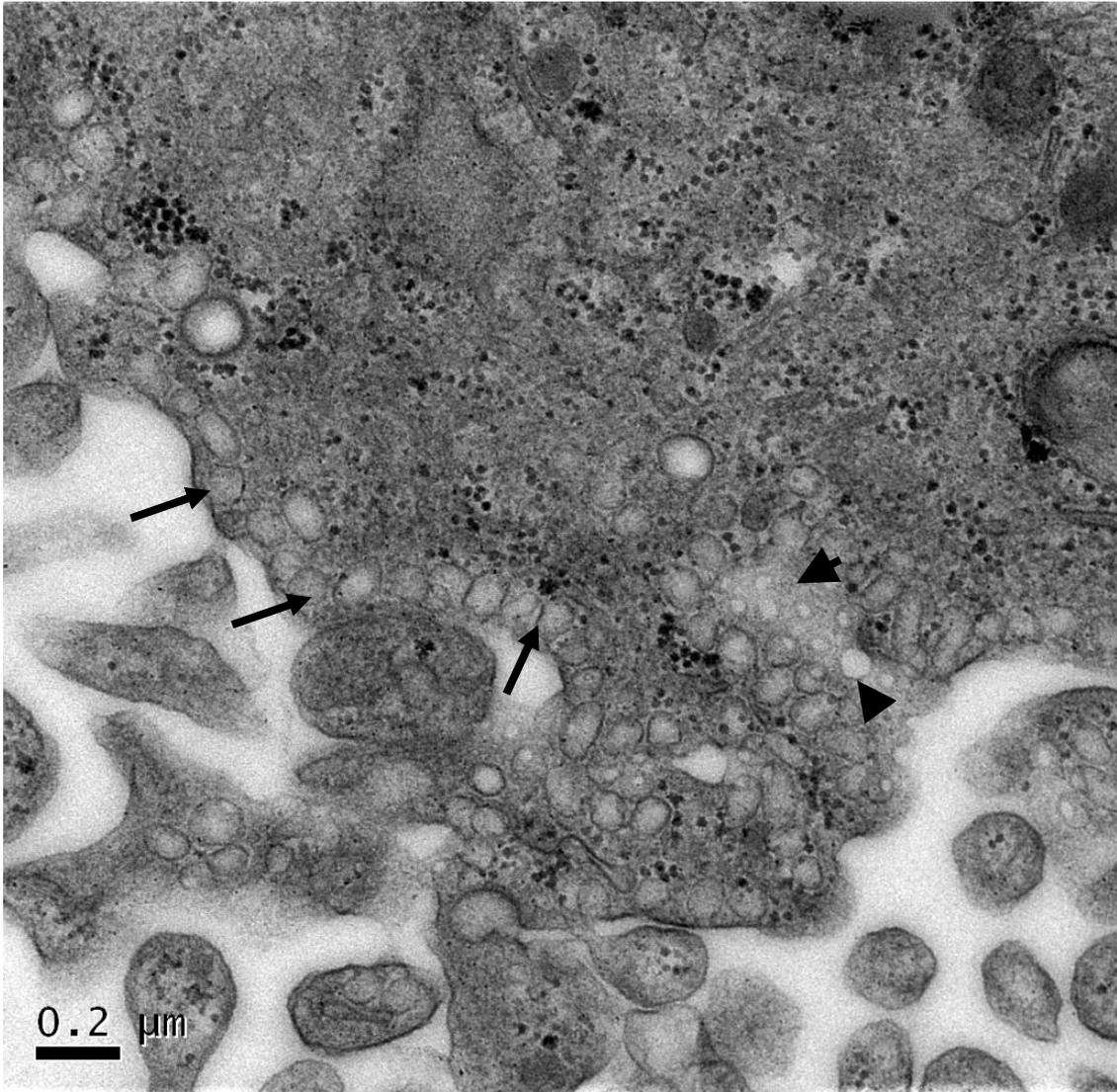


Figura 14. hADSC diferenciadas por 21 dias. 50.000x. Membrana plasmática contendo caveólas (setas); caveólas cortadas perpendiculares ao plano de corte (ponta de seta).

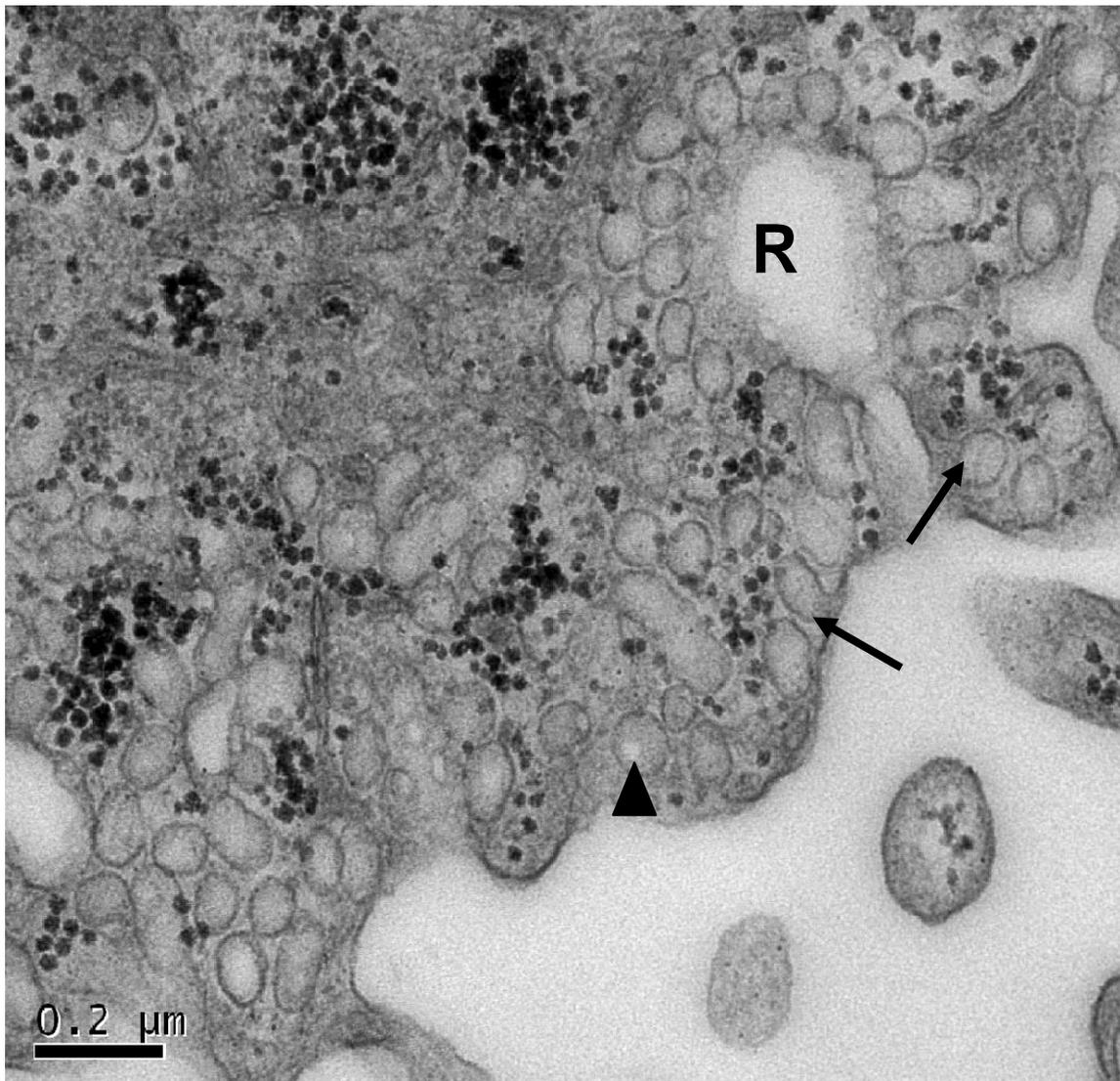


Figura 15. hADSC diferenciadas por 21 dias. 75.000x. Membrana plasmática contendo caveólas (setas); caveólas cortadas perpendiculares ao plano de corte (ponta de seta); invaginações da membrana plasmática formando estruturas tipo “rosetas” (R)

II.2.7 GLC e interações com outras organelas

As GLC são organelas que contém um núcleo de lipídeos neutros, estocados em sua maioria como TG e ésteres de colesterol (EC), circundados por uma monocamada de fosfolípidos e proteínas específicas. A síntese e a hidrólise destes TG e EC requerem a regulação extremamente controlada de enzimas específicas para evitar lipotoxicidade. Em adição aos hormônios,

interações entre organelas desempenham um importante papel na regulação do metabolismo de lipídeos (Issop, Rone et al. 2013).

Estudos de proteômica revelaram que proteínas características das gotas lipídicas como as Perilipinas e Caveolinas, são encontradas em outras organelas, facilitando a ancoragem das GLC, formando contatos de membranas do tipo LAM com as organelas alvo (Fong, Yang et al. 2002). As Perilipinas são candidatas a atuar no tráfego do colesterol para as mitocôndrias formando associações do tipo MAM (McFie, Banman et al. 2011).

LERMIT foram descritas em células esteroidogênicas (Rone, Midzak et al. 2012). A estimulação hormonal dessas células é capaz modificar a plasticidade das organelas através do rearranjo do citoesqueleto. O estudo desta plasticidade revela a existência de interações físicas que são fortemente reguladas entre GLC, o principal local de estoque de EC e TG; RER, local da regulação de tráfego lipídico e mitocôndrias, principal local da esteroidogênese. Essa interação entre as organelas indica a presença de uma função coordenada entre elas e um compartilhamento de componentes proteicos multifuncionais (Issop, Rone et al. 2013).

A microscopia eletrônica de transmissão revelou que as hADSC diferenciadas durante 21 dias possuem inúmeros MCS que conectam fisicamente as GLC com outras organelas celulares. Interações entre GLC e outras organelas podem funcionar através de processos de hemi fusão transiente e continua entre a monocamada da gota e a camada externa da bicamada lipídica destas organelas (Figura 16). Durante este processo, proteínas e frações lipídicas da superfície da GLC e componentes

correspondentes a camada externa da membrana da organela podem translocar (Beller, Thiel et al. 2010).

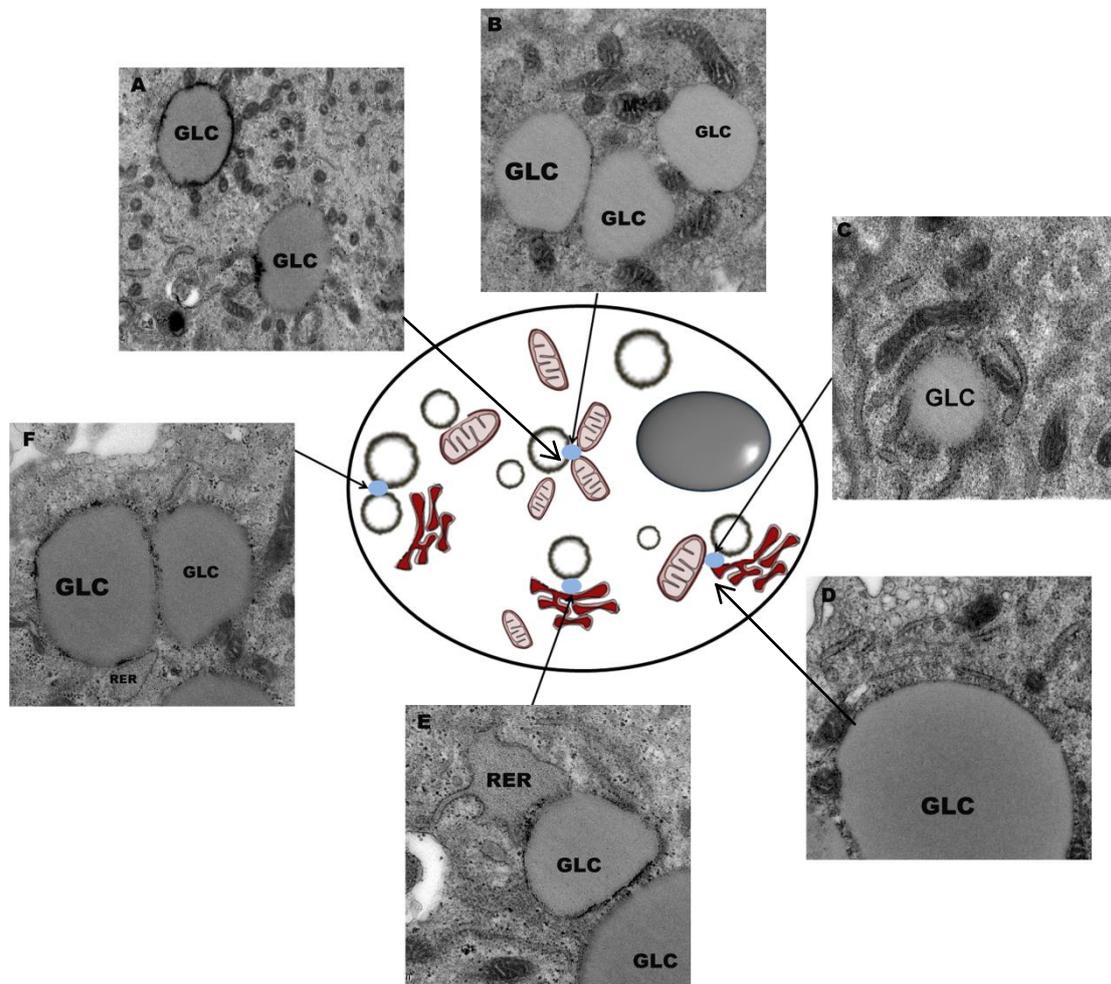


Figura 16. hADSC diferenciadas por 21 dias mostrando vários MCS (círculo azul). A e B- interações entre mitocôndrias e GLC (MAM); C e D, interações entre GLC, mitocôndrias e RER- (LERMIT); E e F, interações entre as GLC e organelas citoplasmáticas (LAM).

PARTE III

III.1 CONCLUSÕES

- 1- Este é o primeiro trabalho que apresenta a descrição ultraestrutural de hADSC indiferenciadas e induzidas para diferenciação adipogênica durante 7 e 21 dias através da microscopia eletrônica de transmissão. Estes dados são importantes e servirão como modelo para futuros estudos.
- 2- A análise da ultraestrutura das hADSC indiferenciadas demonstrou que estas células não possuem estruturas especializadas, apresentando o citoplasma com organelas pouco desenvolvidas. Esta característica deve estar relacionada com o fato de essas células estarem comprometidas com o estado de proliferação, mas não com a diferenciação.
- 3- Em hADSC com tempo de diferenciação de 7 dias, observamos o surgimento de GLC que são menores e aparecem distribuídas próximas da membrana plasmática, associadas umas as outras ou individualizadas. As organelas celulares aparecem de forma mais desenvolvida e as células estão remodelando seu citoplasma, processos que acompanham a diferenciação.
- 4- Em hADSC com tempo de diferenciação de 21 dias as GLC são maiores, as organelas citoplasmáticas são extremamente desenvolvidas e a membrana plasmática possui inúmeras caveolas. As mudanças que acompanham a diferenciação adipogênica devem tornar estas células mais eficazes nos processos de absorção e síntese de TG e EC envolvidos com o metabolismo de adipócitos.

- 5- As células diferenciadas 3T3-L1 exibem grandes GLC elétrons lucentes. Essas GLC são circundadas pelo RER e observamos fragmentos do RER dentro das GLC, interação que não é nítida nas hADSC.
- 6- As hADSC diferenciadas durante 21 dias possuem inúmeros MCS que conectam fisicamente as GLC com outras organelas celulares. Os estudos dos MCS em pré-adipócitos podem elucidar os processos envolvidos na biogênese e metabolismo das GLC.
- 7- Este trabalho mostra a importância de estudos que visam esclarecer como as GLC são formadas, modificadas e reguladas. Através destes estudos poderemos ter uma melhor compreensão acerca da relação existente entre o acúmulo excessivo de lipídios no organismo e a chamada síndrome metabólica (obesidade, diabetes e aterosclerose).

III.2 PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos até o momento pretendemos:

- a) Identificar, através de microscopia eletrônica de transmissão e usando a técnica de *immunogold*, a localização intracelular das proteínas Perilipina-1 e Caveolina-1.
- b) Observar utilizando marcadores específicos de organelas e proteínas características das GLC, através de microscopia confocal, se ocorre compartilhamento de proteínas nos diferentes MCS,.
- c) Verificar a existência de gangliosídeos nas GLC e em outras organelas por microscopia confocal.

REFERÊNCIAS

- Alberts, B., A. Johnson, et al. (2010). Biologia Molecular da Célula. Porto Alegre, ARTMED.
- Beller, M., K. Thiel, et al. (2010). "Lipid droplets: a dynamic organelle moves into focus." FEBS Lett **584**(11): 2176-2182.
- Beyer Nardi, N. e L. da Silva Meirelles (2006). "Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization." Handb Exp Pharmacol(174): 249-282.
- Bianco, P., M. Riminucci, et al. (2001). "Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications." Stem Cells **19**(3): 180-192.
- Binns, D., T. Januszewski, et al. (2006). "An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies." J Cell Biol **173**(5): 719-731.
- Blouin, C. M., S. Le Lay, et al. (2008). "Regulated association of caveolins to lipid droplets during differentiation of 3T3-L1 adipocytes." Biochem Biophys Res Commun **376**(2): 331-335.
- Caplan, A. I. e S. P. Bruder (2001). "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century." Trends Mol Med **7**(6): 259-264.
- Chini, B. e M. Parenti (2004). "G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?" J Mol Endocrinol **32**(2): 325-338.
- Cohen, A. W., B. Razani, et al. (2004). "Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation." Diabetes **53**(5): 1261-1270.
- Cornelius, P., O. A. MacDougald, et al. (1994). "Regulation of adipocyte development." Annu Rev Nutr **14**: 99-129.
- Cushman, S. W. (1970). "Structure-function relationships in the adipose cell. I. Ultrastructure of the isolated adipose cell." J Cell Biol **46**(2): 326-341.
- Ducharme, N. A. e P. E. Bickel (2008). "Lipid droplets in lipogenesis and lipolysis." Endocrinology **149**(3): 942-949.
- Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." J Allergy Clin Immunol **115**(5): 911-919; quiz 920.
- Fantuzzi, G. e T. Mazzone (2007). "Adipose tissue and atherosclerosis: exploring the connection." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(5): 996-1003.

- Farese, R. V., Jr. e T. C. Walther (2009). "Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T." Cell **139**(5): 855-860.
- Fernandez, M. A., C. Albor, et al. (2006). "Caveolin-1 is essential for liver regeneration." Science **313**(5793): 1628-1632.
- Fodor, W. L. (2003). "Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate." Reprod Biol Endocrinol **1**: 102.
- Fong, T. H., C. C. Yang, et al. (2002). "Immunocytochemical studies on lipid droplet-surface proteins in adrenal cells." J Cell Biochem **86**(3): 432-439.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, et al. (1974). "Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo." Transplantation **17**(4): 331-340.
- Gimble, J. M., A. J. Katz, et al. (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-1260.
- Giordano, A., U. Galderisi, et al. (2007). "From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells." J Cell Physiol **211**(1): 27-35.
- Goetz, J. G., P. Lajoie, et al. (2008). "Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly." Cancer Metastasis Rev **27**(4): 715-735.
- Green, H. e M. Meuth (1974). "An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture." Cell **3**(2): 127-133.
- Horwitz, E. M., K. Le Blanc, et al. (2005). "Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement." Cytotherapy **7**(5): 393-395.
- Issop, L., M. B. Rone, et al. (2013). "Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis." Molecular and Cellular Endocrinology **In Press**.
- Karnovsky, M. J. (1965). "A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy." Journal of Cell Biology **27**: 137A-138A.
- Keating, A. (2006). "Mesenchymal stromal cells." Curr Opin Hematol **13**(6): 419-425.
- Kern, S., H. Eichler, et al. (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." Stem Cells **24**(5): 1294-1301.

- Kuri-Harcuch, W. e H. Green (1977). "Increasing activity of enzymes on pathway of triacylglycerol synthesis during adipose conversion of 3T3 cells." J Biol Chem **252**(6): 2158-2160.
- Lebiedzinska, M., G. Szabadkai, et al. (2009). "Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 1805-1816.
- Levine, T. e C. Loewen (2006). "Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly." Curr Opin Cell Biol **18**(4): 371-378.
- Liu, P., R. Bartz, et al. (2007). "Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets." Biochim Biophys Acta **1773**(6): 784-793.
- Locke, M., J. Windsor, et al. (2009). "Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery." ANZ J Surg **79**(4): 235-244.
- Mastrodonato, M., G. Calamita, et al. (2011). "Altered distribution of caveolin-1 in early liver steatosis." Eur J Clin Invest **41**(6): 642-651.
- McFie, P. J., S. L. Banman, et al. (2011). "Murine diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) can catalyze triacylglycerol synthesis and promote lipid droplet formation independent of its localization to the endoplasmic reticulum." J Biol Chem **286**(32): 28235-28246.
- Murphy, D. J. (2001). "The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms." Prog Lipid Res **40**(5): 325-438.
- Murphy, D. J. e J. Vance (1999). "Mechanisms of lipid-body formation." Trends Biochem Sci **24**(3): 109-115.
- Murphy, S., S. Martin, et al. (2009). "Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 441-447.
- Nelson, D. L. e M. M. Cox (2007). Princípios de Bioquímica de Lehninger, Sarvier.
- Novikoff, A. B., P. M. Novikoff, et al. (1980). "Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes." J Cell Biol **87**(1): 180-196.
- Ohsaki, Y., J. Cheng, et al. (2009). "Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure." Biochim Biophys Acta **1791**(6): 399-407.
- Ortegren, U., L. Yin, et al. (2006). "Separation and characterization of caveolae subclasses in the plasma membrane of primary adipocytes; segregation of specific proteins and functions." FEBS J **273**(14): 3381-3392.

- Ozeki, S., J. Cheng, et al. (2005). "Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane." J Cell Sci **118**(Pt 12): 2601-2611.
- Pani, B. e B. B. Singh (2009). "Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling." Cell Calcium **45**(6): 625-633.
- Parat, M. O. e G. J. Riggins (2012). "Caveolin-1, caveolae, and glioblastoma." Neuro Oncol **14**(6): 679-688.
- Parton, R. G. e K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(3): 185-194.
- Peters, P. J. e W. Hunziker (2001). "Subcellular localization of Rab17 by cryo-immunogold electron microscopy in epithelial cells grown on polycarbonate filters." Methods Enzymol **329**: 210-225.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-147.
- Pohl, J., A. Ring, et al. (2002). "Uptake of long-chain fatty acids in HepG2 cells involves caveolae: analysis of a novel pathway." J Lipid Res **43**(9): 1390-1399.
- Poulos, S. P., M. V. Dodson, et al. (2010). "Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes." Exp Biol Med (Maywood) **235**(10): 1185-1193.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." Science **276**(5309): 71-74.
- Rajendran, L., S. Le Lay, et al. (2007). "Raft association and lipid droplet targeting of flotillins are independent of caveolin." Biol Chem **388**(3): 307-314.
- Reue, K. (2011). "A thematic review series: lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man." J Lipid Res **52**(11): 1865-1868.
- Reynolds, E. S. (1963). "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy." J Cell Biol **17**: 208-212.
- Robenek, H., O. Hofnagel, et al. (2006). "Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis." J Cell Sci **119**(Pt 20): 4215-4224.
- Rone, M. B., A. S. Midzak, et al. (2012). "Identification of a dynamic mitochondrial protein complex driving cholesterol import, trafficking, and metabolism to steroid hormones." Mol Endocrinol **26**(11): 1868-1882.

- Rosen, E. D. e O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(12): 885-896.
- Rubin, C. S., E. Lai, et al. (1977). "Acquisition of increased hormone sensitivity during in vitro adipocyte development." J Biol Chem **252**(10): 3554-3557.
- Schaffler, A., K. Landfried, et al. (2007). "Potential of adipocytokines in predicting peripancreatic necrosis and severity in acute pancreatitis: pilot study." J Gastroenterol Hepatol **22**(3): 326-334.
- Schrader, M. (2001). "Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets." J Histochem Cytochem **49**(11): 1421-1429.
- Sethe, S., A. Scutt, et al. (2006). "Aging of mesenchymal stem cells." Ageing Res Rev **5**(1): 91-116.
- Sturme, R. G., P. J. O'Toole, et al. (2006). "Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte." Reproduction **132**(6): 829-837.
- Suzuki, M., Y. Shinohara, et al. (2011). "Lipid droplets: size matters." J Electron Microsc (Tokyo) **60 Suppl 1**: S101-116.
- Trayhurn, P., B. Wang, et al. (2008). "Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity?" Br J Nutr **100**(2): 227-235.
- Turro, S., M. Ingelmo-Torres, et al. (2006). "Identification and characterization of associated with lipid droplet protein 1: A novel membrane-associated protein that resides on hepatic lipid droplets." Traffic **7**(9): 1254-1269.
- van Meer, G., D. R. Voelker, et al. (2008). "Membrane lipids: where they are and how they behave." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(2): 112-124.
- Vogel, V. e M. Sheetz (2006). "Local force and geometry sensing regulate cell functions." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(4): 265-275.
- Walther, T. C. e R. V. Farese, Jr. (2012). "Lipid droplets and cellular lipid metabolism." Annu Rev Biochem **81**: 687-714.
- Yarak, S. e O. K. Okamoto (2010). "Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives." An Bras Dermatol **85**(5): 647-656.
- Zhu, Y., T. Liu, et al. (2008). "Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC." Cell Biochem Funct **26**(6): 664-675.
- Zuk, P. A., M. Zhu, et al. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." Mol Biol Cell **13**(12): 4279-4295.

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Potencial de diferenciação em múltiplas linhagens da MSCs | 13 |
| Figura 2 Anatomia da Gota Lipídica Citoplasmática (GLC) | 18 |
| Figura 3 Modelo da formação da GLC no Retículo Endoplasmático..... | 19 |
| Figura 4 Interações das GLC e outras organelas | 22 |
| Figura 5 Imagem ilustrativa de uma caveola com seus componentes | 24 |
| Figura 6. hADSC indiferenciadas; pré-adipócitos 7 dias e- pré-adipócitos 21 dias..... | 35 |
| Figura 7 Expressão proteica da Perilipina 1 e da Caveolina 1 por <i>Immunoblotting</i> | 36 |
| Figure 8 hADSC indiferenciadas | 38 |
| Figure 9 hADSC diferenciadas 7 dias | 40 |
| Figure 10 hADSC diferenciadas 21 dias | 41 |
| Figure 11 Pré-adipócitos 3T3-L1 | 43 |
| Figure 12 hADSC diferenciadas por 7 dias | 45 |
| Figure 13 hADSC diferenciadas por 7 dias | 46 |
| Figure 14 hADSC diferenciadas por 21 dias | 47 |
| Figure 15 hADSC diferenciadas por 21 dias | 48 |
| Figure 16 hADSC diferenciadas por 21 dias mostrando vários MCS | 50 |