

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF. TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Papel da Caveolina-1 na Capacidade de Migração e Proliferação de Células Estreladas
Hepáticas

MARIANA ILHA

Orientador: Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma

Porto Alegre, Março de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA PROF.TUISKON DICK
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA

Papel da Caveolina-1 na Capacidade de Migração e Proliferação de Células Estreladas
Hepáticas

MARIANA ILHA

Orientador: Fátima Theresinha Costa Rodrigues Guma

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas ICBS – Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Sul para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.**

Porto Alegre, Março de 2015

O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas

(Claude Lévi-Strauss)

A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original

(Albert Einstein)

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer imensamente aos meus pais maravilhosos Nelson e Adriane por todo o carinho familiar e o apoio aos estudos.

Aos meus queridos avós, Arno e Lourdes meus segundos pais por todo o carinho, suporte psicológico e aconselhamentos sobre futuros e profissões.

Aos meus queridos avós, Henrique e Walmy por me iniciar no esporte que me faz feliz, o voleibol.

Aos meus queridos irmãos Gustavo e Felipe que sempre me encorajaram a enfrentar os mais difíceis problemas.

A toda a minha família, meu porto seguro, que sempre foi muito unida.

Ao meu namorado Eduardo Nunes por todo o carinho e amor ao longo destes anos.

Ao meu amigo e colega Leo Meira por toda a ajuda com este trabalho.

Aos colegas e amigos do laboratório 21 pelas rodas de mate e amizade ao longo dos anos.

A minha orientadora, Fátima por sempre me apoiar, orientar, acreditar e me trazer para o caminho da pesquisa.

A Florência por me ensinar muitas das técnicas realizadas neste trabalho.

Aos demais professores deste PPG pelas excelentes aulas de pós-graduação.

Aos suportes financeiros CAPES, CNPq e FAPERGS pelos anos de auxílio à pesquisa realizada neste laboratório.

Resumo

A fibrose hepática é uma característica comum de diversas doenças crônicas do fígado e é caracterizada pela deposição excessiva de matriz extracelular no órgão. Em última instância, essa alteração anormal do parênquima hepático acarreta em hipertensão portal, cirrose e insuficiência do fígado, o que pode levar o paciente à morte. As células estreladas hepáticas (HSC) participam ativamente deste processo, modificando seu fenótipo quiescente, rico em gotas lipídicas no citoplasma, para o fenótipo ativado, em resposta a um insulto hepático. A linhagem GRX é um modelo de HSC ativadas. As caveolas são pequenas invaginações de 50-100 nm da membrana plasmática que são ricas em glicosíngolipídeos, colesterol e proteínas GPI ancoradas. Elas são caracterizadas pela presença de caveolina, uma proteína estrutural específica desta organela. Estas pequenas organelas, consideradas especializações dos “rafts” lipídicos, estão presentes nos mais diversos tipos celulares e podem funcionar como plataformas onde se ancoram várias proteínas de membrana. Estas proteínas reconhecem sinais externos e transmitem sinais moduladores da atividade celular, regulando ou facilitando o transporte de ácidos graxos e de lipídeos, e também são responsáveis pelo transporte de vesículas de membrana. As caveolinas são as principais proteínas estruturais das caveolas, sendo a caveolina-1 (Cav-1) a mais importante. A Cav-1 é encontrada em todos os tipos celulares e está relacionada com a transformação oncogênica e tumorigênese. Estudos já mostraram a interação entre as caveolas e os filamentos de actina, os microtúbulos, e os filamentos intermediários. Em fígados cirróticos foi encontrado um aumento da expressão de Cav-1 nas células endoteliais sinusoidais e nas HSC. Em trabalho anterior, utilizamos o plasmídeo pCav1EGFP para a obtenção de uma linhagem permanente que superexpressa a Cav-1 e a proteína EGFP, a $GRX^{EGFP-Cav}$. Neste trabalho, nós caracterizamos, bioquímica e morfológicamente, essa linhagem e realizamos outra transfecção com o plasmídeo vazio pCineoEGFP para estabelecer uma linhagem controle, a $GRX^{EGFPpCineo}$. Através de métodos de análise bioquímica, de imunocitoquímica, de citometria de fluxo e de microscopia confocal e eletrônica de transmissão, mostramos que a superexpressão de Cav-1, aumentou a proliferação e a adesão celular, alterou a morfologia e a estrutura do citoesqueleto das células, a capacidade de migração e de endocitose da $GRX^{EGFP-Cav}$. A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão revelou o aumento do número de caveolas na membrana plasmática. As alterações do citoesqueleto de actina e o aumento da afinidade célula-célula são indicativos de maior mobilidade celular. Esses resultados somados ao aumento do conteúdo de α SMA e Col-I sugerem a modulação da $GRX^{EGFP-Cav}$ para um fenótipo de miofibroblasto ativado característico de situações de dano hepático. Como a distribuição e a significância da expressão de Cav-1 em fígados normais e cirróticos são pouco conhecidas, e considerando o papel das HSC nas doenças hepáticas, entendemos que a linhagem permanente $GRX^{EGFP-Cav}$ pode ser uma ferramenta experimental muito interessante para o estudo destas patologias.

Palavras chaves: Caveola, Caveolina-1, Células Estreladas Hepáticas, Fibrose Hepática

Abstract

Liver fibrosis is a common feature of several chronic hepatic diseases and is characterized by the excessive deposition of extracellular matrix in the organ. Usually, this abnormal change of the hepatic parenchyma causes portal hypertension, cirrhosis and liver failure, which can lead to the patient death. Hepatic stellate cells (HSC) participate actively in this process through modifying their quiescent phenotype rich in lipid droplets in the cytoplasm to the activated phenotype in response to the liver injury. GRX line is a model of activated HSC. The caveolae are small invaginations of plasma membrane that reaches 50-100nm of size, rich in glycosphingolipids, cholesterol, and GPI-anchored proteins. These organelles are characterized by the presence of caveolin, a structural and specific protein. These small organelles, which are considered specializations of lipid "rafts" and can be present in several cell types, can act as anchoring platforms for several membrane proteins. These proteins recognize external signals and transmit these signals to modulate the cell activity through regulating or facilitating the transport of fatty acids and lipids, being also responsible for the transport of membrane vesicles. Caveolins are the main structural proteins of caveolae and caveolin-1 (Cav-1) is the most important. Cav-1 is found in all cell types and is related to the oncogenic transformation and tumorigenesis. Previous studies have shown the interaction among caveolae, actin filaments, microtubules, and intermediate filaments. Also, it was found an increase of Cav-1 expression in sinusoidal endothelial cells and HSC of cirrhotic livers, which was suggested to be related to the portal hypertension that accompanies the process of fibrosis. In a previous work, we used the pCav1EGFP plasmid to obtain a permanent cell strain that overexpresses Cav-1 protein and EGFP, which was named GRX^{EGFP-Cav}. In this work we biochemical and morphologically characterized this strain. We also did another cell transfection with an empty pCineoEGFP plasmid to establish a permanent control cell line, which was named GRX^{EGFPpCineo}. Through biochemical analysis, immunocytochemistry, flow cytometry, confocal and electron transmission microscopy, we showed that Cav-1overexpression increased cell proliferation and adhesion, changed cell morphology and cytoskeleton structure, and the cell migration and endocytosis capacity of GRX^{EGFP-Cav}. The actin cytoskeletal changes and the increased cell-cell affinity are indicative of greater cell motility. These results associated to the increase of α SMA and Col-I contents suggest the GRX^{EGFP-Cav} modulation be the activated myofibroblast that characterizes liver damage. As the distribution and the significance of Cav-1 expression in normal and cirrhotic livers are little known and considering the role of HSC in liver diseases, we believe that the permanent GRX^{EGFP-Cav} line can be a very interesting experimental tool for the study of these pathologies.

Keywords: Caveolae, Caveolin-1, Hepatic Stellate Cells, Liver Fibrosis

Lista de Abreviaturas

- α -SMA- Alfa actina de músculo liso
- Cav-1- Caveolina-1
- Cav-2- Caveolina-2
- Cav-3- Caveolina-3
- CSD- Caveolin scaffold domain
- Col-I- Colágeno do tipo I
- EGF- Fator de crescimento epidermal
- EGFP- Enhanced Green Fluorescent Protein
- EGFR- Receptor de fatores de crescimento epidermais
- eNOS- Óxido nítrico sintase endotelial
- ER- Retículo Endoplasmático
- GPCRs- Receptores acoplados a proteína G
- GPI- Glicosilfosfatidilinositol
- GRX- Linhagem representativa da célula estrelada hepática
- GRX^{EGFP-Cav} – Linhagem GRX transfectada que superexpressa a Caveolina-1
- GRX^{EGFPpCineo} – Linhagem GRX transfectada com o plasmídeo vazio
- HSC- *HepaticStellateCells* em português: célula estrelada hepática
- MEC- Matriz extracelular
- MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
- NOS- Óxido nítrico sintase
- nRTK-Non-receptor tyrosine kinases
- PCK- Proteína cinase K
- PDGF- Fator de crescimento de plaquetas
- PKA- Proteína cinase A
- RHOA- Gene homólogo da família Ras, membro A
- SRB - Sulforrodamina B

TGF- β 1- Fator de crescimento tumoral beta

Lista de Figuras

Introdução

Figura 1- Estrutura do lóbulo hepático.....	2
Figura 2- Estrutura histológica do Espaço de Disse e células associadas.....	4
Figura 3- Microscopia eletrônica de uma célula de músculo liso da artéria pulmonar mostrando uma típica invaginação de caveolas.....	7
Figura 4- - Detalhe de uma caveola com suas múltiplas proteínas e moléculas.....	9
Figura 5- Estrutura do gene das três isoformas humanas da caveolina.....	11
Figura 6- Domínios da proteína Cav-1.....	12

Resultados

Figura 7- A expressão de EGFP confirma a eficiência da transfecção nas linhagens $GRX^{EGFP-Cav}$ e $GRX^{EGFPpCineo}$	23
Figura 8- A expressão da proteína EGFP confirma a transfecção com o plasmídeo pCineoEGFP.....	24
Figura 9- A transfecção com plasmídeo pCav-1EGFP aumentou a expressão de Cav-1 na linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$	24
Figura 10- A superexpressão de Cav-1 aumentou a biomassa nas culturas da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$	25
Figura 11- A superexpressão de Cav-1 estimulou a proliferação das células $GRX^{EGFP-Cav}$	26
Figura 12- A superexpressão de Cav-1 aumentou adesão das células da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$	27
Figura 13- A superexpressão de Cav-1 alterou as propriedades de adesão da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$	27
Figura 14- A transfecção provocou o aumento do tamanho das células das linhagens $GRX^{EGFPpCineo}$ e $GRX^{EGFP-Cav}$	28
Figura 15- A superexpressão de Cav-1 aumentou a granulosidade da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$	28

Figura 16- A expressão de Cav-1 alterou o citoesqueleto de actina da linhagem GRX ^{EGFP-Cav}	29
Figura 17- A superexpressão de Cav-1 aumentou a densidade de caveolas na linhagem GRX ^{EGFP-Cav}	30
Figura 18- A superexpressão de Cav-1 aumentou a concentração de autofagossomos na linhagem GRX ^{EGFP-Cav}	31
Figura 19- A transfecção induziu aumento da expressão de α SMA nas células GRX ^{EGFP-Cav} e GRX ^{EGFP-Cineo}	32
Figura 20- A superexpressão de Cav-1 induziu o aumento da expressão de Col1 nas células GRX ^{EGFP-Cav}	33
Figura 21- A transfecção afeta a migração medida pelo ensaio de wound-healing.....	34
Figura 22- A superexpressão de Cav-1 induz a formação de grumos.....	35
Figura 23- A superexpressão de Cav-1 estimulou a endocitose nas células GRX ^{EGFP-Cav}	36
Figura 24- A superexpressão de Cav-1 aumentou a concentração de colesterol livre.....	37

Sumário

1	Introdução.....	1
	1.1 O Fígado.....	1
	1.2 Doenças Hepáticas, Fibrose e a Célula Estrelada Hepática (HSC).....	3
	1.3 Linhagem GRX como Modelo da HSC.....	5
	1.4 Membrana Plasmática, Caveolas, Caveolina-1 e o Colesterol.....	6
	1.5 Doenças associadas à Caveolina-1.....	13
2	Objetivos.....	15
	2.1 Objetivo Geral.....	15
	2.2 Objetivos Específicos.....	15
3	Materiais e Métodos.....	16
	3.1 Cultura das Células.....	16
	3.1.1 Transfecção com Plasmídeo pCineoEGFP.....	16
	3.2 Determinação da Biomassa e da Proliferação Celular.....	17
	3.2.1 Ensaio da Sulforrodamina B (SRB).....	17
	3.2.2 Contagem do Número de Células no Citômetro de Fluxo.....	18
	3.2.3 Ensaio de Adesão por Microscopia Óptica e MTT.....	18
	3.3 Análise Morfológica.....	19
	3.3.1 Determinação do Tamanho e da Complexidade Citoplasmática.....	19
	3.3.2 Análise do Citoesqueleto por microscopia de fluorescência confocal.....	19
	3.3.3 Análise Ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	19
	3.3.4 Análise de Expressão Proteica por Imunocitoquímica e Microscopia de Fluorescência Confocal.....	20
	3.4 Migração Celular.....	20
	3.5 Endocitose.....	21
	3.6 Mensuração do Colesterol Livre no Extrato Lipídico Total.....	22
	3.7 Análise Estatística.....	22
4	Resultados.....	23
	4.1 Sucesso na Transfecção.....	23
	4.2 Análise da Proliferação e Adesão Celular.....	25
	4.2.1 A Superexpressão da Cav-1 Resultou no Aumento da Biomassa Celular..	25
	4.2.2 Aumento da Proliferação na Linhagem que Superexpressa Cav-1.....	25
	4.2.3 A Superexpressão de Cav-1 Modulou a Adesão Celular.....	26

4.3	<i>Análise Morfológica</i>	27
4.3.1	Determinação do tamanho das células e da complexidade do citoplasma..	27
4.3.2	Mudanças na Estrutura do Citoesqueleto de Actina nas Células que Superexpressam a Cav-1.....	29
4.4	<i>Análise Ultraestrutural</i>	29
4.5	<i>Alterações na expressão das proteínas alfa actina de músculo liso (αSMA) e colágeno do tipo I (Col-I)</i>	31
4.6	<i>Análise da capacidade de migração celular</i>	33
4.7	<i>Análise da capacidade de Endocitose</i>	35
4.8	<i>Quantificação do colesterol livre presente nas membranas</i>	37
5	Discussão.....	38
6	Conclusão.....	44
7	Perspectivas.....	46
8	Referências.....	47

1. Introdução

1.1 Fígado

Cada tecido do corpo humano tem uma função especializada que se reflete na sua anatomia e atividade metabólica. O fígado tem função central no metabolismo, papel que é indicado pela referência comum que se faz a todos os outros tecidos e órgãos como extra-hepáticos ou periféricos, abastecendo todos os outros órgãos e tecidos com uma mistura apropriada de nutrientes via corrente sanguínea, reduzindo as variações no metabolismo causadas pela ingestão intermitente de alimentos e processando o excesso de grupos amino em ureia e outros produtos para serem eliminados pelos rins (Nelson and Cox, 2007).

O fígado é uma interface importante entre o sistema digestório e o sanguíneo, participando do processamento e do armazenamento dos nutrientes durante a digestão. Cerca de 80% do sangue que chega ao fígado atravessa a veia porta e somente os 20% restantes acabam indo para as outras artérias hepáticas. O fígado é o primeiro órgão a ter contato com os nutrientes absorvidos pelo intestino, que chegam pela veia porta; exceto os lipídeos complexos, que chegam pela artéria hepática (Guyton and Hall, 2006; Junqueira and Carneiro, 2008). Determinados nutrientes são armazenados no fígado, entre eles íons Fe, vitamina A e glicogênio. Além disso, este órgão exerce uma função muito importante na produção de proteínas plasmáticas tais como albumina e outras proteínas carreadoras e na detoxificação de xenobióticos, como drogas, aditivos e conservantes alimentares.

O fígado está situado na cavidade abdominal abaixo do diafragma e é o segundo maior órgão do corpo depois da pele e a maior glândula exócrina, pesando cerca de 1,5 kg e contribuindo com 2% do total do peso corporal. Este órgão é revestido por uma cápsula delgada de tecido conjuntivo, a cápsula de Glisson, por onde a veia porta e a artéria hepática penetram no fígado e por onde saem os ductos hepáticos direito, esquerdo e linfático. Estes vasos e ductos são circundados por tecido conjuntivo ao longo de toda a sua extensão até o término nos espaços porta entre os lóbulos hepáticos. Neste ponto forma-se uma delicada rede de fibras reticulares que suporta os hepatócitos. O componente estrutural básico do fígado é o lóbulo hepático (Figura 1), que se

constitui em uma estrutura cilíndrica com alguns milímetros de comprimento, contendo de 50.000 a 100.000 lóbulos individuais. Os hepatócitos são as células estruturais do fígado e estão radialmente dispostos no lóbulo hepático, como se fossem “tijolos” em uma parede, formando um labirinto em um formato de esponja. Os espaços entre as placas contêm os capilares chamados de sinusóides, que são vasos irregularmente dilatados compostos por uma camada de células endoteliais fenestradas. As células endoteliais adjacentes estão separadas dos hepatócitos por uma lâmina basal descontínua e um espaço subendotelial conhecido como espaço de Disse ou espaços perissinusoidais que contém os microvilos dos hepatócitos. Fluidos do sangue seguem rapidamente a parede endotelial e fazem um contato íntimo com a parede dos hepatócitos que permitem a troca facilitada de macromoléculas. Esta troca é muito importante fisiologicamente devido ao grande número de macromoléculas secretadas pelos hepatócitos para o sangue e porque o fígado capta e cataboliza muitas moléculas grandes (Junqueira and Carneiro, 2008).

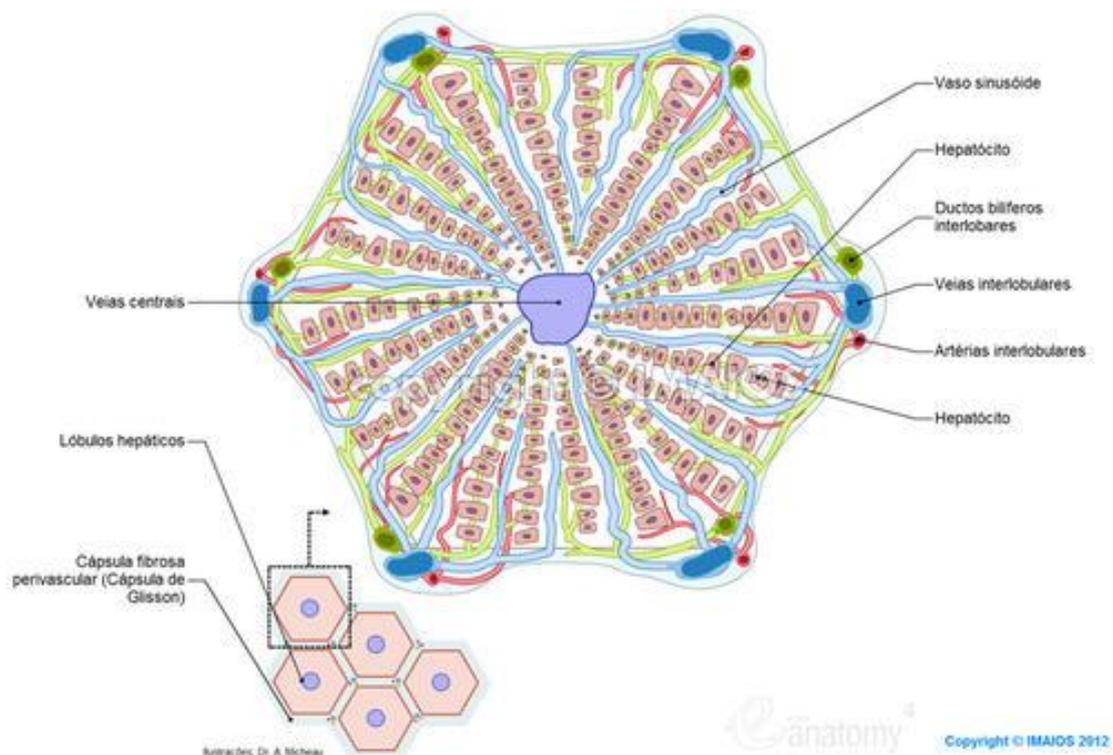


Figura 1: Estrutura do lóbulo hepático. Fonte: <http://www.imaio.com/br/e-Anatomy/Torax-Abdome-Pelve/Sistema-digestorio-Ilustracoes>, em 11/02/2015

No espaço de Disse encontram-se as células estreladas hepáticas e macrófagos residentes. Os macrófagos são conhecidos como células de Kupffer ou células

reticuloendoteliais e constituem cerca de 15% da população celular do fígado, sendo capazes de metabolizar eritrócitos velhos, digerir hemoglobina, secretar proteínas dos processos imunológicos, fagocitar bactérias e outras substâncias estranhas provindas do sangue (Guyton and Hall, 2006). As células estreladas hepáticas (do inglês *hepatic stellate cells* – HSC) ou células de Ito se caracterizam por conter inclusões lipídicas que armazenam vitamina A (Junqueira and Carneiro, 2008). Existem cerca de 5 a 20 HSC para cada 100 hepatócitos. Estas células controlam o *turnover* do tecido conectivo hepático e regulam a contractilidade dos sinusóides (Lieberman and Marks, 2013). Uma função importante das HSC é a renovação da matriz extracelular através do controle de secreção de metaloproteinases e de seus inibidores, bem como a manutenção da homeostasia do espaço sinusoidal através da secreção de fatores parácrinos, autócrinos justácrinos e de quimiotratantes (Bataller and Brenner, 2005).

No fígado saudável, as HSC desempenham várias funções, como captação, armazenamento e liberação de retinóides, síntese e secreção de várias proteínas de matriz extracelular e proteoglicanos, secreção de fatores de crescimento, citocinas e regulação do diâmetro do lúmen sinusoidal em resposta a diferentes fatores reguladores como prostaglandinas e tromboxano A2 (Junqueira and Carneiro, 2008). Estas células apresentam um fenótipo quiescente lipocítico com baixa taxa de proliferação e de produção de colágeno do tipo IV.

1.2 Doenças Hepáticas, Fibrose e a Célula Estrelada Hepática (HSC)

As doenças crônicas do fígado estão entre as maiores causas de morte no mundo (Elsharkawy, Oakley et al. 2005) e são clínica e bioquimicamente devastadoras porque nenhum outro órgão pode compensar a perda das múltiplas funções que o fígado normalmente executa. Várias doenças hepáticas crônicas podem resultar em fibrose e cirrose. Quando isso ocorre, a função do fígado fica prejudicada podendo levar o paciente à morte. Sinais e sintomas de doenças hepáticas incluem: aumento na taxa de enzimas, icterícia, aumento do tempo de coagulação, edema e encefalopatia hepática (Lieberman and Marks, 2013).

A inflamação crônica invariavelmente dá origem ao tecido fibroso que pode ser considerado uma resposta fibroproliferativa desregulada, impactando na arquitetura e função do tecido hepático. A fibrose hepática (Figura 2) resulta da ação conjunta de

diferentes tipos celulares incluindo macrófagos, células estreladas hepáticas e células epiteliais (Iredale, Thompson et al., 2013). Em resposta aos fatores geradores de danos, várias células hepáticas iniciam um processo de degeneração, necrose e apoptose, secretando citocinas inflamatórias e neurotransmissores químicos (Bi and Ge 2014).

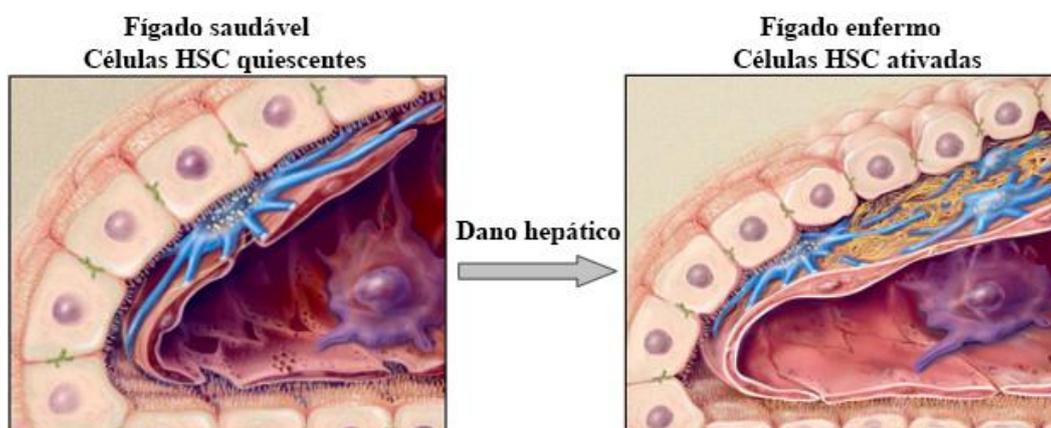


Figura 2: Estrutura histológica do Espaço de Disse e células associadas. Em azul célula HSC. Fonte: http://www.nature.com/nrgastro/journal/v1/n2/fig_tab/ncpgasthep0055_F1.html, em 11/02/15

Os tecidos de suporte do fígado sadio contém matriz extracelular composta, entre outras proteínas, por proteoglicanos, glicoproteínas e colágeno do tipo IV, que não forma fibras. Após o dano ao fígado, a produção de matriz extracelular aumenta oito vezes e os colágenos fibrilares do tipo I e III tornam-se os componentes majoritários, formando um ambiente pró-oxidativo e inflamatório. Este aumento e alteração da matriz extracelular causa uma diminuição significativa de fenestras nas células endoteliais acarretando perda da função das membranas basais, interferindo nas trocas normais transmembranas entre hepatócitos e o sangue (Lieberman and Marks, 2013).

As células estreladas hepáticas (HSC) são as principais responsáveis pelo aumento e alteração de matrix extracelular durante o estabelecimento da fibrose hepática. Estas células são ativadas por fatores de crescimento que tem a secreção induzida pelo dano aos hepatócitos ou às células endoteliais. Os fatores de crescimento envolvidos na ativação celular incluem o fator de crescimento tumoral beta 1 (TGF- β 1) – derivado das células endoteliais, das células de Kupffer e das plaquetas, o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento epidermal (EGF) derivados das plaquetas. A secreção de PDGF estimula a proliferação das HSC e aumenta a síntese e a liberação de matriz extracelular e de metaloproteinasas. Esta cascata de eventos leva a

degradação da matriz extracelular normal que é substituída por uma matriz fibrosa (Lieberman and Marks, 2013). Os miofibroblastos ativados se caracterizam pela perda da capacidade de armazenamento de gotas lipídicas ricas em vitamina A, pelo rearranjo do citoesqueleto de actina, que passa a se dispor em fibras de estresse e pelo aumento da taxa de proliferação (Friedman, 2000).

Os processos de regeneração do fígado são benéficos e envolvem a troca e substituição das células danificadas por células saudáveis. No entanto, quando há danos crônicos, esta regeneração se torna patogênica, ocorrendo um desequilíbrio na produção de matriz extracelular e a transformação e substituição do tecido sadio pela cicatriz fibrosa. O dano crônico e extensivo pode resultar em cirrose, falência do órgão e na morte do paciente (Wynn, 2008).

1.3 Linhagem GRX como um Modelo da HSC

A linhagem celular GRX foi obtida através da cultura primária de granulomas induzidos em fígados de camundongo C3H/HeH pela penetração transcutânea da cercaria *Schistosoma mansoni* (Borojevic, Monteiro et al. 1985). Este procedimento deu origem a células miofibroblastóides com características de HSC ativadas. Esta linhagem possui propriedades importantes para o estudo da fibrose, tais como alta taxa de proliferação, capacidade de secretar colágeno do tipo I e outras proteínas de matriz extracelular entre outras propriedades bioquímicas e biológicas características de um miofibroblasto (Borojevic, Guaragna et al., 1990). Estudos mostraram que esta linhagem pode ser induzida a expressar o fenótipo lipocítico semelhante às HSC quiescentes por meio de tratamento com drogas como a indometacina e o retinol, que levam a GRX ao acúmulo de gotas lipídicas e à diminuição da capacidade de proliferação e de produção de colágeno tipo I (Margis, Pinheiro-Margis et al. 1992). Do mesmo modo, esta linhagem pode ser induzida a expressar o fenótipo mais ativado em resposta ao tratamento com mediadores inflamatórios ou com substâncias que provoquem o estresse oxidativo (Guimaraes, Franceschi et al. 2006). Enfim, esta linhagem é modelo interessante e já bem conhecido para o estudo dos mecanismos que envolvem e acarretam o desenvolvimento da fibrose hepática.

1.4 Membrana Plasmática, Caveolas, Caveolina-1 e o Colesterol

A membrana plasmática das células animais tem duas funções chave: primeiro, a separação do meio intracelular e extracelular via barreira de lipídeos e de proteínas. Segundo, o fornecimento de um domínio celular que pode perceber mudanças no meio externo e iniciar eventos que alteram a fisiologia celular, como, por exemplo, o transporte celular, a comunicação célula-célula, e a transdução de sinal. Um aspecto fundamental dessa resposta funcional é a localização das moléculas dentro da membrana. Após o estímulo externo, ocorre o reconhecimento e a comunicação entre os componentes da membrana ou outros compartimentos celulares (Patel and Insel, 2009).

A membrana plasmática é uma entidade dinâmica, e a sua estrutura é composta por proteínas e lipídeos que controlam e são controlados por vários processos biológicos. Os lipídeos de membrana são anfipáticos os seus motivos hidrofílicos interagem com o meio externo aquoso. As membranas plasmáticas dos eucariotos são compostas por glicerofosfolipídios, esfingolipídios e esteróis, em particular, o colesterol, variando em suas estruturas. Acredita-se que a introdução do colesterol apareceu tarde na evolução. Sua presença coincide com o aumento na concentração de oxigênio do meio ambiente que ocorreu aproximadamente 2,5 bilhões de anos atrás. A presença de esfingolipídios e esteróis aumentam a complexidade da membrana dos eucariotos em relação à membrana dos procariotos. O colesterol aumenta a espessura e a rigidez da bicamada lipídica e permite o “*sorting*” proteico. Singer e Nicolson descreveram em 1953 o modelo de “mosaico fluido” para a membrana plasmática que partilha randomicamente proteínas e lipídeos de modo a alcançar a menor energia livre. Vários estudos vêm demonstrando que esta partilha entre lipídeos e proteínas não é homogênea nem randômica, mas sim organizada em agrupamentos de proteínas estruturais, enzimas, receptores de sinalizações, transportadores e canais dentro de domínios lipídicos. Alguns destes domínios lipídicos são ricos em colesterol e glicoesfingolipídeos e são denominados de “*rafts*” de membrana ou “*rafts*” lipídicos (Head, Patel et al. 2014). O colesterol e os glicoesfingolipídeos podem interagir entre si e com outros lipídeos e proteínas das camadas internas e externas da membrana plasmática para formar os “*rafts*” de membrana (Jasmin, Frank et al. 2012). Os “*rafts*” lipídicos são estruturas pequenas e altamente organizadas, contendo agrupamentos móveis de colesterol e glicoesfingolipídeos na parte exoplasmática da membrana celular envolvidas na

transdução de sinais. São necessários *clusters de “rafts”* de 100-200 nm para promover suas funções de sinalização. Existem dois tipos de “rafts” lipídicos, o que contém caveolina, uma proteína que liga o colesterol e os que não contém. Os “rafts” que não contém caveolina são planos e não podem ser identificados por microscopia eletrônica de transmissão (Head, Patel et al. 2014). Além disso, usualmente na literatura estes são os microdomínios que mantêm a denominação de “rafts”. Já os “rafts” lipídicos que contém caveolinas são chamados de caveolas, que do latim significa “pequenas cavernas”.

As caveolas foram descobertas nos anos iniciais da microscopia eletrônica. Em 1953, o ganhador do prêmio Nobel George Palade reportou a presença das caveolas em capilares sanguíneos. Logo após, em 1955, Yamada também descreveu a presença de estruturas semelhantes às caveolas no epitélio da vesícula biliar de camundongos (Nassoy and Lamaze 2012). De fato, os estudos para caracterizar as caveolas só iniciaram quatro décadas depois com a descoberta da caveolina, uma proteína requerida para a formação da caveola (Kovtun, Tillu et al. 2014). As caveolas são, classicamente, descritas como pequenas invaginações da membrana plasmática de 50-100 nm com formato de Ω (ômega) ou com formato de balão, ricas em caveolinas, glicosíngolípídeos e colesterol (Nassoy and Lamaze, 2012). As caveolas podem existir como invaginações individuais, como “*clusters*” em forma de cachos de uva chamadas de rossetas ou como estruturas longas tubulares derivadas da fusão de várias caveolas (Figura 3) (Zou, Stoppani et al. 2011). Elas são consideradas como subdomínios especializados de membrana plasmática que participam ativamente na fisiologia celular através da regulação do tráfico e funções de sinalização (Gupta, Toufaily et al. 2014).

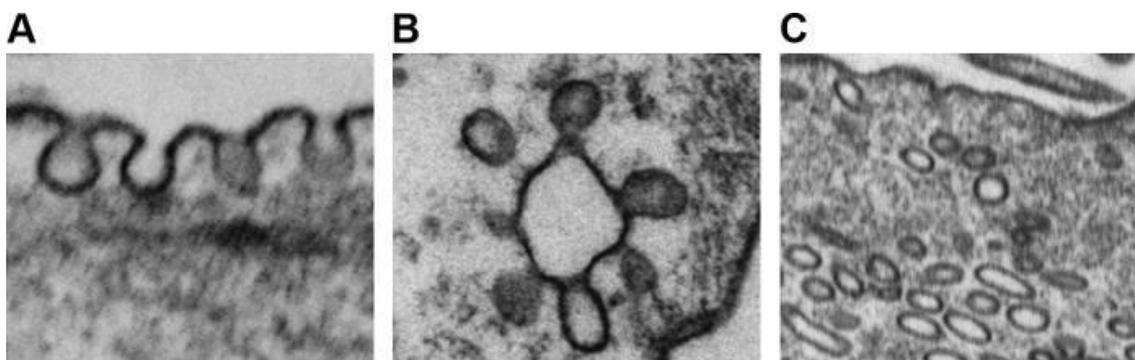


Figura 3: Microscopia eletrônica de uma célula de músculo liso da artéria pulmonar mostrando uma típica invaginação de caveolas A), em formato de cacho de uva ou em rossetas B), ou vesículas intracelulares (caveossomos, C). Fonte Patel and Insel, 2009.

As caveolas são consideradas como um subconjunto dos “*rafts*” devido ao seu tamanho e conteúdo de lipídeos. No entanto, nem todos os “*rafts*” lipídicos são caveolas. Estes dois microdomínios têm constituintes similares e ambos têm sobreposições de funções e um conjunto de funções próprias (Jasmin, Frank et al. 2012). Estas estruturas são ricas em várias moléculas sinalizadoras, incluindo alguns receptores de superfície de membrana no qual são ligadas a uma âncora de lipídeos. As caveolas ocorrem em diferentes densidades, em diferentes tipos celulares, sendo mais proeminentes em fibroblastos, células endoteliais vasculares, adipócitos e células epiteliais (Gupta, Toufaily et al. 2014).

Várias proteínas estão ancoradas na parte de fora da caveola, entre estas estão: as proteínas ligadas a GPI, os receptores transmembranas como GPCRs, o receptor de insulina, a enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e os receptores beta adrenérgicos. Outros tipos de proteínas ficam na face interna da membrana, entre estas estão: as proteínas G, as proteínas ligantes a colesterol como as caveolinas, as cavinas e a família de Src tirosina cinase (Jasmin, Frank et al. 2012). As caveolas possuem muitas funções, sendo elas: a homeostase do colesterol (Goetz, Lajoie et al. 2008), o transporte vesicular, a endocitose, a transcitose, a migração e a adesão celular, a entrada de patógenos (Sonnino and Prinetti, 2009), a polaridade, e o controle do ciclo celular e da transformação celular. Além destas funções, as caveolas são mecanossensoras e mecanotransdutoras (Nasoy and Lamaze, 2012), consistindo em um reservatório de membrana que ajuda a prevenir a lise celular, além de seu papel como plataforma de sinalizações e transdução de sinais.

A endocitose mediada pela caveola é dependente da dinamina II, que se localiza ao longo do pescoço da invaginação e promove o fechamento da caveola. Alguns estudos recentes mostraram que o vírus não envelopado SV40 usa a rota da caveola para entrar na célula hospedeira. Logo depois que o vírus entra na célula, são formadas pequenas estruturas semelhantes a endossomos, que são ricas em caveolina e colesterol, chamados de caveossomos. Estas organelas são diferentes entre si, sendo os caveossomos reguladores do “*turnover*” de receptores, e reguladores de caminhos de sinalizações (Jasmin, Frank et al. 2012). Após isso, os componentes da caveola podem se reciclar e

voltar para a superfície. Esta unidade de reciclagem pode ser mantida pelos complexos de cavinas, como a cavina-1 que está associada a caveola durante a endocitose. O ciclo da endocitose e a reciclagem das caveolas para os endossomos mantêm a densidade celular de caveolas (Parton and del Pozo 2013).

A forma da caveola descrita na literatura é dita como cantil, frasco, balão de vidro, contudo isto é dependente do conteúdo de colesterol da célula. O colesterol está localizado na parte de fora da membrana plasmática, sendo ele importante componente da caveola (Figura 4). Estudos mostram que a depleção do colesterol faz com que as caveolinas sejam movidas para o retículo endoplasmático e/ou para o complexo de Golgi, reduzindo assim o número de caveolas celulares. Os níveis de colesterol na célula não são estáticos: em processos fisiológicos normais o colesterol move-se para dentro e para fora da caveola. Estudos recentes têm demonstrado que o transporte de colesterol das caveolas até os compartimentos intracelulares é feito pela caveolina-1, sugerindo que esta proteína modula a concentração de colesterol nas caveolas (Jasmin, Frank et al. 2012). As caveolas contêm duas famílias de proteínas muito importantes para sua estrutura e função, a família das caveolinas e das cavinas.

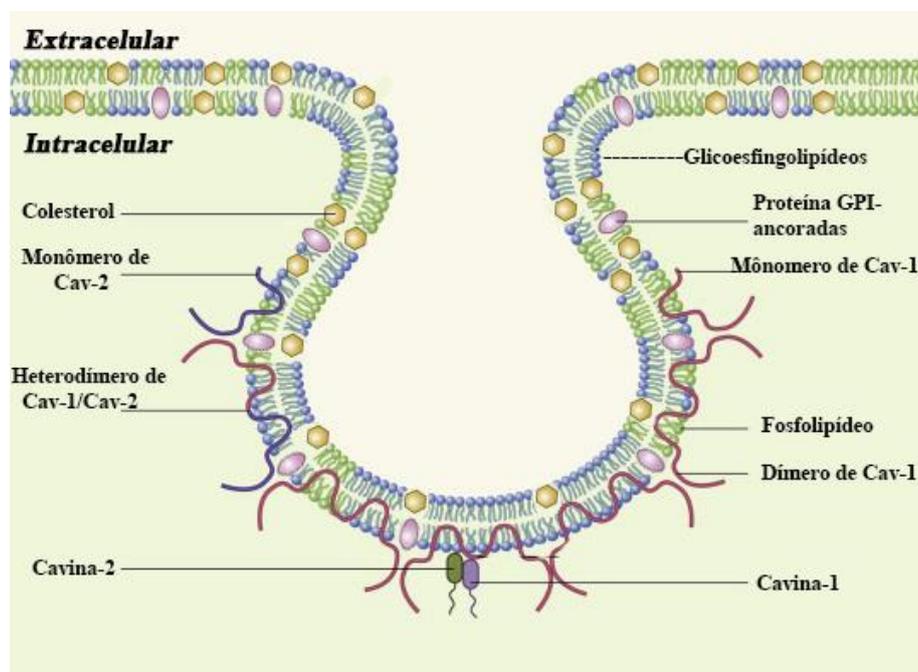


Figura 4: Detalhe de uma caveola com suas múltiplas proteínas e moléculas. Formação do oligômero da caveolina é regulada sobre a interação com os membros da cavina. Cav-1 e Cav-2 existem como monômeros, homodímeros ou heterodímeros. Adaptado de Gupta and Toufaily, 2014.

Quarenta anos depois do descobrimento das caveolas foi descoberta a família das caveolinas por Richard G.W. Anderson em 1992 (Rothberg, Heuser et al. 1992). Com isso, aumentaram os estudos em relação às funções das caveolas e finalmente sobre as caveolinas. As caveolinas pertencem a uma família de proteínas estruturais de células de mamíferos que são essenciais para a formação das caveolas. A família das caveolinas é composta por três tipos, sendo elas, a caveolina-1 (Cav-1), a caveolina-2 (Cav-2) e a caveolina-3 (Cav-3). Monômeros das caveolinas variam entre 18-24 kDa, sendo a Cav-3 a menor e a Cav-1 a maior. Os monômeros são organizados em multímeros na membrana plasmática de cerca 400 kDa e para isso são necessárias cerca de 14-16 caveolinas. A principal proteína das caveolas é a Cav-1. A Cav-1 e a Cav-2 são encontradas em diferentes tipos celulares predominantemente em adipócitos e células endoteliais, já a Cav-3 somente em células de músculo cardíaco e células de músculo estriado (Fridolfsson, Roth et al. 2014).

A Cav-1 e a Cav-2 estão na mesma localização no cromossomo (7q31.1) enquanto a Cav-3 está (3p25). Elas são altamente conservadas entre as espécies, sendo que a Cav-1 e a Cav-3 apresentam uma similaridade de 65% e 85% na sequência da proteína (Figura 5) (Patel and Insel, 2009). A Cav-1 é uma proteína estrutural de membrana plasmática de 22 kDa, descoberta através da imunocitoquímica como componente chave das caveolas e a sua expressão é essencial para a sua biogênese (Gupta, Toufaily et al. 2014). A Cav-1 tem 178 aminoácidos e pode ser fosforilada pela Src no resíduo 14 da tirosina (Goetz, Lajoie et al. 2008). Esta proteína tem formato de grampo de cabelo e tem as suas duas extremidades, N-terminal ou amino terminal e C-terminal ou carboxil terminal, orientadas para o citoplasma da célula (Figura 6). Estudos *in vivo* mostram que a Cav-1 é expressada por dois RNAm e proteínas diferentes, chamadas de isoformas α e β , que derivam do mesmo gene, mas que contém sítios de iniciação alternados. A Cav-1 α expressa toda a extensão contendo resíduos de 1-178 de aminoácidos enquanto que a Cav-1 β tem uma terminação amino truncada com resíduos de aminoácidos de 32-178 (Patel and Insel, 2009). Estudos mostram que esta proteína é palmitoilada nos resíduos Cys133, Cys143 e Cys156, esta modificação não é necessária para a localização da proteína nas caveolas, mas sim para a sua oligomerização (Gupta, Toufaily et al. 2014). A proteína caveolina é altamente estruturada e composta por domínios funcionais. A presença do domínio estruturante da caveolina (do inglês *Caveolin Scaffold Domain*, CSD), na porção 82-101 na Cav-1 e na porção 55-74 na Cav-3, é particularmente

importante, pois é onde ocorre a interação com moléculas e proteínas de sinalização. A interação direta com o CSD da Cav-1 geralmente resulta no sequestro de uma dada molécula de sinalização dentro da membrana das caveolas e a modulação da sua atividade de sinalização. Estas proteínas de sinalizações incluem subunidades alfa de proteínas G, H-Ras, óxido nítrico sintase (NOS), receptor de fatores de crescimento epidermais (EGFR), Não receptores de tirosina cinase igual a Src (nRTK), proteína cinase K (PKC) e proteína cinase A (PKA) (Fridolfsson, Roth et al. 2014).

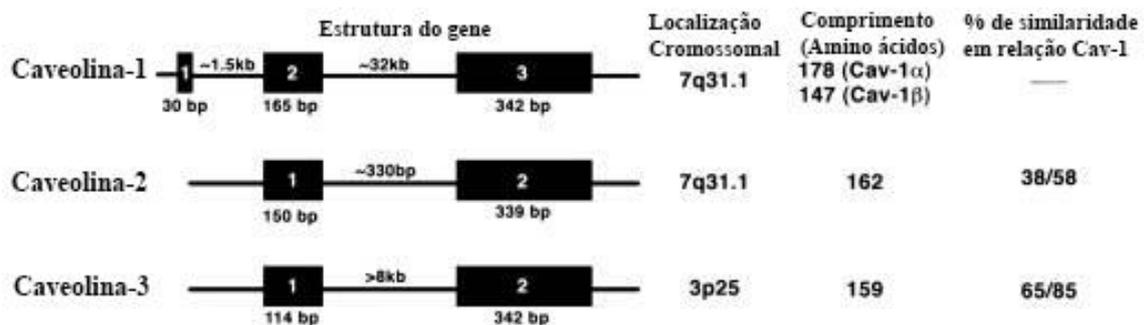


Figura 5: Estrutura do gene das três isoformas humanas da caveolina bem como a localização do cromossomo, comprimento em amino ácidos e % de similaridade entre as isoformas. Fonte: Patel and Insel, 2009.

Estudos recentes mostram que a Cav-1 pode desenvolver papéis independente das caveolas, na regulação de atividades celulares, incluindo no transporte de lipídeos, expressão gênica e função mitocondrial. Alguns autores sugerem que a caveolina-1 também é encontrada na membrana das organelas celulares bem como, vesículas endocíticas e exocíticas, retículo endoplasmático (ER), complexo de Golgi, mitocôndrias, o núcleo, lisossomos, peroxissomos e gotas lipídicas (Fridolfsson, Roth et al. 2014). A Cav-1 é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (ER) como proteínas integrais de membrana e transitam pelo complexo de Golgi até a superfície celular. A saída da Cav-1 do complexo de Golgi é acelerada pela a adição do colesterol e desacelerada pela depleção do colesterol, sugerindo assim o papel facilitador do colesterol na saída do complexo de Golgi. Consistente com isto, as caveolinas são convertidas do complexo 8S para o complexo 70S complexo de Golgi, sofrendo importantes mudanças conformacionais e associando-se assim, ao colesterol (Parton and del Pozo, 2013).

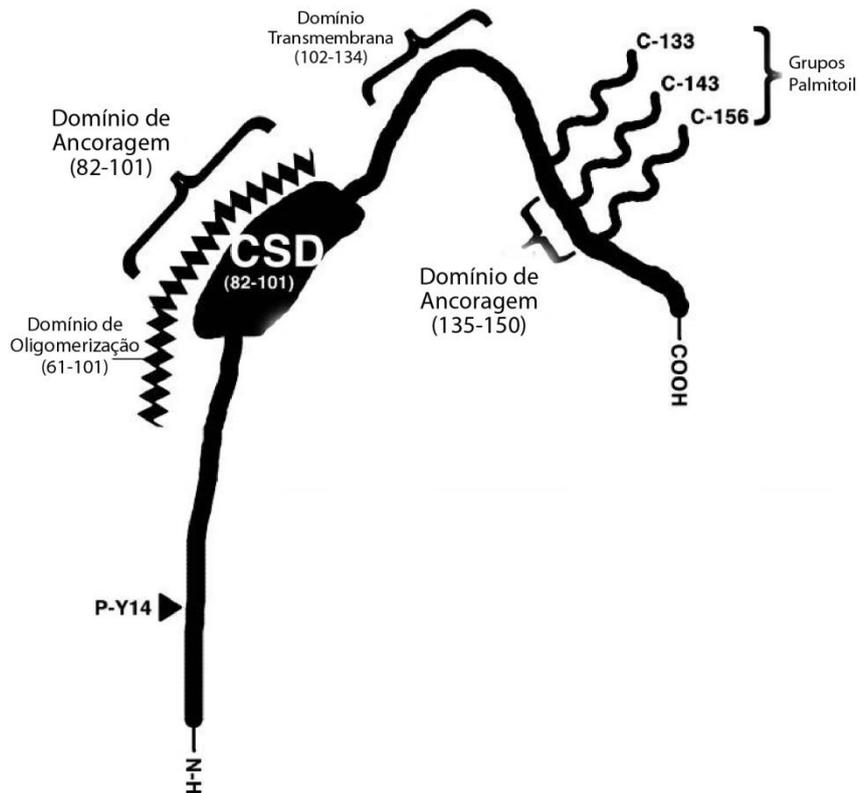


Figura 6: Domínios da proteína Cav-1 incluindo sítios de palmitoilação, domínios de ancoragem, domínios de oligomerização, domínio transmembrana, terminações N e C, domínio de ancoramento com outras proteínas, do inglês *Caveolin Scaffold Domain (CSD)* e sítios de fosforilação. Fonte: Patel and Insel, 2009.

A associação dos filamentos de actina, microtúbulos e os filamentos intermediários mostraram através da microscopia eletrônica tridimensional, uma complexa interação entre o citoesqueleto das células e as caveolas. Alguns autores sugerem que os microtúbulos promovem a formação e o tráfico das caveolas e da Cav-1 de volta para a superfície. Em vários tipos celulares, impressionantemente, as caveolas são distribuídas linearmente na membrana plasmática, na qual são influenciadas pelas fibras de estresse das actinas. A localização das caveolas ao longo das fibras de actina foi primeiramente notada através da microscopia eletrônica, e confirmada posteriormente através da tomografia eletrônica, que mostrou que a interação é feita através da RHOA, do citoesqueleto de actina e da proteína que liga aos filamentos de actina chamada de filamina A. Esta proteína é um fator chave da endocitose e é crucial para a interação entre a Cav-1 e os filamentos de actina. Portanto, o tráfico das caveolas e a sua

organização são regulados por ambos microtúbulos e filamentos de actina (Parton and del Pozo 2013).

4.5 Doenças Associadas à Caveolina-1

Muitos estudos vêm sendo feitos depois da descoberta da interação Cav-1 com a membrana plasmática e com a fisiologia da célula. Mais de 900 trabalhos são encontrados na literatura (20/01/2015) (www.PubMed.com) relacionando a Cav-1 e doenças. Devido às suas funções chave na fisiologia celular, as caveolas e a Cav-1 estão conectadas com muitas doenças humanas e podem, num futuro próximo, ser um potencial alvo terapêutico. Embora as caveolas sejam importantes para a vida, ratos deficientes são viáveis, a presença das caveolas parece promover uma vantagem evolucionária. Mutações nos genes das caveolinas e cavinas são associadas a várias doenças em humanos, incluindo distrofias do músculo esquelético, anormalidades cardíacas, lipodistrofias, e câncer (Parton and del Pozo, 2013). O câncer é um processo complexo que envolvem vários passos, no qual a ativação de oncogenes ou supressão dos genes supressores de tumor são fenômenos importantes. O câncer é largamente caracterizado pelo crescimento descontrolado e anormal de células que escapam do sistema imune, resistindo a apoptose, e adquirindo a habilidade de acionar a angiogênese e a metástase. As mudanças moleculares responsáveis pela malignidade celular são causadas ambas por mutações genéticas e mecanismos epigenéticos relacionados com a expressão gênica. Vários estudos vêm revelando a importância da Cav-1 durante o processo de progressão do tumor e a sua expressão foi detectada em diferentes tipos de câncer. Em vários trabalhos foi reportado que a expressão de Cav-1 é associada com o grau, tamanho e estágio do tumor, mostrando uma correlação com a evolução dos cânceres. No entanto, é evidente que a Cav-1 age também como supressora de tumores. O papel dual da Cav-1 é dependente do tipo de tumor. Em alguns tipos de cânceres, como o carcinoma hepatocelular, a superexpressão de Cav-1 inibe a metástase celular, adesão celular, proliferação e migração celular, enquanto que em outros tipos de cânceres, a Cav-1 induz este fenômeno (Gupta, Toufaily et al. 2014).

A fibrose é comumente considerada o resultado da desregulação do reparo de tecido, pois forma o tecido conectivo e uma cicatriz fibrosa, levando assim a ruptura da estrutura normal do tecido. Esta desregulação resulta na perda de homeostase e a deposição desproporcionada de componentes da MEC e a excessiva contração do

tecido. A Cav-1 tem um papel no monitoramento da homeostase hepática pela conexão com eventos da sinalização celular, tendo importância no reparo do tecido e na fibrose. Vários trabalhos vêm sugerindo a sua atividade fibrossupressora e mostram suas implicações em vários aspectos da remodelação tecidual. Seu potencial terapêutico nas doenças fibróticas vem sendo considerado. O conhecimento dos mecanismos pelo qual a Cav-1 regula os processos de reparo tecidual é importante para o entendimento da fibrose. Em ratos e mini porcos a indução de fibrose no pulmão por radiação resultou em diminuição da concentração de Cav-1. Os pesquisadores viram também que a reintrodução de Cav-1 por vários métodos resultou em uma melhora significativa dos sintomas da fibrose, demonstrando a importante atividade antifibrótica desta proteína.

O aumento da proliferação celular é comum em várias doenças fibróticas. Um dos motivos da remodelação tecidual e do aumento de tecido conectivo é a proliferação descontrolada de fibroblastos e miofibroblastos. A Cav-1 está relacionada com a regulação do ciclo celular, da senescência celular e da sinalização da apoptose. Em fibroblastos murinos, a superexpressão da Cav-1 levou a uma inibição da proliferação por induzir a permanência das células na fase G1 e indução de senescência celular prematura (Gvaramia, Blaauboer et al. 2013). Em outros estudos, no entanto, foi encontrados em fígados cirróticos um aumento da expressão de Cav-1 nas células endoteliais sinusoidais e nas HSC. Os autores sugerem que o aumento da expressão de Cav-1 está relacionado com a hipertensão portal que acompanha o processo de fibrose (Yokomori, Oda et al. 2002). Diante do exposto e considerando a relevância da Cav-1 em doença que envolvem processos fibróticos em nosso laboratório, nós estabelecemos uma linhagem permanente de células GRX que superexpressa a proteína Cav-1, chamada GRX^{EGFP-Cav} (Ilha, 2012).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estabelecemos a linhagem permanente $GRX^{EGFP-Cav}$ que superexpressa Cav-1 através da transfecção com o plasmídeo pCav1EGFP em nosso laboratório. Devido a estreita correlação entre a ativação das HSC e a fibrose hepática, consideramos que o estabelecimento da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$ seria uma ferramenta experimental importante para o esclarecimento dos mecanismos de ativação da HSC. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho foi caracterizar bioquímica e morfológicamente a linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$ e relacionar a superexpressão de Cav-1 com o estado de ativação das HSC.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Estabelecer a linhagem $GRX^{EGFPpCineo}$ através da transfecção do plasmídeo pCineoEGFP nas células GRX, para assegurar que os resultados obtidos nas técnicas utilizadas neste trabalho são devido à superexpressão da Cav-1 e não à inserção do plasmídeo.
- 2) Comparar as taxas de proliferação das células GRX, $GRX^{EGFPpCineo}$ e $GRX^{EGFP-Cav}$.
- 3) Comparar a capacidade de adesão das linhagens GRX, $GRX^{EGFPpCineo}$ e $GRX^{EGFP-Cav}$.
- 4) Comparar a capacidade de migração entre células GRX, $GRX^{EGFPpCineo}$ e $GRX^{EGFP-Cav}$.
- 5) Comparar a capacidade de endocitose das linhagens GRX e $GRX^{EGFP-Cav}$ utilizando as microesferas fluorescentes
- 6) Comparar a morfologia das células GRX, $GRX^{EGFPpCineo}$ e $GRX^{EGFP-Cav}$
- 7) Mensurar a quantidade de colesterol livre nas células GRX, $GRX^{EGFPpCineo}$ e $GRX^{EGFP-Cav}$.

3 Materiais e Métodos

3.1 *Cultura das Células*

As células GRX foram fornecidas pelo Banco de células do Rio de Janeiro, HUCFF, UFRJ. A linhagem GRX^{EGFP-Cav} foi estabelecida em nosso laboratório através de transfecção do plasmídeo pCav1EGFP (Ilha, 2012). Ambas as linhagens pertencem ao bioestoque do laboratório de Diferenciação, Proliferação e Viabilidade Celular do Departamento de Bioquímica da UFRGS. As células foram mantidas em meio de cultura padrão DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 1g de glicose/L, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 2g/L de tampão HEPES (pH 7.4), em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e a 37°C. As células transfectadas foram mantidas em meio de cultura padrão suplementado com 500 ng/ml de geneticina (G418, Sigma Aldrich, Inc., San Louis, MO, USA).

3.1.1 Transfecção com Plasmídeo pCineoEGFP

A GRX^{EGFPpCineo} foi estabelecida para assegurar que os resultados obtidos são em resposta à superexpressão da Caveolina-1 e não ao plasmídeo inserido. Foi utilizado o mesmo protocolo de transfecção utilizado no trabalho anterior (Ilha, 2012). Assim como a GRX^{EGFP-Cav}, esta linhagem é resistente ao antibiótico geneticina e expressa EGFP. Resumidamente, as células GRX foram semeadas em uma placa de 24 poços em uma densidade de $1,0 \times 10^4$ /cm² para que atingissem o máximo de 50% da confluência ideal em 24 horas. Para a transfecção, o meio de cultura padrão foi trocado por 200 µL de meio DMEM sem SFB contendo 2,0µl de reagente comercial LipofectamineTM (Invitrogen) e 0,3 ng de DNA plasmidial, gentilmente doado pelo Dr José Luis Daniotti (Faculdade de Ciências Químicas, Departamento de Química Biológica, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina). A lipofectamina é uma mistura de lipídeos anfipáticos que formam uma miscela com o plasmídeo, encapsulando-o. Esta cápsula funde-se com a membrana plasmática das células a serem transfectadas, liberando o plasmídeo no citoplasma celular. Após 5 horas, foi adicionado 200 µL de meio DMEM com 10% de SFB para que a concentração final de SFB alcançasse os 5%. Após 72 horas, o meio de cultura padrão suplementado com 1000 µg/mL de G418 foi utilizado para selecionar as células que continham o plasmídeo de interesse, resistentes a este

antibiótico. Sendo assim, as células sobreviventes são indicativas do sucesso na transfecção e representam a nova linhagem GRX^{EGFPpCineo}. Após a seleção, as células foram mantidas em meio de cultura padrão suplementado com 500 µg/mL de G418. Para atestar o sucesso da transfecção, foram realizadas imagens no microscópio confocal. As células GRX^{EGFPpCineo}, foram cultivadas em mini câmaras próprias para confocal (CELLviewTM glassbottonplates, GreinerBioone) em uma densidade de 1x10⁴/cm². Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS, pré-fixadas e fixadas com paraformaldeído 4% (10 minutos cada etapa), lavadas com Tris glicina, permeabilizadas com 0,5% de Triton x100. Para marcação do núcleo destas células, foi usado o corante fluorescente Hoechst 33342 (H1398, Invitrogen) por 10 minutos e seguido de lavagem com PBS. As imagens foram adquiridas no microscópio confocal de fluorescência FV1000 - Olympus no Centro de microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS), deconvoluídas e analisadas pelo *software ImageJ* (National Institutes of Health, RockvillePike, Bethesda, Maryland, EUA).

3.2 *Determinação da Biomassa e da Proliferação Celular*

3.2.1 Ensaio da Sulforrodamina B (SRB)

A proliferação celular foi avaliada através do ensaio da Sulforrodamina B (SRB). A SRB é um corante que se liga de forma estequiométrica aos aminoácidos básicos das proteínas celulares, sendo assim a quantidade de corante extraído da camada celular é proporcional ao número de células. A SRB também é utilizada para a determinação da densidade celular e é um indicativo de sobrevivência celular.

Para este experimento, as células foram semeadas na densidade de 2,5x10⁴/cm² em placa de 12 poços e fixadas após 24 horas com paraformaldeído 4% por 15min. Após a fixação, as células foram incubadas por 1 hora com uma solução de Sulforrodamina B 0,4% dissolvida em ácido acético glacial 1%. Após este período, as células foram lavadas com água destilada até todo o corante não ligado em proteínas sair. Por fim, foi adicionado SDS 1% dissolvido em PBS e as placas foram colocadas no agitador para a dissolução completa do corante (Skehan, Storeng et al. 1990). A absorbância da SRB foi mensurada no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) em um comprimento de onda de 560nm.

3.2.2 Contagem do Número de Células no Citômetro de Fluxo

As células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foram plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^4 / \text{cm}^2$. Após 24, 48 e 72 horas de cultivo celular, as culturas foram tripsinizadas, ressuspensas em 200 μL de PBS e contadas no citômetro de fluxo FACScalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA), protocolo estabelecido em nosso laboratório, usando as especificações referentes ao volume de fluxo e tempo de aquisição do aparelho.

Cálculo do número de células utilizando manual de Citometria de fluxo:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/amostra} = (10000 \times V)/t$$

V = volume em que a amostra foi ressuspensa em μL

t = tempo em segundos necessários para a aquisição de 10000 células (eventos).

Obs: velocidade de aquisição 1 $\mu\text{L}/\text{s}$.

3.2.3 Ensaio de Adesão por Microscopia Óptica e MTT

A viabilidade e a adesão celular foram avaliadas em um experimento que quantifica a atividade das desidrogenases celulares que reduzem o MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma Inc) a um precipitado de sal formazan roxo e insolúvel.

As células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foram semeadas em placa de 24 poços em uma densidade de $3 \times 10^4 / \text{cm}^2$. A adesão celular foi avaliada depois de duas horas. Após este tempo, as células foram fotografadas em microscópio óptico invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse TE300) e, a seguir, foram incubadas com 1 mg/mL de MTT por mais 2 horas a 37°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e os cristais de formazan foram solubilizados com 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Inc.). A absorbância foi mensurada no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 570 e 630 nm (Hansen, Nielsen et al. 1989).

3.3 Análise Morfológica

3.3.1 Determinação do Tamanho e Complexidade Citoplasmática

O tamanho e a complexidade do citoplasma das diferentes linhagens foram analisadas por citometria de fluxo usando os parâmetros de FSC (*ForwardScatter*) e SSC (*SideScatter*), seguindo as especificações do fabricante. O FSC mede o tamanho relativo da célula, enquanto que o SSC mede complexidade citoplasmática das células. Resumidamente, as culturas pré-confluentes das células foram tripsinizadas e ressuspensas em 300 µl de PBS para serem levadas ao citômetro de fluxo.

3.3.2 Análise do Citoesqueleto por Microscopia de Fluorescência Confocal

Para análise do citoesqueleto, as células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foram cultivadas em mini câmaras próprias para microscopia confocal (CELLviewTMglass bottonplates, GreinerBioone) em uma densidade de 1×10^4 /cm². Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS, pré-fixadas e fixadas com paraformaldeído 4% (10 minutos cada etapa), lavadas com Tris glicina, permeabilizadas com Triton x100 0,5%. Para marcação do citoesqueleto de actina, as células foram incubadas com a toxina Faloidina conjugada com Rodamina ou com Alexa flúor 488 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) (Mermelstein, Guma et al. 2001).

3.3.3 Análise Ultraestrutural por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para as análises ultraestruturais, as células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foram fixadas com paraformaldeído/glutaraldeído por 24 horas e foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio. Logo após, as amostras foram desidratadas, embebidas em resina epóxi e cortadas por ultramicrotomia (Robenek, Buers et al. 2009). Os cortes foram depositados em *grids* de cobre recobertos com Formvar e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As análises foram realizadas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS) no microscópio eletrônico de transmissão (MET; JEM 1200EXII, Jeol).

3.3.4 Análise de Expressão Proteica por Imunocitoquímica e Microscopia de Fluorescência Confocal

Para análise da expressão das proteínas Colágeno do tipo I (Col-I) e α -actina de músculo liso (α SMA), as células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foram cultivadas em mini câmaras próprias para confocal (CELLviewTM glassbottomplates, GreinerBioone) em uma densidade de 1×10^4 /cm². Para análise da expressão da caveolina-1 (Cav-1), as células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foram semeadas sobre lamínulas de vidro estéreis colocadas em placas de 24 poços, em uma confluência de 1×10^4 /cm². Após 24 horas, as células foram lavadas duas vezes com PBS, pré-fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS por 10 minutos, fixadas com 4% de paraformaldeído em PBS por 10 minutos, lavadas com Tris glicina por 10 minutos e em seguida com PBS três vezes por 5 minutos cada vez. Após as lavagens, as células foram permeabilizadas com Triton x100 0,1% por 5 minutos e lavadas com PBS três vezes por 5 minutos. A marcação da Cav-1, Col-I e α SMA foram feitas usando anticorpos primários anti-mouse correspondentes diluídos em solução de bloqueio (5% de albumina em PBS) na concentração de 1:500 (Cav-1, sc 53564, Col-I, sc8784; α SMA, sc1615; Santa Cruz Biotechnology, Dalas, TX, USA). Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse AlexaFluor 647 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) diluídos em solução de bloqueio na concentração de 1:1000. Para marcação do núcleo destas células, foi usado o corante fluorescente Hoechst 33342 (H1398, Invitrogen). Após as lavagens com PBS, as lamínulas foram dispostas sobre lâminas histológicas usando o meio de montagem *Fluormount* (Sigma-Aldrich, Inc., San Louis, MO, USA). As imagens foram adquiridas no microscópio de fluorescência confocal FV1000 - Olympus no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS), deconvoluídas e analisadas pelo *software ImageJ* (National Institutes of Health, RockvillePike, Bethesda, Maryland, EUA) (Meira Martins, Vieira et al. 2014).

3.4 Migração Celular

A capacidade de migração das células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foi testada através da técnica de dano e cicatrização (*Wound-healing*), conforme descrito por Hulkower e Herber (Hulkower and Herber, 2011).

Para o ensaio, $7,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ células foram colocadas em uma placa de 6 poços e cultivadas até atingirem a confluência de 90%. Atingida a confluência adequada, foi realizado um risco vertical na camada celular com a ponteira de micropipeta. Após isso, foram feitas fotografias em microscópio invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse TE300) no tempo zero, logo após o dano na camada celular, 6 horas e 24 horas. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS, pré-fixadas e fixadas com paraformaldeído 4% (10 minutos cada etapa), lavadas com Tris glicina, diluídas para 1x com pH de 8,5, permeabilizadas com Triton x100 0,5%. Para marcação do citoesqueleto de actina no ensaio de migração, as células foram incubadas com a toxina Faloidina conjugada com Rodamina por 10min (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA) e visualizadas no microscópio invertido de fluorescência (Nikon Eclipse TE300).

3.5 Endocitose

A capacidade de endocitose das linhagens GRX e GRX^{EGFP-Cav} foi determinada pelo método estabelecido por Lee e colaboradores (Lee, Twomey et al. 2013), usando as microesferas fluorescentes de poliestireno (*FluoSpheres® Fluorescent Microspheres*, Molecular Probes). As culturas de células foram incubadas com as microesferas em uma razão de 1:100 (microesferas/células) por 4, 8 e 16 horas. A cada tempo, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas, fixadas com paraformaldeído 4% diluído em PBS e analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA), onde foi mensurada a fluorescência captada no canal FL3 (intensidade de fluorescência vermelha). A análise dos dados obtidos foi realizada FCS Express 4 software (DeNovo, Software, Ontario, Canada).

As células incubadas com as microesferas também foram analisadas por microscopia de fluorescência confocal. As células GRX e GRX^{EGFP-Cav} foram cultivadas nas câmaras adequadas (CELLview glass botton plates, GreinerBioone). As células foram incubadas com as microesferas e, após o tempo apropriado, o meio foi removido e as culturas lavadas com PBS. O citoesqueleto das células foi corado com Faloidina-Alexafluor 488 (Invitrogen, USA) e os núcleos corados com Hoechst 33342 (Invitrogen, USA). Após as marcações, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS. A presença de microesferas no interior das células foi visualizada no microscópio

confocal (FV1000, Olympus), no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS (CME-UFRGS).

3.6 *Mensuração do Colesterol Livre no Extrato Lipídico Total*

As células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} foram semeadas em placas de 6 poços para alcançar a confluência de $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ em 2 dias de cultura. Após o crescimento celular, as culturas foram raspadas com PBS e as células colocadas em tubos de vidro, onde foi adicionado clorofórmio, metanol e água (C:M:H₂O, 3:2:1, v/v/v). Os tubos foram agitados no vórtex e centrifugadas por 5 min a 3000 rpm para a separação da fases. Após a centrifugação foi retirada a fase inferior que foi passada para outro tubo, lavada com C:M:H₂O (na proporção de 3:48:47, v/v/v) e centrifugada novamente por 5 min a 3000 rpm. Logo após a fase superior foi descartada e a fase inferior foi seca com nitrogênio líquido a 37°C em banho-maria. Posteriormente as amostras foram suspensas com clorofórmio para a aplicação na placa de alumínio de sílica gel G-60 (Merck, Darmstadt, Germany) para cromatografia em camada delgada (TLC) para migrar na cuba de vidro com a mistura de solventes de hexano, éter etílico e ácido acético na proporção de 90:10:1 (Guaragna, Trugo et al. 1991). Para revelar os componentes das amostras utilizou-se a solução de ácido fosfórico e sulfato de cobre e borrifou-se a mesma sobre a placa cromatográfica, com posterior aquecimento a temperatura de 160°C, em estufa. A quantificação relativa das bandas foi feita por densitometria através do programa AlphaEasyFC. O resultado foi expresso em porcentagem de lipídeos totais.

3.7 *Análise Estatística*

Os dados foram obtidos de três experimentos independentes (n=3) e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) de uma ou duas vias, e, quando indicado, submetidos ao teste de *post hoc* Tukey. Para a comparação entre dois dados, foi utilizado o teste t. As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. As análises foram feitas com o programa GraphPad Prism 5 (versão 5.02).

4. Resultados

4.1 Sucesso da Transfecção

Para comprovar que as modificações metabólicas e morfológicas encontradas nas células $\text{GRX}^{\text{EGFP-Cav}}$ deveram-se à proteína Cav-1 e não a inserção do plasmídeo, inicialmente, foi estabelecida a linhagem controle $\text{GRX}^{\text{EGFPpCineo}}$. Para tal, as células GRX foram transfectadas com o plasmídeo vazio pCineoEGFP, através da mesma metodologia utilizada para obtenção da linhagem $\text{GRX}^{\text{EGFP-Cav}}$ (Ilha, 2012).

O sucesso da transfecção com o plasmídeo pCineoEGFP foi confirmado por citometria de fluxo e microscopia confocal como mostram as figuras 7 e 8. A maior expressão de Cav-1 na linhagem $\text{GRX}^{\text{EGFP-Cav}}$ fica evidente na análise das imagens apresentadas na figura 9.

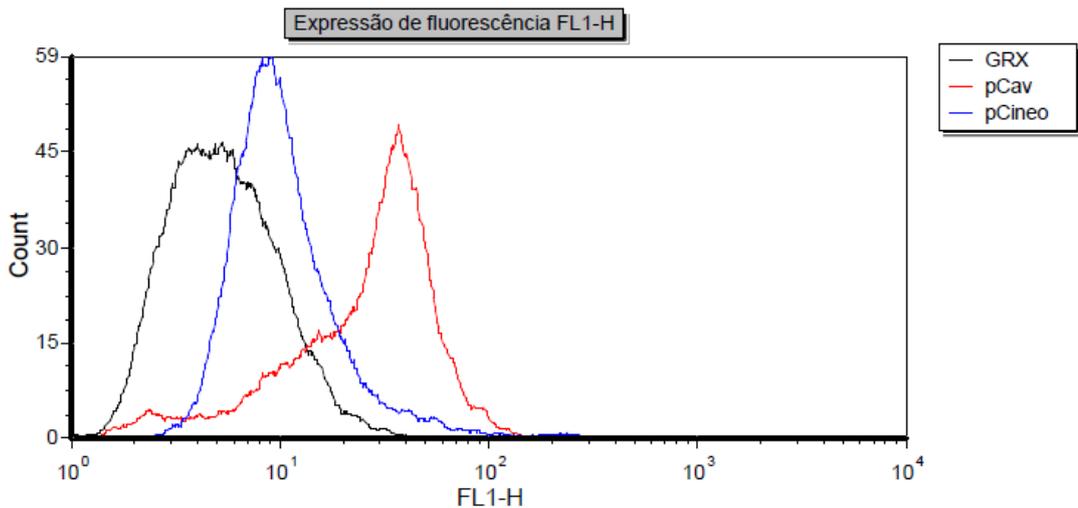


Figura 7: A expressão de EGFP em verde confirma a eficiência da transfecção nas linhagens $\text{GRX}^{\text{EGFP-Cav}}$ e $\text{GRX}^{\text{EGFPpCineo}}$. O aumento da fluorescência verde captada no canal FL1 representa a expressão de EGFP.

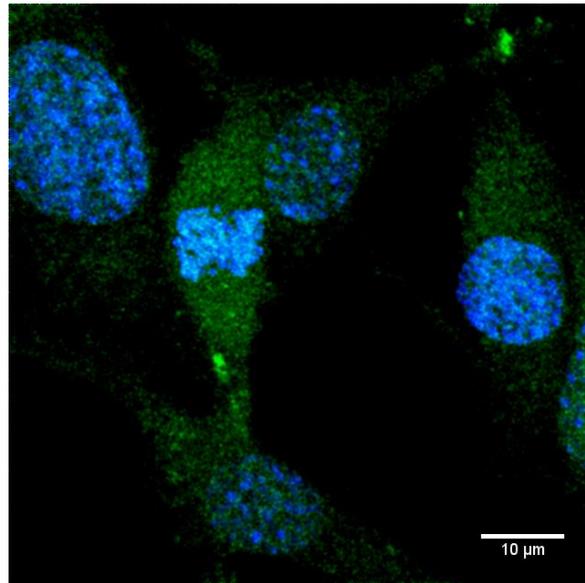


Figura 8: A expressão da proteína EGFP confirma a transfecção com o plasmídeo pCineoEGFP. Imagens de microscopia confocal das células da linhagem $GRX^{EGFPpCineo}$, obtidas no microscópio Olympus FV1000. Magnificação de 600x, zoom 3x, núcleos em azul corados com Hoechst.

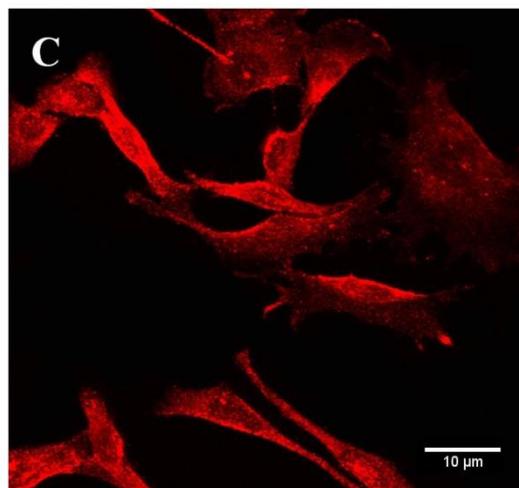
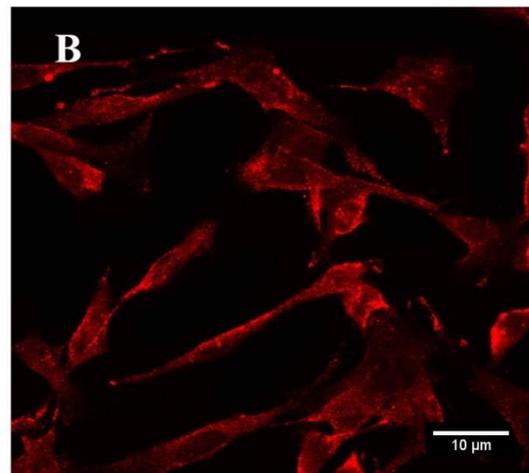
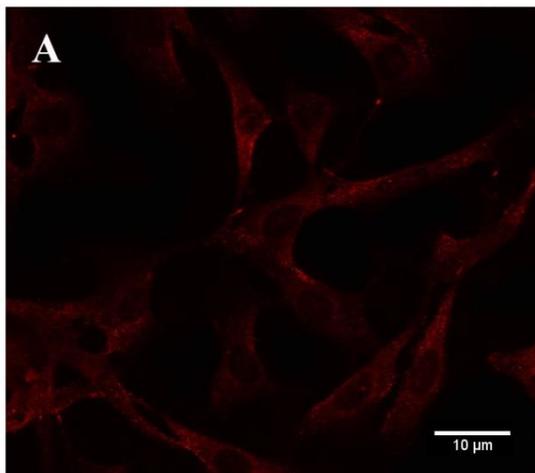


Figura 9: A transfecção com plasmídeo pCav1EGFP aumentou a expressão de Cav-1 na linhagem GRX^{EGFP-Cav}. Imagens de microscopia confocal das células GRX (A), GRX^{EGFPpCineo} (B), GRX^{EGFP-Cav} (C). A expressão da Cav-1 em vermelho foi revelada por imunocitoquímica, conforme descrito em Material e Métodos. Aumento de 600x.

4.2 Análise da Proliferação e Adesão celular

4.2.1 A Superexpressão da Cav-1 Resultou em um Aumento da Biomassa Celular

A determinação da quantidade de células aderidas (biomassa) das linhagens GRX e GRX^{EGFP-Cav} foi realizada pela técnica da Sulforrodamina B. A figura 10 mostra que houve um aumento significativo de biomassa nas culturas da linhagem GRX^{EGFP-Cav} em relação às culturas controle GRX. Este aumento foi significativo nos tempos de 24, 48 e 72 horas depois do plaqueamento, sugerindo que a superexpressão de Cav-1 provoca um aumento na proliferação.

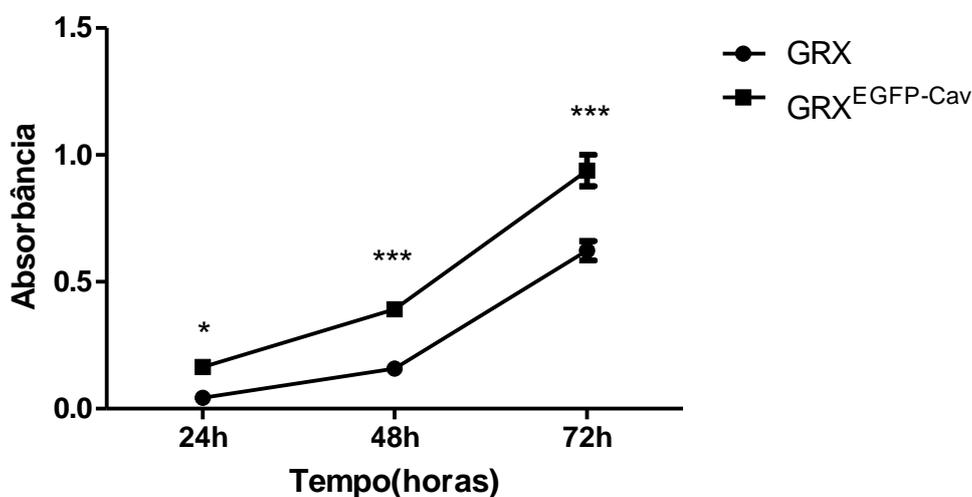


Figura 10: A superexpressão de Cav-1 aumentou a biomassa nas culturas da linhagem GRX^{EGFP-Cav}. A biomassa foi medida pelo ensaio da Sulforrodamina B nos tempos de 24, 48 e 72 horas. O aumento foi significativo em todos os tempos de cultura na linhagem que superexpressa a Cav-1 (n=3, *p<0,05 comparadas com o controle GRX; ***p<0,001 comparadas com o controle GRX).

4.2.2 Aumento da Proliferação na Linhagem que Superexpressa Cav-1:

Para comparar a capacidade de proliferação das linhagens GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} a quantidade de células presentes nas culturas foi determinada em 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento. Os resultados apresentados na figura 11 são semelhantes aos da figura 10 e mostram que, já a partir das 24 horas, existe um aumento na proliferação da linhagem que superexpressa a Cav-1. Verifica-se que o número de células nas culturas de 48 e 72 horas da linhagem GRX^{EGFP-Cav} foi aproximadamente o dobro do encontrado das outras duas linhagens.

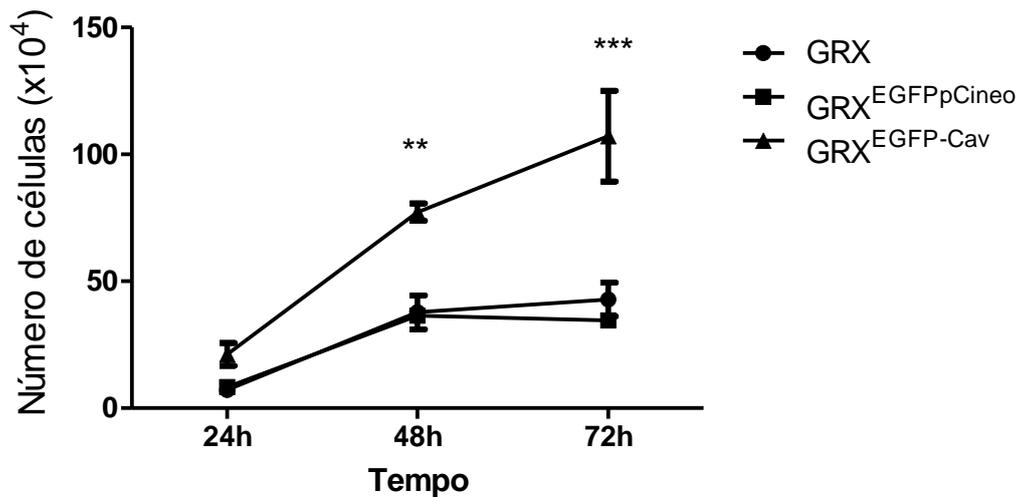


Figura 11: A superexpressão de Cav-1 estimulou a proliferação das células GRX^{EGFP-Cav}. A contagem de células foi feita por Citometria de Fluxo nos tempos de 24, 48 e 72 horas. A proliferação da linhagem GRX^{EGFP-Cav} foi significativamente maior que a das linhagens controle em 48 horas (**p<0,01) e 72 horas (**p<0,001) n=3.

4.2.3 A Superexpressão de Cav-1 Modulou a Adesão Celular:

Os resultados das figuras 10 e 11, que mostram o aumento de biomassa e do número de células já em 24 horas de cultura na linhagem GRX^{EGFP-Cav} e levantam a possibilidade de existirem diferenças na capacidade de adesão entre as linhagens. A figura 12 mostra o aumento significativo no número de células GRX^{EGFP-Cav} aderidas após duas horas de plaqueamento.

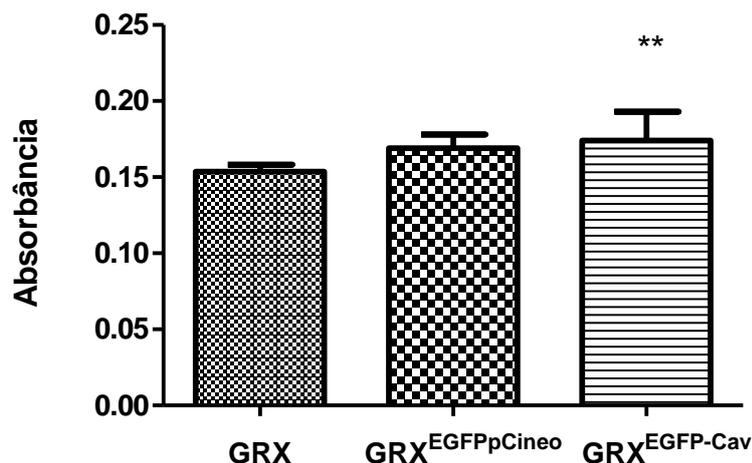


Figura 12: A superexpressão de Cav-1 aumentou adesão das células da linhagem GRX^{EGFP-Cav}. A adesão foi medida duas horas após o plaqueamento pelo método do MTT, a absorbância obtida após a solubilização dos cristais de formazan está diretamente relacionada com a quantidade de células aderidas. **p<0,05, n=3, comparadas com GRX e GRX^{EGFPpCineo}

No entanto, fica evidente pela análise da figura 13 que, embora existam mais células GRX^{EGFP-Cav} aderidas, estas ainda apresentavam morfologia esférica após duas horas de plaqueamento enquanto que as células GRX e GRX^{EGFPpCineo} já apresentavam prolongamentos citoplasmáticos mais evidentes representando um estágio mais avançado de adesão.

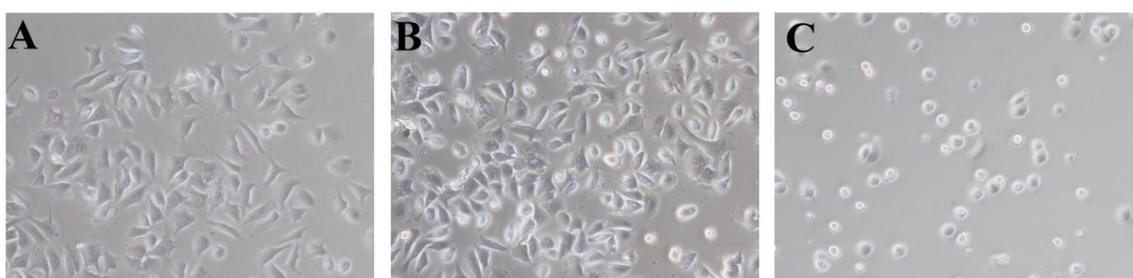


Figura 13: A superexpressão de Cav-1 alterou as propriedades de adesão da linhagem GRX^{EGFP-Cav}. (A e B) Linhagens GRX e GRX^{EGFPpCineo} já apresentando uma morfologia mais espreiada. C) Linhagem GRX^{EGFP-Cav} ainda apresentando uma morfologia esférica. Magnificação de 200x n=3.

4.3 Análise Morfológica

4.3.1 Determinação do Tamanho das Células e da Complexidade do Citoplasma

Por citometria de fluxo foram comparados o tamanho e a complexidade citoplasmática através dos parâmetros de FSC (*ForwardScatter*) e de SSC (*SideScatter*). O deslocamento dos histogramas na escala FSC-H mostra que as células das linhagens GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav} são maiores que as GRX (Figura 14). Já pela análise do parâmetro SSC-H foi possível observar a maior complexidade citoplasmática da linhagem GRX^{EGFP-Cav} (Figura 15).

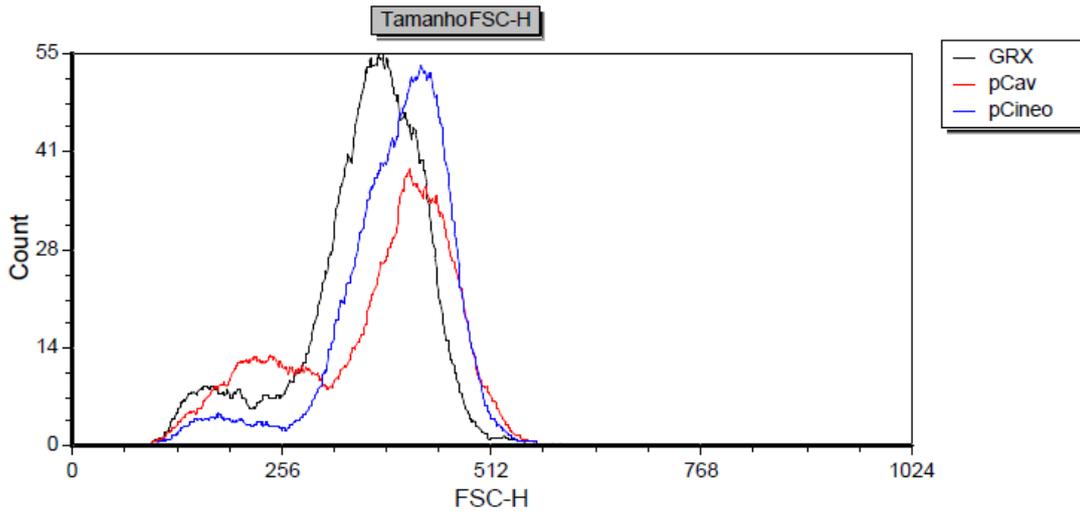


Figura 14: A transfecção provocou o aumento do tamanho das células das linhagens GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav}. Na análise por citometria de fluxo o deslocamento do pico do histograma na escala FSC-H (forward scatter, eixo x) representa o tamanho das células.

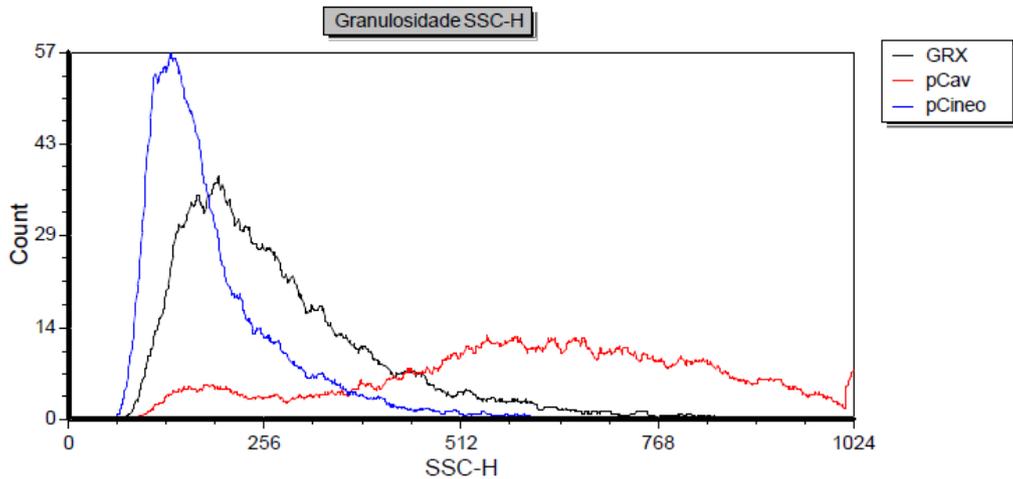


Figura 15: A superexpressão de Cav-1 aumentou a granulosidade da linhagem GRX^{EGFP-Cav}. Na análise por citometria de fluxo o deslocamento do pico do histograma na escala SSC-H (side scatter, eixo x) demonstra que as células apresentam maior complexidade citoplasmática (granulosidade).

4.3.2 Mudanças na Estrutura do Citoesqueleto de Actina nas Células que Superexpressam a Cav-1

Para análise do citoesqueleto de actina, as células foram marcadas com a toxina Faloidina conjugada com Rodamina, que tem afinidade por f-actina. Nas imagens mostradas na figura 16 é possível observar a presença das fibras de estresse nas células GRX e GRX^{EGFPpCineo} (A e B). Já as células que superexpressam a Cav-1 (C) não apresentam fibras de estresse, evidenciando a fragmentação dos filamentos de actina.

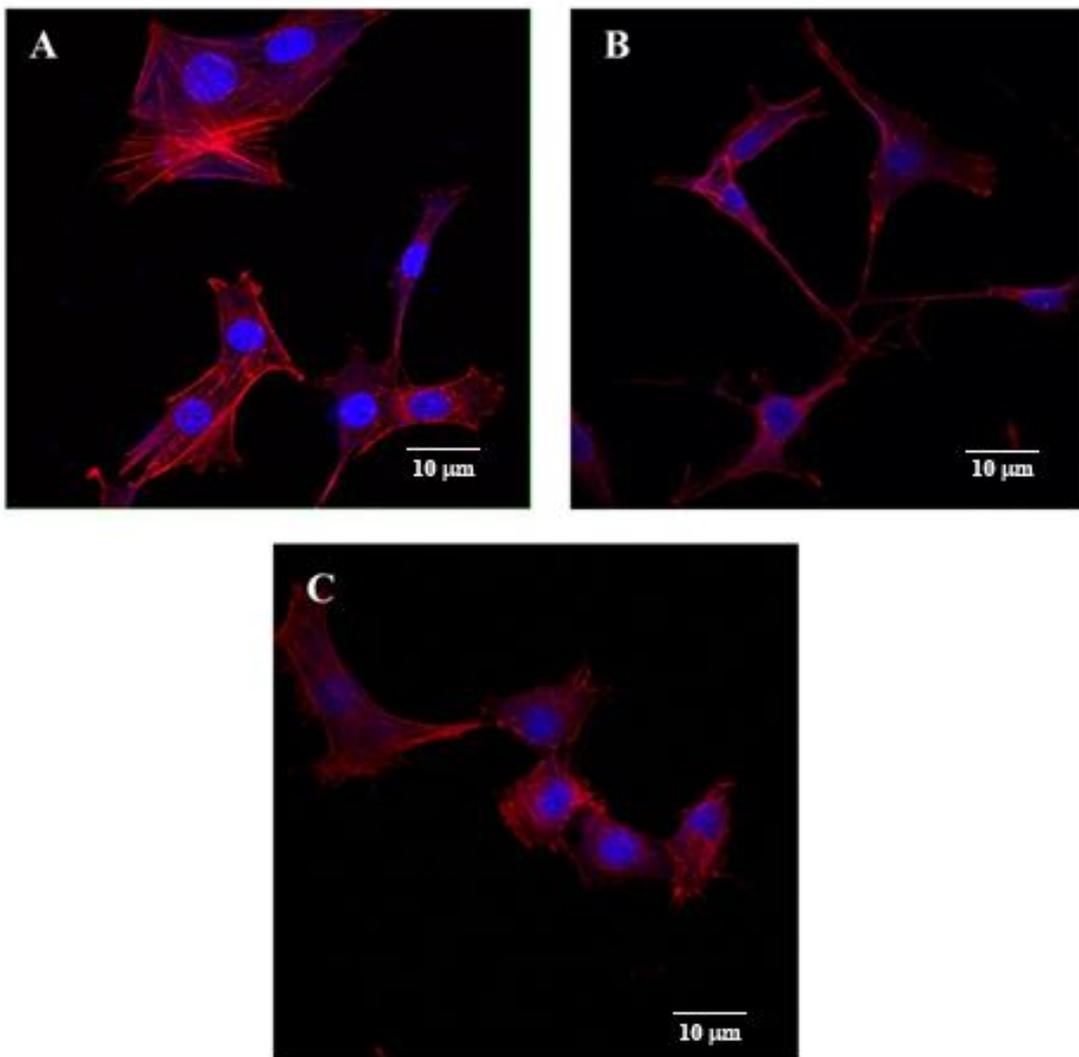


Figura 16: A expressão de Cav-1 alterou o citoesqueleto de actina em vermelho da linhagem GRX^{EGFP-Cav}. Imagens representativas da marcação do citoesqueleto de actina em vermelho com faloidina rodamina. (A e B) Linhagens GRX e GRX^{EGFPpCineo}, respectivamente apresentando as fibras de estresse e, vermelho bem evidentes, C) Linhagem GRX^{EGFP-Cav}, a imagem mostra a fragmentação das fibras de estresse e o acúmulo de actina nas bordas das células. Núcleos revelados em azul pela coloração de Hoechst. Aumento de 600x.

4.4 Análise Ultraestrutural

Como a Cav-1 é uma proteína estrutural das caveolas e fundamental para a sua biogênese, a análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi usada para avaliar o efeito de sua superexpressão sobre a densidade de caveolas na linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$. Nas figuras 17 C e 17 D é possível observar o aumento da densidade de caveolas nas células que superexpressam a Cav-1 em relação às linhagens controles.

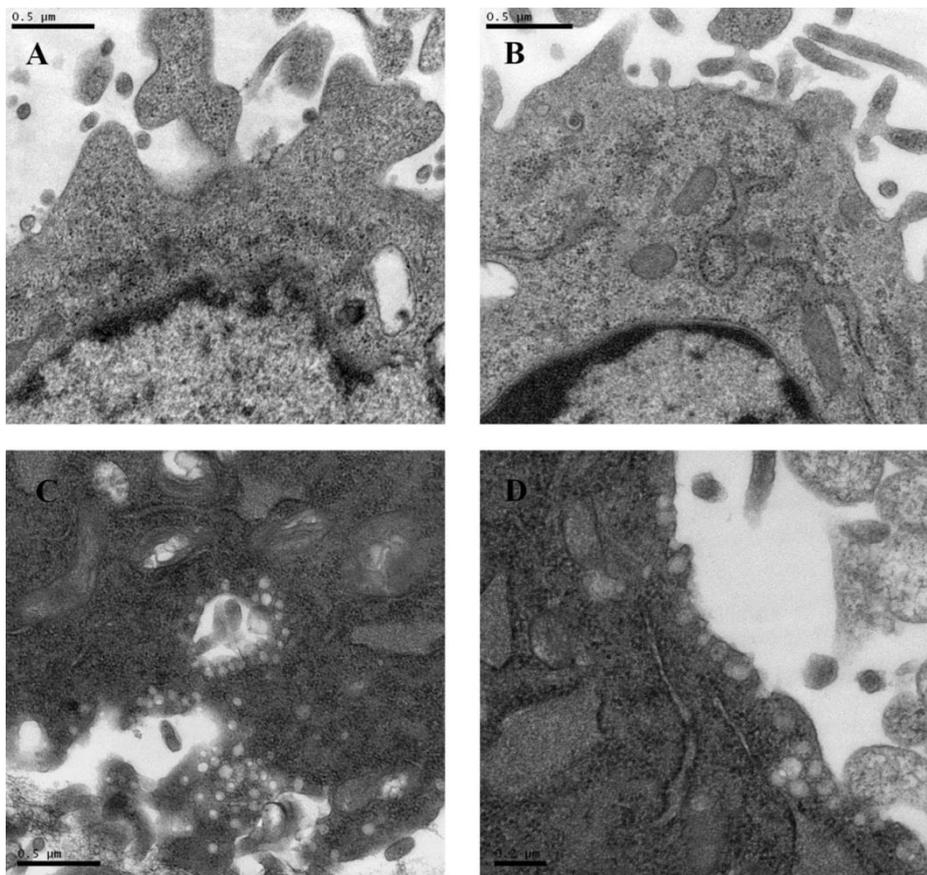


Figura 17: A superexpressão de Cav-1 aumentou a densidade de caveolas na linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$. A) Linhagem GRX, B) Linhagem $GRX^{EGFPpCineo}$, C) Linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$. Magnificação de 50k. D) Detalhe da membrana de uma célula $GRX^{EGFP-Cav}$. Magnificação de 75k

Já na figura 18 C é possível notar o aumento da concentração de autofagossomos nas células $GRX^{EGFP-Cav}$ comparadas com as células das linhagens GRX e $GRX^{EGFPpCineo}$

respectivamente nas figuras 18 A e 18 B. Este fato pode explicar a maior complexidade do citoplasma apresentado por estas células (figura 15).

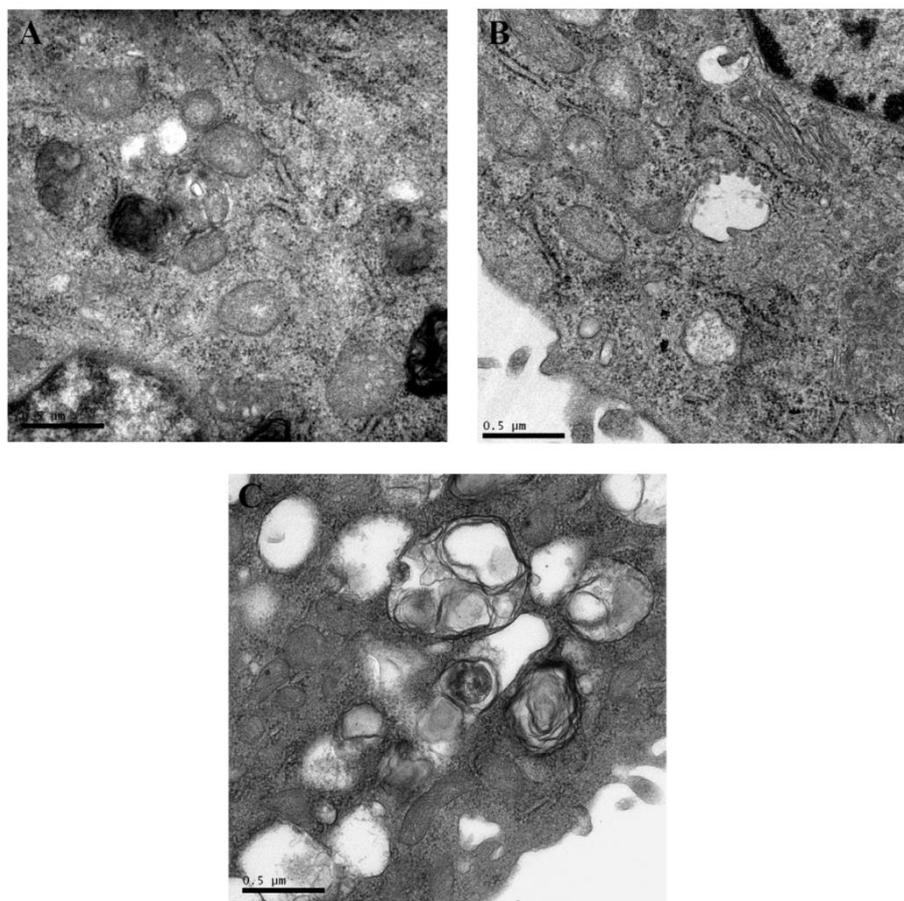


Figura 18: A superexpressão de Cav-1 aumentou a concentração de autofagossomos na linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$. **A)** Linhagem GRX, **B)** Linhagem $GRX^{EGFPpCineo}$, **C)** Linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$. Magnificação de 50k.

4.5 Alterações na Expressão das Proteínas Alfa Actina de Musculo Liso (α SMA) e Colágeno do Tipo I (Col-I).

Através da técnica de imunocitoquímica foi possível visualizar e quantificar a expressão de proteínas marcadoras do estado de ativação das HSC, alfa actina de músculo liso (α SMA) figura 19 e colágeno tipo I (Col-I), figura 20. Verifica-se na figura 19 que a expressão de α SMA foi significativamente maior na linhagem que superexpressa a Cav-1, $GRX^{EGFP-Cav}$ e surpreendentemente na linhagem $GRX^{EGFPpCineo}$. Já a expressão de Col-I, mostrada na figura 20 aumentou significativamente somente na linhagem superexpressora de Cav-1.

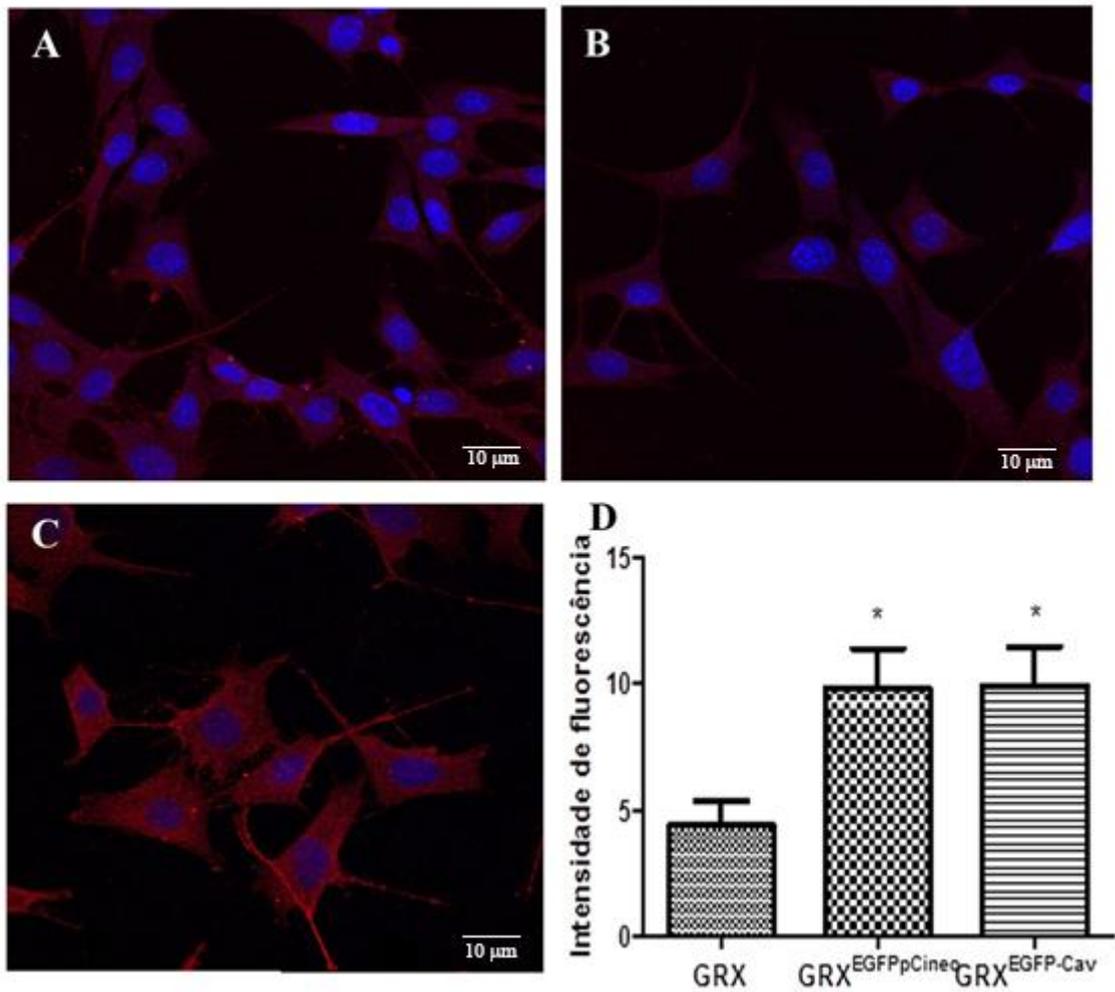


Figura 19: A transfecção induziu aumento da expressão de α SMA nas células GRX^{EGFP-Cav} e GRX^{EGFPpCineo}. Imagens de microscopia confocal da expressão de α SMA revelada por imunocitoquímica em vermelho conforme descrito em Material e Métodos. Linhagem GRX (A), Linhagem GRX^{EGFPpCineo} (B), GRX^{EGFP-Cav} (C). Núcleos revelados em azul pela coloração de Hoechst. Aumento de 600x. Em (D) A expressão da α SMA foi revelada por imunocitoquímica e quantificada conforme descrito em Material e Métodos. * $p < 0,05$ comparado com as células GRX $n=3$.

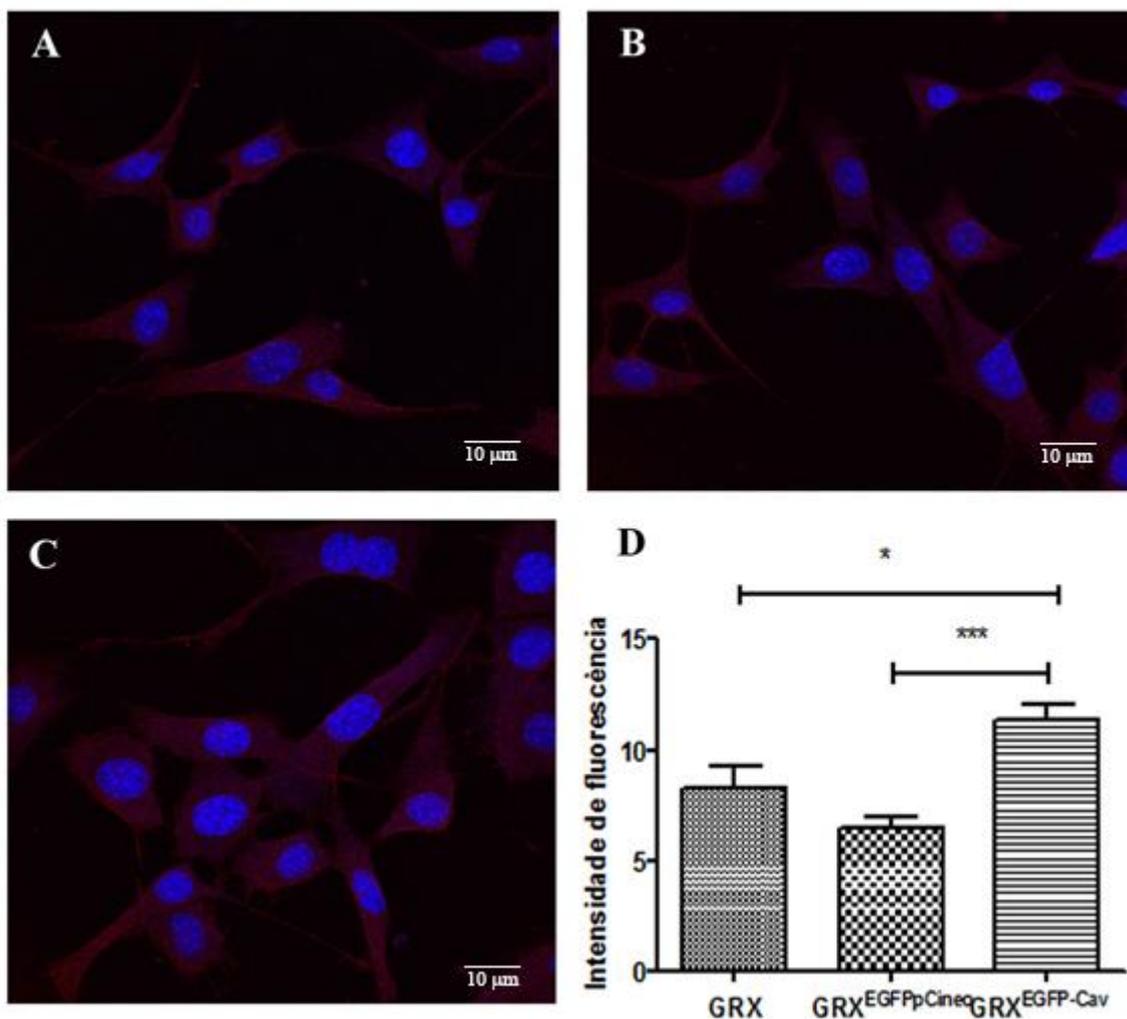


Figura 20: A superexpressão de Cav-1 induziu o aumento da expressão de Col-I nas células GRX^{EGFP-Cav}. Imagens de microscopia confocal da expressão de Col-I em vermelho revelada por imunocitoquímica conforme descrito em Material e Métodos. Linhagem GRX (A), Linhagem GRX^{EGFPpCineo} (B), GRX^{EGFP-Cav} (C). Núcleos revelados em azul com Hoechst. Aumento de 600x. Em (D) A expressão da Col-I foi revelada por imunocitoquímica e quantificada conforme descrito em Material e Métodos. *p<0,05 comparado com as células GRX; ***p<0,001 comparado com as células GRX^{EGFPpCineo} n=3.

4.6 Análise da Capacidade de Migração Celular

O ensaio de *Wound-healing* foi usado para analisar a capacidade de migração das células GRX, GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav}. A análise da figura 21 mostra que a migração das duas linhagens transfectadas foi menor que a das células GRX. No entanto, as imagens apresentadas na figura 22, revelam a tendência das células GRX^{EGFP-Cav} a formarem grumos, aderindo umas sobre as outras, sugerindo um aumento na afinidade célula-célula o que pode prejudicar a avaliação da migração por este tipo de ensaio.

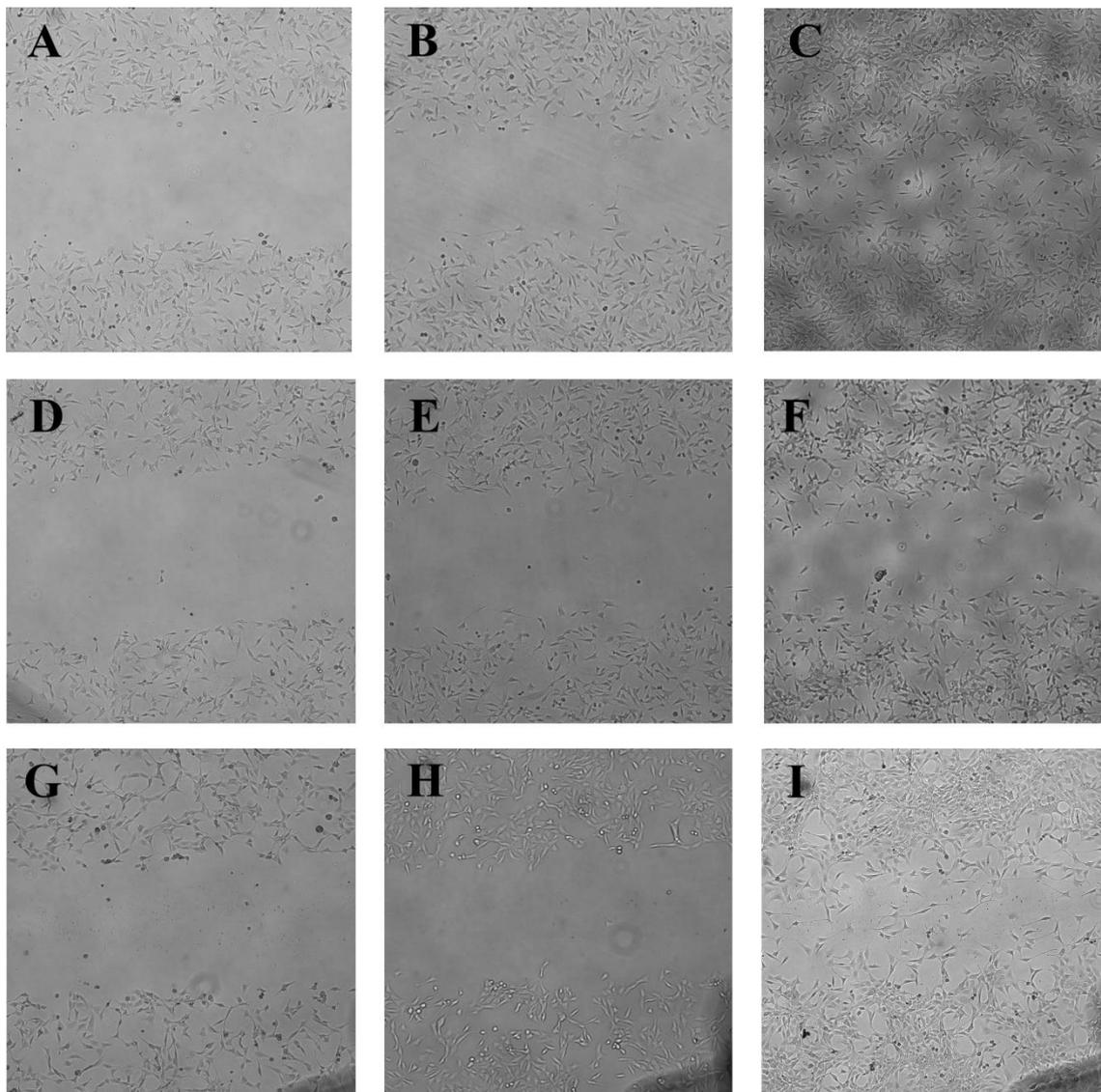


Figura 21: A transfecção afeta a migração medida pelo ensaio de *Wound-healing*. **A-C)** Migração da linhagem GRX nos tempos 0, 6 e 24 horas; **D-F)** Migração da linhagem GRX^{EGFPpCineo} nos tempo 0, 6 e 24 horas.; **G-I)** Migração da linhagem GRX^{EGFP-Cav}. Aumento de 40x

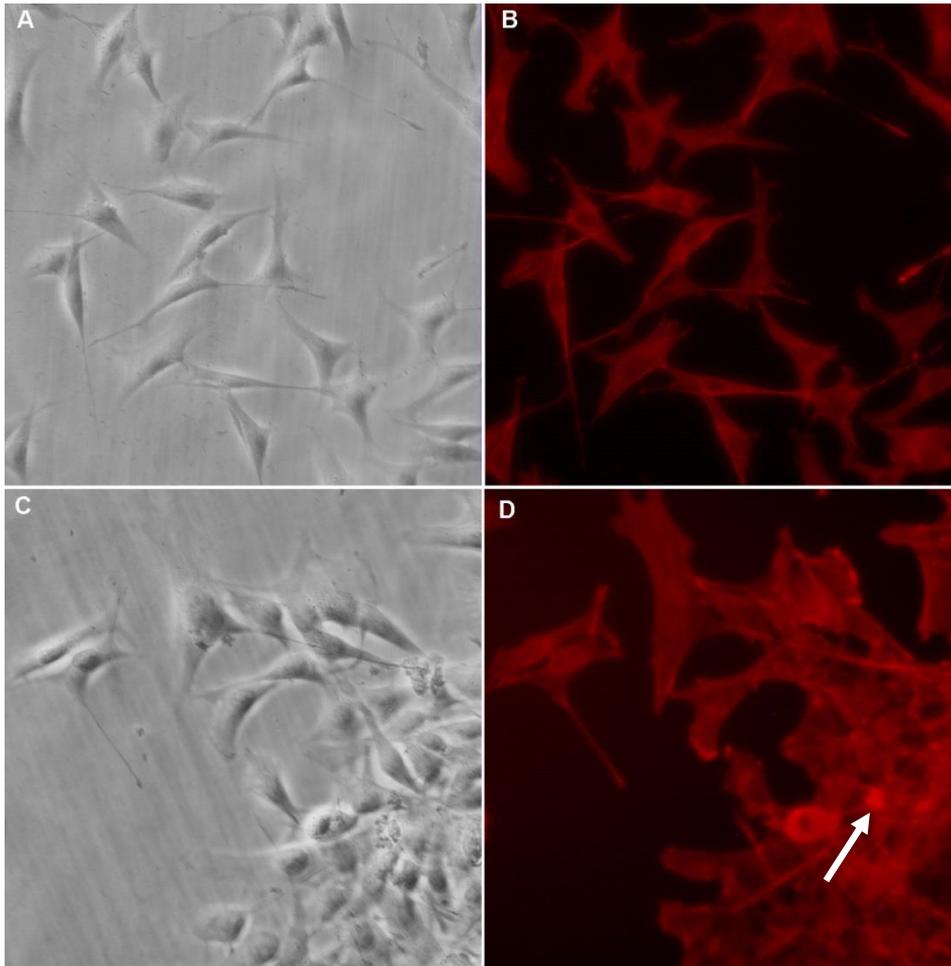


Figura 22: A superexpressão de Cav-1 induz a formação de grumos. Imagens das bordas do risco feito na camada celular 24 horas após o início do experimento de migração. **A e B)** Linhagem GRX, **C e D)** linhagem GRX^{EGFP-Cav}, **A e C)** contraste de fase, **B e D)** coloração das f-actina em vermelho com faloidina-rodamina. A seta aponta o crescimento tridimensional das células GRX^{EGFP-Cav} (formação de grumos de células). Aumento de 200x.

4.7 Análise da Capacidade de Endocitose

A capacidade de endocitose foi medida nas linhagens GRX e GRX^{EGFP-Cav}. A captação de microesferas fluorescentes foi quantificada por citometria de fluxo e visualizada por microscopia confocal. A endocitose foi quantificada após 4, 8 e 16 horas com as microesferas. No tempo de 8 horas houve um aumento significativo da endocitose pela linhagem que superexpressa a Cav-1 em relação ao controle GRX (figura 23 em E), mostrando que a endocitose da linhagem que superexpressa a Cav-1 foi acelerada, no entanto após 16 horas as duas linhagens apresentaram o mesmo nível de captação de microesferas fluorescentes.

A localização citoplasmática das microesferas foi comprovada pela reconstituição tridimensional das imagens da varredura no eixo Z realizada no microscópio confocal (figura 23B e D). A marcação do citoesqueleto de actina com Faloidina-AlexaFluor 488 possibilitou a observação das fibras de estresse nas células GRX e a fragmentação das fibras de actina nas $GRX^{EGFP-Cav}$ já mostradas na figura 16. O crescimento tridimensional, isto é, capacidade de adesão célula-célula mostrada nas figuras 22C e D ficam evidentes na imagem da figura 23C.

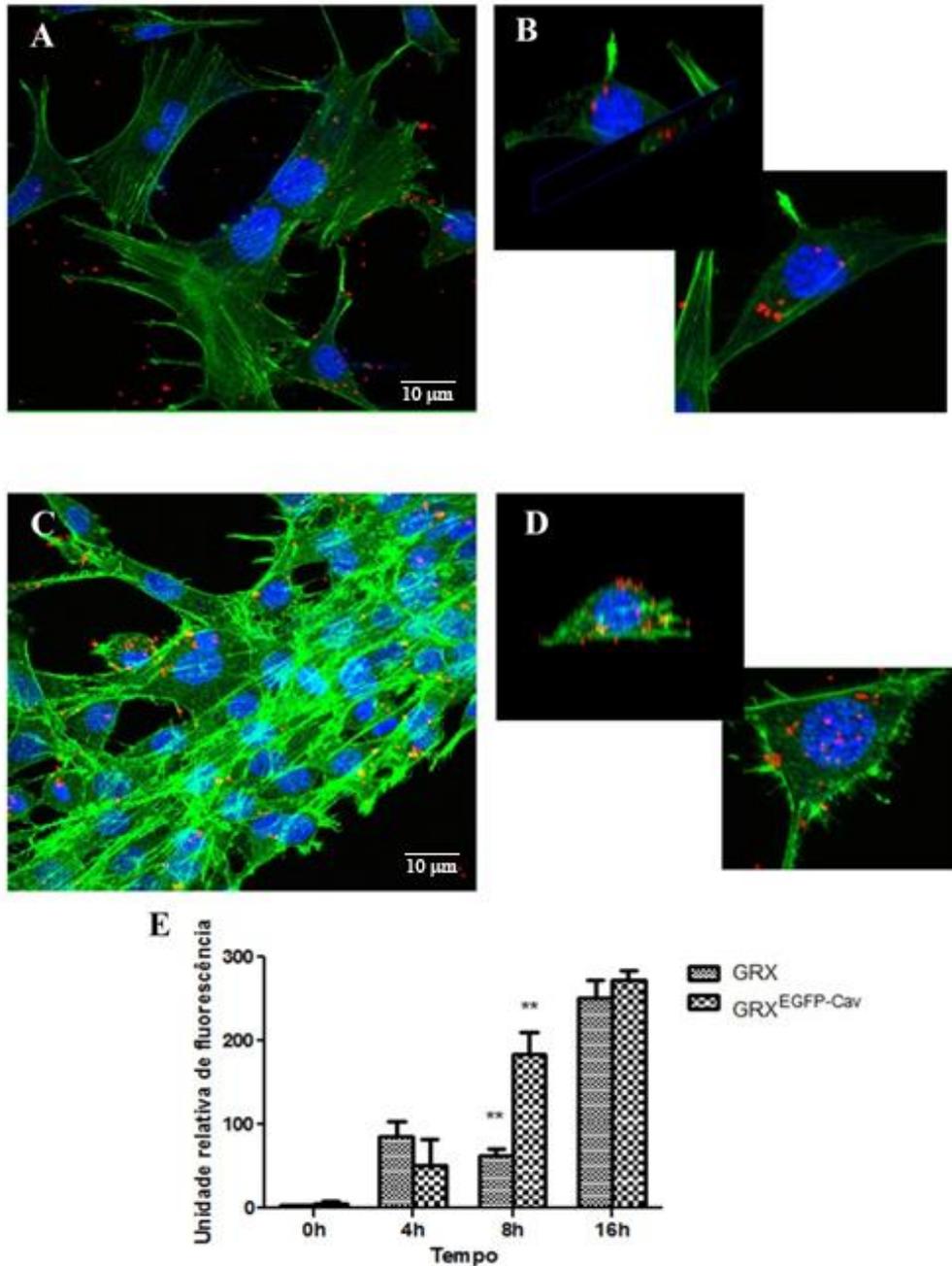


Figura 23: A superexpressão de Cav-1 estimulou a endocitose nas células $GRX^{EGFP-Cav}$. **A e B)** Linhagem GRX, **C e D)** Linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$. Em verde observa-se o citoesqueleto de actina marcado com Faloidina-AlexaFluor 488, em vermelho as microesferas, em azul o núcleo corado com Hoescht. **B e D)** Reconstituição tridimensional da varredura no eixo Z, mostrando a presença de maior número de

microesferas nas células GRX^{EGFP-Cav}. Em **A**, fibras de estresse das células GRX. Em **C**, actina fragmentada e o crescimento tridimensional das células GRX^{EGFP-Cav}. Em **E**) A quantificação da endocitose foi realizada em Citômetro de Fluxo nos tempos de 0, 4, 8 e 16 horas de incubação com as microesferas fluorescentes (**p<0,01, n=3). Canal de fluorescência FL3.

4.8 Quantificação do Colesterol Livre Presente nas Membranas

A Cav-1 é conhecida por seu papel no transporte de colesterol para a membrana plasmática. Os lipídios extraídos das três linhagens foram analisados por cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês *Thin Layer Chromatography*) do extrato lipídico. A figura 24 mostra um pequeno, mas significativo aumento do colesterol livre nas células que superexpressam a Cav-1. O aumento do conteúdo de colesterol livre era esperado pelo aumento da expressão de Cav-1.

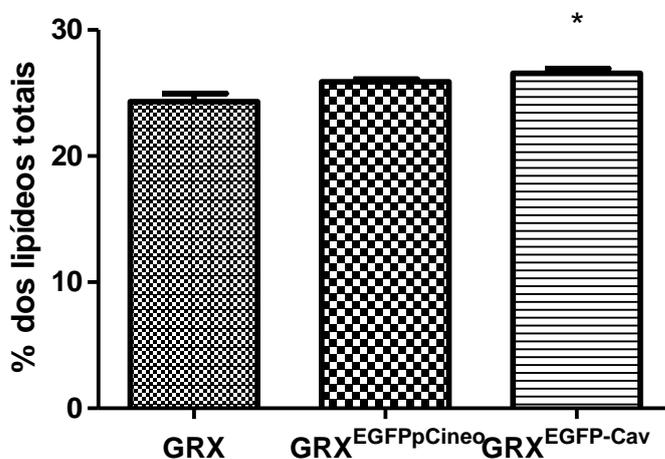


Figura 24: A superexpressão de Cav-1 aumentou a concentração de colesterol livre. A quantificação do colesterol livre foi feita por densitometria das bandas cromatográficas. A linhagem que superexpressa a Cav-1 apresentou um aumento significativo da concentração de colesterol (*p<0,05, n=3) quando comparadas com os controles.

5. Discussão

As doenças hepáticas estão entre as maiores causas de mortes no mundo. Estão entre elas a fibrose e a cirrose, representando as manifestações patológicas mais comuns entre os problemas e epidemias mundiais de saúde (Elsharkawy, Oakley et al. 2005). As caveolas são pequenas invaginações de membrana plasmática ricas em glicoenfingolípídeos, colesterol e proteínas GPI ancoradas, sendo responsáveis por vários processos celulares importantes para a fisiologia celular, como por exemplo, a endocitose, transporte de colesterol e plataforma de transdução de sinais (Goetz, Lajoie et al. 2008). A Cav-1 é uma proteína integral de membranas biológicas presente em várias organelas e nas caveolas. A sua presença é extremamente importante para a biogênese e formação das caveolas. Em um estudo com fígados cirróticos humanos foi reportado um aumento da Cav-1 em células endoteliais sinusoidais e nas HSC, sugerindo um importante papel dessa proteína no desenvolvimento da fibrose hepática (Yokomori, Oda et al. 2002).

Neste trabalho foi realizado a caracterização metabólica e morfológica da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$ de HSC, superexpressora de Cav-1. A linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$ estabelecida por Ilha em 2012 expressa 83% mais Cav-1 que as células GRX, existindo alta taxa colocalização entre a pCav1EGFP e a proteína endógena. Para confirmar a relação entre a superexpressão de Cav-1 e os resultados descritos neste trabalho, inicialmente foi estabelecida a linhagem controle $GRX^{EGFPpCineo}$, pela inserção do plasmídeo vazio pCineoEGFP em células GRX. A transfecção foi realizada com o mesmo protocolo experimental estabelecido anteriormente (Ilha 2012), para a obtenção da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$. O sucesso da transfecção foi confirmado por citometria de fluxo e microscopia confocal e na maioria dos ensaios utilizados para caracterizar as células $GRX^{EGFP-Cav}$ a linhagem $GRX^{EGFPpCineo}$ se comportou com as células GRX.

O efeito da superexpressão de Cav-1 sobre a proliferação, foi determinado por contagem do número de células e pelo ensaio da Sulforrodamina B (SRB), metodologias comumente usadas por outros autores. A SRB se liga de forma estequiométrica aos aminoácidos básicos das proteínas celulares e a quantidade de corante extraído da camada celular é proporcional ao número de células e corresponde a biomassa das culturas. Os resultados mostram que a velocidade de proliferação da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$ é praticamente o dobro das células GRX e $GRX^{EGFPpCineo}$. A

determinação do conteúdo total de proteínas nas culturas pelo método de Lowry modificado por Peterson (Peterson 1979) reforçou os resultados da SRB e da contagem celular (dados não mostrados).

Alguns autores sugerem que a Cav-1 está associada à regulação do ciclo celular, senescência e sinalização apoptótica, porém estes estudos referem-se ao câncer, onde a expressão de Cav-1 pode ser tanto um supressor como um promotor de tumor. Em culturas primárias de fibroblastos de camundongo, a superexpressão de Cav-1 inibiu a proliferação, bloqueando o ciclo celular na fase G1, induzindo uma senescência celular prematura (Gvaramia, Blaauboer et al. 2013).

Os resultados dos experimentos de adesão celular mostram que, duas horas após o plaqueamento, existiam mais células $GRX^{EGFP-Cav}$ aderidas ao substrato comparando com as outras linhagens. Porém, as imagens de microscopia de contraste de fase da adesão celular, mostram que as $GRX^{EGFP-Cav}$, embora aderidas ainda apresentavam uma morfologia esférica, enquanto que as células GRX e $GRX^{EGFPpCineo}$ já apresentavam processos citoplasmáticos bem formados, estando em um estágio mais avançado de adesão. Estes dados sugerem que as células que superexpressam Cav-1 precisam de um tempo maior para aderir completamente ao substrato.

O tamanho e a complexidade do citoplasma foram determinados por citometria de fluxo. Foi verificado que as células $GRX^{EGFPpCineo}$ e $GRX^{EGFP-Cav}$ são maiores que as GRX , sugerindo um efeito da transfecção sobre o tamanho das células. A linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$ apresentou um citoplasma mais complexo que as demais linhagens. Esse aumento de granulidade pode ser explicado pelo aumento da quantidade de autofagossomos evidentes nas imagens de MET, este efeito pode ser relacionado com a superexpressão de Cav-1.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta muito útil para a análise ultraestrutural, permitindo a visualização de organelas e especializações de membrana. Foi através dela que as caveolas e outras organelas importantes para a fisiologia celular foram descobertas no século passado (Patel and Insel 2009). Neste trabalho, usamos a técnica de MET para a visualização das caveolas. Nossos resultados mostram que a superexpressão de Cav-1 resultou em aumento da densidade de caveolas na membrana plasmática, sugerindo que a proteína que é transcrita a partir do plasmídeo está se dirigindo para a formação e biogênese das caveolas.

O citoesqueleto é uma rede de fibras compostas por proteínas específicas, microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários. O citoesqueleto está envolvido em várias funções celulares, entre elas: a manutenção da forma e resistência mecânica a deformação, contração e migração celular, endocitose, segregação dos cromossomos na divisão celular, transporte intracelular de organelas e vesículas e, além disso, na formação dos cílios, flagelos, lamelipódios e podossomos (Parton and del Pozo 2013; Head, Patel et al. 2014). Como já descrito anteriormente por Mermelstein e colaboradores (Mermelstein, Guma et al. 2001) e novamente mostrado neste estudo as células GRX apresentam fibras de estresses bem definidas, aderidas firmemente ao substrato através de numerosas adesões focais. Já na linhagem GRX^{EGFP-Cav} o aumento da concentração de Cav-1 modulou o citoesqueleto de actina, provocando a sua fragmentação e o acúmulo de actina nas bordas da célula e a formação de adesões focais no extremo de filopódios. Nas células GRX o mesmo tipo de reestruturação do citoesqueleto foi observada após o tratamento das células com citocinas inflamatórias (da Silva, Guimaraes et al. 2003). Essa modulação do citoesqueleto é compatível com um aumento na mobilidade celular. A organização do citoesqueleto foi mostrada por microscopia confocal após incubação das células com a toxina faloidina conjugada com determinantes de fluorescência (rodamina ou alexa flúor 488). Esta toxina tem afinidade por f-actina.

A marcação do citoesqueleto de actina com faloidina também mostrou a tendência das células GRX^{EGFP-Cav} crescerem dispondo-se umas sobre as outras, sugerindo assim uma modulação das proteínas de contato celular, como por exemplo, as integrinas e E-caderinas. A possível consequência dessas alterações é uma maior afinidade célula-célula e menor afinidade célula-substrato (Parton and del Pozo 2013).

Os mecanismos que envolvem a fibrose ainda não foram totalmente compreendidos. Um excesso do fator de crescimento de transformação (TGF- β 1) e o aumento da suscetibilidade de fibroblastos a sua ação são as possíveis causas da persistência do processo de remodelação tecidual. Como consequência os fibroblastos se diferenciam a miofibroblastos passando a expressar a α SMA. Este tipo de célula participa do reparo tecidual e da fibrose, sendo responsável pelo aumento da contração do tecido e da produção dos componentes de matriz extracelular (MEC). As funções celulares vitais na remodelação do tecido, como motilidade direcional, o *turnover* e deposição de MEC, expressão de α SMA e apoptose, dependem da composição e das

propriedades mecânicas da MEC. O desequilíbrio em qualquer um desses processos leva a perda de homeostase, a deposição desproporcional dos componentes da MEC e a contração excessiva do tecido resultando em fibrose (Gvaramia, Blaauboer et al. 2013).

As células que superexpressam a Cav-1 apresentam um aumento significativo na expressão de α SMA e do Col-I. Vários estudos anteriores de nosso grupo, revisados por Guimarães (Guimaraes, Franceschi et al. 2006), demonstram que as células GRX são miofibroblastos em estado intermediário de ativação que em resposta a estímulos fibrogênicos podem ser induzidas a expressar um fenótipo de miofibroblasto ativado. Sendo assim, propomos que o aumento no conteúdo de α SMA e do Col1 nas células GRX^{EGFP-Cav} são um indicativo da indução das células para um fenótipo de miofibroblasto ativado produtor de MEC característico de estados fibróticos.

A endocitose mediada pelas caveolas é um tópico controverso para muitos autores. Mas, é consenso que na endocitose mediada pelas caveolas é necessária a participação da proteína dinamina II que dirige o fechamento da parte superior da estrutura, formando os chamados caveossomos para a internalização. Em alguns tipos celulares a caveola se funde com os endossomos primários ou iniciais. Também já foi proposto que os caveossomos podem se fundir com os corpos multivesiculares (MBV) (Parton and del Pozo 2013). Sabe-se também que a internalização das caveolas depende da integridade e da reorganização do citoesqueleto: a montagem e desmontagem local da rede cortical de actinas são essenciais para iniciar a internalização das caveolas. Uma vez que se desliga da membrana plasmática, o caveossomo é transportado por proteínas motoras que o impulsionam ao longo dos microtúbulos (Kiss, 2012).

Usando microesferas fluorescentes, foi possível quantificar a endocitose nas linhagens GRX e GRX^{EGFP-Cav}. A endocitose foi medida por citometria de fluxo nos tempos de 4, 8 e 16 horas de incubação com as microsferas. Após 8 horas de incubação as células que superexpressam a Cav-1 endocitaram mais rapidamente as microesferas fluorescentes que as células controle GRX. Estes resultados foram confirmados por microscopia confocal através de reconstituição tridimensional das imagens da varredura no eixo Z. As imagens mostram claramente a localização citoplasmática das microesferas e o maior número de partículas nas células GRX^{EGFP-Cav}.

A marcação com Faloidina-AlexaFluor 488 novamente evidencia as alterações do citoesqueleto já discutidas anteriormente, mostrando a fragmentação das fibras de

estresse, localização pericelular da actina e o crescimento tridimensional que caracterizam as células que superexpressam Cav-1.

O movimento das células é impulsionado pela reorganização contínua e *turnover* do citoesqueleto de actina. Duas habilidades dos filamentos de actina são exploradas pela célula a fim de migrar: a capacidade de empurrar por polimerização e a capacidade de contrair. A polimerização da actina impulsiona a protrusão da célula e a formação de lamelipódios e filopódios. A migração foi avaliada pelo ensaio de *Wound-healing*, neste experimento usa-se uma ponteira de micropipeta para arranhar e remover células da camada celular, formando um “risco”, uma área vazia na qual as células da borda podem migrar e preencher novamente o espaço livre. Os resultados mostraram diferenças de comportamento entre as diferentes linhagens, em 24 horas as células GRX fecharam a camada celular, o mesmo não acontecendo nas culturas das linhagens GRX^{EGFPpCineo} e GRX^{EGFP-Cav}. O comportamento das células GRX e as GRX^{EGFP-Cav} é diferente desde a abertura do “risco” na camada celular, enquanto este é bem delimitado e parelho nas GRX, nas GRX^{EGFP-Cav} a camada celular parece soltar do substrato como um tapete que se dobra e adere sobre as células adjacentes, formando espaços de migração muito maiores. A avaliação da migração pelo ensaio de *Wound healing* pode ser tanto qualitativa quanto quantitativa, nas duas situações depende da observação do preenchimento do espaço vazio pelas células da borda. No caso das células GRX e GRX^{EGFP-Cav} esse tipo de ensaio se mostrou pouco apropriado, já que desde o início do experimento os espaços de migração eram muito diferentes. Além disso, a coloração com faloidina-rodamina após 24 horas de migração confirmou o crescimento tridimensional das células GRX^{EGFP-Cav} nas bordas do “risco” reforçando a hipótese, já discutida, de que a superexpressão de Cav-1 provoca um aumento na afinidade célula-célula e diminui a afinidade pelo substrato. As células GRX^{EGFPpCineo} migraram menos que as GRX mas não apresentam o crescimento tridimensional das GRX^{EGFP-Cav}. Entendemos que um ensaio em um sistema bicameral (Câmara de Boyle) seria mais apropriado para comparar a capacidade de migração dessas linhagens.

Por último, a quantificação do colesterol livre presente no extrato lipídico foi maior nas GRX^{EGFP-Cav}. A Cav-1 é conhecida por participar tanto do transporte do colesterol para a membrana plasmática quanto das caveolas para compartimentos intracelulares (Fu, Hoang et al. 2004). Este resultado sugere que o aumento do conteúdo de colesterol

provocado pela Cav-1 é compatível com a maior quantidade de caveolas mostrado pela MET.

Alguns estudos relacionam os níveis de Cav-1 e a agressividade de células de câncer incluindo aumento de proliferação, crescimento independente de substrato, migração e invasão (Chanvorachote, Pongrakhananon et al. 2015). Células estreladas hepáticas ativadas apresentam altas taxas de proliferação e adquirem capacidade migrar para as regiões do dano hepático, iniciando o processo de cicatrização. Neste estudo mostramos que a superexpressão de Cav-1 na linhagem GRX estimulou a expressão de α SMA, possivelmente induzindo essas células para um fenótipo de miofibroblasto ativado, mais proliferativo, com alterações no citoesqueleto que sugerem aumento da capacidade de migração. O aumento da produção de Col-I é outro indicativo desse fenótipo ativado já que pode ser relacionado diretamente com o papel das HSC na remodelação tecidual.

6. Conclusões:

Em nosso laboratório estabelecemos a linhagem permanente de células GRX que superexpressa a proteína Cav-1, chamada GRX^{EGFP-Cav}. A caracterização funcional e morfológica destas células foi tema deste trabalho e mostramos que a superexpressão de Cav-1, aumentou a proliferação, alterou a morfologia, a estrutura do citoesqueleto, a capacidade de migração e de endocitose da GRX. Os experimentos de migração celular pelo ensaio do “*Wound healing*” (risco na camada celular) sugerem um aumento na capacidade de crescimento independente de substrato nas GRX^{EGFP-Cav}, característica encontrada em células transformadas.

- 1) Através da transfecção do plasmídeo pCineoEGFP nas células GRX, asseguramos que os resultados obtidos nas técnicas abordadas neste trabalho foram devido a superexpressão da Cav-1 e não a inserção do plasmídeo.
- 2) Através de citometria de fluxo vimos que a linhagem que superexpressa a Cav-1 apresenta maior taxa de proliferação, maior complexidade citoplasmática, maior tamanho celular e maior emissão de fluorescência do canal FL1 quando comparadas com as outras linhagens.
- 3) Pela técnica de Sulforrodamina B vimos que a linhagem GRX^{EGFP-Cav} apresentou maior biomassa que a linhagem GRX.
- 4) Pelo ensaio de Adesão vimos que a linhagem GRX^{EGFP-Cav} apresentou maior adesão quando comparada com as outras linhagens. No entanto após duas horas de cultivo celular ainda apresentava morfologia mais esférica e com menos prolongamentos citoplasmáticos.
- 5) O ensaio de migração mostrou que as linhagens se comportaram de maneira diferente. Enquanto que a linhagem GRX^{EGFP-Cav} abria um espaço maior que as demais, a GRX fechava o espaço feito pela ponteira de micropipeta antes das outras linhagens. A GRX^{EGFP-Cav} apresentou uma afinidade célula-célula maior do que afinidade célula-substrato comparadas com as outras linhagens.
- 6) A expressão das proteínas Cav-1, α -SMA e Col-I medidas pela intensidade da fluorescência foi maior na linhagem GRX^{EGFP-Cav}, sugerindo que esta célula está em um fenótipo mais ativado de HSC.

- 7) A marcação do citoesqueleto de actina com faloidina mostrou que a linhagem que superexpressa a Cav-1 apresentava maior fragmentação das fibras de actina comparadas com as outras duas linhagens.
- 8) No tempo de 8 horas houve um aumento significativo da endocitose pela linhagem que superexpressa a Cav-1 em relação ao controle GRX, mostrando que a endocitose da linhagem que superexpressa a Cav-1 foi acelerada, no entanto após 16 horas as duas linhagens apresentaram o mesmo nível de captação de microesferas fluorescentes.
- 9) A quantificação do colesterol livre mostrou que a linhagem que superexpressa a Cav-1 apresentou uma maior quantidade. Este resultado está em concordância com maior conteúdo de Cav-1 e com as imagens de MET, onde visualizamos maior número de caveolas.

7. Perspectivas

Tendo como base os resultados obtidos até agora no trabalho de caracterização da linhagem $GRX^{EGFP-Cav}$, pretendemos determinar como a superexpressão e o silenciamento de Cav-1 interferem no estado de ativação, na síntese e localização do colesterol, na função mitocondrial e na estrutura do citoesqueleto das HSC. Ou seja:

- 1) Estabelecer uma linhagem estável $GRX^{-/-Cav1}$ por silenciamento gênico;
- 2) Avaliar a influência da superexpressão e do silenciamento de Cav-1 sobre o estado de ativação das células GRX;
- 3) Avaliar a influência do silenciamento da expressão de Cav-1 sobre a morfologia e citoesqueleto de actina.
- 4) Avaliar a influência do silenciamento e superexpressão da Cav-1 sobre os microtúbulos e filamentos intermediários.
- 5) Avaliar a influência do silenciamento e da superexpressão de Cav-1 sobre a síntese e efluxo do colesterol;
- 6) Avaliar a influência do silenciamento e da superexpressão de Cav-1 sobre a função mitocondrial;
- 7) Analisar a localização celular da proteína Cav-1 através de MET pela técnica de imunomarcação com ouro coloidal.

8. Referências Bibliográficas

- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." J Clin Invest **115**(2): 209-218.
- Bi, J. and S. Ge (2014). "Potential roles of BMP9 in liver fibrosis." Int J Mol Sci **15**(11): 20656-20667.
- Borojevic, R., R. M. Guaragna, et al. (1990). "In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX." In Vitro Cell Dev Biol **26**(4): 361-368.
- Borojevic, R., A. N. Monteiro, et al. (1985). "Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers." In Vitro Cell Dev Biol **21**(7): 382-390.
- Chanvorachote, P., V. Pongrakhananon, et al. (2015). "Caveolin-1 regulates metastatic behaviors of anoikis resistant lung cancer cells." Mol Cell Biochem **399**(1-2): 291-302.
- da Silva, F. M., E. L. Guimaraes, et al. (2003). "Hepatic stellate cell activation in vitro: cell cycle arrest at G2/M and modification of cell motility." J Cell Biochem **90**(2): 387-396.
- Elsharkawy, A. M., F. Oakley, et al. (2005). "The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis." Apoptosis **10**(5): 927-939.
- Fridolfsson, H. N., D. M. Roth, et al. (2014). "Regulation of intracellular signaling and function by caveolin." FASEB J.
- Friedman, S. L. (2000). "Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury." J Biol Chem **275**(4): 2247-2250.
- Fu, Y., A. Hoang, et al. (2004). "Expression of caveolin-1 enhances cholesterol efflux in hepatic cells." J Biol Chem **279**(14): 14140-14146.
- 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.
- Guaragna, R. M., L. Trugo, et al. (1991). "Neutral lipid synthesis and accumulation during in vitro induction of the lipocyte phenotype in hepatic connective tissue cells." Biochim Biophys Acta **1085**(1): 29-34.
- Guimaraes, E. L., M. F. Franceschi, et al. (2006). "Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line." Liver Int **26**(4): 477-485.
- Gupta, R., C. Toufaily, et al. (2014). "Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer." Biochimie **107PB**: 188-202.
- Guyton, A. C. and J. E. Hall (2006). Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro.
- Gvaramia, D., M. E. Blaauboer, et al. (2013). "Role of caveolin-1 in fibrotic diseases." Matrix Biol.
- Hansen, M. B., S. E. Nielsen, et al. (1989). "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill." J Immunol Methods **119**(2): 203-210.
- Head, B. P., H. H. Patel, et al. (2014). "Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling." Biochim Biophys Acta **1838**(2): 532-545.
- Hulkower, K. I. and R. L. Herber (2011). "Cell Migration and Invasion Assays as Tools for Drug Discovery." Pharmaceutics **3**(1): 107-124.

- Ilha, M. (2012). Estudo da expressão da Caveolina-1 em células estreladas hepáticas (GRX). Departamento Bioquímica. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul: 29.
- Iredale, J. P., A. Thompson, et al. (2013). "Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation." Biochim Biophys Acta **1832**(7): 876-883.
- Jasmin, J.-F., P. G. Frank, et al. (2012). Lipid rafts, Caveolae and GPI-linked Proteins. Caveolins and Caveolae roles in signaling and disease mechanisms. S. Science. USA.
- Junqueira, L. C. and J. Carneiro (2008). Histologia Básica. Rio de Janeiro: 323-335
- Kiss, A. L. (2012). Caveolae and regulation of endocytosis. Caveolin and Caveolae Roles in Signaling and Disease Mechanisms. S. Science. USA.
- Kovtun, O., V. A. Tillu, et al. (2014). "Structural insights into the organization of the cavin membrane coat complex." Dev Cell **31**(4): 405-419.
- Lee, J., M. Twomey, et al. (2013). "Caveolae-Mediated Endocytosis of Conjugated Polymer Nanoparticles." Macromolecular Bioscience **13**(7): 913-920.
- Lieberman, M. and A. D. Marks (2013). Basic Medical Biochemistry- A clinical approach: 880-881
- Margis, R., M. Pinheiro-Margis, et al. (1992). "Effects of retinol on proliferation, cell adherence and extracellular matrix synthesis in a liver myofibroblast or lipocyte cell line (GRX)." Int J Exp Pathol **73**(2): 125-135.
- Meira Martins, L., M. Vieira, et al. (2014). "The Interplay Between Apoptosis, Mitophagy and Mitochondrial Biogenesis Induced by Resveratrol Can Determine Activated Hepatic Stellate Cells Death or Survival." Cell Biochemistry and Biophysics: 1-16.
- Mermelstein, C. S., F. C. Guma, et al. (2001). "Induction of the lipocyte phenotype in murine hepatic stellate cells: reorganisation of the actin cytoskeleton." Cell Tissue Res **306**(1): 75-83.
- Nassoy, P. and C. Lamaze (2012). "Stressing caveolae new role in cell mechanics." Trends Cell Biol **22**(7): 381-389.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2007). Lehninger Princípios de Bioquímica. São Paulo, Sarvier: 446-449, 912.
- Parton, R. G. and M. A. del Pozo (2013). "Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(2): 98-112.
- Patel, H. H. and P. A. Insel (2009). "Lipid rafts and caveolae and their role in compartmentation of redox signaling." Antioxid Redox Signal **11**(6): 1357-1372.
- Peterson, G. L. (1979). "Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall." Anal Biochem **100**(2): 201-220.
- Robenek, H., I. Buers, et al. (2009). "GFP-tagged proteins visualized by freeze-fracture immuno-electron microscopy: a new tool in cellular and molecular medicine." J Cell Mol Med **13**(7): 1381-1390.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell **68**(4): 673-682.
- Skehan, P., R. Storeng, et al. (1990). "New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening." J Natl Cancer Inst **82**(13): 1107-1112.
- Sonnino, S. and A. Prinetti (2009). "Sphingolipids and membrane environments for caveolin." FEBS Lett **583**(4): 597-606.
- Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." J Pathol **214**(2): 199-210.

- Yokomori, H., M. Oda, et al. (2002). "Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis." Liver **22**(2): 150-158.
- Zou, H., E. Stoppani, et al. (2011). "Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases." Mech Ageing Dev **132**(11-12): 533-542.