

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA**

**A CAVEOLINA-1 COMO REGULADORA
FISIOLÓGICA NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS
ESTRELADAS HEPÁTICAS**

Um novo modelo *in vitro* de doenças hepáticas

MARIANA ILHA

PORTO ALEGRE, 2019

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA**

**A CAVEOLINA-1 COMO REGULADORA
FISIOLÓGICA NA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS
ESTRELADAS HEPÁTICAS**

Um novo modelo *in vitro* de doenças hepáticas

MARIANA ILHA

Orientadora: Dra. Fátima T. C. R. Guma

Coorientadora: Dra. Vera Maria Treis Trindade

**Tese a ser apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, como requisito parcial
à obtenção do grau de Doutor em
Bioquímica.**

PORTO ALEGRE, 2019

*Não sei em nenhum momento da história da humanidade em que a ignorância foi
melhor do que o conhecimento.*

Neil DeGrasse Tyson

*Um sonho só é possível quando temos a liberdade para voar e sentir o que faz o
coração vibrar.*

Mariana Ilha

Cada um de nós é, sob perspectiva cósmica, precioso.

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Para a finalização desta importante etapa na minha vida não poderia deixar de fazer alguns agradecimentos especiais:

Aos queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado,

Aos queridos amigos do esporte que tanto amo, o voleibol, time de voleibol da UFRGS, time do União, Beach da Alegria na praça da Encol, CT Elias Machado Beach Vôlei, técnicos, fisioterapeutas, preparadores físicos, sem o esporte e sem vocês com certeza teria sido muito mais difícil.

Aos queridos colegas do laboratório 21, Ketlen, Patrícia, Vinícius, Lucas, Cleverson, Carine, Nicolly, Luiz Pedro, Débora, Babi, Arieli, Silvia, Moema, que fizeram parte da minha rotina diária por 10 anos de laboratório 21 nesta universidade. Agradeço a amizade, as trocas de experiências, o chimarrão, o café, os experimentos, as instalações de Softwares, dividindo a vida e os suplícios. Em especial ao Leo Anderson Meira Martins pela amizade de todos estes anos, pelas correções do inglês, preparação de experimentos, por me apoiar nas minhas ideias. Também em especial à Francieli Rohden, pela amizade de longa data, carinho, apoio e pela preparação das amostras para as microscopias eletrônicas.

Aos queridos colegas colaboradores, Marcos Paulo Thomé, Fernanda Petry e Camila Kehl Dias que ajudaram na realização de experimentos para esta tese.

Aos professores da minha vida escolar e acadêmica, carrego comigo um pouquinho dos seus ensinamentos e aprendizados que nunca serão esquecidos.

Aos professores colaboradores Guido Lenz, Fábio Klamt, Florência Barbé-Tuana, Vera Maria Treis Trindade que ajudaram e muito incentivaram as realizações das técnicas, dos artigos e desta tese.

À minha querida orientadora Fátima Guma pelo total apoio para esta pesquisa, me acolhendo por 10 anos neste laboratório e principalmente me dando total liberdade para decidir, pensar por mim e questionar.

Ao meu namorado, Thiago Machado, pelo carinho, apoio e amor.

À toda a minha querida FAMILHA e à Tribo Mão na Mala, por todo amor e carinho.

Aos meus queridos irmãos Gustavo e Felipe que me apoiam e sempre me incentivaram.

Aos meus queridos avós Henrique e Walmy pela maneira leve de ver a vida, pelo carinho, amor ao esporte, velejadas e o incentivo ao voleibol.

À minha querida avó Lourdes, minha segunda mãe, que me apoia e sempre me apoiou para o ramo da pesquisa, por sua incontável bondade e ensinamentos de vida. Ao meu querido falecido avô Arno por todos os questionamentos, pensamentos críticos e ensinamentos. Os dois são e sempre serão uma referência na minha vida.

Aos meus queridos pais Nelson e Adriane pelo amor incondicional, carinho e total apoio na realização dos meus sonhos. Vocês são um exemplo de amor, união, ética e sensibilidade. Todos os dias agradeço muito por ser filha de vocês, não poderia ter melhor família! Amo muito vocês.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	2
LISTA DE ABREVIACÕES	3
LISTA DE FIGURAS	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
1.2 <i>A Membrana Plasmática, Domínios de Membrana e suas Balsas lipídicas</i>	9
1.3 <i>Um Subdomínio de Membrana Plasmática: Caveolas</i>	10
1.4 <i>A Família das Caveolinas</i>	12
1.5 <i>O Fígado e suas Células Residentes</i>	15
1.6 <i>As Doenças Crônicas do Fígado e a Ativação das HSCs</i>	17
1.7 <i>Os Mecanismos de Ativação das HSCs</i>	20
1.8 <i>A linhagem GRX como um Modelo Murino de HSC Ativada</i>	23
1.9 <i>As Doenças Crônicas do Fígado e uma proteína de Ativação: Caveolina-1</i>	23
2. OBJETIVOS.....	26
3. CAPÍTULO I	29
4. CAPÍTULO II	45
5. CAPÍTULO III	56
6. DISCUSSÃO.....	80
7. CONCLUSÕES.....	88
8. PERPSPECTIVAS.....	90
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

APRESENTAÇÕES

Esta tese está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: *Introdução, Objetivos, Capítulos (I, II, III), Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas*.

A seção *Introdução* se apresentam os embasamentos teóricos que levou a formulação das propostas da Tese, as quais estão descritas na seção *Objetivos*.

A seção *Capítulos* contém o artigo científico publicado, resultados e um artigo em fase de preparação. Esta seção também apresenta os materiais e métodos e as referências bibliográficas específicas de cada artigo e está dividida em *Capítulos I, II e III*.

A seção *Discussão* contém uma interpretação geral dos resultados obtidos nos diferentes artigos científicos e dos resultados preliminares. A seção *Conclusões* aborda as conclusões gerais obtidas na Tese. A seção *Perspectivas* aborda as possibilidades de desenvolvimento de projetos a partir dos resultados obtidos, dando continuidade a essa linha de pesquisa.

A seção *Referências Bibliográficas* lista as referências citadas na *Introdução* e *Discussão* da Tese.

LISTA DE ABREVIACOES

Cavs- Caveolinas

Cav-1- Caveolina-1

Cav-2- Caveolina-2

Cav-3- Caveolina-3

CCL- Quimiocinas com grupamento CC

CCR- Receptores com grupamento de quimiocinas CC

Col-I- Colágeno do tipo I

CSD- *Caveolin scaffold domain*

CTGF- *Connective tissue growth factor*

CXCR- Receptores com grupamento de quimiocinas CXC

DRP1- *Dynamin- related protein 1*

EGF- Fator de crescimento epidermal

EGFP- *Enhanced green fluorescent protein*

EGFR- Receptor de fatores de crescimento epidermais

eNOS- óxido nítrico sintase endotelial

ERK- *Extracellular signal-regulated kinase*

ER- *Endoplasmic reticulum*

GFAP- *Glial fibrillary acidic protein*

GFP- *Green fluorescent protein*

GPCRs- Receptores acoplados a proteína G

GPI- Glicosilfosfatidilinositol

GRX- Linhagem representativa da célula estrelada hepática

GRX^{EGFP-Cav1}- Linhagem GRX que superexpressa a Caveolina-1 e EGFP

GRX^{EGFPpCineo}- Linhagem GRX controle da superexpressão com expressão de EGFP

GRX^{GFPNT}- Linhagem GRX *Non target* com expressão de GFP, controle para o silenciamento

GRX^{GFPshCav1}- Linhagem GRX silenciada para a Cav-1 com expressão de GFP

HSCs- *Hepatic stellate cells*

IMM- *Inner mitochondrial membrane*

LPS- Lipopolissacarídeo

LSECs- *Liver sinusoidal endothelial cells*

MAM- Membrana associada a mitocôndria
MEC- Matriz extracelular
MET- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV- Microscopia eletrônica de varredura
MMP- Metaloproteinases
MNF1- *Mitofusin 1*
NAFLD- *Non-alcoholic fatty liver disease*
NASH- *Non-alcoholic steatohepatitis*
NOS- Óxido nítrico sintase
NOX- NADPH oxidase
nRTK- *Non-receptor tyrosine kinases*
OMM- *Outer mitochondrial membrane*
OPA1- *Optic atrophic protein 1*
PCK- Proteína cinase K
PDGF- Fator de crescimento de plaquetas
PKA- Proteína cinase A
RE- Retículo endoplasmático
RHOA- Gene homólogo da família Ras, membro A
RnR₂- *RNA ribosomal 2*
ROS- Espécies reativas de oxigênio
SRB- Sulforrodamina B
TGF-β1- Fator de crescimento tumoral beta
TIMP- *Tissue inhibitor of MMPs*
TLR4- *Toll like receptor 4*
TNF- *Tumour necrosis fator*
αSMA- Alfa actina de músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia eletrônica de transmissão de célula estrelada hepática	11
Figura 2 - Os domínios de membrana plasmática.....	12
Figura 3 - A família das caveolinas.....	13
Figura 4 - A Cav-1 localiza-se em diferentes compartimentos celulares	15
Figura 5 - Esquema de doenças do fígado e a ativação da HSC	18
Figura 6 - A cascata de sinalização pós dano hepático.....	20
Figura 7 - Mecanismos de ativação da HSC.....	21
Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrando a afinidade célula-célula das culturas celulares	48
Figura 9 - A superexpressão de Cav-1 aumentou afinidade célula-célula, induziu a formação de maiores esferoides e inibiu a migração.....	50
Figura 10 - Morfologia externa e interna da cultura dos esferoides	51
Figura 11- A localização de Cav-1 no núcleo celular	53
Figura 12 - A localização de GFAP no citoplasma celular	55

RESUMO

As caveolas e os *rafts* lipídicos são importantes plataformas de sinalizações, nas quais aglomerados de proteínas e alguns lipídios fazem o correto posicionamento para intensificar a qualidade da amplificação da sinalização. A caveolina-1 (Cav-1) é uma proteína estrutural, presente em todas as organelas e tipos celulares, conhecida por fazer ligações com outras proteínas, sendo importante na homeostase do colesterol, endocitose, migração, respiração celular, transcitose, autofagia, ativação e adesão celular. O aumento da expressão de Cav-1 em fígados cirróticos e doenças hepáticas crônicas mostra a importância do controle da homeostase desta proteína. A célula estrelada hepática (HSC) é a principal responsável por produzir proteínas de cicatrização ou matriz extracelular fibrótica (MEC) em lesões hepáticas, expressando marcadores clássicos de ativação, tais como: alfa actina de musculo liso (α SMA), colágeno do tipo I (Col-I) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Neste estudo, desenvolvemos duas linhagens permanentes derivadas das células GRX, um conhecido modelo murino de HSC, uma que superexpressa a proteína Cav-1, denominada GRX^{EGFP-Cav1} e outra silenciada para Cav-1, a GRX^{GFPshCav1}. Primeiro, mostramos que a superexpressão de Cav-1 foi suficiente para ativar as células GRX^{EGFP-Cav1} e com isso propomos que a Cav-1 possa ser um potencial marcador molecular para ativação das HSCs. A seguir, mostramos que a superexpressão de Cav-1 favoreceu a formação de culturas de esferoides 3D, ativando rotas de apoptose e necrose celular, diminuindo a migração celular a partir do esferoide. Por fim, mostramos que tanto a superexpressão quanto o silenciamento de Cav-1 foi capaz de aumentar parâmetros de respiração celular ligada ao ATP, mudar morfologia das redes mitocondriais e das mitocôndrias e modular as interações entre membrana mitocondrial (MAM) e retículo endoplasmático (RE). Em suma, nesta tese, mostramos o envolvimento da Cav-1 na fisiologia da ativação das HSC. Por fim, os resultados obtidos, nos permitem propor que desenvolvemos e caracterizamos um novo modelo *in vitro* de HSC ativadas para os estudos de doenças hepáticas.

ABSTRACT

Caveolas and lipid rafts are important signaling platforms, in which protein clusters and some lipids are correctly positioned to enhance the quality of signaling amplification. Caveolin-1 (Cav-1) is a structural protein, present in all organelles and cell types, known to make connections with other proteins and is important in cholesterol homeostasis, endocytosis, migration, cellular respiration, transcytosis, autophagy, activation, and cell adhesion. Increased Cav-1 expression in cirrhotic livers and chronic liver diseases shows the importance of controlling this protein's homeostasis. The hepatic stellate cell (HSC) is primarily responsible for producing fibrotic extracellular matrix (ECM) in liver damage, expressing classic activation markers such as smooth muscle alpha actin (α SMA), type I collagen (Col-I) and acid fibrillar glial protein (GFAP). In this study, we developed two permanent GRX cell-derived strains, a known murine model of HSC, one is exogenous expressing of Cav-1 called GRX^{EGFP-Cav1} and another knockdown for Cav-1, GRX^{GFPshCav1}. First, we showed that exogenous expression of Cav-1 was sufficient to activate GRX^{EGFP-Cav1} cells and therefore we propose that Cav-1 could be a potential molecular marker for HSC activation. Next, we show that exogenous expression of Cav-1 favored the formation of 3D spheroid cultures, activating apoptosis and cell necrosis routes, reducing cell migration from the spheroid. Finally, we showed that both exogenous expression of and knockdown of Cav-1 were able to increase ATP-linked cellular respiration parameters, change mitochondrial and mitochondrial network morphology, and modulate interactions between mitochondrial membrane (MAM) and endoplasmic reticulum (RE). In summary, in this thesis, we show the involvement of Cav-1 in the physiology of HSC activation. Finally, the results allow us to propose that we develop and characterize a new in vitro model of activated HSC for liver disease studies.

1. Introdução

1.1 A Membrana Plasmática, Domínios de Membrana e suas Balsas lipídicas

A membrana plasmática das células animais tem duas funções chaves: primeira, a separação do meio intracelular e extracelular via barreira de lipídios e proteínas. Segunda, o fornecimento de um domínio celular que pode perceber mudanças na face externa e iniciar eventos que alteram a fisiologia celular, como por exemplo, a transcitose, 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, sendo a sua estrutura composta por proteínas e lipídios, que controlam e são controlados por vários processos biológicos. Os lipídios de membrana são anfipáticos, seus motivos hidrofílicos interagem com o meio externo aquoso e sua porção hidrofóbica. As membranas plasmáticas dos eucariotos são compostas por glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esteróis, como o colesterol, variando em suas composições. Acredita-se que a introdução do colesterol nas membranas celulares apareceu mais tarde na evolução. A sua presença coincide com o aumento na concentração de oxigênio no meio ambiente que ocorreu aproximadamente 2,5 bilhões de anos atrás. Além disso, a presença de esfingolipídios e esteróis aumenta 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. Os pesquisadores Singer e Nicolson propuseram em 1953 o modelo de “mosaico fluido” para a membrana plasmática, o qual partilha randomicamente proteínas e lipídios de modo a alcançar a menor energia livre. Desde então, vários estudos têm demonstrando que esta partilha entre lipídios e proteínas não é homogênea e nem randômica, mas sim organizada em agrupamentos de proteínas estruturais, enzimas, receptores de sinalizações, transportadores e canais dentro de domínios lipídicos. Dessa maneira, alguns destes domínios lipídicos são ricos em colesterol e glicoesfingolipídios e são denominados de balsas lipídicas, “*rafts*” de membrana ou “*rafts*” lipídicos (Head, Patel et al. 2014). O colesterol e os glicoesfingolipídios podem interagir entre si e com outros lipídios e proteínas das camadas internas e externas da membrana plasmática para formar as balsas lipídicas (Jasmin, Frank et al. 2012). Em síntese, os “*rafts*” lipídicos são estruturas pequenas e altamente organizadas envolvidas na transdução de sinais, contendo

agrupamentos móveis de colesterol, caveolinas (Cavs) e glicosíngolipídios, especialmente, gangliosídios. Para promover suas funções de sinalização é necessária a formação de clusters de “*rafts*” de 100-200 nm. Estas estruturas são dinâmicas e móveis, dependentes dos componentes do citoesqueleto para intensificar os mecanismos de sinalização. Essa organização eficiente regula e posiciona corretamente as proteínas e receptores para a propagação do estímulo, fazendo assim a comunicação entre o meio extracelular e o meio intracelular (Head, Patel et al. 2014).

1.2 Um Subdomínio de Membrana Plasmática: Caveolas

Em 1953, nos anos iniciais da microscopia eletrônica, George Palade, ganhador do prêmio Nobel, 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). Todavia, os estudos para caracterizar as caveolas só iniciaram quatro décadas depois com a descoberta das caveolinas, que são importantes proteínas requeridas para a formação das caveolas (Rothberg, Heuser et al. 1992; Kovtun, Tillu et al. 2014). Em suma, as caveolas são classicamente descritas como pequenas invaginações da membrana plasmática de 60-80 nm com formato de Ω (ômega), ricas em caveolinas, glicosíngolipídios e colesterol (Nassoy and Lamaze, 2012). Além disso, elas podem existir como invaginações individuais, como “clusters” em forma de cachos de uva, chamadas de rosetas ou como estruturas longas tubulares derivadas da fusão de várias caveolas (Figura 1) (Zou, Stoppani et al. 2011). Do mesmo modo, elas são consideradas subdomínios especializados da membrana plasmática que participam na fisiologia celular através da regulação do tráfego vesicular e funções de sinalização (Gupta, Toufaily et al. 2014). Ademais, as caveolas são consideradas como um subconjunto dos “*rafts*” devido ao seu tamanho e conteúdo lipídico. 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). Além do mais, estas estruturas são ricas em várias moléculas sinalizadoras, incluindo alguns receptores de superfície, ligados a âncoras de lipídios. As caveolas ocorrem em diferentes quantidades 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 citoplasmática 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. Igualmente, 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). Portanto, as caveolas possuem muitas funções, entre elas: a homeostase do colesterol (Goetz, Lajoie et al. 2008), o transporte vesicular, a endocitose, a transcitose, a migração, a adesão celular, a entrada de patógenos (Sonnino and Prinetti, 2009), a polaridade, o controle do ciclo celular e da transformação celular. Além destas funções, as caveolas são mecanossensoras e mecanotransdutoras, formando um reservatório de membrana que ajuda a prevenir a lise celular, além de seu papel como plataforma de sinalizações e transdução de sinais (Figura 2) (Nassoy and Lamaze, 2012).

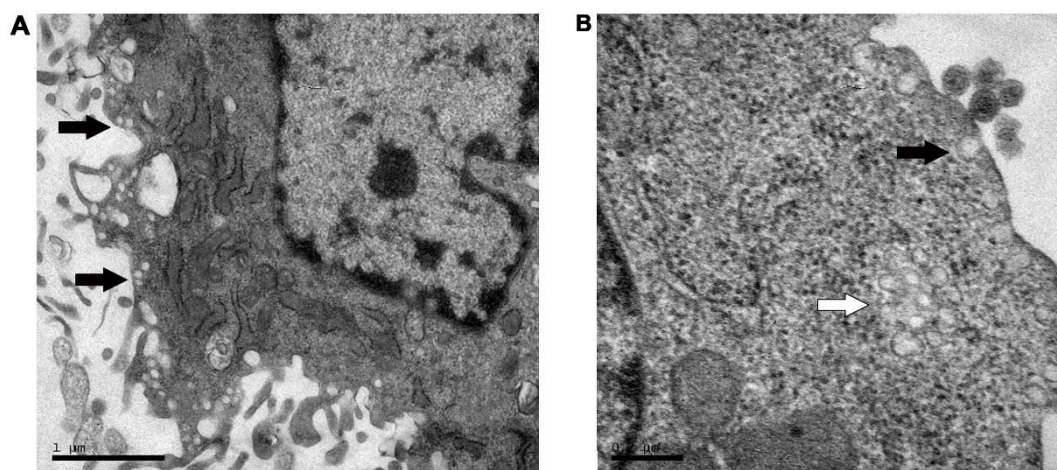


Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão de célula estrelada hepática, linhagem GRX^{EGFP-Cav1}. A) Setas em preto mostram caveolas nas membranas celulares. B) Na seta branca mostra um conjunto de caveolas, chamado de roseta. Magnificação de 1 e 0,2 μm.

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. Assim, estas organelas são diferentes entre si, sendo os caveossomos reguladores do “turnover” de receptores, conduzindo para os caminhos de sinalizações (Jasmin, Frank et al. 2012). Após isso, os componentes da caveola podem ser reciclados 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. Desta maneira, o ciclo da endocitose e a reciclagem das caveolas para os endossomos mantêm a densidade celular de caveolas (Parton and del Pozo 2013).

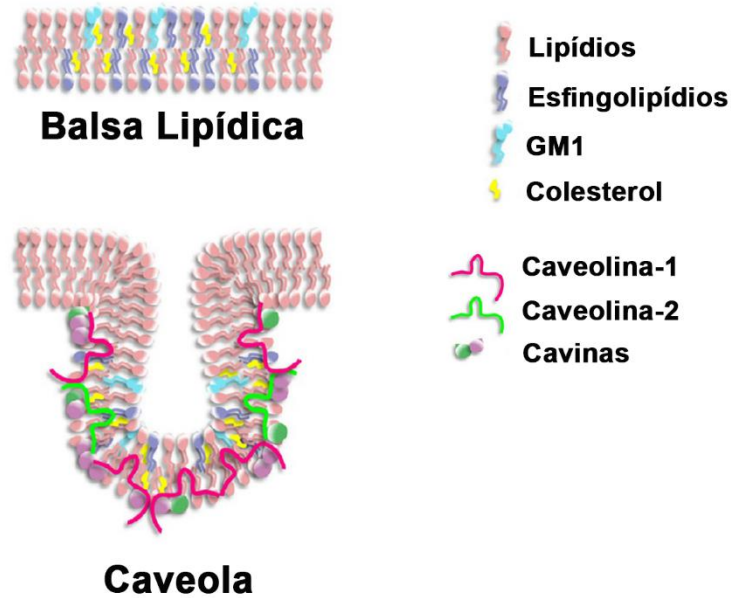


Figura 2: Os domínios de membrana plasmática. As balsas lipídicas ou *rafts* lipídicos são altamente dinâmicas e estruturas transientes enriquecidas com esfingolipídios (gangliosídeo 1, GM1) e colesterol. As caveolas são invaginações estruturáveis e estáveis compostas de caveolinas, cavinas, esfingolipídios e colesterol. Adaptado e traduzido de Fiala and Minguet, 2018

1.3 A Família das Caveolinas

O formato clássico de invaginação da caveola é dependente do conteúdo de colesterol na célula. Esta importante molécula influencia na fluidez, na permeabilidade, na curvatura, na formação de domínios laterais e outras características biofísicas das membranas plasmáticas (Martin, Kennedy et al. 2016). Além disso, alguns estudos mostram que a depleção do colesterol faz com que as Cavs sejam movidas para o RE e/ou para o complexo de Golgi, reduzindo assim o número de caveolas na superfície celular. Os níveis de colesterol na célula não são estáticos: em condições fisiológicas normais o colesterol se move 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 (Cav-1), mostrando que esta proteína modula a concentração de colesterol nas caveolas (Bosch et al 2011, Jasmin, Frank et al. 2012).

As caveolas contêm duas famílias de proteínas muito importantes para sua estrutura e função, a família das Cavs e das cavinas. As Cavs pertencem a uma família de proteínas estruturais de células de mamíferos que são essenciais para a formação das caveolas. A família das Cavs é composta por três proteínas, a caveolina-1 (Cav-1), a caveolina-2 (Cav-2) e a caveolina-3 (Cav-3). Monômeros das Cavs 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 Cavs. A principal proteína das caveolas é a Cav-1. Dessa forma, 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).

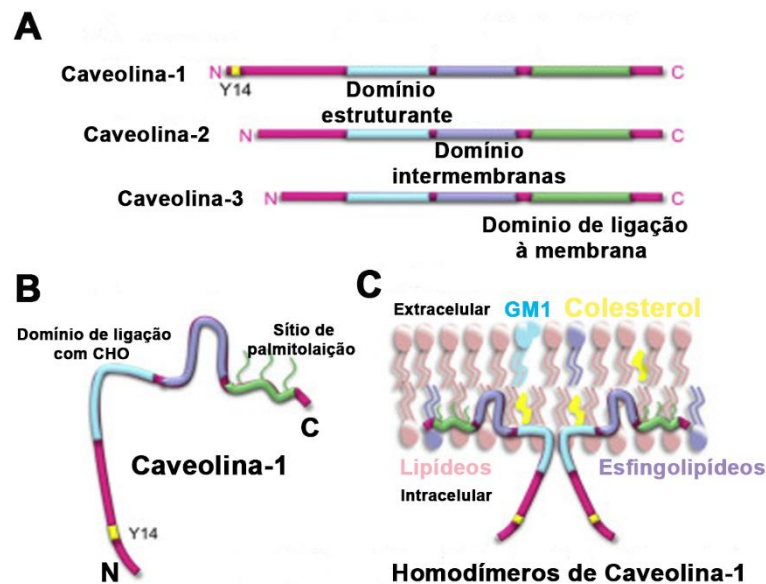


Figura 3: A família das caveolinas. A) Representação esquemática da estrutura proteica da família das caveolinas. B) A estrutura terciária da Caveolina-1 mostrando seus domínios funcionais. Partes N e C terminais voltadas para dentro do citoplasma, domínio de ligação com o colesterol, sítios de palmitoilação, sítio de ligação com outras proteínas e sítio de fosforilação na tirosina 14 (Y14). C) Topologia da Caveolina-1 na membrana plasmática mostrando a interação do homodímeros de Caveolina-1 e demais moléculas da membrana, tais como gangliosídeo (GM1) em azul, outros lipídios em rosa, colesterol em amarelo e esfingolipídios em lilás. Adaptado e traduzido de Fiala and Minguet, 2018.

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 (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, sendo a sua expressão essencial para a sua biogênese (Gupta, Toufaily et al. 2014). Além do mais, a Cav-1 tem 178 aminoácidos e pode ser fosforilada pela Src na tirosina 14 (Goetz, Lajoie et al. 2008). Inclusive, esta proteína tem formato de grampo de cabelo e tem as extremidades, N-terminal ou amino terminal e C-terminal ou carboxil terminal, orientadas para o citoplasma da célula. Estudos *in vivo* mostram que existem duas isoformas da Cav-1 chamadas de isoformas α e β , que derivam do mesmo gene, mas que contém sítios de iniciação diferentes. A Cav-1 α contém os resíduos de 1-178, enquanto a Cav-1 β tem os resíduos de 32-178 (Patel and Insel, 2009). Além disso, esta proteína é palmitoilada nos resíduos Cys133, Cys143 e Cys156, sendo que esta modificação não é necessária para a localização da proteína nas caveolas, porém 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, são essenciais, uma vez que é onde ocorre a interação com moléculas e proteínas de sinalização. Assim, 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. Diante disso, estas proteínas de sinalizações interagem com receptores acoplados a proteína G (GPCRs), canais iônicos, óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), receptor de fatores de crescimento epidermais (EGFR), família das Src cinases, adenil ciclases, cinases ativadas por mitógenos (MAPs) e a proteína cinase A (PKA) (Figura 3) (Fridolfsson, Roth et al. 2014).

Estudos recentes mostram que a Cav-1 pode desenvolver papéis independente das caveolas, na regulação de atividades celulares, incluindo no transporte de lipídios, expressão gênica e função mitocondrial. A Cav-1 também é encontrada nas membranas das organelas celulares tais como, vesículas endocíticas e exocíticas, retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi, mitocôndrias, núcleo, lisossomos, membranas associadas a mitocôndrias (MAM), peroxissomos e gotas lipídicas (Figura 4) (Fridolfsson, Roth et al. 2014). Sendo uma proteína integral de membrana, a Cav-1 é sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (RER) e transita 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 Caves são convertidas do complexo 8S para o complexo 70S no complexo de Golgi, sofrendo importantes mudanças conformacionais associando-se ao colesterol para membranas celulares. Além disso, as caveolas ligam-se ao citoesqueleto de actina através das proteínas RHOA e filamina A. Esta proteína é um fator chave na 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 os microtúbulos e os filamentos de actina (Parton and del Pozo 2013).

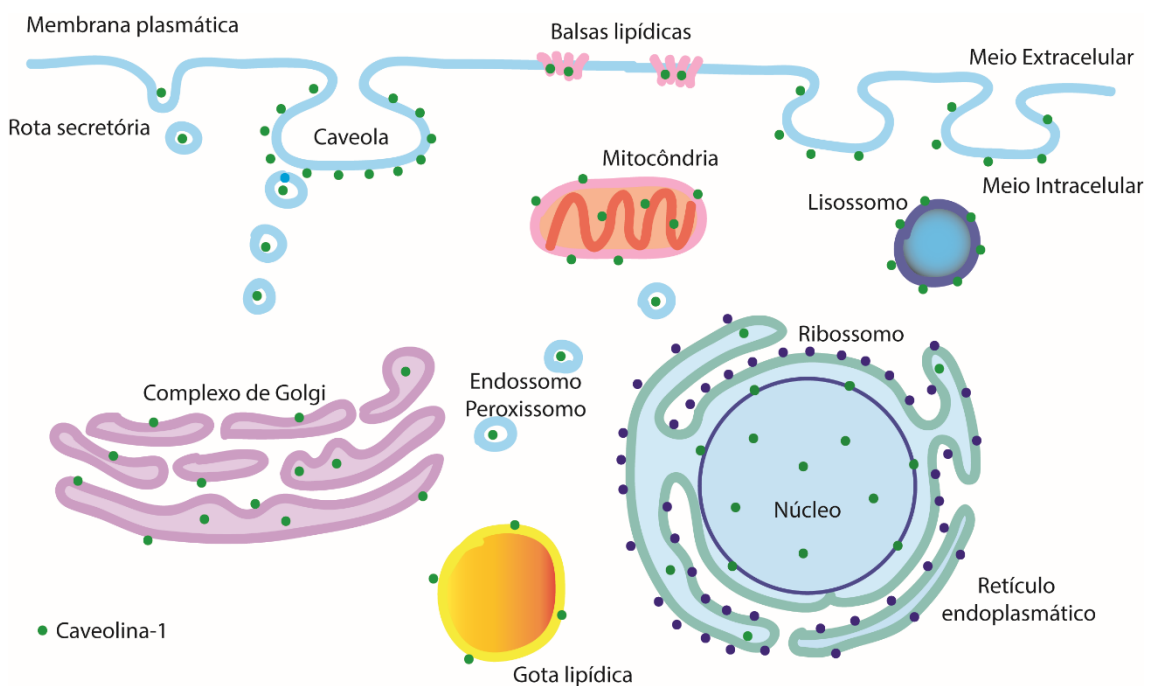


Figura 4: A Cav-1 é encontrada em diferentes compartimentos celulares. Desenho esquemático retratando a localização da Cav-1 (pontos em verde) nas várias organelas intracelulares para regular múltiplos processos celulares. Desenho realizado pela Autora.

1.4 O Fígado e suas Células Residentes

O fígado é o principal órgão metabólico do corpo humano, exibindo uma alta taxa de vascularização e um epitélio fenestrado, dando assim um acesso direto do sangue provindo das veias do corpo às células do tecido hepático (Heymann and Tacke 2016). Ele é um órgão central imunológico, pois mais do que qualquer outro órgão do corpo humano, tem uma admirável capacidade de se adaptar aos danos ocorridos através do reparo de tecido, ativando células do sistema imune, através dos antígenos e endotoxinas

circulantes providas da microbiota intestinal (Pellicoro, Ramachandran et al. 2014; Heymann and Tacke 2016). Além do mais, o fígado abastece todos os outros órgãos e tecidos com nutrientes oriundos da alimentação e digestão via corrente sanguínea (Nelson and Cox 2018). Sendo assim, ele é uma interface importante entre sistema digestório e o sanguíneo, participando do processamento e armazenamento dos nutrientes. Interessantemente, cerca de 80% do sangue que chega ao fígado atravessa a veia porta e somente os 20% restantes acabam indo para outras veias hepáticas, sendo então o primeiro órgão a ter contato com os nutrientes absorvidos do intestino, também produzindo proteínas plasmáticas como albumina e armazenando íons Fe e vitamina A (Guyton and Hall 2017; Junqueira and Carneiro 2017). O fígado está situado na cavidade abdominal abaixo do diafragma pesando cerca de 1,5 kg contribuindo com 2% do total do peso corporal humano. A cápsula de Glisson hepática é uma cápsula delgada de tecido conjuntivo, na qual a veia porta e a artéria hepática penetram no fígado e por onde saem os ductos hepáticos direito, esquerdo e linfático, formando-se uma rede de fibras reticulares, funcionando como sustentação para os hepatócitos. O componente estrutural básico é o lóbulo hepático, constituindo uma estrutura cilíndrica com apenas alguns milímetros de comprimento, contendo aproximadamente 50 a 100 mil lóbulos individuais (Junqueira and Carneiro 2017).

Os hepatócitos são as principais células do parênquima hepático e participam da homeostase da glicose, do metabolismo de ácidos graxos, do tráfico de colesterol, da síntese de ácidos biliares, metabolismo energético, de processos de detoxificação e da síntese proteica (Guyton and Hall 2017). Estas células expressam e enviam várias proteínas para a corrente sanguínea, que são importantes para a ativação do sistema imune inato e adquirido. Sendo assim, os hepatócitos captam sinais inflamatórios e patogênicos e respondem secretando proteínas do sistema imune inato para a corrente sanguínea, tais como opsoninas, fibrinogênio, proteína C reativa, transferrinas, hemopexinas, entre outras. Por consequência, este sistema de proteínas manteve-se durante os processos evolutivos e podem matar o patógeno ou recrutar o sistema imune para que haja uma limpeza eficiente do ambiente (Zhou, Xu et al. 2016). Os capilares chamados de sinusóides são vasos irregularmente dilatados compostos por uma camada de células endoteliais fenestradas que estão separadas dos hepatócitos com suas microvilosidades por uma lâmina basal descontínua. Além disso, no espaço chamado de espaço de Disse inserem-se as células de *Kupffer* (macrófagos residentes do tecido hepático) e as células

estreladas hepáticas (do inglês, *hepatic stellate cells* ou HSCs). 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 2017).

As HSCs são pericitos originalmente identificadas por von Kupffer em 1876, estando localizadas no espaço subendotelial de Disse, interpostas entre as células dos sinusóides hepáticos (do inglês, *liver sinusoidal endothelial cells*, LSECs) e os hepatócitos. Existem cerca de 5 a 20 HSCs 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 HSCs 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). Em vista disso, em fígados saudáveis as HSCs mantêm seu fenótipo quiescente, não proliferativo, representando cerca de 10% das células residentes do fígado e armazenam ésteres de retinol em gotas lipídicas citoplasmáticas (Tsuchida and Friedman 2017). Desta maneira, as HSCs também 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 2017). As HSCs também expressam marcadores clássicos neurais, como a proteína glial fibrilar ácida (do inglês, *glial fibrillary acidic protein*, GFAP), a sinaptofisina e a desmina. Mediante o exposto, estas células apresentam um fenótipo quiescente lipocítico com baixa taxa de proliferação e de produção de colágeno do tipo IV (Pellicoro, Ramachandran et al. 2014; Tsuchida and Friedman 2017).

1.5 As Doenças Crônicas do Fígado e a Ativação das HSCs

As doenças crônicas do fígado (DCF) estão entre as maiores causas de morte no mundo. São clinicamente devastadoras, porque nenhum outro órgão pode compensar a perda das múltiplas funções que o fígado naturalmente executa (Elsharkawy, Oakley et al. 2005). São elas: hepatites virais, doença hepática gordurosa não alcoólica (do inglês, *non-alcoholic fatty liver disease*, NAFLD) e esteato-hepatite não alcoólica (do inglês,

non-alcoholic steatohepatitis, NASH), que resultam em cirrose e câncer. Quando isso ocorre, a função do fígado fica prejudicada podendo levar à morte do paciente. Os sinais e sintomas de doenças hepáticas incluem: aumento na taxa de enzimas, icterícia, aumento do tempo de coagulação sanguínea, edema e encefalopatia hepática (Lieberman and Marks 2013). Preocupantemente, nos últimos 20 anos, as DCFs vêm aumentando excessivamente, com um índice de 844 milhões de pessoas afetadas (Fernandez-Rojo and Ramm 2016) e uma taxa de mortalidade anual de mais de 2 milhões (Marcellin and Kutala 2018), onde 1 milhão em decorrência de cirrose hepática, meio milhão devido ao abuso de álcool e o outro 1 milhão provindo de hepatites virais e câncer hepático (Asrani, Devarbhavi et al. 2019). O fígado é um órgão metabólico crucial para a manutenção e da homeostase das funções de tecidos e órgãos periféricos. Como consequência das DCFs, a desregulação da função hepática, contribui para a colestease e desordens metabólicas, incluindo: diabetes, síndrome metabólica e disfunção renal. Outras doenças que também podem ocorrer com a desregulação hepática são: obesidade relacionada com doenças hepáticas, bem como NASH e NAFLD que podem resultar no desenvolvimento de cirrose e em última instância câncer hepático (Figura 5)

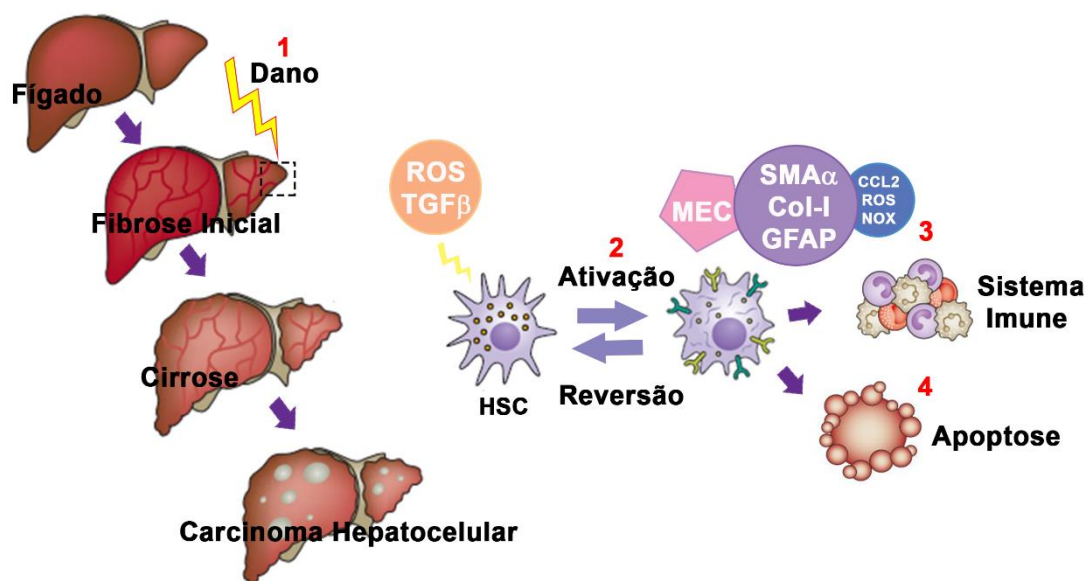


Figura 5: Esquema de doenças do fígado e a ativação da HSC. A história natural das doenças hepáticas. 1) A fibrose hepática é a resposta a cicatrização do fígado a várias causas de insultos hepáticos, tais como: infecção viral, esteto-hepatite alcoólica e não alcoólica (NASH) são as mais comuns. Os danos ao fígado causam uma resposta inflamatória, deposição de MEC, morte de células do parênquima e angiogênese, levando a uma fibrose progressiva. A matriz fibrótica se acumula lentamente, levando cerca de 30 anos até o estabelecimento da cirrose. Uma vez instalada a cirrose, a reversão se torna muito difícil, podendo se transformar em carcinoma hepatocelular. 2) A ativação da célula estrelada hepática (HSC). O dano hepático inicia-se com a transdiferenciação do fenotípica das HSCs quiescentes em ativadas através do estímulo de

ROS e TGF β . 3) As HSCs começam a proliferar, produzir MEC e marcadores de ativação clássicos, como: α SMA, Col-I, GFAP e citocinas pró-inflamatórias para atrair macrófagos e conter a lesão. 4) Quando o insulto cessa, as HSCs miofibroblastóides podem regredir para o fenótipo quiescente ou entrar em apoptose para diminuir a população de células ativadas. Modificado e Traduzido de Pellicoro, Ramachandran et al 2014 e Tsuchida and Friedman 2017.

A fibrose hepática é um processo dinâmico caracterizado pela liberação e o acúmulo líquido de matriz extracelular (MEC), e/ou cicatriz, resultado do dano crônico ao fígado (Friedman 2003). Embora a fibrose possa ser revertida após cessar a causa da lesão, o dano crônico deixado sem controle pode levar a cirrose, no qual é caracterizada pela distorção da arquitetura hepática associada com fluxo sanguíneo anormal e hipertensão portal (Friedman 2000). A maioria dos malefícios que ocorrem no fígado são nas células do epitélio hepático (hepatócitos e os colangiócitos), levando ao extravasamento de mediadores inflamatórios e a iniciação da cascata de coagulação anti-fibrinolítica. Os leucócitos são recrutados para o local, fagocitando as células mortas ou em apoptose e amplificando a resposta inflamatória gerando citocinas pró-inflamatórias tais como: fator de necrose tumoral (do inglês, *tumour necrosis factor*, TNF), interleucina 6 (IL-6), interleucina 1 β (IL-1 β), recrutando assim as células T. Os mediadores pró-inflamatórios que são produzidos pela lesão celular e pelos estímulos de células imunes, incluindo, fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, *platelet-derived growth factor*, PDGF), fator de crescimento do tecido conectivo (do inglês, *connective tissue growth factor*, CTGF), fator de crescimento transformador β (do inglês, *transforming growth factor- β* , TGF- β) e IL-13, ativam células precursoras mesenquimais em tecidos e induzem sua transdiferenciação para miofibroblastos. A fagocitose de hepatócitos ou linfócitos apoptóticos pelas HSCs também iniciam diretamente ações fibrogênicas. O TGF- β é a mais importante citocina pró-fibrogênica e que também estimula a síntese de α actina de músculo liso (do inglês, *α -smooth muscle actin*, α SMA) e colágeno do tipo I (do inglês, *type I collagen*, Col-I) pelas HSC ativadas. O PDGF induz a proliferação de miofibroblastos através da ativação das cinases dependentes de sinais extracelulares (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*, ERK), de sinalização independente da ERK e por mudanças do pH intracelular. Outra característica importante é a permeabilização do epitélio intestinal, aumentando, assim a quantidade de bactérias e a presença de lipopolisacarídeos (LPS) na circulação, contribuindo para a ativação das HSCs e dos macrófagos residentes do tecido hepático (células de *Kupffer*) através da sinalização do receptor Toll 4 (do inglês, *toll-like receptor 4*, TLR4) (Figura 6). O acúmulo de miofibroblastos pró-fibrogênicos é a principal característica da fibrose tecidual. Estas

células são as principais reguladoras da resposta fibrogênica, como resultado da aquisição de propriedades proliferativas, migratórias, contráteis, imunomodulatórias, fagocíticas e de produção da cicatriz fibrótica. Conseqüentemente, os miofibroblastos, e no caso do fígado as HSCs, têm sido um dos maiores alvos da pesquisa básica e dos estudos sobre terapias anti-fibróticas nos últimos anos (Pellicoro, Ramachandran et al. 2014).

Os avanços metodológicos têm mostrado novos *insights* para a origem, a regulação e a variação da população dos miofibroblastos no fígado (Pellicoro, Ramachandran et al. 2014). Além disso, as HSCs tornando-se ativadas, quando ocorrem danos hepáticos, transdiferenciam-se de células que armazenam gotas de vitamina A para miofibroblastos, que são mais proliferativas, contráteis, inflamatórias, quimiotácteis, aumentam a produção de MEC, tornando assim o tecido hepático mais rígido, com aumento da pressão nas veias e artérias hepáticas, resultando em diminuição na irrigação sanguínea (Tsuchida and Friedman 2017). Os processos de regeneração do fígado são benéficos e envolvem a troca e substituição das células danificadas por células saudáveis. No entanto, quando há lesões crônicas, esta regeneração se torna patogênica, ocorrendo um desequilíbrio na produção de matriz extracelular e a transformação e substituição do tecido sadio pela cicatriz fibrosa. Os eventos crônicos e extensivos podem resultar em cirrose, falência do órgão e na morte do paciente (Wynn 2008).

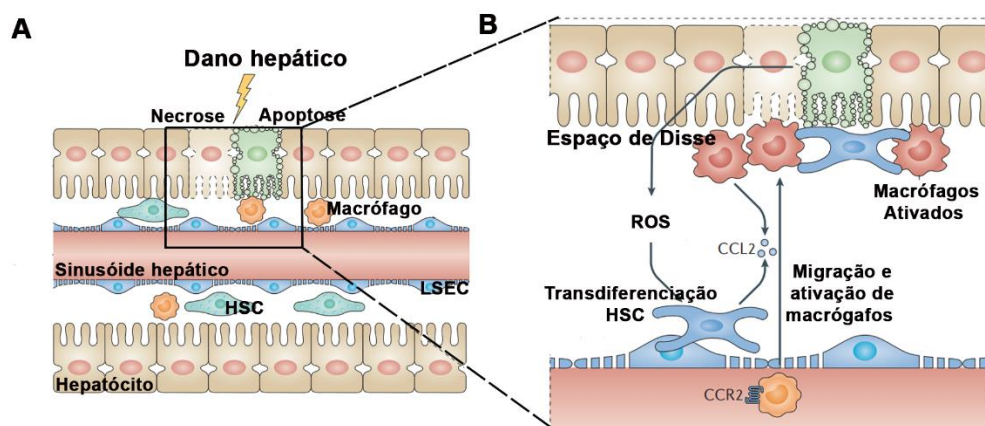


Figura 6: Cascata de sinalização pós dano hepático. A) Dano hepático causa necrose e/ou apoptose do tecido parenquimal. B) O extravasamento de conteúdo celular e espécies reativas de oxigênio (ROS) ativam as HSCs e ativam e atraem os macrófagos através do eixo de quimiocinas CCL2 e do receptor CCR2. (HSC) *hepatic stellate cells*, (LSEC) *liver sinusoidal endothelial cells*. Adaptado e traduzido de Pellicoro, Ramachandran et al. 2014.

1.6 Os Mecanismos de Ativação das HSCs

As HSCs têm um perfil de transcrição característico e expressam uma variedade enorme de genes e proteínas que as distinguem das outras células residentes do fígado. Estas células seguem dois processos muito importantes de ativação, a iniciação e a perpetuação. A iniciação se refere aos eventos precoces, que tornam as células responsivas a muitos sinais extracelulares, tais como, rápida indução de receptores de fatores de crescimento, desenvolvimento de fenótipo contráctil e fibrogênico. A perpetuação é caracterizada por eventos que amplificam o fenótipo ativado. As HSCs que já foram estimuladas pelos eventos de iniciação podem responder a várias citocinas e fatores de crescimento locais, predominantemente provindos de macrófagos, resultando na formação da cicatrização fibrótica. Assim, dependendo do estímulo e do dano que o fígado recebe, o período de perpetuação da ativação das HSCs pode ser dividido em vários estágios de fenótipos iniciais fibrogênicos, até fenótipos inflamatórios senescentes tardios. Além do mais, os mecanismos de remoção das HSC incluem, regressão para o fenótipo inativo e quiescente e apoptose das células que sobram quando o dano é revertido. Alguns caminhos que regulam a ativação das HSC podem ser organizados em mecanismos centrais e mecanismos regulatórios. Os mecanismos centrais são definidos como aqueles que contribuem para a fibrose através dos tecidos e do contexto da doença, enquanto os mecanismos regulatórios ficam restritos aos tecidos. Quando se busca estratégias terapêuticas focando nos mecanismos centrais ou nos reguladores, poderão ser desenvolvidas mecanismos antifibróticos específicas para cada caso, conseguindo assim uma maior assertividade no tratamento das doenças hepáticas (Tsuchida and Friedman 2017).

Classicamente, alguns marcadores de ativação das HSCs são descritos como, a diminuição dos níveis intracelulares de gotas lipídicas, o aumento da expressão de α SMA, Col-I e Col-III, produção de outras proteínas de MEC, bem como as mudanças morfológicas. Em pacientes com hepatite crônica, a expressão de α SMA é um marcador muito utilizado da ativação das HSCs (Singh, Liu et al. 2016). A GFAP, uma proteína dos filamentos intermediários do tipo III (FI), comumente expressa em astrócitos no sistema nervoso central, também é expressa *in vivo* no fígado e especificamente nas HSCs (Tennakoon, Izawa et al. 2013; Tsuchida and Friedman 2017). Em fígados de ratos, já foi mostrado um aumento da expressão de GFAP em resposta a fibrose hepática crônica (Carotti, Morini et al. 2008). Estas células também fazem interações com proteínas da

MEC, tais como lamininas, colágenos, proteoglicanos, integrinas entre outras, regulando a adesão celular, diferenciação, proliferação e a migração. As integrinas são receptores transmembranas compostos pelas subunidades α e β . Elas podem controlar a liberação e ativação do TGF β , representando um potencial alvo de superfície para inibir sua ativação. A integrina β 1 também regula o fenótipo pró-fibrogênico das HSCs ativadas. Outros importantes mecanismos descritos para ativação das HSCs são: autofagia, estresse de retículo endoplasmático (RE), estresse oxidativo, metabolismo do retinol, estimulação do colesterol, adipocitocinas, metilação do DNA, entre outros (Figura 7). A autofagia fornece a energia requerida para iniciar e perpetuar o fenótipo ativado das HSCs, através da hidrólise de ésteres de retinol, liberando ácidos graxos livres que vão participar da β -oxidação mitocondrial, gerando ATP para manter o fenótipo ativado (Tsuchida and Friedman 2017; Schuppan, Ashfaq-Khan et al. 2018).

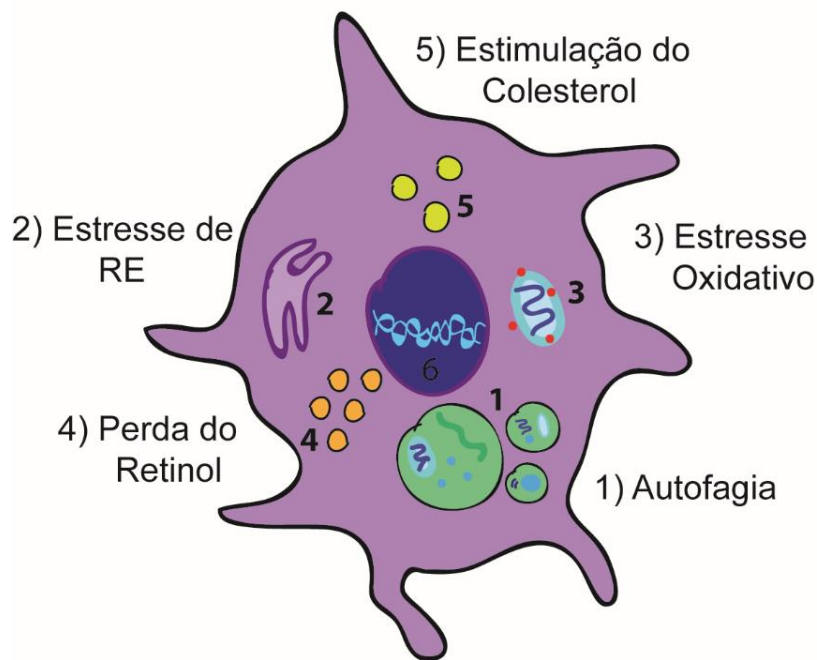


Figura 7: Mecanismos de ativação da HSC. Esquema dos caminhos envolvidos na ativação da HSC. 1) A autofagia ativa a HSC, pois gera substratos energético e aumenta o (2) estresse de RE. 3) O estresse oxidativo é uma característica das doenças crônicas hepáticas que ativa as HSCs. 4) A perda de retinóides é classicamente definida como uma característica de ativação das HSCs. 5) O colesterol livre estimula as HSCs, tornando-as mais susceptíveis ao TGF β . 6) Metilação do DNA e modificações nas histonas, controlam tanto a ativação quanto a inativação das HSCs. Receptores nucleares e sinais epigenéticos, incluindo miRNAs, também modulam a ativação das HSCs. Esquema criado pela autora.

Em doenças agudas do fígado ocorre o aumento da fibrogênese em relação a fibrólise, caracterizando um desequilíbrio entre produção e a degradação da MEC pelas metaloproteinases (MMPs). Quando há uma lesão prolongada ao fígado, a fibrogênese se sobrepõem a fibrólise, resultando assim em excesso de deposição de MEC, devido a

menor secreção e atividade das MMPs e um aumento dos inibidores teciduais das MMPs, as TIMPs (do inglês, *tissue inhibitor of MMPs*, TIMP), predominantemente a TIMP-1, produzida por todas as células do tecido hepático. Porém, uma produção e atividade desregulada em local ou tempo errados, podem promover um dano tecidual e ativar uma resposta fibrogênica secundária, deixando as HSCs e os miofibroblastos migrarem e se proliferarem. As HSCs interagem com diferentes populações de células do sistema imune, bem como ativam rotas específicas da sinalização imune, funcionando em conjunto com elas para promover a fibrogênese hepática. Estas células medeiam vários efeitos imunoreguladores através da produção das enzimas NAPDH oxidase (NOX), espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas e quimiocinas, como por exemplo, quimicinas -CC CCL2,-3,-4,-5,e -7, também receptores de quimiocinas CC, CCR2,-5,-7, receptores de quimiocinas CXC, CXCR3,-7 e receptores Toll 4, TLR4 (Schuppan, Ashfaq-Khan et al. 2018).

1.7 A linhagem GRX como um Modelo de HSC Murino Ativada

A linhagem celular GRX foi estabelecida 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 que são características de um miofibroblasto (Borojevic, Guaragna et al., 1990). Vários estudos do nosso grupo mostraram que esta linhagem pode ser induzida a expressar o fenótipo lipocítico, semelhante às HSC quiescentes, por meio de tratamentos com drogas como a indometacina, retinol, licopeno, capsaicina e frutose 1,6 bisfosfato, que levaram a GRX ao acúmulo de gotas lipídicas e à diminuição da capacidade de proliferação e de produção de Col-I (Guaragna, Trugo et al. 1991; Pinheiro-Margis, Margis et al. 1992; Bitencourt, de Mesquita et al. 2012; de Mesquita, Bitencourt et al. 2013; Elias, Oliveira et al. 2019). 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 (da Silva et al. 2003; Guimaraes, Franceschi et al. 2006). Sendo assim, a linhagem GRX é um modelo com uma plasticidade de fenótipos

interessantes e já bem conhecida, sendo um ótimo instrumento para o estudo dos mecanismos que envolvem e acarretam o desenvolvimento da fibrose hepática e as DCF.

1.8 As Doenças Crônicas do Fígado e uma proteína de Ativação: Caveolina-1

Na última década a Cav-1 tem surgido como uma importante proteína na regulação da função hepática. Ademais, a Cav-1 tem participação no monitoramento da homeostase lipídica, regulando o acúmulo de lipídios, tráfico e catabolismo, bem como na função mitocondrial durante a adaptação metabólica hepática. Podendo, assim ser considerada, como um sensor proteico que mantém a homeostase hepática em condições fisiológicas e fisiopatológicas (Fernandez-Rojo and Ramm 2016). Devido às suas funções chave na fisiologia celular, as caveolas e a Cav-1 estão conectadas com muitas doenças humanas que podem, num futuro próximo, ser um potencial alvo terapêutico. As caveolas são importantes para a fisiologia celular e para a perpetuação da vida, promovendo uma vantagem evolucionária. Camundongos deficientes de Cav-1 são viáveis, mas são também modelos precoces da doença de Alzheimer. Mutações nos genes das Caves e cavininas estão associadas a várias doenças em humanos, incluindo distrofias do músculo esquelético, anormalidades cardíacas, lipodistrofias e cânceres (Parton and del Pozo 2013).

Em fígados cirróticos humanos foi descrito um aumento da expressão da Cav-1 nas LSECs e nas HSCs, em decorrência da hipertensão portal que acompanha os processos de fibrose (Yokomori, Oda et al. 2002). Outro estudo relatou, em fígados de camundongos após o dano por ligação dos ductos biliares, um aumento da expressão proteica e do RNAm da Cav-1 nas HSC, porém o aumento não foi relatado nas LSECs (Singh, Liu et al. 2016). Já, Yamazaki *et al.* mostraram em amostras de tecido hepático cirrótico humano um aumento da expressão de Cav-1 em comparação com amostras de tecido hepático saudável humano (Yamazaki, Oda et al. 2013). Mais um estudo do grupo de Cokakli *et al.* mostrou uma relação positiva do aumento da expressão de Cav-1 em fígados cirróticos de pacientes com carcinoma hepatocelular em comparação a indivíduos saudáveis (Cokakli, Erdal et al. 2009). De Gang Ji *et al.* relataram em camundongos KO (*knockout*), ou seja, sem expressão de Cav-1, e ainda submetidos a exposição de tetracloreto de carbono (CCL₄) um importante indutor de fibrose hepática, que na ausência de Cav-1, o dano hepático foi muito maior do que o grupo controle, mostrando uma relação

importante de proteção da Cav-1 para estas lesões do fígado (Ji, Zhang et al. 2018). Inclusive, em outro trabalho Sala-Vila, A. *et al* mostraram que a Cav-1 está presente nas membranas associadas a mitocôndrias (MAMs) hepáticas, onde atuaria determinando o conteúdo de colesterol, regulando, assim os níveis de esteroides intracelulares e processos relacionados ao metabolismo de lipoproteínas (Sala-Vila, Navarro-Lerida et al. 2016). Outros pesquisadores mostraram que camundongos KO para a Cav-1 submetidos a uma dieta hipercalórica por quatro semanas, desenvolveram severa esteatose hepática com gotas lipídicas maiores, aumento do peso do fígado e marcadores sanguíneos como HDL, LDL e colesterol total em comparação com camundongos controles também submetidos a dieta hipercalórica (Li, Chen et al. 2017). Também, estudos com humanos deficientes em Cav-1 ou cavina-1 demonstraram hepatomegalia, aumento das transaminases no soro e em alguns casos esteatose hepática, provavelmente como um mecanismo compensatório decorrente da incapacidade dos adipócitos para acumular os triglicerídeos. Portanto, com a deficiência de Cav-1, a oxidação de ácidos graxos, cetogênese e a respiração celular estão comprometidas, exacerbadas devido ao acúmulo de colesterol nas membranas das mitocôndrias. Com isso, a superexpressão de Cav-1 na cirrose é relacionada com um mecanismo de defesa para melhorar o estado redox diminuindo o óxido nítrico (NO) e a produção das espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Fernandez-Rojo and Ramm 2016).

A fibrose hepática é comumente considerada o resultado do desequilíbrio no reparo de tecido, com aumento do tecido conectivo e formação de uma cicatriz fibrosa, levando a ruptura da estrutura normal do tecido. Esse desequilíbrio resulta na perda de homeostase e a deposição desproporcional de componentes da MEC e a excessiva contração do tecido, sendo a ativação das HSCs as principais orquestradoras deste processo. A Cav-1 tem um papel no monitoramento da homeostase hepática pela conexão com eventos de sinalização celular, tendo importância na fibrose e no reparo do tecido. O conhecimento dos mecanismos pelo qual a Cav-1 regula os processos de reparo tecidual é importante para o entendimento da fibrose (Gvaramia, Blaauboer et al. 2013). Com base nos estudos mencionados anteriormente, devido ao seu potencial de regulatório nas doenças hepáticas e na fisiologia da ativação das HSC, este trabalho também propõe que a Cav-1 poderá ser um marcador molecular da ativação das HSCs e um alvo terapêutico para a criação de novos fármacos.

Fundamentado no exposto acima, nosso grupo utilizou o plasmídeo pCav1EGFP no modelo celular GRX para obter uma linhagem permanente que superexpressa a

proteína Cav-1 chamada de GRX^{EGFP-Cav1} (Ilha 2012). Através de várias técnicas nós mostramos que a superexpressão de Cav-1 aumentou a adesão, afinidade célula-célula, modulou a migração, morfologia do citoesqueleto de actina, a capacidade de endocitose da GRX^{EGFP-Cav1} em comparação com GRX. Estes resultados associados com o aumento do conteúdo de α -SMA, Col-I e GFAP, mostraram que esta linhagem apresenta um fenótipo mais ativado do que as células GRX (Ilha 2015). Para verificar as interações de uma cultura em 3D, também utilizamos a cultura de esferoides para analisar as células que superexpressam a Cav-1 em relação ao controle GRX. Assim, sendo de extrema importância para a continuação deste trabalho, nosso grupo também estabeleceu o silenciamento gênico da Cav-1, GRX^{GFPshCav1}, para experimentos com respiração celular, rede mitocondrial, interação com as MAMs e RE.

2. *Objetivos*

2.1 Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho foi demonstrar que a Cav-1 é um possível marcador molecular de ativação das HSCs.

2.2 Objetivos específicos do capítulo 1:

- Avaliar os marcadores de ativação nas células que superexpressam a Cav-1.
- Avaliar a migração das células que superexpressam a Cav-1.
- Avaliar a proliferação e ciclo celular das células que superexpressam a Cav-1.
- Avaliar a adesão celular e a expressão de proteínas do complexo de adesão celular como a Integrina $\beta 1$ e a Paxilina nas células que superexpressam a Cav-1.
- Avaliar a atividade lisossomal, a ultraestrutura celular através da microscopia eletrônica de transmissão (MET) e o fluxo endocítico nas células que superexpressam a Cav-1.

2.3 Objetivos específicos do capítulo 2:

- Desenvolver a cultura de esferoides.
- Avaliar a migração das células a partir dos esferoides em matriz proteica.
- Visualizar através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da monocamada celular 2D e da superfície dos esferoides evidenciando a produção de MEC.
- Visualizar através do MET a parte interna (parte cortical e parte medular) dos esferoides.
- Visualizar a imunomarcação com ouro coloidal das proteínas Cav-1 e GFAP na superfície celular das duas linhagens.

2.4 Objetivos específicos do capítulo 3:

- Estabelecer a linhagem GRX^{GFPshCav1} através do silenciamento com shRNA de interferência da Cav-1 pela técnica de transdução com partículas virais.
- Avaliar a superexpressão e o silenciamento da Cav-1 na respiração celular por respirometria de alta resolução (OROBOROS).
- Avaliar o conteúdo celular total e mitocondrial de colesterol, a atividade lisossomal e a função mitocondrial das linhagens celulares.








- Avaliar a morfologia da rede mitocondrial das linhagens celulares por microscopia confocal com Mitotracker® Red em culturas *in vivo*.
- Analisar a ultraestrutura pela MET com foco na morfologia mitocondrial e nos contatos do RE com as mitocôndrias (MAM) nas linhagens celulares.
- Visualizar a imunomarcação com ouro coloidal da proteína Cav-1 na membrana interna e externa mitocondrial, nas MAMs e RE.

3. Capítulo 1

3. Artigo aceito para publicação na revista Journal of Cellular Biochemistry:
Exogenous Expression of Caveolin-1 is sufficient for hepatic stellate cell activation

RESEARCH ARTICLE

Exogenous expression of caveolin-1 is sufficient for hepatic stellate cell activation

Mariana Ilha¹  | Ketlen da Silveira Moraes¹ | Francieli Rohden¹  |
 Leo Anderson Meira Martins¹  | Radovan Borojevic²  | Guido Lenz³  |
 Florencia Barbé-Tuana^{1,4}  | Fátima Costa Rodrigues Guma^{1,5} 

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas- Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

²Centro de Medicina Regenerativa, Faculdade de Medicina de Petrópolis – FMP, Petrópolis, RJ, Brazil

³Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

⁵Centro de Microscopia e Microanálise, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence

Mariana Ilha, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil.
 Email: mariana.ilha@ufrgs.br

Funding information

Ministério da Ciência e Tecnologia, Grant/Award Number: 423712/2016-0; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Grant/Award Number: 1952-2551/13; Pró-Reitoria de Pesquisa, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Grant/Award Number: 423712/2016-0; CNPq; CAPES; MCT/ CNPq Universal, Grant/Award Number: 423712/2016-0; PqG/FAPERGS, Grant/Award Number: 1952-2551/13; PROPESQ-UFRGS

Abstract

Caveolin-1 (Cav-1) expression is increased in hepatic stellate cells (HSC) upon liver cirrhosis and it functions as an integral membrane protein of lipid rafts and caveolae that regulates and integrates multiple signals as a platform. This study aimed to evaluate the role of Cav-1 in HSC. Thus, the effects of exogenous expression of Cav-1 in GRX cells, a model of activated HSC, were determined. Here, we demonstrated through evaluating well-known HSC activation markers – such as α -smooth muscle actin, collagen I, and glial fibrillary acidic protein – that up regulation of Cav-1 induced GRX to a more activated phenotype. GRX^{EGFP-Cav1} presented an increased migration, an altered adhesion pattern, a reorganization f-actin cytoskeleton, an arrested cell cycle, a modified cellular ultrastructure, and a raised endocytic flux. Based on this, GRX^{EGFP-Cav1} represents a new cellular model that can be an important tool for understanding of events related to HSC activation. Furthermore, our results reinforce the role of Cav-1 as a molecular marker of HSC activation.

KEYWORDS

caveolae, caveolin-1, GRX, hepatic stellate cells activation, liver fibrosis, molecular marker

1 | INTRODUCTION

Chronic liver diseases (CLDs) have a large impact on public health expenditures, significantly contributing to human mortality rates.¹ Worldwide, 844 million people have CLDs with a lethality rate of 2 million deaths per year.² Liver fibrosis is a characteristic of several CLDs, such as nonalcoholic fatty liver disease,

viral hepatitis, nonalcoholic steatohepatitis, cirrhosis, and liver cancer and it is defined by the excessive release of extracellular matrix (ECM).¹ Moreover, liver has a unique competence to adapt to damage through tissue repair. The imbalance of ECM release by hepatic scarring leads to significant changes in architectural and organ function, making it dangerous and clinically significant.³

Hepatic stellate cells (HSC) are the major orchestrators of liver fibrosis by producing and altering the ECM in acute injury of liver. Through stimuli of hepatic damage, these cells are activated to a more proliferative and fibrogenic phenotype, transforming their quiescent phenotype to a cell with classic myofibroblast characteristics.⁴ Indeed, HSC control the turnover of liver connective tissue regulating homeostasis of ECM and also participating in contractility of hepatic sinusoids.⁵ Besides the morphological changes,⁶ some hallmarks of HSC activation include the reduction on levels of intracellular lipid droplets, increase on the production of ECM, alpha-smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (Col-I), desmin, and glial fibrillary acidic protein (GFAP),^{7,8} cholesterol metabolism, induction of autophagy, endoplasmic reticulum stress, and oxidative stresses.⁴

Integrins and focal adhesion (FA) proteins complex are mechanotransducers and mechanosensors. Indeed, these proteins can act with the cell-cell and cell-ECM interactions through cytoskeleton, importantly participating in the initiation, maintenance, and resolve of fibrosis. Moreover, integrins are capable to connect the cells to ECM proteins, conducting a positional and mechanical indication from the ECM to inside the cell, affecting cell adhesion, migration, and proliferation.⁹

Caveolae are a subgroup of lipid rafts enriched in cholesterol and sphingolipids. Classically, these organelles are described as invaginations of plasma membrane or "little caves" of 60 to 80 nm.¹⁰ These structures can act as mechanic sensors that react to plasma membrane variations. Most importantly, caveolae regulate cholesterol homeostasis and cell physiology as a platform signaling for cell proliferation, migration, and endocytosis.^{11,12}

Caveolin-1 (Cav-1), a 22 kDa transmembrane scaffolding protein, is an essential regulator of caveolae present in all plasma membranes and it is indispensable for its formation.¹³ Cav-1 and caveolae are both involved in fundamental cellular processes such as endocytosis, transcytosis, signaling pathway transduction, lipid metabolism regulation, and mechanosensors.¹ Many studies demonstrated the importance of cholesterol transport by Cav-1 to membranes, showing a critical role of this protein to membrane homeostasis and organelles functions.¹⁴

Cav-1 exerts an important hepatic functions through the balance of lipid homeostasis,¹ tissue repair homeostasis, liver fibrosis,¹⁵ and regeneration.¹ It was already described that Cav-1 is increased in both sinusoidal endothelial cells and HSC of cirrhotic livers. This fact was suggested to be related to the portal hypertension that accompanies liver fibrosis.^{16,17} Another study demonstrated that Cav-1 protein and messenger RNA increase

in HSC after hepatic damage.⁶ Importantly, in physiological and pathophysiological conditions, Cav-1 regulates the homeostasis of lipids and mitochondrial function, appearing as a key sensor protein in the liver tissue. In addition, the overexpression of Cav-1 in cirrhosis condition is related to a defense mechanism that raises the redox status by decreasing nitric oxide (NO) and reactive species of nitrogen production.¹

GRX cell line is an activated HSC model that was isolated from a hepatic fiber granuloma produced by infection of *Schistosoma mansoni* in C3H/HeN mice.¹⁸ In addition, GRX can be driven to manifest HSC quiescent-like phenotype by treatment with β -carotene, retinol, indomethacin, capsaicin, and lycopene; or to express the HSC activated-like phenotype by stimuli of proinflammatory cytokines. In summary, GRX cell line is an excellent tool for liver fibrosis study.¹⁹⁻²⁷ Here, we show that exogenous expression of Cav-1 can modify the morphology and metabolism of GRX cells, thus reinforcing its important role in HSC activation. Because Cav-1 has been considered as an attractive strategy for therapeutic design against chronic liver diseases, the GRX^{EGFP-Cav1} may be a first-rate tool to focus study Cav-1 as molecular marker of HSC activation.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Cell culture

The GRX cell line was established by Borojevic et al¹⁸ and kindly provided by the Cell Bank of Rio de Janeiro (HUCFF, UFRJ, RJ, Brazil). Cells were routinely maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 5% FBS and 2 g/L HEPES buffer, gentamicin 50 μ g/mL, fungizone 250 μ g/mL, pH 7.4, at 37°C and 5% CO₂. All culture reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 | Preparation of stable GRX^{EGFP-Cav1} cell line

To establish the GRX^{EGFP-Cav1} cell line that constitutively overexpresses caveolin-1, we used pCav1EGFP (kindly provided by Dr J. Daniotti, Cordoba University, Argentina) cloned into the recombinant plasmid pcDNA3.1TOPO (Invitrogen) and transformed into through thermal shock. Plasmids were purified using the PureLink Quick Plasmid Miniprep kit (Qiagen). The recombinant plasmid pCav1EGFP (Amp^R) was transfected into GRX cells at 50% confluence with 2 μ L of LipofectamineTM (Invitrogen) and 0.3 ng of pCav1EGFP. After 72 hours, transfected cells were selected by addition of 1000 μ g/mL Geneticin 418 (G418; Sigma-Aldrich) to the culture medium for 4 weeks

and then reduced to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. pCI-neo:EGFP (pCI-neo Mammalian Expression Vector; Promega) that expresses EGFP was used as the control plasmid.

2.3 | Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction

Total RNA (from 10^6 cells) was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) and was reverse-transcribed with SuperScript-II (Invitrogen). RNA expression levels were quantified using SYBR Green on StepOne Plus real-time cyler (Applied-Biosystems, Grand Island, NY). Samples were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method²⁸ with the C_t values relative to the housekeeping gene β -actin. Gene sequence information was collected from free-internet databases (www.ensembl.org and https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/) and used to design specific primers for CAV-1 Forward- 5' GCACACCAAGGAGATTGACC 3', Reverse- 5' GACAACAAGCGGTAAAACCAA3' and β -Actin Forward-5' TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG 3' Reverse- 5' TACTCCTGCTTGCTGATCCACAT 3' using a freely available software from Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com).²⁹

2.4 | Immunoblotting

Protein expression of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} was detected by Western blot analysis. Cells were lysed in Tris-HCl buffer (pH 6.8) with 2% SDS, 10% glycerol, and 2- β -Mercaptoethanol. Equal amounts of protein previously measured according to Peterson³⁰ were loaded into 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, transferred into nitrocellulose membranes (Hybond ECL Nitrocellulose Membrane, Amersham), and immunoblotted with the appropriate antibodies. Primary antibodies used were anti-Cav-1 (1:500, SC-53564; Santa Cruz) and anti- β -actin (1:500, SC-47778; Santa Cruz). Secondary antibodies used were horseradish peroxidase conjugated antirabbit or anti-mouse-IgG antibodies (1:1000; both from Bio Rad, CA). Proteins blots were detected by chemiluminescence (ECL detection system; Amersham Pharmacia, UK) using Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Chicago). Band intensities were quantified by densitometry using Alpha Easy FC software (version 6.0.0; Genetic Technology Inc., Miami, FL).

2.5 | Flow cytometry

For cell counting, GRX and GRX^{EGFP-Cav1} were seeded at the density of 2.5×10^4 cells/cm². After 24, 48, and 72 hours of culture, cells were trypsinized and suspended in 200 μL of phosphate buffered saline (PBS). Population doublings were defined according to $\text{PD} = \log N(t) - \log(N(0))/\log 2$, where $N(t)$ is the number of cells per well at time of

passage, and $N(0)$ is the number of cells seeded at the previous passage.³¹ For morphological analysis, the size and cytoplasmic complexity of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} cells were analyzed using the forward scatter and the side scatter) parameters, respectively. Cell cycle phase progression was analyzed after 48 hours of culture. A total of 3×10^5 cells was incubated with cell cycle buffer (3.5 mM de trisodium citrate, 0.5 mM Tris, with 0.05% nonidet), RNase (10 mg/ml) and the DNA was stained with propidium iodide (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 15 minutes.

Endocytosis capacity of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} was determined according to Lee et al³² using red FluoSpheres[®] (Fluorescent microspheres; Molecular Probes). Briefly, cells were incubated in a ratio of 1:100 cell/microspheres for 4, 8, and 16 hours. Cells were washed two times with PBS, trypsinized, fixed with 4% paraformaldehyde, and submitted to flow cytometry.

The lysosome quantification was performed through staining cells with Lysotracker Red DND 99 (LysRed) (Invitrogen). Briefly, cells were cultured in 12-well plates, trypsinized and incubated for 30 minutes with LysRed.

All data was acquired with a FACS Calibur cytometry system (FACS Calibur; BD Bioscience, Mountain View, CA) and Cell Quest software (BD Bioscience). Data obtained (20.000 events) was analyzed with FCS Express 4 Software (De Novo Software, Los Angeles, CA).

2.6 | Sulphorhodamine B assay

To assess adhesion and proliferation properties, sulphorhodamine B assay was performed.³³ In short, GRX and GRX^{EGFP-Cav1} were seeded at 1×10^4 cells/cm² into 96-well plates and 2.5×10^4 cells/cm² into 24-well plates. Cell adhesion and proliferation were assessed after 2, 4, and 6 hours for adhesion experiments and 24, 48, and 72 hours for proliferation assay, respectively. Absorbance was measured in a spectrophotometer (Spectra Max M5; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) at 560 nm.

2.7 | Cholesterol measurement

Free cholesterol content of cells was measured by Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To measure free cholesterol, cholesterol esterase was omitted from the assay. The values obtained from a cholesterol standard curve were normalized by protein content.

2.8 | Microscopy analyses

2.8.1 | Phase contrast microscopy

Cell morphology, transwell cell migration, and wound healing capacity of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} were analyzed

by phase contrast microscopy using a Nikon Eclipse TE300 inverted microscope. Images were acquired using a Nikon Digital Camera DXM1200C (Düsseldorf, Germany).

2.8.2 | Transwell cell migration assay

To test cell migration, transwell migration assay using transparent PET membrane 24 well 8.0 μm pore size according manufactures protocol (ref 353097; Falcon, Corning, NY) was performed. Briefly, cells were plated in transwell chambers at density of 2×10^4 cells/cm² using serum free DMEM. A total of 700 μL of 10% FBS DMEM was added to the lower chamber and cells were maintained at 37°C and 5% CO₂. For the migration test, cells were fixed after 16 hours and 22 hours with 4% paraformaldehyde for 15 minutes and then stained with 1% toluidine Blue O (Sigma) for 5 minutes. Cells that migrated were photographed in six randomly selected fields for each membrane in triplicate and counted using the ImageJ software (National Institute of Health, Rock Ville Pike, Bethesda, MD).

2.8.3 | Wound-healing cell migration assay

For analyzing cell migration, we followed standard methods with modifications.^{34,35} Briefly, GRX and GRX^{EGFP-Cav1} were seeded into 24 well and cultured until reach 80% of confluence. After, cells were scratched with a micropipette tip and images were captured at 0, 6, and 24 hours later.

2.8.4 | Laser-scanning confocal microscopy

Expression and localization of Cav-1, Col-1, αSMA , GFAP, $\beta 1$ integrin and paxillin were assessed by fluorescence labeling. Lysosomal function and endocytosis were respectively analyzed by LysRed staining and microspheres uptake FluoSpheres®. For all experiments, GRX and GRX^{EGFP-Cav1} cells were cultured in appropriate glass bottom culture plates (CELLview Glass bottom plates; GreinerBioone).

For immunofluorescence labeling, cells were fixed with 4% paraformaldehyde before incubating with the primary antibodies (1:500) Cav-1, collagen-I, αSMA , $\beta 1$ Integrin (sc53564, sc8784, sc1615, sc8978, respectively; all from Santa Cruz Biotechnology, Dalas), GFAP (ZO334, from DAKO, Glostrup, Denmark), and paxillin (610051; BD Biosciences, San Jose, CA). Sequentially, cells were incubated with the secondary antibody (1:1000) Alexa-Fluor 408, AlexaFluor 555, or AlexaFluor 647

(Invitrogen). The fluorescent dye Hoechst 33342 (H1398; Invitrogen) was used for labeling cell nuclei.

LysRed staining were performed as in accordance to the manufacturer's instructions. To visualize microspheres uptake cells were incubated by 8 hours with 1:100 cells/microspheres according.³² To contrast, actin cytoskeleton was stained with Phalloidin - AlexaFluor 488 (Invitrogen) and cell nuclei with Hoechst 33342 (Invitrogen). In this experiment, images underwent a three-dimensional reconstruction of the sweep on the Z axis. For actin cytoskeleton analysis, cells were stained with Actin Red™ 555 (R37112; Invitrogen) for 30 minutes in accordance to the manufacturer's instructions

All images were collected using Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope. Ten single confocal sections of 0.7 μM were taken parallel to the bottom plates (xy sections). All experiments were performed at least four times for each sample. Images from six random fields were acquired, deconvolved using the Interactive 3D plugin and cell fluorescence intensity was analyzed using the software ImageJ (National Institute of Health, Rock Ville Pike, Bethesda, MD, EUA). Colocalization analysis was performed using intensity correlation analysis plugin of ImageJ.³⁶

2.8.5 | Electron microscopy

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at room temperature. Afterwards, they were washed in PB and fixed in 1% osmium tetroxide, OsO₄ (Sigma) in PB, pH 7.4 for 1 hour at room temperature. They were washed again with PB and then gradually dehydrated with acetone (Merck) and soaked in epon resin. Polymerization was carried out for 48 hours at 60°C. Semi-thin sections (1 μm) were made in ultramicrotome (Leica EM UC7) and stained with 1% toluidine blue. Ultrafine cuts were obtained in an ultramicrotome for the assembly of copper grids (200 mesh). Samples were counterstained with 1% uranyl acetate (Merck) and then with 1% lead citrate (Merck). Cell morphology, autophagosomes, and autolysosomes were observed using TEM at an 80-kV acceleration voltage (JEM 1200; EXII, Japan).

2.9 | Statistical analysis

Data were obtained at least from three independent experiments done in triplicate and expressed as mean values \pm SD. Statistical comparisons were carried out by one- or two-way analysis of varianc followed by Bonferroni's post hoc test. When necessary, Student t-test

was used. Statistical significance was accepted at $P < .05$. All analyses and graphics were performed using the statistical software GraphPad Prism 6 for Windows (version 6; GraphPad Software Inc., Sa Diego).

3 | RESULTS

3.1 | Caveolin-1 expression in the GRX^{EGFP-Cav1} activation

GRX^{EGFP-Cav1} expresses around 83% more Cav-1 when compared to nontransfected GRX and the green fluorescence form EGFP colocalizes with anti-Cav-1 antibody in red, revealing Pearson coefficient of 0.82 ± 0.02 , as expected (Figure S1). To ensure that Cav-1 may be responsible by all changes in GRX^{EGFP-Cav1}, we tested the GRX cells transfected with a plasmid that expresses only the EGFP, GRX^{EGFPpCineo} (pCI-neo mammalian expression vector; Promega). Thus, we found that EGFP did not interfere in cell proliferation, cell adhesion after 2 hours, Cav-1 expression, lysosomal function and GRX^{EGFPpCineo} cell ultrastructure (Figure S2). Activation of HSC, transdifferentiation of quiescent into activated myofibroblasts, is well defined as a primary driver of liver fibrosis. The expression of α -SMA, Col-I, GFAP, as well as the changes on the cholesterol metabolism and the autophagy rate by lysosomal stimulation, are reliably markers that are generally used to assess HSC activation.⁴ Therefore, we investigated the activation state of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} through analyzing these classical parameters. In all immunofluorescence labeling for α -SMA, Col-I and GFAP, it was noticed an increase on the intensity of fluorescence (IF) in GRX^{EGFP-Cav1} in comparison to GRX cells (Figure 1A).

Caveolae may show a homogeneous distribution on the plasma membrane with association of actin stress fibers.¹² In a previous work, our group showed that the treatment with proinflammatory cytokines induce the GRX cells to a more activated state with a reorganization of actin cytoskeleton.²⁷ GRX cells present a typical myofibroblast phenotype grow in a “hills and valleys” model, characteristic of the smooth muscle cells lineages, had low contact inhibition and have a well-organized stress-fibers.²² On the other hand, GRX^{EGFP-Cav1} cells grow into small clusters composed of several cells climbing over each other. In addition, labeling with Actin Red 555 in GRX^{EGFP-Cav1} showed that stress fibers were reduce in length with a granular actin perinuclear zone. An extensive dense peripheral actin-rich border and distant large focal adhesions at the end of long pseudopodia (Figure 1B). In concordance with previously description for the activation of GRX,²⁷ these results reinforce the hypothesis that the cell-cell adhesion was

stronger than cell-substrate adhesion. In addition, the IF for Actin Red 555 was higher in GRX^{EGFP-Cav1}, thus suggesting an interconnection between the increased Cav-1 expression and the amount/structure of the actin cytoskeleton (Figure 1B). We further examine whether expression of Cav-1 is implicated in cholesterol metabolism by Amplex Red method and it was found an increase of free cholesterol in GRX^{EGFP-Cav1} compared to GRX (Figure 1C). Altogether, these results are in accordance to the previous description of GRX and/or HSC activation.

3.2 | Cav-1 in cell migration

Cav-1 and caveolae play an important role in cell migration.³⁷ Therefore, we conducted the transwell experiments to view chemotaxis attractive interaction in response to the increased expression of Cav-1. GRX^{EGFP-Cav1} presented an increased capacity on migrating toward the chemo-attractant after 16 and 22 hours in comparison to the GRX. Interestingly, GRX^{EGFP-Cav1} remained in clusters when passing through the transwell, showing strong attraction between cells produced by the activation process, suggesting enhances polarity and collective cell movement migration (Figure 2A).

In wound healing experiment at time 0 hours GRX^{EGFP-Cav1} opened a larger wound. Curiously, cells detached from the substrate as a layer and these cells adhere again on the edges of wound (Figure 2B black arrow). On the other hand, GRX detached from the substrate individually. These phenomena are very interesting because GRX^{EGFP-Cav1} showed an enhanced mechanosensory, surface tension, and cell-cell affinity to continually attached to others.³⁸ Curiously, at time 6 hours, migration pattern of both cell lines is different. GRX expanded pseudopodium-like projections into the free space and have a cell single migration. On the other hand, GRX^{EGFP-Cav1} cells showed a collective migration pattern, suggesting a lamellipodial crawling movement (Figure 2B white arrow). After, 24 hours both cells lines closed the wound. Collectively, these results demonstrated that Cav-1 accelerated transwell migration in chemo-attractant conditions, and in the wound healing experiment demonstrated a different pattern of migration for both cell lines, higher superficial tension and cell-cell affinity in GRX^{EGFP-Cav1} (Figure 2B).

3.3 | Effects of caveolin-1 expression on cell cycle

Although the proliferation curve of transfected cells appears to indicate a higher rate of proliferation compared to GRX cells, the calculation of population doubling

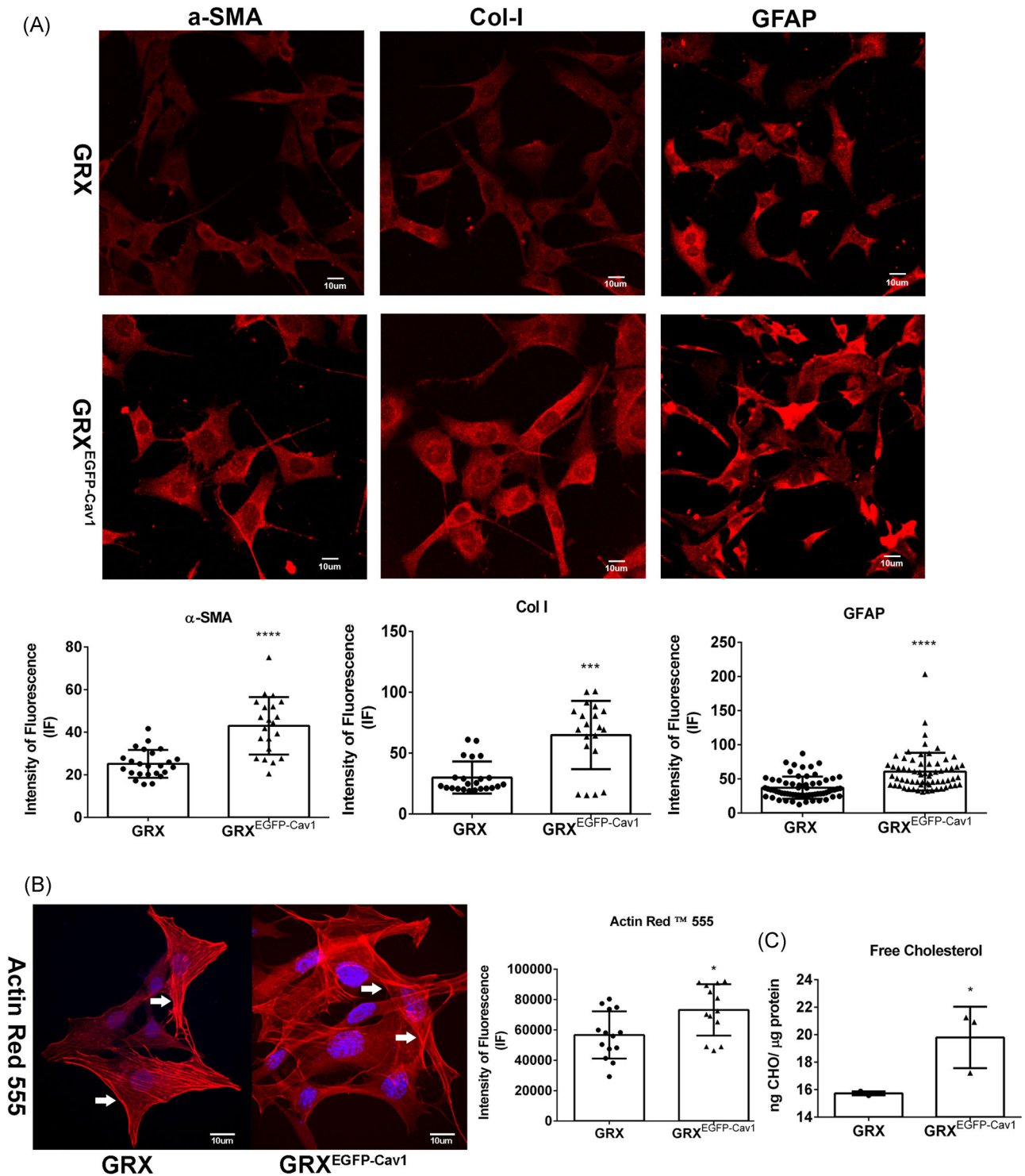


FIGURE 1 Cav-1 expression in the GRX and GRX^{EGFP-Cav1} activation. Representative confocal images of GRX and GRX^{EGFP-Cav1}. A, Cells were immunolabelled for α-SMA, Col-I and GFAP with Alexa Fluor 555 secondary antibody. Scale Bar 10 μm. B, Cells were stained with TRITC Rhodamine phalloidin Scale Bar 10 μm. Intensity of fluorescence (IF) were quantified by ImageJ. C, Quantification of free cholesterol was performed by Amplex Red. Cellular IF means ± SD were presented. **P* < .05; *** *P* < .001; *****P* < .0001. α-SMA, alpha-smooth muscle actin; caveolin-1, Cav-1; Col-I, collagen I

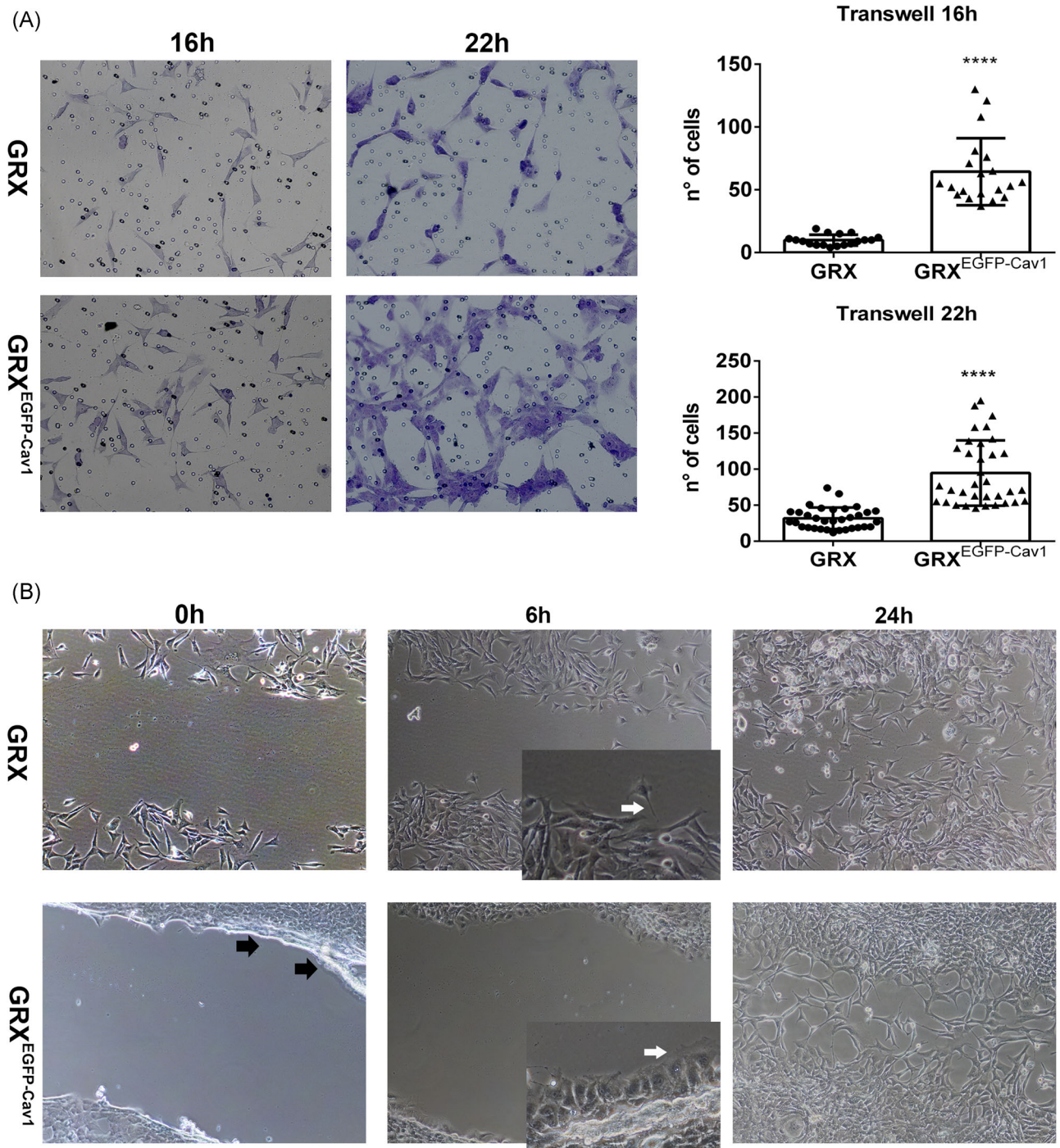


FIGURE 2 Cav-1 in Directional Migration. A, Representative images of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} cell in transwell migration at 16 and 22 hours. Cells were staining with Toluidine Blue O, (total magnification 100 \times). Pores of the membrane are visible as spots. Quantification of cells migration in 16 and 22 hours was performed by Image J. B, Representative images of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} at 0, 6, and 24 hours after monolayer injury. In 0 hours, GRX^{EGFP-Cav1} showed a larger wound and layer of detached cells attached again on the edges (black arrow). After 6 hours migration pattern was different in both cell lines. In zoom, detailed GRX cells demonstrated a single cell pattern of migration (white arrow) whereas GRX^{EGFP-Cav1} demonstrated a collective pattern of migration. In 24 hours, both cell lines closed wound. **** $P < .0001$. Caveolin-1, Cav-1

(CPD) and growth coefficient did not differ between the two cell lines (Figure 3A). This can be explained by the comparison between the adhesion proprieties of GRX cells and GRX^{EGFP-Cav1}. GRX^{EGFP-Cav1} presented an increased

cell adhesion, when evaluated in 2 hours, and this pattern was maintained over 4 and 6 hours after plating (Figure 3B). Despite the increased number of adhered cells, GRX^{EGFP-Cav1} exhibited a distinct adhesion pattern since

cells remained rounded for at least 2 hours after plating. In contrast, 2 hours after plating, GRX cells already have well-formed cytoplasmic processes, demonstrating its cell spreading, traction force magnitude, cytoskeleton remodeling, and possibly more hydrophilic proprieties by substrate (Figure 3B). Thus, cell cycle progression in GRX and GRX^{EGFP-Cav1} were analyzed by flow cytometer. Significantly, GRX^{EGFP-Cav1} showed a reduction in percent of cells in G0/G1 phase and an increase in percent of cells in the S phase, but number of cells in G2/M was similar in both cell lines (Figure 3C). Caveolin regulate cell cycle and tumor progression in some cases.¹³

3.4 | Effects of caveolin-1 expression in adhesion complex

Integrins communicate positional and mechanical signals from the ECM to the extracellular milieu, modulating important cell function such as adhesion, migration, and proliferation. $\beta 1$ integrin and paxillin are adhesions proteins connected with Cav-1 and ECM.^{39,40} To investigate if these proteins are involved in the aforementioned adhesion pattern, we evaluated their expression by measurement of IF in GRX and GRX^{EGFP-Cav1}, seeking for the potential proteins colocalizations. As expected, the IF of both proteins was increased in response to exogenous expression of Cav-1 (Figure 4A and 4B). Colocalization

between $\beta 1$ integrin and Cav-1 in GRX and GRX^{EGFP-Cav1} was demonstrated by the analysis of images presented in Figure 4A. Furthermore, the $\beta 1$ integrin/Cav-1 colocalization was clearly enhanced in GRX^{EGFP-Cav1}. Moreover, $\beta 1$ integrin and paxillin are distributed and colocalized throughout all cell cytoplasm (Figure 4B), thus indicating a strong interaction between these proteins. Indeed, immunofluorescence of paxillin showed more FA sites and increased of IF in GRX^{EGFP-Cav1}, which may implicate in the recruitment of many structural and regulatory proteins to the cell adhesion sites. In summary, these results support the evidence that exogenous expression of Cav-1 is capable to modify the cell cycle and to change the cell adhesion pattern.

3.5 | Impact of Cav-1 expression on cell morphology and endocytosis flux

Caveolin proteins are best known for their facilitations of the formation of plasma membrane caveolae.¹³ To examine the effect of exogenous expression of Cav-1 on GRX cell line, we analyzed cellular ultrastructure by TEM (Figure 5A). Among the observed differences between transfected and nontransfected cells, the most remarkable fact was the presence of autophagosome-like structures and autophagolysosomes (AL). Also, we visualized a notable of clumping caveolae (white circles)

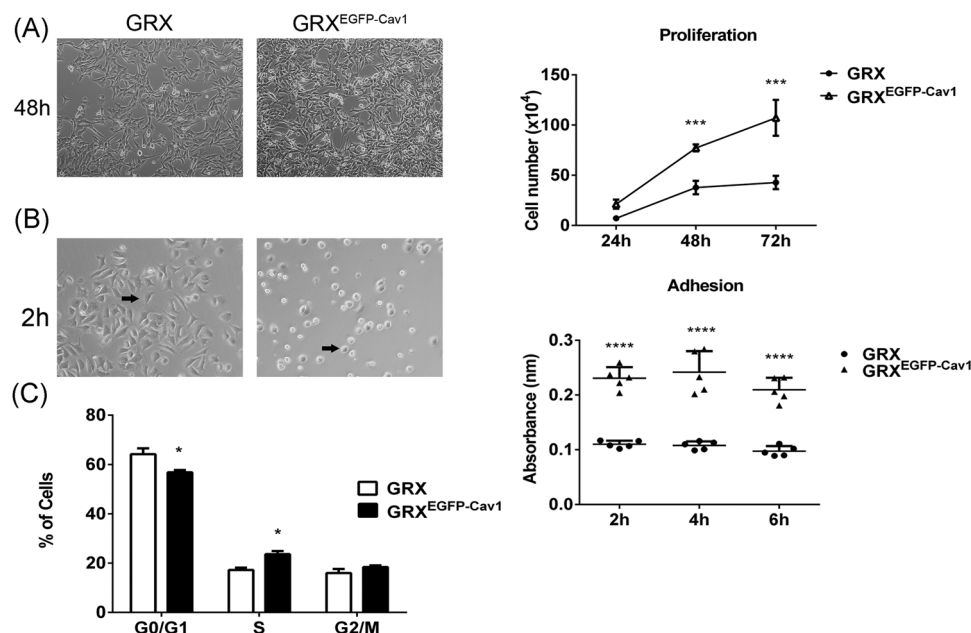


FIGURE 3 Effects of Caveolin-1 on cell proliferation and adhesion. A, Images from phase-contrast microscopy on cell morphology on 48 hours and cell proliferation after 24, 48, and 72 hours of culture. For GRX and GRX^{EGFP-Cav1} calculation of population doubling (CPD) revealed a growth coefficient of 0.835 and 0.818 and a duplication time of 20 and 19 hours. B, Images from phase-contrast microscopy in 2 hours after plating (black arrows) and cell adhesion measured by sulphorhodamin B. assay after 2, 4, and 6 hours. Magnification of 200 \times . C, Cell cycle was analyzed by flow cytometry. * $P < .05$; *** $P < .001$; **** $P < .0001$

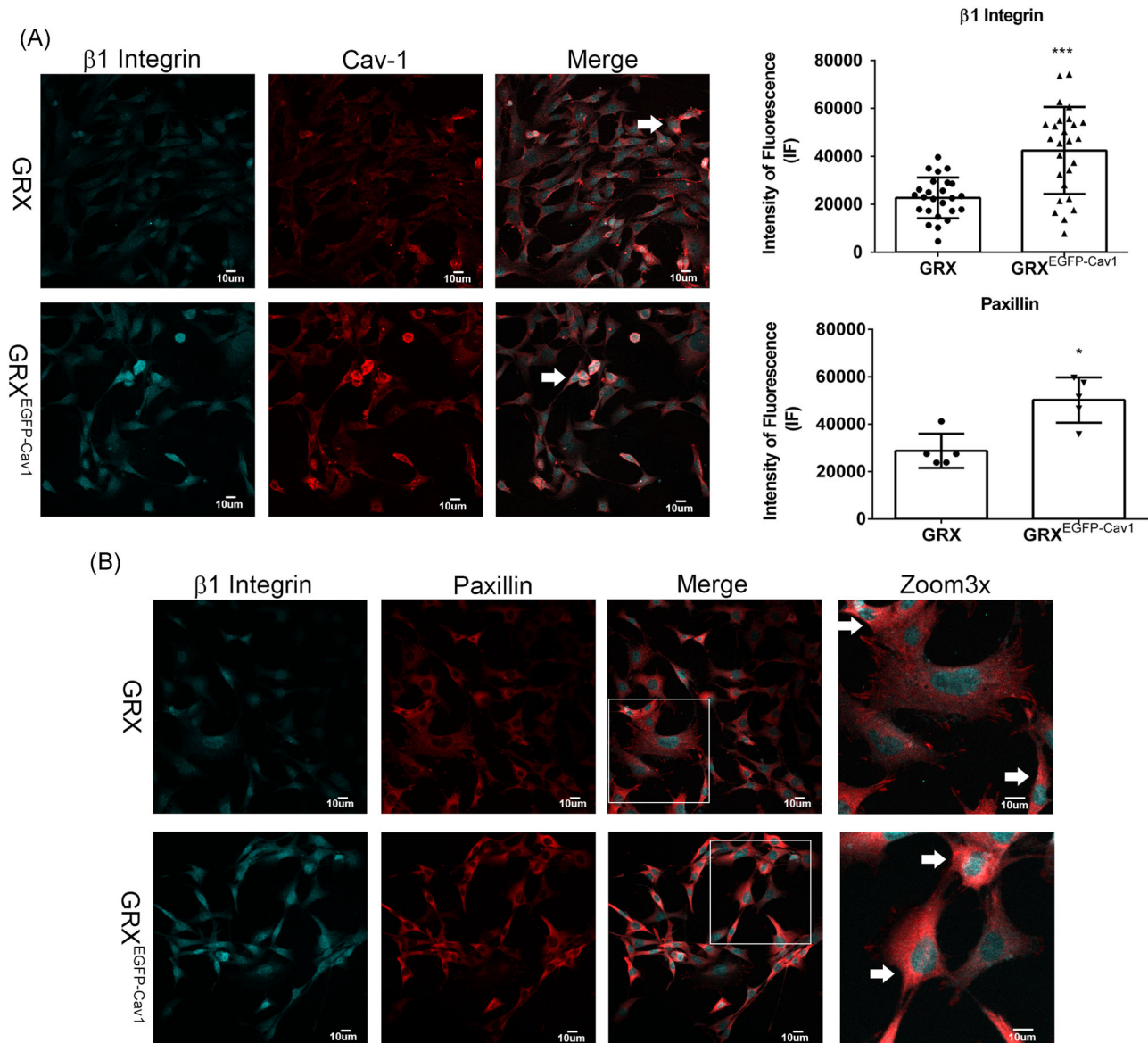


FIGURE 4 Effects of Cav-1 in $\beta 1$ Integrin and paxillin expression. A, B, Cells were immunolabelled for $\beta 1$ -integrin, caveolin-1 and paxillin with monoclonal anti-($\beta 1$ integrin), anti-(Cav-1) and anti-(paxillin) antibodies, with Alexa Fluor 405 (cyan-blue) and 555 secondary antibodies, thus examined by confocal microscopy. Colocalization were indicated by a white arrow. Scale bars, 10 μm . The $\beta 1$ Integrin and paxillin expression was evaluated by measuring the intensity of fluorescence (IF) using Image J. Values are means \pm SD from random fields as described in Material and Methods. * $P < .05$; *** $P < .001$. Caveolin-1, Cav-1

in transfected cells (Figure 5A). Likewise, the data of TEM (Figure 5A) showed an endoplasmic reticulum (ER) dilated in GRX^{EGFP-Cav1} when compared with GRX, thus suggesting ER stress. In addition, HSC activation is triggered by ER stress and autophagy, producing thus fatty acids from cleavage of retinyl esters.⁴ These results indicated that exogenous Cav-1 promoted a great change in the cytoplasm of GRX^{EGFP-Cav1}, which may be responsible for the greater granularity shown by these cells in the morphological analysis by flow cytometry (Figure S1F-G).

Because TEM analysis revealed presence of autophagosome-like structures and AL, we examined whether

Cav-1 expression affects lysosomal function by evaluating LysRed stained cells. Notably, there was a significant increase in LysRed in GRX^{EGFP-Cav1} when comparing to GRX, indicating enhanced acidification of lysosomes (Figure 5B). Autophagy is a dynamic process constituted by a succession of steps leading to the formation of autophagosomes. After fusion with lysosomes, the cargo material is degraded.⁴¹

Since TEM analysis revealed many caveolae (Figure 5A), we evaluated the endocytosis capacity of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} cells using FluoSpheres[®] by flow cytometry. Endocytosis capacity was increased in GRX^{EGFP-Cav1} cells after 8 hours of cell incubation, reaching a plateau

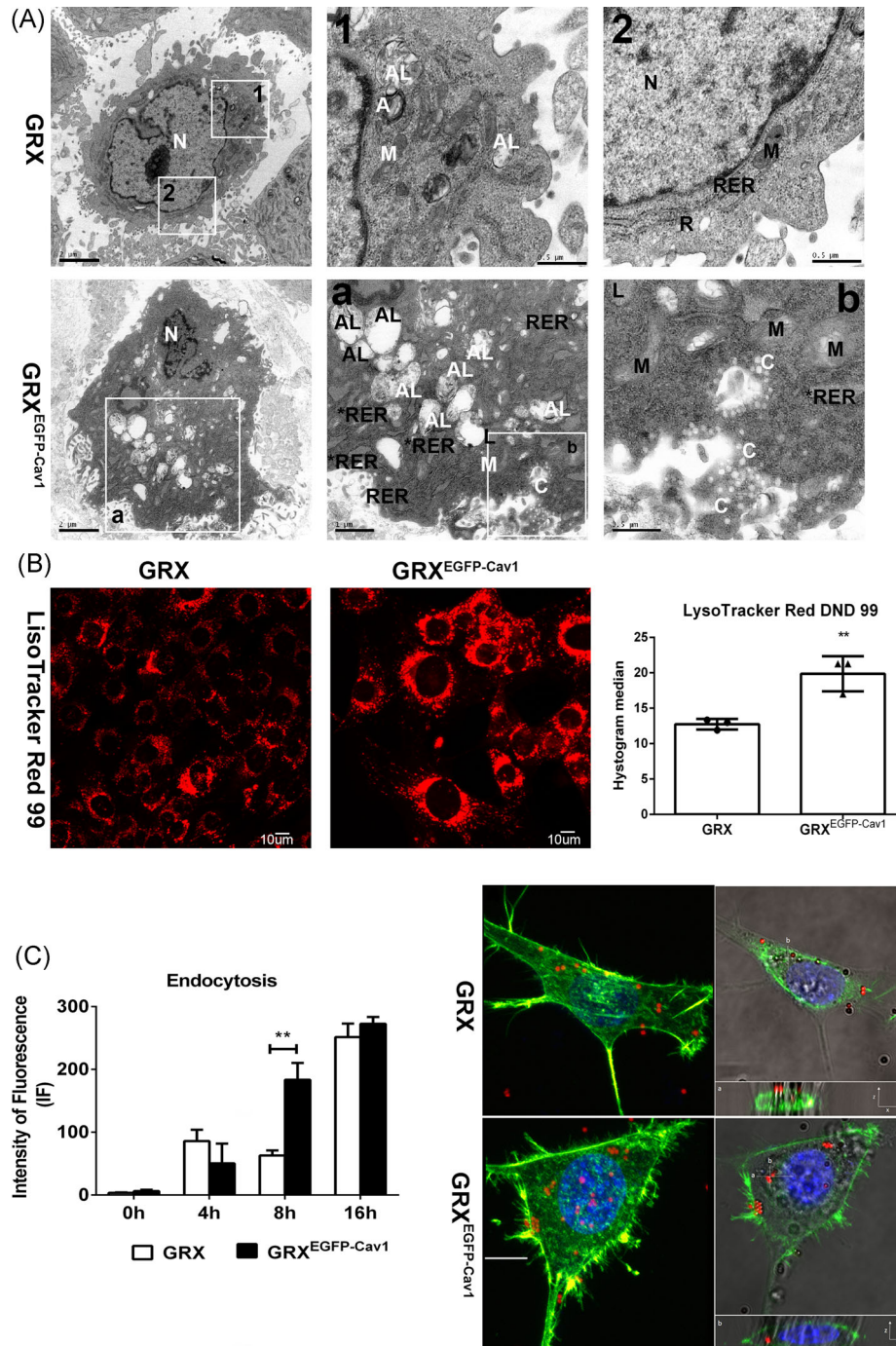


FIGURE 5 Impact of Cav-1 expression on cell morphology and endocytosis flux: A, Ultrastructural analysis assessed by TEM: Nucleus (N), mitochondria (M), autophagolysosomes (AL), mature autophagosome (A), rough endoplasmic reticulum (RER), dilated RER (RER*), caveolae (white C), lysosome (L). Scale bars, 2, 1, and 0.5 μm. B, Representative images of lysosomal function after staining with LysRed. C, 3D reconstruction revealed the FluoSpheres® inside GRX and GRX^{EGFP-Cav1}. Images represent a 3D project and the orthogonal view of GRX and GRX^{EGFP-Cav1} after incubation with FluoSpheres®, displayed using Image J software. An x,z section was demonstrated at the bottom and y,z at the right. Scale bars, 10 μm. ** P < .001. Caveolin-1, Cav-1; 3D, three-dimensional; TEM, transmission electron microscopy

after 16 hours. Phalloidin counterstaining for the three-dimensional imaging reconstruction confirmed that the FluoSpheres® were inside the cells (Figure 5C). These data indicated that exogenous expression of Cav-1 was able to accelerate the endocytosis flux in GRX^{EGFP-Cav1} cells.

4 | DISCUSSION

Our group^{22,25} has demonstrated that GRX has GFAP and Col-I expression and we show that exogenous expression of Cav-1 increases the expression of GFAP, Col-I, α-SMA

and the amount of free cholesterol in GRX^{EGFP-Cav1} cell line than in GRX. HSC have an important typical transcriptomic profile that expresses a variation of genes and proteins that differentiate these cells from others liver cells. There are well-known molecular markers for myofibroblast differentiation like the increased content of α -SMA and Col-1.⁴ In addition, GFAP is expressed *in vivo* in HSC⁷ and is increased in the chronic liver fibrotic response.^{4,8} Another characteristic involved in HSC activation is enhances of free cholesterol content. It is important to note that dilated or stressed ER is associated to the fibrogenic gene expression in HSC and to the increased autophagy during HSC activation. Indeed, ER is the cellular site of cholesterol synthesis. Cav-1 binds to cholesterol and regulates the cholesterol trafficking – import and export – to and between the plasma membrane and other cellular sites.^{4,13} Unlike in most organs, such as heart, lung, and kidney, Cav-1 operates as a pro-fibrotic role in hepatic tissue. Cav-1 binds to cholesterol and its levels are increased in cirrhosis, showing an interdependence of two molecules in the pathophysiology of liver diseases.⁴²

Cav-1 was linked to proliferation and cell cycle in several studies.¹³ Furthermore, exogenous expression of Cav-1 did not change the CPD; however, modified cell cycle through enhancing the percentual number of cells at phase S and decreasing at phase G0/G1. Indeed, Cav-1 is thought to regulate cell cycle and tumor progression through modulating of signaling by the Ras/MAPK pathway. This fact could indicate that soluble Cav-1 is carried into the nucleus, regulating gene expression. In the nucleus, Cav-1 can bind to promoters and can down-regulate the expression of genes responsible for controlling of cell proliferation, such as cyclin D1 and folate receptor.¹³

Our findings support the notion that Cav-1 modulated actin cytoskeleton, β 1 integrin, and paxillin complex by enhancing cell polarization, directional migration, adhesion proprieties, and cell-cell affinity. We showed that exogenous expression of Cav-1 increases the protein content of β 1 integrin, paxillin, and f-actin, which are important FA proteins on promoting the connection between cell cytoskeleton and ECM. In addition, we evaluated the impact of Cav-1 in the cell migration. GRX^{EGFP-Cav1} cells presented an accelerated and collective migration toward chemoattractant media and an extended abroad (lamellipodia) migration. On the other hand, GRX cells presented an extended spike-like protrusion (filopodia) and a single cell migration. In the wound healing assay, it was possible to note the formation of FA in both GRX^{EGFP-Cav1} and GRX cells. Mechanosensing is when cells transduce the mechanical proprieties to cells-ECM and cell-cell interactions through FA that are linked to actin fibers.⁴³ Integrins are an important cell adhesion proteins that act in cell-

cell and cell-ECM interactions, and are the first to be activated among FA proteins during wound healing responses.^{3,40,43} Indeed, β 1 integrin protein increase is associated with the progression of fibrotic liver diseases.⁴⁰ Cav-1 and β 1 integrin have a strong association with adhesion proprieties and migration, remodeling actin cytoskeleton and stabilizing the focal adhesion kinase at FA.³⁷ How cells collectively adjust their forces and how they sense and transduce the mechanical properties of their neighbors cells are currently under intensive investigation.⁴³

In the present study, expression of Cav-1 enhanced the number of caveolae, revealing noticeable changes in cell morphology of GRX^{EGFP-Cav1}. Accordingly, GRX^{EGFP-Cav1} cells have greater size and cytoplasmic complexity. The appearance of autophagolysosomes in GRX^{EGFP-Cav1} was higher and concomitant to the increase of lysosome revealed by the LysRed signal in comparison to GRX. Cav-1 has an extensive membrane distribution in all organelles, including lysosomes. Moreover, autophagy drives HSC activation by generating metabolic homeostasis.^{41,44}

In fact, in ours results we demonstrated that GRX^{EGFP-Cav1} cells endocytosed more FluorSpheres[®] when compared with GRX. Importantly, Cav-1 and its interactions with actin cytoskeleton and ATP play a pivotal role in the structure, formation, and function of caveolae.^{12,13,41,45,46} Although these results may be related to the increase on the caveolae number, it is possible that FluorSpheres[®] uptake can be being driven by both caveolar endocytosis or clathrin-dependent endocytosis.^{12,47}

GRX cells represent a heterogeneous population that can be induced to have majority activated or quiescent cells.^{20,25,48,49} Here, we showed for the first time that exogenous expression of Cav-1 (GRX^{EGFP-Cav1}) induced the majority of the GRX population into an activated-like HSC state. The established cell lines can have a high impact on strategy and comprehension of cellular biology, substantially contributing to novel therapeutic design for liver fibrosis study. Our results suggest that Cav-1 is a new possible candidate for molecular marker of HSC activation. Because Cav-1 is enhanced in the context of pathophysiology, an advantage on establishing a GRX model that expresses increased levels of Cav-1, is the possibility to focus on future pivotal studies and the role of Cav-1 on molecular mechanisms involved in HSC activation at cellular level. In this sense, further studies are indispensable to fully understand possible healing cooperation of Cav-1 in liver fibrosis, when rapid reversal is required. The GRX^{EGFP-Cav1} cell line is accessible to be used for research to further understand the pathology and physiopathology of liver fibrosis and its susceptibility to new available medications.

ACKNOWLEDGMENTS

Mariana Ilha is a recipient of PhD degree fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil). FCR Guma, G Lenz, LA Meira Martins, F Barbe-Tuana and F Rodhen are recipients of a research fellowship from CNPq. The authors thank Dr JL Daniotti for the donation of pCav1EGFP plasmid and Dra. Iduvirges Lourdes Müller for some ideas to this study. This study was supported by CAPES, MCT/CNPq Universal (423712/2016-0), PqG/FAPERGS 1952-2551/13 and PROPESQ-UFRGS.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there are no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and design the analysis: MI, FG. Collected data: MI, KM, FR, LM, RB. Performed the analysis: MI, FB, LM, FR, FG. Wrote the paper: MI. Contribution to the text writing: LM, GL, FB, FG.

ORCID

Mariana Ilha  <http://orcid.org/0000-0001-9741-8865>
 Francieli Rohden  <http://orcid.org/0000-0002-9232-7371>
 Leo Anderson Meira Martins  <http://orcid.org/0000-0003-0878-0489>
 Radovan Borojevic  <http://orcid.org/0000-0002-2393-7280>
 Guido Lenz  <http://orcid.org/0000-0003-4077-6316>
 Florencia Barbé-Tuana  <http://orcid.org/0000-0002-5358-3524>
 Fátima Costa Rodrigues Guma  <http://orcid.org/0000-0003-2369-7739>

REFERENCES

- Fernandez-Rojo MA, Ramm GA. Caveolin-1 function in liver physiology and disease. *Trends Mol Med*. 2016;22:889-904. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.08.007>
- Marcellin P, Kutala BK. Liver diseases: a major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening. *Liver Int*. 2018;38(Suppl 1):2-6. <https://doi.org/10.1111/liv.13682>
- Pellicoro A, Ramachandran P, Iredale JP, Fallowfield JA. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol*. 2014;14:181-194. <https://doi.org/10.1038/nri3623>
- Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:397-411. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.38>
- Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115:209-218. <https://doi.org/10.1172/JCI24282>
- Singh S, Liu S, Rockey DC. Caveolin-1 is upregulated in hepatic stellate cells but not sinusoidal endothelial cells after liver injury. *Tissue Cell*. 2016;48:126-132. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.12.006>
- Tennakoon AH, Izawa T, Wijesundera KK, et al. Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury. *Exp Toxicol Pathol*. 2013;65:1159-1171. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2013.05.008>
- Carotti S, Morini S, Corradini SG, et al. Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C. *Liver Transpl*. 2008;14:806-814. <https://doi.org/10.1002/lt.21436>
- Schuppan D, Ashfaq-Khan M, Yang AT, Kim YO. Liver fibrosis: direct antifibrotic agents and targeted therapies. *Matrix Biol*. 2018;68-69:435-451. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.04.006>
- Wang J, Schilling JM, Niesman IR, et al. Cardioprotective trafficking of caveolin to mitochondria is Gi-protein dependent. *Anesthesiology*. 2014;121:538-548. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000295>
- Kovtun O, Tillu VA, Jung W, et al. Structural insights into the organization of the cavin membrane coat complex. *Dev Cell*. 2014;31:405-419. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.10.002>
- Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors, and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14:98-112. <https://doi.org/10.1038/nrm3512>
- Fridolfsson HN, Roth DM, Insel PA, Patel HH. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB J*. 2014;28:3823-3831. <https://doi.org/10.1096/fj.14-252320>
- Bosch M, Mari M, Gross SP, Fernandez-Checa JC, Pol A. Mitochondrial cholesterol: a connection between caveolin, metabolism, and disease. *Traffic*. 2011;12:1483-1489. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01259.x>
- Gvaramia D, Blaauboer ME, Hanemaaijer R, Everts V. Role of caveolin-1 in fibrotic diseases. *Matrix Biol*. 2013;32:307-315. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2013.03.005>
- Yokomori H, Ando W, Oda M. Caveolin-1 is related to lipid droplet formation in hepatic stellate cells in human liver. *Acta Histochem*. 2019;121:113-118. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.10.008>
- Yokomori H, Oda M, Ogi M, Sakai K, Ishii H. Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. *Liver*. 2002;22:150-158. [https://doi.org/10.1588\[pil\]](https://doi.org/10.1588[pil])
- Borojevic R, Monteiro AN, Vinhas SA, et al. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1985;21:382-390.
- Elias MB, Oliveira FL, Guma FCR, Martucci RB, Borojevic R, Teodoro AJ. Lycopene inhibits hepatic stellate cell activation and modulates cellular lipid storage and signaling. *Food Funct*. 2019;10:1974-1984. <https://doi.org/10.1039/c8fo02369g>
- Guimaraes EL, Franceschi MF, Grivicich I, et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. *Liver Int*. 2006;26:477-485. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2006.01245.x>

21. Margis R, Borojevic R. Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line (GRX). *Biochim Biophys Acta*. 1989;1011:1-5. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(89\)90069-4](https://doi.org/10.1016/0167-4889(89)90069-4)[pii].
22. Mermelstein CS, Guma FC, Mello TG, et al. Induction of the lipocyte phenotype in murine hepatic stellate cells: reorganisation of the actin cytoskeleton. *Cell Tissue Res*. 2001;306:75-83.
23. Monteiro AN, Borojevic R. Interaction of human liver connective tissue cells, skin fibroblasts and smooth muscle cells with collagen gels. *Hepatology*. 1987;7:665-671. <https://doi.org/S0270913987000983>[pii]
24. Pinheiro-Margis M, Margis R, Borojevic R. Collagen synthesis in an established liver connective tissue cell line (GRX) during induction of the fat-storing phenotype. *Exp Mol Pathol*. 1992;56:108-118.
25. Borojevic R, Guaragna RM, Margis R, Dutra HS. In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1990;26:361-368.
26. Teodoro AJ, Perrone D, Martucci RB, Borojevic R. Lycopene isomerisation and storage in an in vitro model of murine hepatic stellate cells. *Eur J Nutr*. 2009;48:261-268. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0001-6>
27. da Silva FM, Guimaraes EL, Grivicich I, et al. Hepatic stellate cell activation in vitro: cell cycle arrest at G2/M and modification of cell motility. *J Cell Biochem*. 2003;90:387-396. <https://doi.org/10.1002/jcb.10642>
28. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3:1101-1108.
29. Grun LK, Teixeira NDR Jr, Mengden LV, et al. TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity. *Free Radic Biol Med*. 2018;129:286-295. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.039>
30. Peterson GL. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem*. 1979;100:201-220.
31. Heiss EH, Schilder YD, Dirsch VM. Chronic treatment with resveratrol induces redox stress- and ataxia telangiectasia-mutated (ATM)-dependent senescence in p53-positive cancer cells. *J Biol Chem*. 2007;282:26759-26766. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703229200>
32. Lee J, Twomey M, Machado C, et al. Caveolae-mediated endocytosis of conjugated polymer nanoparticles. *Macromol Biosci*. 2013;13:913-920. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300030>
33. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82:1107-1112.
34. Andrade CM, Lopez PL, Noronha BT, et al. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 knockdown increases cell migration and mRNA level of collagen I in a hepatic stellate cell line. *Cell Tissue Res*. 2011;344:279-286. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1140-7>
35. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang LV. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis Exp*. 2014;88:1-8. <https://doi.org/10.3791/51046>.
36. Meira Martins L, Vieira M, Ilha M, et al. The interplay between apoptosis, mitophagy and mitochondrial biogenesis induced by resveratrol can determine activated hepatic stellate cells death or survival. *Cell Biochem Biophys*. 2014;71:1-16. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0245-5>
37. Urra H, Torres VA, Ortiz RJ, et al. Caveolin-1-enhanced motility and focal adhesion turnover require tyrosine-14 but not accumulation to the rear in metastatic cancer cells. *PLoS One*. 2012;7:1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033085>.
38. Grada A, Otero-Vinas M, Prieto-Castrillo F, Obagi Z, Falanga V. Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *J Invest Dermatol*. 2017;137:e11-e16. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.11.020>
39. Maziveyi M, Alahari SK. Cell matrix adhesions in cancer: the proteins that form the glue. *Oncotarget*. 2017;8:48471-48487. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17265>
40. Yeh YC, Ling JY, Chen WC, Lin HH, Tang MJ. Mechanotransduction of matrix stiffness in regulation of focal adhesion size and number: reciprocal regulation of caveolin-1 and beta1 integrin. *Sci Rep*. 2017;7:1-14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14932-6>.
41. Shi Y, Tan SH, Ng S, et al. Critical role of CAV1/caveolin-1 in cell stress responses in human breast cancer cells via modulation of lysosomal function and autophagy. *Autophagy*. 2015;11:769-784. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1034411>
42. Shihata WA, Putra MRA, Chin-Dusting JPF. Is there a potential therapeutic role for caveolin-1 in fibrosis? *Front Pharmacol*. 2017;8:567-575. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00567>.
43. DePascalis C, Etienne-Manneville S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions. *Mol Biol Cell*. 2017;28:1833-1846. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-03-0134>
44. Luo X, Wang D, Zhu X, et al. Autophagic degradation of caveolin-1 promotes liver sinusoidal endothelial cells defenestration. *Cell Death Dis*. 2018;9:576-593. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0567-0>.
45. Nwosu ZC, Ebert MP, Dooley S, Meyer C. Caveolin-1 in the regulation of cell metabolism: a cancer perspective. *Mol Cancer*. 2016;15:71-83. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0558-7>.
46. Sinha B, Koster D, Ruez R, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*. 2011;144:402-413. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.031>
47. Cheng JP, Nichols BJ. Caveolae: one function or many? *Trends Cell Biol*. 2016;26:177-189. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.010>
48. Martucci RB, Ziulkoski AL, Fortuna VA, et al. Beta-carotene storage, conversion to retinoic acid, and induction of the lipocyte phenotype in hepatic stellate cells. *J Cell Biochem*. 2004;92:414-423. <https://doi.org/10.1002/jcb.20073>
49. Bitencourt S, deMesquita FC, Caberlon E, et al. Capsaicin induces de-differentiation of activated hepatic stellate cell. *Biochem Cell Biol*. 2012;90:683-690. <https://doi.org/10.1139/o2012-026>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section.

How to cite this article: Ilha M, Moraes KdS, Rohden F, et al. Exogenous expression of caveolin-1 is sufficient for hepatic stellate cell activation. *J Cell Biochem*. 2019;1-13. <https://doi.org/10.1002/jcb.29226>

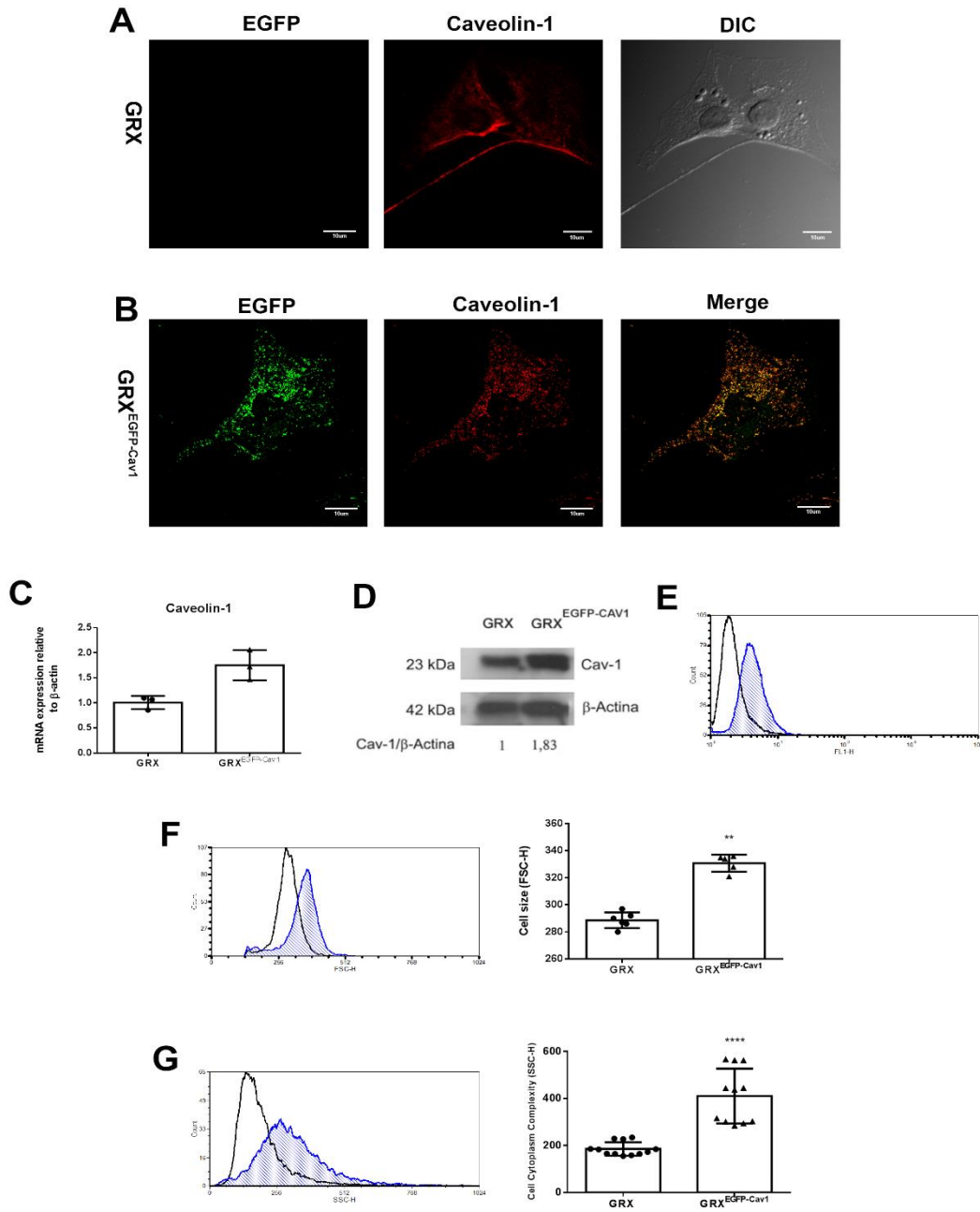


Figure Supplementary 1: The Successful for transfection the pCav1EGFP in GRX cell line A) GRX cells, which normally express Cav-1 immunolabelled in red. B) Co-localization between the green EGFP-Cav1 and immunolabelled in red Cav-1 (Pearson's ratio 0.82 ± 0.02) confirm the success of transfection. Scale bar $10 \mu\text{m}$. C) Total mRNA of Caveolin-1 was graphically presented. D) Equal cell lysates for GRX and GRX^{EGFP-Cav1} were prepared and the caveolin-1 protein content was detected by immunoblotting analysis, normalized by β -actin protein content. Data was graphically presented. E) We also confirm the green fluorescence expression (FL1-H) of pCav1EGFP plasmid by flow cytometry. F-G) Analysis of FSC-H (forward scatter, cell size) and SSC-H (side scatter, cytoplasmic complexity). Data in black is GRX and data with blue hatched area is GRX^{EGFP-Cav1}. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

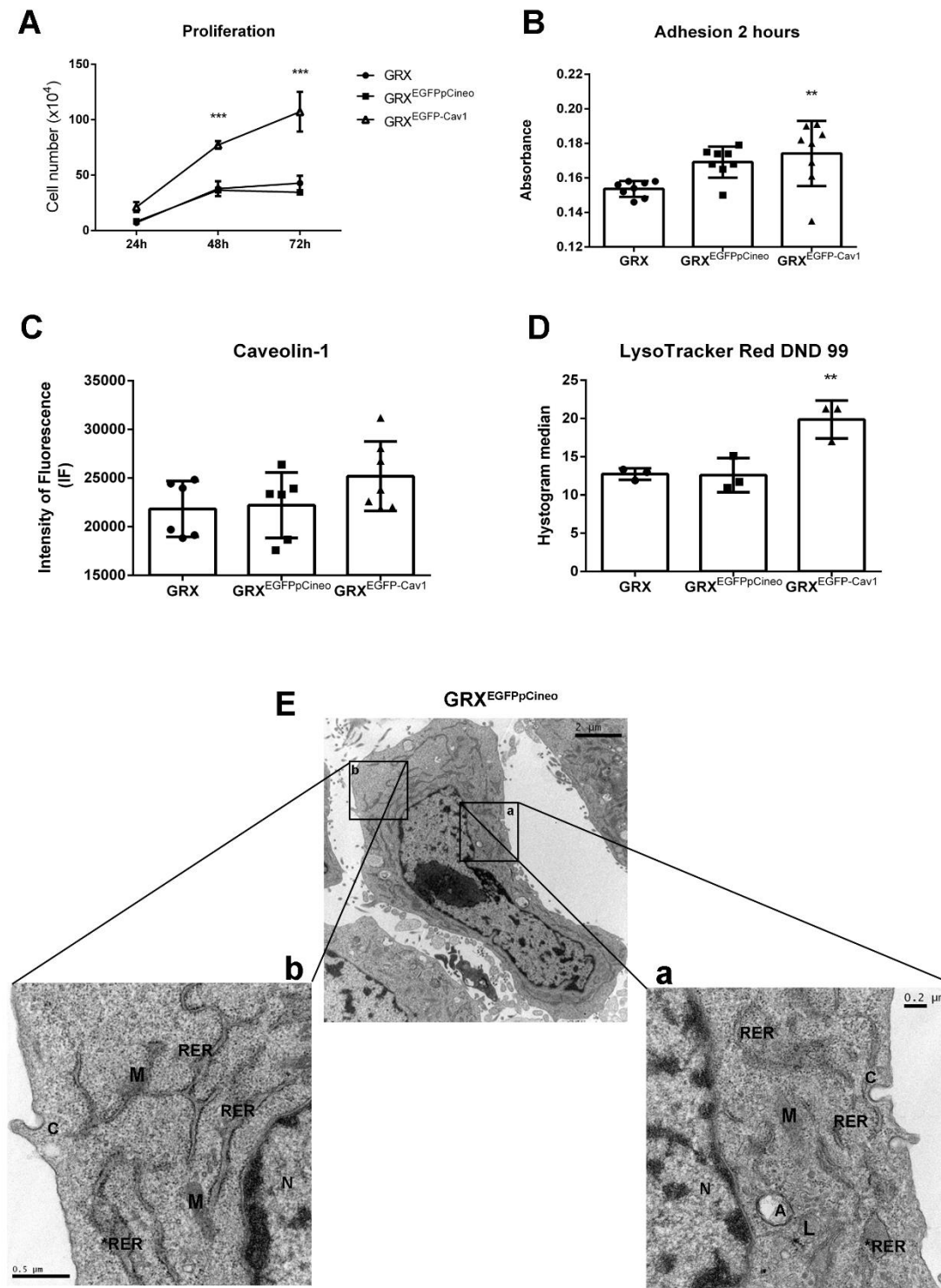


Figure Supplementary 2: Expression of EFGRP did not causes changes in GRX cell line. A) Cell proliferation of GRX, GRX^{EGFPpCineo} and GRX^{EGFP-Cav1} after 24, 48 and 72 hours of culture. B) Cell adhesion measured by Sulphorhodamin B. assay after 2 hours after plating. C) Cells were immunolabelled for Cav-1 with Alexa Fluor 555 secondary antibody. Intensity of fluorescence (IF) were quantified by ImageJ software. Cellular IF means \pm SD were presented. D) Lysosomal function was acquired after staining with LysRed for 30 min by flow cytometer. E) Ultrastructural analysis of GRX^{EGFPpCineo} assessed by TEM: Nucleus (N), mitochondria (M), mature autophagosome (A), rough endoplasmic reticulum (RER), dilated RER (RER*), caveolae (C), lysosome (L). Scale bars, 2 μ m, 0,5 μ m and 0,2 μ m. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

4. Capítulo 2

*Resultados: Desenvolvimento do Sistema de Cultura Celular de Esferoide e
Localização de Cav-1 e GFAP*

As culturas de esferoides vem sendo cada vez mais utilizadas por suas similaridades com as culturas *in vivo*, pois as células exploram as três dimensões do espaço, aumentando assim a interação com o microambiente no qual elas se inserem e com as células vizinhas (Amaral et al 2010, Vinci, Gowan et al. 2012). Para analisar estas interações, o aumento da afinidade célula-célula, e testar a linhagem que superexpressa a Cav-1 proposta anteriormente, foram realizados os experimentos de formação e migração de esferoides. Também, através de imunomarcação com ouro coloidal de Cav-1 e GFAP podemos visualizar a localização celular destas importantes proteínas de ativação.

4.1 Materiais e Métodos

4.1.1 Desenvolvimento do Sistema de Cultura Celular de Esferoide:

Os esferoides foram desenvolvidos conforme reportado por (Vinci, Gowan et al. 2012). Brevemente, foi adicionado 200µl de agarose 1% (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA) com pipeta multicanal na placa de 96 poços com fundo redondo próprio para preparação de esferoides e retirado imediatamente. As placas foram secadas a temperatura ambiente e deixadas na luz UV por 15min e depois as células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} foram semeadas nas densidades de 3 x 10³, 6 x10³ e 9 x10³ células por poço. Para análise do tamanho e forma dos esferoides foi escolhida a densidade de 9 x10³ células por poço. A formação dos esferoides foi monitorada nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas, imagens foram capturadas em microscópio óptico invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse TE300) e analisadas pelo software ImageJ (National Institute of Health, Rockville Pike, Bethesda, Maryland, EUA).

4.1.2 Ensaio de Migração de Esferoides sobre plástico ou sobre Matriz de Proteína

Para o ensaio de migração celular a partir dos esferoides, após 96 horas da semeadura, os esferoides formados foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo plano recobertas ou não com 0,1% (v/v) de gelatina (Invitrogen Inc., Carlsbad, CA, USA). A migração sobre matriz proteica foi avaliada no 4º, 6º 12º dia de cultura e após 4 dias quando sobre plástico. A migração foi avaliada em microscópio óptico invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse TE300).

4.1.3 Análise Morfológica Externa dos Esferoides por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

Para a análise da morfologia externa, os esferoides das células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} foram fixados com glutaraldeído 10% (TP 0,1M). Após, as culturas foram pós fixadas com ósmio 2%, e desidratadas gradualmente em acetona. Para dessecação, os esferoides foram fixados em lamínulas e dessecados, ao ponto crítico, com CO₂ líquido, e metalizados com ouro, seguindo o protocolo padrão. A preparação das amostras e as análises foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS (CMM-UFRGS) no microscópio eletrônico de varredura (MEV, JSM 6060, Jeol)

4.1.4 Análise Ultraestrutural dos Esferoides por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para as análises ultraestruturais, os esferoides das células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} foram fixadas com paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em TP 0,1% por 24 horas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio. Após, as amostras foram desidratadas, emblocadas em resina epóxi e cortadas por ultramicrotomia (Ilha, Moraes et al. 2019). Os cortes de 70nm 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 e Microanálise da UFRGS (CMM -UFRGS) no microscópio eletrônico de transmissão (MET; JEM 1200EXII, Jeol).

4.1.5 Análise da Localização Subcelular da Cav-1 e GFAP

A localização subcelular das proteínas Cav-1 e GFAP nas linhagens GRX e GRX^{EGFP-Cav1} foi realizada conforme Wilson and Basic 2012. Brevemente, as células foram imunomarcadas com anticorpo primário de concentração 1:500 para a anti-Cav-1 anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) e GFAP anti-rabbit (GFAP, ZO334 Glostrup, Denmark) com anticorpo secundário conjugado com ouro coloidal 1:50 (Immunogold) (para Cav-1, anti- mouse IgG conjugado com partículas de ouro de 10nm; e para GFAP, anti-rabbit IgG conjugado com partículas de ouro de 5nm, Sigma- Aldrich). As análises foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise da UFRGS (CMM-UFRGS) no microscópio eletrônico de transmissão (MET; JEM 1200EXII, Jeol).

4.2 Resultados e Discussão:

4.2.1 A superexpressão de Cav-1 aumentou afinidade célula-célula, induziu a formação de esferoides maiores e inibiu a migração

Devido aos resultados anteriores que demonstraram que a GRX^{EGFP-Cav1} apresentava maior afinidade célula-célula quando comparadas com a GRX (Ilha et al, 2019), o crescimento em 2D das duas linhagens foi analisado através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Podemos notar claramente na figura 8 que as células que superexpressam a Cav-1 apresentaram uma maior afinidade célula-célula, reforçando resultados anteriores mostrados por microscopia óptica (Ilha et al, 2019).

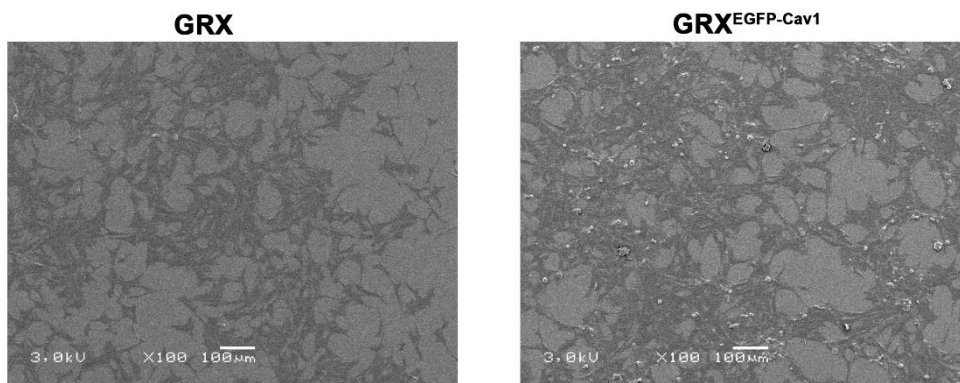


Figura 8: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de monocamadas de células GRX e GRX^{EGFP-Cav1}. A célula GRX mostra característica típica de uma cultura semi-confluenta de miofibroblastos. A imagem da cultura de GRX^{EGFP-Cav1} mostra seu aumento de afinidade célula-célula com a presença de grumos (*clusters*) celulares.

As culturas de esferoides vem sendo cada vez mais utilizadas por sua similaridade com a arquitetura das células *in vivo* (Vinci, Gowan et al. 2012). O diferencial das culturas de esferoides 3D é permitir que as células explorem as três dimensões do espaço, aumentando assim a interação com o microambiente e as células vizinhas (Amaral et al 2010). Para analisar esta interação e testar a linhagem proposta anteriormente, foram realizados os experimentos de formação de esferoides como descrito por (Vinci, Gowan et al. 2012). Através das imagens de microscopia óptica, verificou-se a formação de esferoides nas linhagens GRX, GRX^{EGFP-Cav1} e GRX^{EGFPpCineo} (controle da superexpressão) nas primeiras 24 horas após a semeadura em placas revestidas em agarose 1% (Figura 9A-B). A mensuração do tamanho dos esferoides foi realizada pelo

software Image J em 24, 48 e 72 horas de cultura celular. Como mostra a figura 9A-B, o tamanho dos esferoides das GRX^{EGFP-Cav1} foi significativamente maior quando comparadas com as linhagens GRX^{EGFPpCineo} e GRX, mantendo-se assim ao longo das 72 horas de cultura celular. Como já mencionado anteriormente e descrito por Ilha, Moraes *et al.* 2019 a linhagem que superexpressa Cav-1 tem maior afinidade célula-célula, pela modulação de proteínas de adesão como a paxilina e a integrina $\beta 1$ (I β 1). A Cav-1 também faz ligação com outras proteínas de adesão como as E-caderinas que também podem estar sendo alteradas (Parton and Dal pozo 2013). No entanto, o tamanho dos esferoides das duas linhagens foi diminuindo ao longo do tempo, sugerindo um aumento na compactação celular com o tempo de cultura (figura 9A-B). Em experimentos onde as linhagens foram plaqueadas em placas de petry não aderentes (dados não mostrados), a GRX^{EGFP-Cav1} formou esferoides mais rapidamente que a linhagem GRX.

Para avaliar a migração, após as 96 horas de incubação, os esferoides foram transferidos para placas aderentes de fundo liso, recobertas ou não com gelatina 0,1% v/v. A migração sobre uma matriz proteica (placas com gelatina) foi avaliada após 4, 6 e 12 dias (Figura 9C). Sendo que, já aos 4 dias, nos esferoides de células GRX a migração é visivelmente maior se comparada com as GRX^{EGFP-Cav1}. Nas células GRX, após 12 dias, as imagens mostram a formação de uma aureola compatível com um padrão radial de migração. Em placas de fundo liso e não recobertas com gelatina os dois tipos celulares apresentaram um padrão disperso de migração, repetindo o resultado anterior (Figura 9C), as GRX^{EGFP-Cav1} migram menos que a GRX (Figura 9D). A superexpressão da Cav-1 e a presença de um microambiente em 3D, formação dos esferoides, mostrou novamente o aumento da interação célula-célula e diminuição da migração de células para o substrato do plástico. Estes resultados reforçam os dados anteriores de migração obtidos através do experimento de *Wound-healing*, onde as células GRX^{EGFP-Cav1} abriam um espaço maior da camada celular, com aumento da afinidade célula-célula dependente da confluência celular (Ilha, Moraes *et al.* 2019). O papel da Cav-1 na migração celular ainda continua controverso. Existem muitos dados na literatura indicando que a Cav-1 promove a migração em vários tipos celulares incluindo, fibroblastos, células endoteliais e células derivadas de tumores dependentes da presença da Tyr14 da Cav-1. Alternativamente a inibição da migração é observada em astrócitos, carcinoma de endotélio e pancreático e células metastáticas de câncer de mama. Em células metastáticas de adenocarcinoma mamária, a presença da Cav-1 é associada com a extensão reduzida das protrusões

celulares e a migração com a estimulação de EGF. Em câncer hepatocelular, a associação da Cav-1 com a invasão e sobrevivência foi relatada com o aumento da expressão de MMP (Urra, Torres et al. 2012).

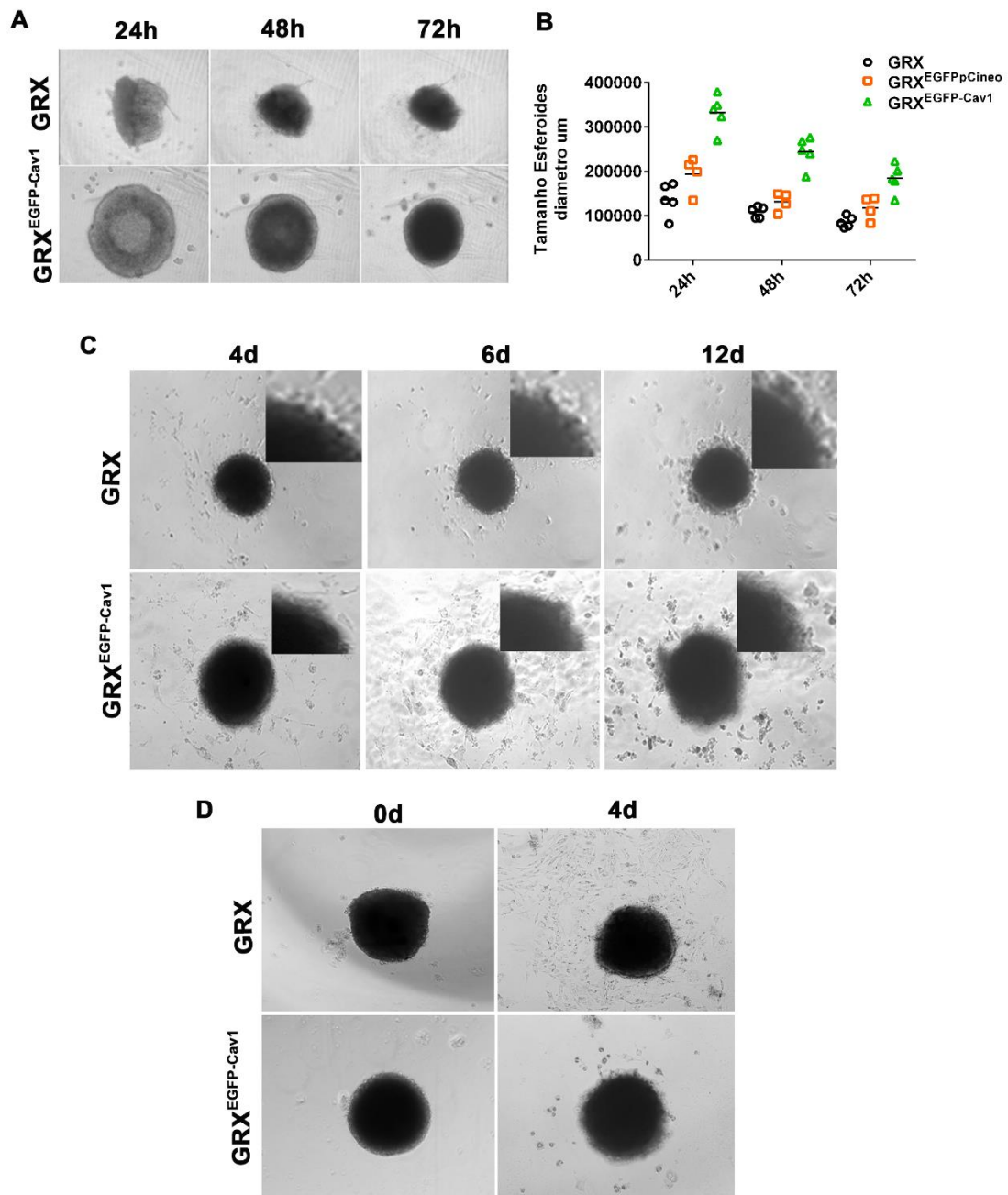


Figura 9: A superexpressão de Cav-1 aumentou afinidade célula-célula, induziu a formação de maiores esferoides e inibiu a migração. A) A formação de esferoides das células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} em 24, 48 e 72h de cultura celular. B) As células GRX^{EGFP-Cav1} formaram esferoides maiores em todos os tempos celulares em comparação a GRX e GRX^{EGFPpCineo}. As imagens foram quantificadas pelo software ImageJ. C) Células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} no experimento de migração em placas revestidas com gelatina em 4, 6 e 12 dias de cultura celular. As células GRX apresentaram uma auréola compatível com padrão de migração radial. As células GRX^{EGFP-Cav1} apresentaram padrão de migração difusa. D) As células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} no experimento de migração sobre plástico em 0 e 4 dias de cultura celular. As células GRX apresentaram maior migração sobre o plástico do que as células GRX^{EGFP-Cav1}. Aumento de 200x.

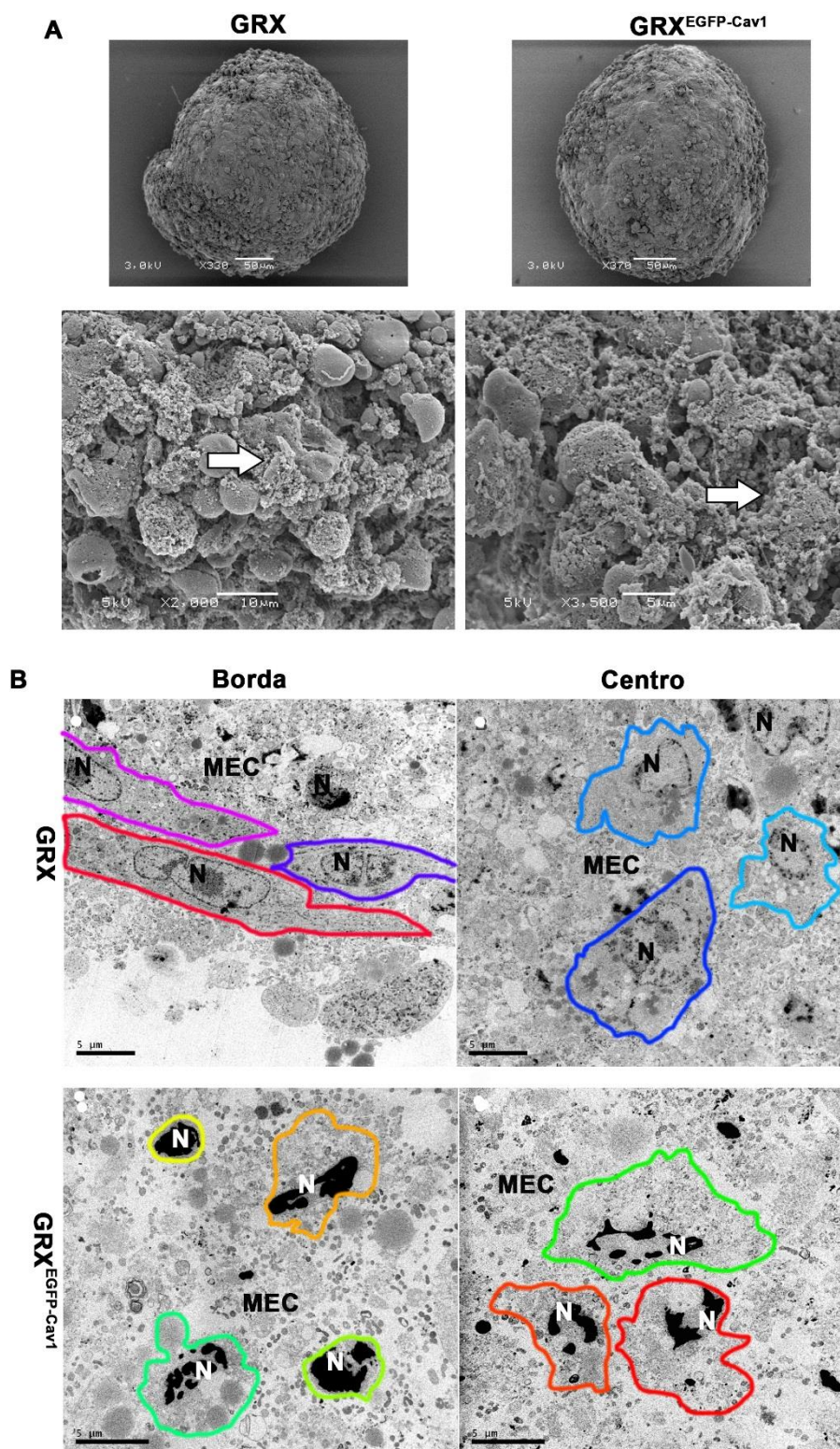


Figura 10: Morfologia externa e interna da cultura dos esferoides. A) As células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} através da MEV mostram um formato arredondado e produção de matriz extracelular (MEC) acentuada nas duas linhagens. Magnificação 5, 10 e 50 μm. B) As células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} através da MET mostram o conteúdo celular e a morfologia celular da parte da borda e do centro dos esferoides. Ambas as células foram sinalizadas e marcadas em pintura colorida para melhor visualização da delimitação dos seus citoplasmas. As células GRX apresentaram na borda celular maior contato entre célula-célula, produção de MEC e núcleos inteiros. Já na parte do centro há um maior

espaçamento entre as células e núcleos celulares inteiros. As células GRX^{EGFP-Cav1} apresentaram tanto na borda quanto no centro do esferoide um maior extravasamento do conteúdo citoplasmáticos, maior produção de MEC e maior espaçamento celular com núcleos (N) picnóticos e eletrodensos. Magnificação 5 µm.

Em alguns tipos de cânceres, como por exemplo, câncer de mama, a superexpressão de Cav-1 inibe a metástase, a adesão, a proliferação e a migração celular, enquanto em outros tipos de câncer a Cav-1 foi reportada a induzir este fenômeno (Gupta, Toufaily et al. 2014). Concluímos que com a superexpressão de Cav-1 e a interação com um microambiente em 3D, houve um aumento da interação célula-célula e uma diminuição da migração das células GRX^{EGFP-Cav1} para o substrato plástico em comparação as células GRX.

Para visualizar o formato e a produção de MEC na cultura dos esferoides, as células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} após 4 dias de cultura celular em placas de fundo U e agarose 1%, foram preparadas para MEV e MET. Através da MEV podemos visualizar a produção de MEC na superfície dos esferoides nas duas linhagens celulares (Figura 10A). Logo após, as culturas de esferoides foram preparadas para a MET para uma análise da morfologia interna. (Figura 9B). Na parte cortical dos esferoides de células GRX foram observadas células intactas, evidenciando o contato entre células. Já na parte medular do esferoide, há um maior espaçamento entre as células, produção de MEC e um extravasamento do conteúdo citoplasmático. Já nos esferoides de células GRX^{EGFP-Cav1}, tanto na parte cortical quanto na parte medular, encontramos células com núcleos picnóticos e eletrodensos característicos de vias de morte por hipóxia e apoptose/necrose, extravasamento do conteúdo citoplasmático e com muita produção de MEC. Com isso, podemos concluir que as culturas de esferoides são ótimas ferramentas experimentais para serem utilizadas futuramente em testes para reversão do fenótipo ativado ou das vias de apoptose/necrose com drogas, fármacos e interações com outros tipos celulares.

4.2.2 Localização celular de Cav-1 e GFAP

Nossos resultados anteriores mostraram que pela técnica de transfecção com o plasmídeo pCav1EGFP nas células GRX houve um aumento de 83% da expressão proteica de Cav-1 (Ilha, Moraes et al, 2019). Para confirmar a localização subcelular de Cav-1 foi utilizado a técnica da imunomarcção com partículas de ouro pela MET.

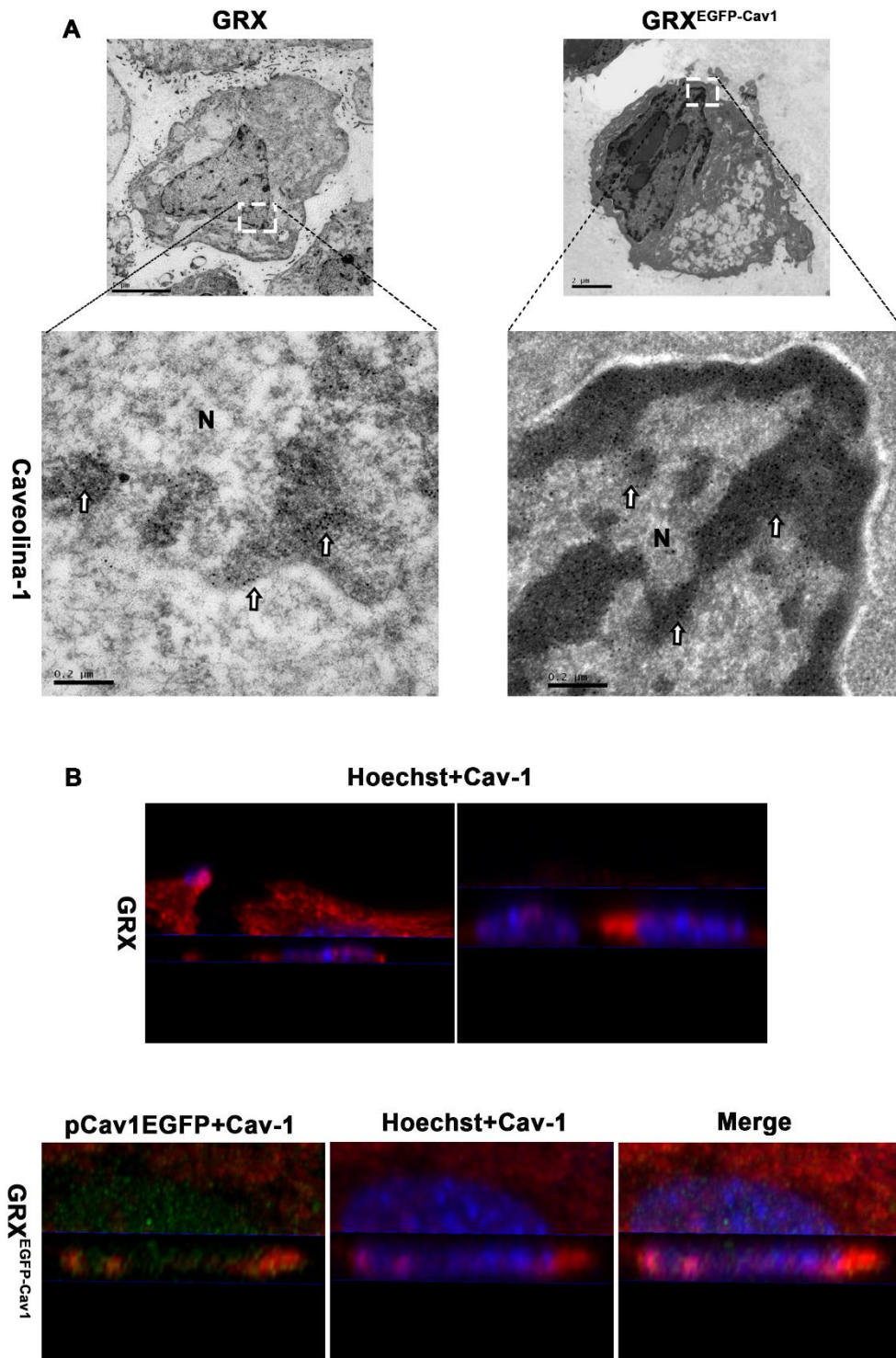


Figura 11: A localização de Cav-1 no núcleo celular. A) A localização celular de Cav-1 pela técnica da imunomarcacão por partículas de ouro. As células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} com imunomarcacão de partículas de ouro marcadas com Cav-1 na heterocromatina nuclear (Setas vazadas pretas). Núcleo em (N). Magnificacão 2 e 0,2μm. B) Imagens das células GRX e GRX^{EGFP-Cav1} por microscopia confocal com expressão de Cav-1 por imunocitoquímica em vermelho. Reconstrucao tridimensional da varredura do eixo Z, mostrando a localizacão de Cav-1 dentro do núcleo celular. As GRX^{EGFP-Cav1} com expressao do plasmideo pCav1EGFP em verde. Núcleos marcados com Hoechst e anticorpo secundario para Cav-1 por Alexa Fluor 555. Aumento de 60x.

Surpreendentemente foi notado uma intensa imunomarcção de Cav-1 na heterocromatina nas duas linhagens GRX e GRX^{EGFP-Cav1}, porém ela aparece mais frequentemente na célula que superexpressa a Cav-1, GRX^{EGFP-Cav1} (Figura 11A). A Cav-1 está presente no núcleo como reguladora gênica e corresponde a uma extensão de função das caveolinas, provindas das membranas plasmáticas das caveolas. Muitos receptores de diversas funções celulares encontram-se dentro das caveolas, e sob ativação estes levam os sinais através da endocitose, translocando-se para o núcleo (Fridolfsson, Roth et al. 2014). As células que superexpressam a Cav-1 apresentaram maior imunomarcção de Cav-1 na heterocromatina e dispersas no citoplasma (Figura 11A). Através da imunocitoquímica por microscopia confocal foi possível fazer uma reconstituição em 3D, mostrando a localização do nuclear da Cav-1 em vermelho, (imunomarcada com alexafluor 555), verde do plasmídeo pCav1EGFP, e o núcleo (azul) marcada com Hoechst (Figura 10B). Estes resultados corroboram com a ativação das HSCs, já que a Cav-1 regula a expressão gênica de alguns receptores como PDGF, VEGF e EGF, situados nas caveolas e translocados junto com a Cav-1 para o núcleo na ativação celular.

Em nosso trabalho, através da imunocitoquímica foi visualizado um aumento significativo da expressão de GFAP nas células que superexpressam a Cav-1, GRX^{EGFP-Cav1} em comparação com a GRX (Ilha, Moraes et al, 2019). Estudos anteriores do nosso grupo mostraram que há expressão de GFAP na linhagem GRX (Mermelstein, Guma et al. 2001). Para confirmar a localização subcelular de GFAP foi utilizada a técnica da imunomarcção com ouro coloidal pela MET, onde a distribuição pelo citoplasma da marcação aparece nas duas linhagens (Figura 12A). A GFAP, uma proteína dos filamentos intermediários do tipo III (FI), comumente expressa em astrócitos no sistema nervoso central, é expressa *in vivo* no fígado e também nas HSCs quiescentes (Carotti, Morini et al. 2008). Alguns trabalhos com lesões fibróticas hepáticas, o número de células GFAP positivas aumentou consideravelmente. Nesse mesmo trabalho foi mostrado que em dupla marcação de imunofluorescência, houve aumento também de proteínas como a vimentina, desmina e α -SMA. Na fibrose hepática, as HSCs se transformam em miofibroblastos expressando altos níveis de GFAP (Tennakoon, Izawa et al. 2013). Estas análises corroboraram com os resultados obtidos até agora de que a Cav-1 está relacionada com a conversão fenotípica para um estado mais ativado das HSCs.

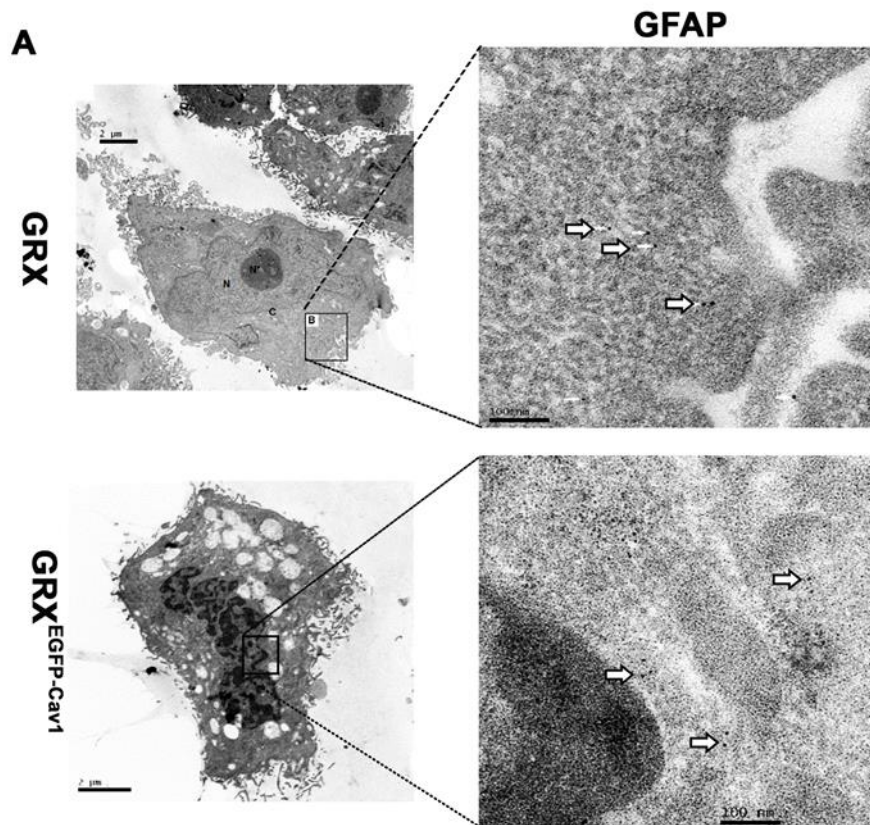


Figura 12: A localização de GFAP no citoplasma de células GRX e GRX^{EGFP-Cav1}. Localização celular de GFAP pela técnica da imunomarcção por partículas de ouro coloidal. As setas vazadas pretas mostram a presença de partículas de ouro, mostrando a presença de GFAP no citoplasma celular. Núcleo em (N). Magnificação 2 e 0,2 μ m.

5. Capítulo 3

Artigo em preparação

Mitochondrial-associated ER membranes (MAM), mitochondrial respiration and dynamics are influenced by caveolin-1 in hepatic stellate cells

MITOCHONDRIAL-ASSOCIATION ER MEMBRANES (MAM),
MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND DYNAMICS ARE INFLUENCED BY
CAVEOLIN-1 IN HEPATIC STELLATE CELLS

Mariana Ilha^a, Ketlen da Silveira Moraes^a, Camila Kehl Dias^a, Marcos Paulo Thomé^b
Fernanda Petry^a, Francieli Rohden^a, Leo Anderson Meira Martins^a, Radovan Borojevic^c,
Vera Maria Treis Trindade^a, Guido Lenz^b, Fábio Klamt^a, Florencia Barbé-Tuana^{a,d},
Fátima Costa Rodrigues Guma^{a,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Departamento de Biofísica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

^c Centro de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^d Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Escola de Ciências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul- PUCRS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^e Faculdade Arthur Sa Earp Neto Faculdade de Medicina de Petropolis, RJ, Brasil.

Corresponding author:

Mariana Ilha

Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS

Rua Ramiro Barcelos, 2600 – anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brasil

Telephone: +55 (51) 3308.5545

Fax: +55 (51) 3308.5535

E-mail: mariana.ilha@ufrgs.br

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and design the analysis: MI, FG. Collected data: MI, KM, CD, MT, FP, FR,

RB, VM, LM. Performed the analysis: MI, CD, FB, LM, FR, FG. Wrote the paper: MI.

Contribution to the text writing: LM, GL, FB, FK, FG.

ABSTRACT

Caveolin-1 (Cav-1) is an integral membrane protein present in all organelles such as Golgi complex, lysosomes, nucleus, caveolae, mitochondria and mitochondrial-associated membranes (MAM) with ER that regulates and integrates multiple signals as a platform. MAM dysfunction and increased of Cav-1 expression has been associated with liver disease. This work aimed to evaluate the role of Cav-1 in cellular respiration, mitochondrial network morphology and contact sides with MAM. We report that both exogenous expression and knockdown of Cav-1 in GRX cells presented high-OXPHOS metabolism, changed mitochondrial cholesterol content and network. We also demonstrated DRP1, MNF1, OPA1 and RnR₂ mRNA expression. DRP1 differs when Cav-1 is up regulated in GRX cells. Finally, a difference in mitochondria and MAM morphology in ultrastructural analysis was observed, suggesting that Cav-1 biology is involved in mitochondria, MAMs function, cell homeostasis in HSC activation being a potential molecular marker for liver diseases.

Keywords: caveolin-1, cholesterol, bioenergetics, mitochondria respiration, MAM, GRX, hepatic stellate cells, liver fibrosis

1) INTRODUCTION

The most important organelle that regulates cell metabolism and metabolic demands are the mitochondria, by which the oxygen consumption occurs through the electron transport system (ETS) that is firmly coupled to the production of ATP. Mitochondrial respiration is driven by key process such as the production of reactive oxygen species (ROS), the oxidative phosphorylation, the ion gradient, the heat dissipation and the membrane potential (Pesta and Gnaiger 2012). In addition, cholesterol levels in mitochondria membrane are approximately 40-fold lower than plasma membrane and this molecule are essential for biogenesis, bioenergetics and membrane maintenance of mitochondria (Martin, Kennedy et al. 2016). These incredible and dynamic networking organelles adjust in response to environmental stresses and changes in states for maintain balance between fusion and fission process and health of mitochondria population. Dynamin 1-like protein (DRP1) is an important regulator of mitochondrial fission and GTPases such as mitofusin 1 (MNF1) and 2 (MNF2) and optic atrophy protein 1 (OPA1) control the opposite process, mitochondrial fusion (Mishra and Chan 2014; Jang, Seeger et al. 2017).

Caveolin-1 (Cav-1) is an integral protein of 22kDa responsible for stabilizing signals through acting as a platform signaling (Parton and del Pozo 2013). This protein is located in all membranes and is critical for the function of all organelles, including caveolae, lipid rafts, Golgi complex, lysosomes, endoplasmic reticulum (ER), and mitochondria (Fridolfsson, Roth et al. 2014). In addition, Cav-1 plays an important role in the traffic of cholesterol to other cellular sites, being important to homeostasis of the intracellular membrane system (Shi, Tan et al. 2015; Fernandez-Rojo and Ramm 2016). Importantly, cholesterol enters into mitochondria through specialized extensions of ER enriched by Cav-1, named mitochondrial-associated membranes (MAM), which have interconnection with inorganic ions, calcium fluxes, and lipids, thus coordinating numerous signaling pathway, metabolic status, and cellular processes (Sala-Vila, Navarro-Lerida et al. 2016).

Hepatic stellate cells (HSC) are the major producers of extracellular matrix (ECM) in response to a damage during liver fibrosis (Singh, Liu et al. 2016). HSC become more activated through differentiating from quiescent vitamin-A-depositing cells to myofibroblasts, which are inflammatory, chemotactic, and proliferative cells, thus expressing a range of markers like desmin, type I collagen (Col-I), glial fibrillary acidic

protein (GFAP), and α smooth muscle actin (SMA- α) (Tsuchida and Friedman 2017). GRX line is a murine HSC model (Borojevic, Monteiro et al. 1985) and is an excellent tool for liver fibrosis mechanism study because these cells can be driven to display the HSC quiescent-like phenotype (Margis, Pinheiro-Margis et al. 1992) or to express the HSC more activated-like phenotype (Guimaraes, Franceschi et al. 2006) by different stimulus. In a previous work of our group, we introduce a new HSC model, the GRX^{EGFP-Cav1}, obtained from exogenous expression of Cav-1. Thought evaluating classical markers, Cav-1 was sufficient to induce the GRX to express some activation parameters. In this way, we proposed Cav-1 to be a possible new molecular marker for HSC activation (Ilha, Moraes et al. 2019).

Cav-1 exerts an important hepatic function and its expression is increased in both sinusoidal endothelial cells and HSC of cirrhotic livers (Yokomori, Oda et al. 2002; Yokomori, Ando et al. 2019). In addition, genetic ablation of CAV-1 has been shown to increase the cholesterol content of liver and mouse embryonic fibroblast (MEF) mitochondria, which leads to a reduced mitochondrial respiration. Therefore, cholesterol accumulation in liver mitochondria in Cav-1^{-/-} mice suggests that this phenomena might also occur within hepatocytes (Fernandez-Rojo and Ramm 2016), but it is not described in HSC. In this way, increasing evidences link MAM dysfunction to complex diseases, such as neurodegenerative disorders, diabetes, cancer, and liver diseases. MAM dysregulation and ER stresses in the liver has been proposed to contribute to hepatosteatosis, hepatitis C infection, and hepatocarcinoma (Sala-Vila, Navarro-Lerida et al. 2016). In light of these observations, we hypothesized that Cav-1 regulates ER-mitochondria interaction, mitochondrial network morphology and respiration by modulating mitochondrial cholesterol content in hepatic stellate cells.

2) MATERIALS AND METHODS

2.1) CELL CULTURE

The GRX cell line was established by Borojevic *et al* (Borojevic, Monteiro et al. 1985) and kindly provided by the Cell Bank of Rio de Janeiro (HUCFF, UFRJ, RJ, Brazil). Cells were routinely maintained in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% FBS and 2g/L HEPES

buffer, gentamicin 50µg/mL, fungizone 250µg/mL, pH 7.4, at 37°C and 5% CO₂. All culture reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2) PREPARATION OF STABLE GRX^{EGFP-Cav1} AND GRX^{GFPshCav1} CELL LINE

2.2.1) *Overexpression of Caveolin 1*

To establish the GRX^{EGFP-Cav1} cell line that constitutively overexpresses Caveolin-1, we used pCav1EGFP (kindly provided by Dr J. Daniotti, Cordoba University, Argentina) cloned into the recombinant plasmid pcDNA3.1TOPO (Invitrogen) previously described (Ilha, Moraes et al. 2019). pCI-neo:EGFP (pCI-neo Mammalian Expression Vector, Promega) that expresses EGFP was used as the control plasmid.

2.2.2) *Caveolin gene knockdown*

Short hairpin RNA (shRNA) lentiviral vectors were used in order to silence CAV-1 with the lentiviral transduction particles from the Mission shRNA library from Sigma-Aldrich (clone NM_007616.2-487s1c1). Mission shRNA non-target (pLKO.1-neo-CMV-tGFP) was used as a non-silencing control. GRX^{GFPshCav1} and GRX^{NT} cells were generated by lentiviral infection and cells selected with G-418 (G8168 Sigma-Aldrich) (1000 µg/ml) to generate stable shRNA-expressing pools, as previously described (Thome, Filippi-Chiela et al. 2016). Knock down was confirmed by immunofluorescence staining and Real Time RT-PCR.

2.3) QUANTITATIVE REAL TIME RT-PCR

Total RNA (from 10⁶ cells) was extracted using TRIzol Reagent (Invitrogen) and was reverse transcribed with SuperScript-II (Invitrogen). RNA expression levels were quantified using SYBR Green on StepOne Plus real-time cycler (Applied-Biosystems, Grand Island, NY). The gene expression was evaluated by the software geNorm (Vandesompele, De Preter et al. 2002). GeNorm is a Microsoft Excel application that provides a gene stability measure (M value) and ranks the tested genes by stepwise exclusion of the gene with highest M value. geNorm analysis ranked as the most stable genes, that were used as reference genes. Samples were analyzed using the $\Delta\Delta C_t$ method (Schmittgen and Livak 2008) with the Ct values relative to geometric media of the RG of

RnR₂ and MNF1 as RG ranked by geNorm. Gene sequence information was collected from free-internet databases (www.ensembl.org and <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/>) and used to design specific primers in Table 1 using a freely available software from Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com) (Grun, Teixeira et al. 2018)

TABLE 1: Primers Sequences

Gene	Primer Sequence	GenBank Reference
Cav-1	F-5` GCACACCAAGGAGATTGACC 3` R-5` GACAACAAGCGGTAAAACCAA 3`	NM 001243064
DRP1	F-5` - TCAATAAGCTGCAGGACGTC 3` R-5` TTCTGGTGAAACCTGGACTAG 3`	NM 001276340.1
RnR ₂	F-5` AGCTATTAATGGTTCGTTTGT 3` R-5` AGGTGGCTCTATTTCTCTTGT 3`	ENSMUSG00000064339.1
MNF1	F-5` GGTGGAAATACAGGGCTACAG 3` R-5` ACACTCAGGAAGCAGTTGG 3`	NM 024200.4
OPA1	F-5` ACGACAAAGGCATCCACC 3` R-5` GAGCAATCATTTCAGCACAC 3`	NM 001199177.1

2.4) FLOW CYTOMETRY

The mitochondrial morphology and lysosomal activity were performed through staining cells with Mitotracker® Red (Invitrogen) and LysoTracker Red DND 99 (Invitrogen). Briefly, cells were cultured in 12-well plates, trypsinized and incubated for 30 min with Mitotracker® Red and LysoTracker Red DND 99.

All data was acquired with a FACS Calibur cytometry system (FACS Calibur, BD Bioscience, Mountain View, CA, USA) and Cell Quest software (BD Bioscience, Mountain View, CA, USA). Data obtained (10.000 events) was analyzed with FCS Express 4 Software (De Novo Software, Los Angeles, CA, USA).

2.5) ISOLATION OF MITOCHONDRIA

Cells were seeded in 6-well plates (15×10^4 cells/cm²). After 24 hours, cells were scratched in PBS solution and centrifuged at 1250 x g for 3 min. Then, cells were transferred to a pre-cooled glass Potter homogenizer with 200µl of lysis buffer (10mM TRIS-HCL, 0,25M Sucrose, 20mM NaF, 1mM DTT, 5mM EDTA and protease inhibitor). The cells were homogenized with 7 min strokes at medium speed. The resulting homogenate was centrifuged for 5 min at 100× g, 4 °C. Then, the supernatant was transferred to a new tube and centrifuged for 15 min at 10,000× g, 4 °C. After

centrifugation, the supernatant was carefully transferred to a new tube and storage (cytosolic fraction), while mitochondrial pellet was resuspended in 100 μ L of lysis buffer for cholesterol quantification.

2.6) CHOLESTEROL ASSAYS

Cholesterol mitochondrial and total cholesterol in all cells were measured with the Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen) as described by the manufacturer.

2.7) MICROSCOPY ANALYSIS

2.7.1) *Laser-scanning Confocal Microscopy*

The mitochondrial morphology networking and lysosomal size was performed through staining cells with Mitotracker® Red (Invitrogen) and LysoTracker Red DND 99 (Invitrogen), respectively. For all experiments, GRX, GRX^{GFPshCav1} and GRX^{EGFP-Cav1} cells were cultured in appropriate glass bottom culture plates (CELLview Glass bottom plates, GreinerBioone).

All images were collected using Olympus FV1000 laser-scanning confocal microscope. Ten single confocal sections of 0.7 μ M were taken parallel to the bottom plates (xy sections). For each sample, images of six fields were acquired and processed with Olympus FluoView FV1000 software. All experiments were performed at least four times for each sample (Meira Martins, Vieira et al. 2014).

2.7.2) *Electron microscopy*

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde plus 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at room temperature. Afterwards, they were washed in PB and fixed in 1% osmium tetroxide, OsO₄ (Sigma) in PB, pH 7.4 for 1 h at room temperature. They were washed again with PB and then gradually dehydrated with acetone (Merck) and soaked in epon resin. Polymerization was carried out for 48 h at 60 °C. Semi-thin sections (1 μ m) were made in ultramicrotome (Leica EM UC7) and stained with 1% toluidine blue. Ultrafine cuts were obtained in an ultramicrotome for the assembly of copper grids (200 mesh). Samples were counterstained with 1% uranyl acetate (Merck) and then with 1% lead citrate (Merck). Ultrastructural analyses was performed using TEM at an 80-kV acceleration voltage (JEM 1200 EXII, Japan) (Ilha, Moraes et al. 2019). The mitochondria area (M_a) was quantified at least fifteen images with 1 μ m and 30k

magnification correspondent to randomly selected fields of GRX, GRX^{GFPshCav1} and GRX^{EGFP-Cav1}, using the ImageJ software.

2.7.3) Immunogold

Samples were fixed in 4% paraformaldehyde plus 0.2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB) at room temperature. Afterwards, they were dehydrated with ethanol and embedded in resin LR White. Polymerization was carried out for 48 h at 50 °C. Ultra-fine sections (70nm) were made in an ultramicrotome and for the assembly of nickel grids (200 mesh). Samples were counterstained with 2% uranyl acetate (Merck) and then with 1% lead citrate (Merck). Then, samples were incubated with primary antibody Cav-1, sc53564 (2:500) in block solution for 2 hours, washed and incubated with secondary antibody conjugated to gold particle Anti-Mouse IgG (whole molecule) Gold antibody (G7652-4ml) 9nm, (2:50) for 2 hours. Cav-1 labeling were observed using TEM at an 80-kV acceleration voltage (JEM 1200 EXII, Japan).

2.8) HIGH-RESOLUTION RESPIROMETRY

Cellular oxygen consumption was measured through high-resolution respirometry in the OROBOROS Oxygraph-2k in standard configuration, with 2 ml final volume on both chambers, at 37°C, and 750 rpm stirrer speed. For all experiments was 0.8 million cells were used per chamber and the data was acquired in pmol of O₂ per second per number of cells. The software DatLab 4 (Oroboros Instruments®, Innsbruck, Austria) was used for data acquisition. The protocol used consisted application of oligomycin (Sigma®, Brazil), followed by several steps of carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) (Sigma®, Brazil) and the application of rotenone (Sigma®, Brazil) with antimycin A (Sigma®, Brazil) at the end of the run (Pesta and Gnaiger, 2012).

2.9) STATISTICAL ANALYSIS

Data were obtained at least from three independent experiments and submitted to one- or two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. Statistical significance was accepted at $p \leq 0.05$. Data are expressed as means \pm standard deviations. All analyses and graphics were performed using the statistical software GraphPad Prism 6 for Windows (GraphPad Software Inc., version 6, Sa Diego, USA).

3) RESULTS

3.1 *Caveolin-1 alters Mitochondrial Respiration*

Cav-1 knockdown in GRX cell line was confirmed throughout immunocytochemistry, GFP expression and real-time PCR and showed a decrease of 74% in mRNA Cav-1 expression when compared with GRX (Sup figure 1A-C). High-resolution respirometry (HRR) (OROBOROS) data indicate that Cav-1 expression affects mitochondrial respiration of HSC. Basal respiration, ATP-linked, maximum capacity, reserve capacity, and extramitochondrial respiration were increased by the expression of Cav1 (Fig.1). Proton-leak was not affected by expression or silencing of Cav1, indicating that mitochondrial membrane and function are preserved regardless of the Cav-1 exogenous expression or knockdown. Interestingly, ATP-linked respiration was increased in $GRX^{EGFPpCineo}$, $GRX^{EGFP-Cav1}$ and $GRX^{GFPshCav1}$. These results confirm the importance of Cav-1 in regulating mitochondrial ATP production without causing mitochondrial membrane rupture or dysfunction.

3.2 *Expression of Caveolin-1 increases Mitochondrial Cholesterol, Lysosome activity and Size.*

Notably, the role of Cav-1 in mitochondrial function is governed by homeostasis of cholesterol transport (Fridolfsson, Roth et al. 2014). As expected, high expression of Cav1 increased mitochondrial cholesterol (Figure 2A), while not affecting the total cholesterol of the cell (Figure 2B). Furthermore, because mitochondrial cholesterol was increased, we examined whether Cav-1 expression affects mitochondrial function by evaluating Mitotracker® Red. Our results in figure 2C confirm that neither the exogenous expression of Cav-1 nor knockdown of Cav-1 did not alter the mitochondrial function, corroborating with proton-leak of the OROBOROS respiration.

Additionally, the ER is the largest intracellular organelle and contains the majority of cellular lipids, and there is growing evidence that the lysosome-ER contact sites function in cholesterol homeostasis (Annunziata, Sano et al. 2018). Through LysoTracker Red DND 99 measurement we showed an increase of lysosome content and size when Cav-1 is upregulated (Figure 2D). In all cell lines the positioning of the endo-lysosomal system is predominantly the perinuclear cloud (Figure 2E). Together, these data indicate that increase of Cav-1 in $GRX^{EGFP-Cav1}$ model enhanced mitochondrial cholesterol,

lysosomes activity and size but not modifies total cellular cholesterol content neither mitochondrial function.

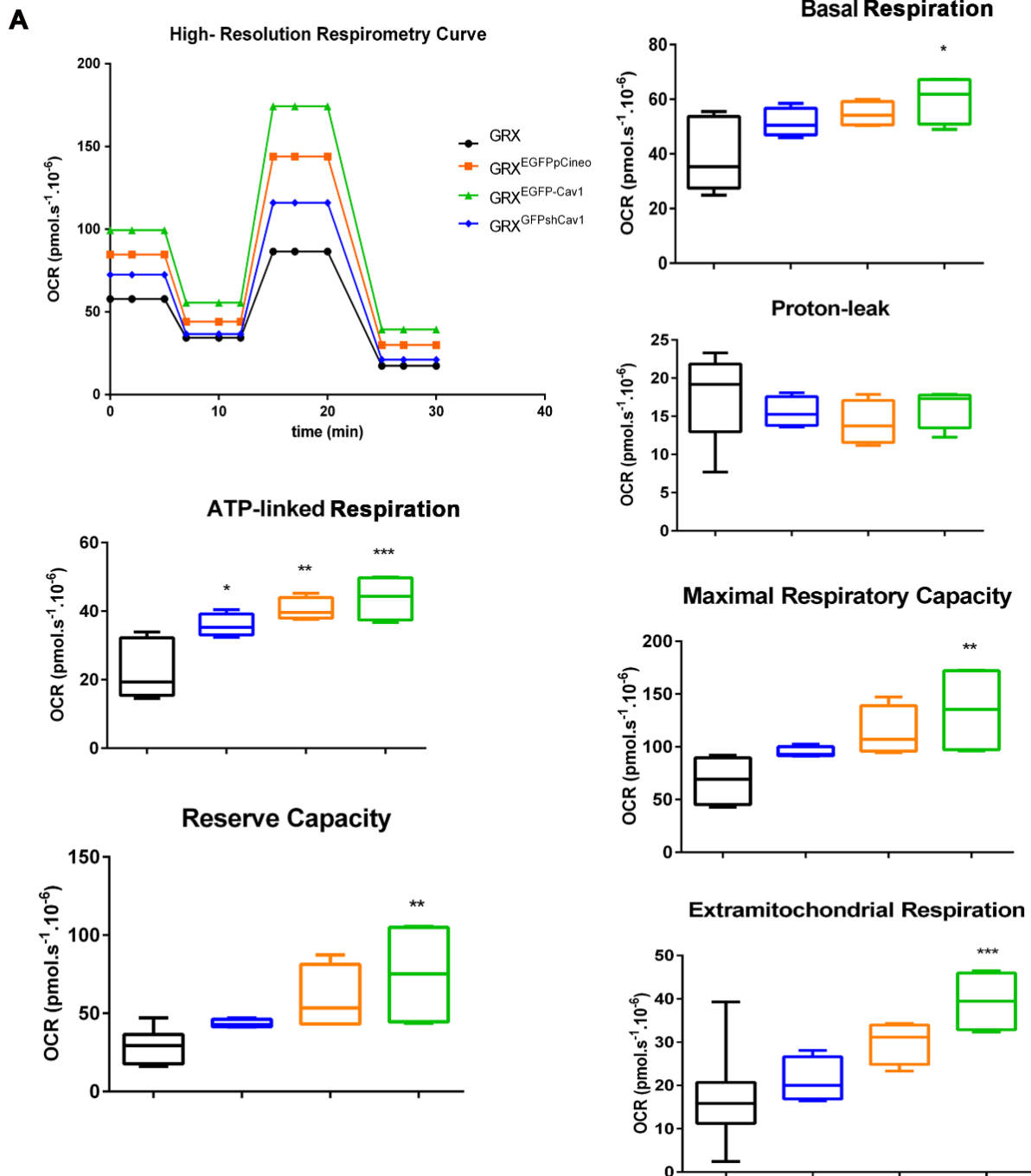


Figure 1: The exogenous expression and knockdown of Cav-1 modulated oxidative metabolism in hepatic stellate cells. A) GRX, (EGFP control) GRX^{EGFPpCineo}, GRX^{EGFP-Cav1} and GRX^{GFPshCav1} cells were cultivated and high-resolution respirometry (HRR) was performed (OROBOROS®) establishing respiratory patterns. A) High-resolution respirometry curve of cell lines, Basal respiration, Proton-Leak, ATP-linked, Maximum capacity, Reserve capacity and Extramitochondrial respiration of cell lines. All data are expressed as relative mean \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

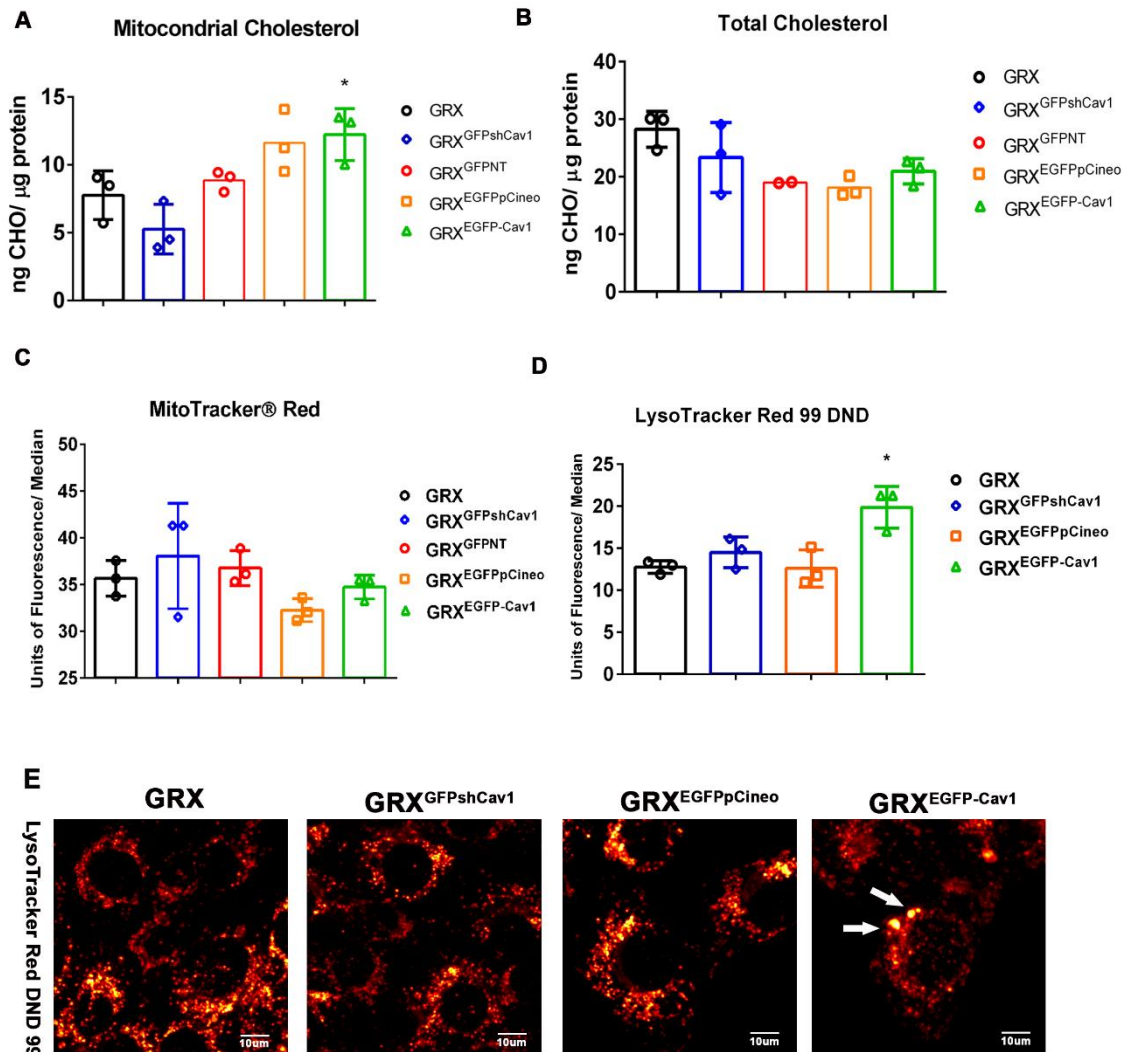


Figure 2: Expression of Caveolin-1 increases Mitochondrial Cholesterol, Lysosome Size but not Differs in Mitochondrial Function. A-B) Isolation of mitochondria was performed as described in Material and Methods. Quantification of mitochondrial and total cholesterol was performed by Amplex Red. C-D) MitoTracker® Red and LysoTracker Red analysis was performed by flow cytometry. E) Representative images of lysosomal size after staining with LysoTracker Red by confocal microscope. The images were artificially colored in red hot by ImageJ. White arrows in GRX^{EGFP-Cav1} showing an increase size of lysosome. Scale bar 10 μ m. *p < 0.05;

3.3 Cav-1 changes Mitochondrial Network Morphology

To examine if there are changes in mitochondrial network morphology cells were labeling with MitoTracker® Red and analyzed by confocal microscopy in live cells (Figure 3A). GRX^{GFPshCav1} demonstrated thin mitochondrial tubules extending to peripheral zone of the cells whereas GRX^{EGFP-Cav1} cells showed larger and rounder mitochondria that form spherical network in peripheral zone of the cells when compared to GRX, which has a punctual mitochondrial network (Figure 3A).

These observations prompted us to study if the expression of some mitochondrial genes (Table 1) was affected by exogenous expression or knockdown of Cav-1. Based on the final ranking of geNorm, we found RnR₂ (M=0.563) and MNF1 (M=0.563) as the most stable genes; thus, they were used as reference in PCR-based experiments. Exogenous expression of Cav-1 led to a decrease in the DRP1 expression while the OPA1 and MNF1 expression did not change (Figure 3B). Dynamin-related protein 1 (DRP1), on the mitochondrial surface, causes constriction of the mitochondria and eventual division of the organelle into two separate entities. On the other hand, Optic atrophy protein 1 (OPA1) and Mitofusin 1 (MNF1) cause mitochondrial fusion (Annunziata, Sano et al. 2018). These data support the notion that Cav-1 interferes in mitochondrial dynamics since it produced an imbalance between the fission/fusion protein expression. RNA ribosomal 2 (RnR₂) is a mtDNA gene (Li, Pan et al. 2018). Since we found no expression difference in this gene, we conclude that Cav-1 did not interfere in cellular mitochondria quantity (Figure 3B).

3.4 Ultrastructural analysis of Mitochondrial Morphology and ER-mitochondria Contacts (MAM)

By TEM analysis we demonstrated that, knockdown of Cav-1 changes ultrastructure of cell, enhancing lipid droplets and Golgi complex content organelles, suggesting a shift to a more quiescent phenotype (Supplementary figure 1C). It's already known that Cav-1 is also distributed in the mitochondrial inner and outer membranes as well as in MAM and ER (Supplementary figure 2A) In these regions, Cav-1 regulates lipid metabolism including fatty acid β -oxidation, ketogenesis and mitochondrial respiration (Fernandez-Rojo and Ramm 2016). In some studies, cholesterol enters mitochondria through specialized extensions of the ER, rich in Cav-1, named mitochondrial-associated membranes (MAM) (Bosch, Mari et al. 2011; Fridolfsson, Roth et al. 2014). Because we viewed changes in respiration, morphology and enhanced of mitochondrial cholesterol, we analyzed cellular ultrastructure by TEM. Among the observed differences between cells, the most impressive fact was the presence of mitochondria with rounded shape, dilated morphology and well-defined but irregular ridges (M*) without membrane rupture in GRX^{EGFP-Cav1} cells.

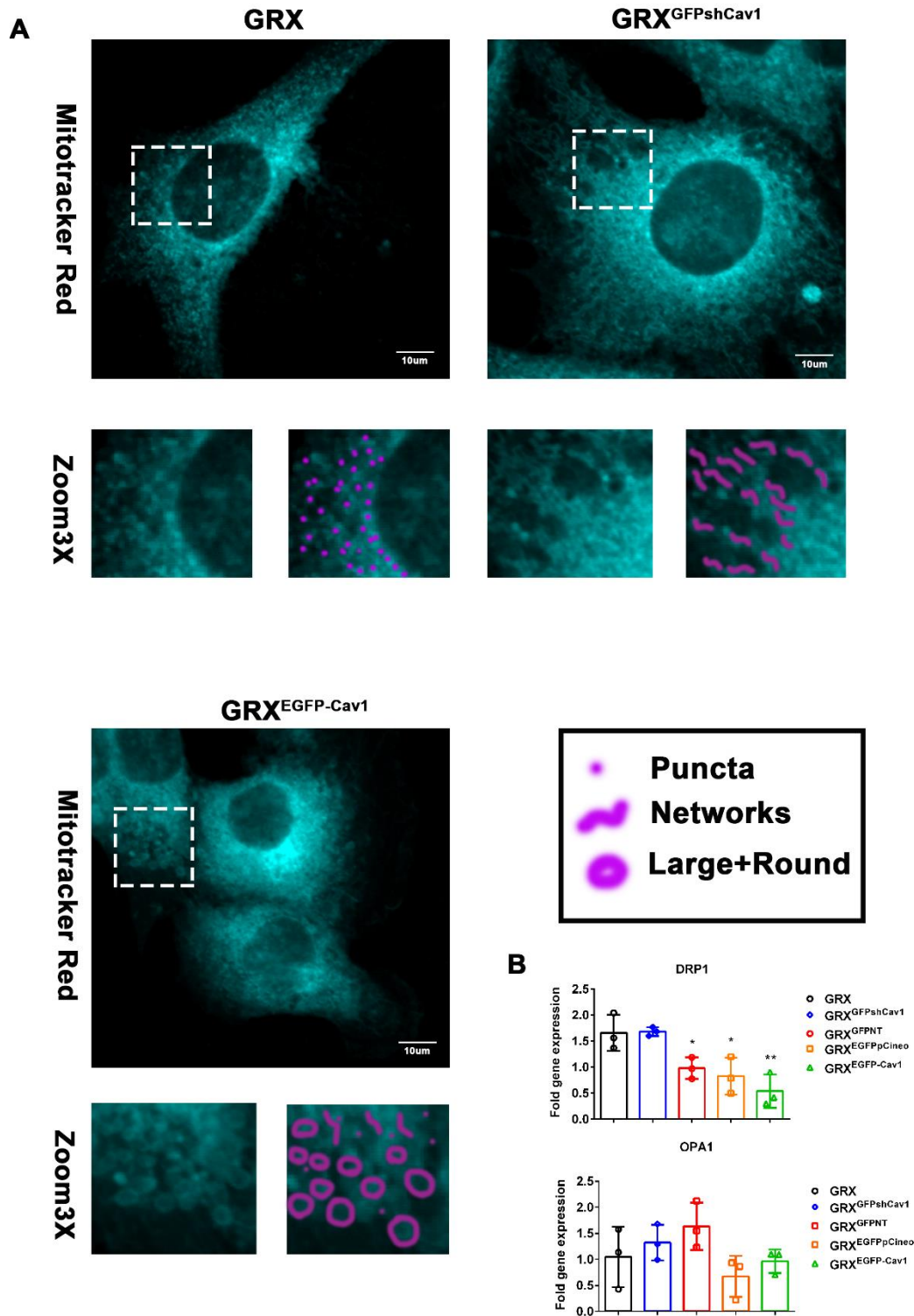


Figure 3: Cav-1 changes Mitochondrial Network Morphology. A) Representative images of mitochondrial network after staining with MitoTracker® Red by confocal microscope. The images were artificially colored in cyan blue by ImageJ. Examples of mitochondrial object subtypes in purple color – puncta are small and round and networks are further elongated. Large & round are distinctly larger than puncta, but still round. Classification by Leonard et al, 2015. Scale bar 10µm. B) Total mRNA of DRP1 and OPA1 was graphically presented. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Another notable difference between GRX^{EGFP-Cav1} and GRX^{GFPshCav1} was the physical ER-mitochondria (MAM) interaction. In previous work (Ilha, Moraes et al. 2019), we demonstrated by TEM that GRX^{EGFP-Cav1} had ER-stressed (ER*), which is a feature of HSC activation. In GRX^{EGFP-Cav1} physical ER-mitochondria interaction are reduced suggesting an ER-mitochondrial miscommunication, whereas in GRX^{GFPshCav1} the physical ER-mitochondria interaction was favored. These data suggest that both exogenous expression and knockdown of Cav-1 changes physical ER-mitochondrial interaction in order to increased oxidative capacities. The measurement of the mitochondrial area confirmed the significant increase in size of this organelle in GRX^{EGFP-Cav1} and decreased in GRX^{GFPshCav1} cells, showing that expression of Cav-1 interfere in mitochondria size and shape (Figure 4B).

4) DISCUSSION

In previous works, our group showed for the first time that the exogenous expression of Cav-1 (GRX^{EGFP.Cav1}) induced the majority of GRX cells into an activated-like HSC state (Ilha, Moraes et al. 2019). To further continue studies regarding the interaction of Cav-1 in liver diseases, we established the knockdown of Cav-1 in GRX cells, creating a GRX^{GFPshCav1} cell line, in order to have one more strategy and better comprehension of HSC activation state cellular biology, substantially contributing to novel therapeutic designs for liver fibrosis studies. Through immunocytochemistry and RT-PCR we showed that the knockdown was successful with a decrease in + 74% Cav-1 expression (Supplementary figure 2). Cav-1 has an important role in regulating signaling events that influence cell homeostasis (Parton and del Pozo 2013). We also used TEM images to characterize this cell line and we found some differences when comparing it to GRX. Indeed, the knockdown of Cav-1 seemed to drastically affect the cells since significant morphological changes were found in the cell's cytoplasm. Enhanced quantity of lipid droplets and Golgi complex content, besides decreased mitochondrial area, was presented, indicating a strong interaction of Cav-1 with lipid transportation, metabolic regulation and signal transduction. An additional function of Cav-1 in the Golgi complex is to regulate protein glycosylation (Fridolfsson, Roth et al. 2014).

Our results in high-resolution respirometry suggested that both exogenous expression and knockdown of Cav-1 enhanced oxidative metabolism and did not cause damage to the mitochondrial function, accordingly to the Mitotracker® Red assay.

Indeed, increased basal respiration in $GRX^{EGFP-Cav1}$ may be indicative of improved of energy machinery, respiratory chain and electron transference efficiency. Some studies suggest that the role of Cav-1 in cholesterol transport and homeostasis affects mitochondrial function (Fridolfsson, Roth et al. 2014). Indeed, exogenous expression of Cav-1 enhanced mitochondrial cholesterol content, mitochondrial area, led to miscommunication of ER-mitochondria interactions, ER stress and alterations on lysosome activity and size. The mitochondrion is a cholesterol-poor organelle and that cholesterol enters the mitochondria through special extensions of ER, MAM, which are enriched in Cav-1. This protein regulates levels of mitochondrial cholesterol by promoting cholesterol efflux from the ER through MAM (Fridolfsson, Roth et al. 2014). MAMs are now considered as a structural platform for optimal bioenergetics response allowing cellular adaptations to environmental changes. The transfer of lipids, ROS and Ca^{2+} from ER to mitochondria is crucial for the control of interorganelle communication, mitochondrial energy metabolism, impacting Krebs cycle and ATP synthesis. MAMs are at the crossroads of several important hormonal and nutrient-regulated signaling pathways (Rieusset 2018). Conversely, in previous results we demonstrated that exogenous expression of Cav-1 induces ER-stress and HSC activation (Ilha, Moraes et al. 2019), and now we have demonstrated that through TEM analysis that the ER-stress participates in ER-mitochondria miscommunication associated with liver diseases. Another interesting result of our group is an enhanced of lysosomal activity and size in $GRX^{EGFP-Cav1}$ when compared to the rest of the cell panel. Considering the widespread ER network within cells, the membranes of ER cisternae can engage in multiple contact sites with other organellar membranes, including lysosomes, named ER-lysosomes contact (Annunziata, Sano et al. 2018). Lysosomes are a source of lipoprotein-derived cholesterol and Cav-1 moves to and from the cytoplasmic surface of lysosomes during intracellular cholesterol trafficking, accumulating Cav-1 in lysosomal membranes when cholesterol homeostasis is perturbed (Fridolfsson, Roth et al. 2014).

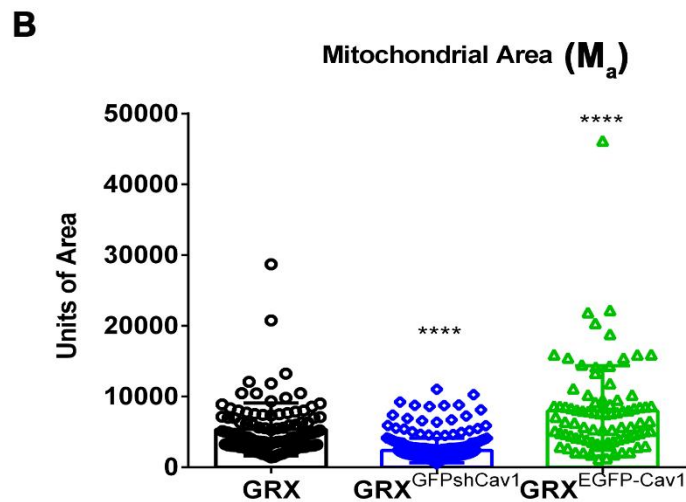
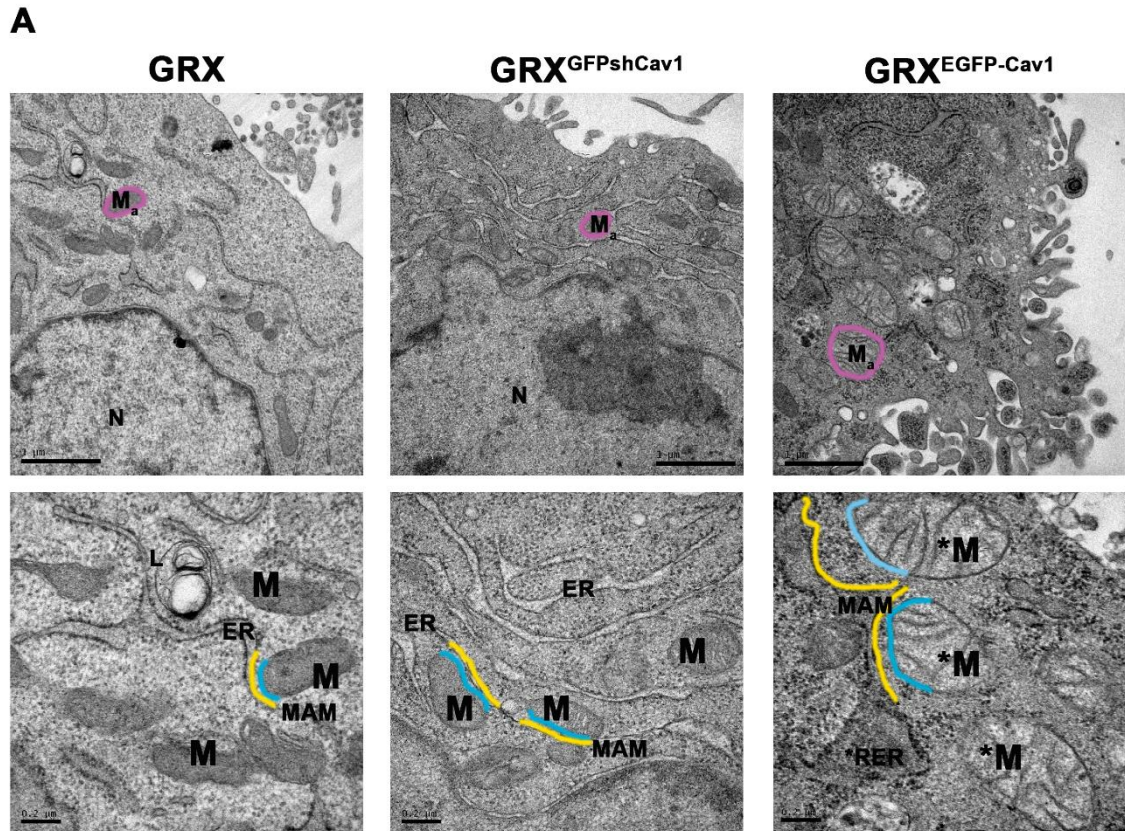


Figure 4: Ultrastructural analysis of Mitochondrial Morphology and ER-mitochondria Contacts (MAM). A) Ultrastructural analysis of GRX, GRX^{GFPshCav1} and GRX^{EGFP-Cav1} assessed by TEM: Nucleus (N), mitochondria (M), dilated mitochondria (M*), lysosome (L), endoplasmic reticulum (ER), dilated rough endoplasmic reticulum (RER*), mitochondria-associated membrane (MAM). In blue mitochondrion contact with RE, in yellow RE contact with mitochondrion. Scale bars, 1 μ m and 0,2 μ m. B) Mitochondrial area (M_a) in pink was measured by ImageJ according material and methods. **** p <0.0001

We also show that both exogenous expression and knockdown of Cav-1 in GRX cells changed the mitochondrial network, ER-mitochondria dynamics and communication. The ER and mitochondria are both enriched in Cav-1 and mutually determine their respective shapes in a highly dynamic manner. ER forms a continuum with the nuclear envelope to generate a network of interconnected cisternae, which can vary from perinuclear sheets to peripheral tubules, in a dependent manner such as microtubules and actin cytoskeleton (Lopez-Crisosto, Pennanen et al. 2017). Beyond mitochondria bioenergetics, other aspects of mitochondria function are controlled by ER-mitochondria interactions, including Ca^{2+} flux and mitochondrial dynamics (Rieusset 2018). Mitochondrial architecture is constantly being modified by highly dynamic processes, involving organelle movement, mitophagy, and fusion-fission events (Lopez-Crisosto, Pennanen et al. 2017). Indeed, in our previous work, we demonstrated that in $\text{GRX}^{\text{EGFP-Cav1}}$ changed actin cytoskeleton architecture, which directly affects organelles motilities and now even cellular respiration (Ilha, Moraes et al. 2019). Also, ours results showed that exogenous expression of Cav-1 decreased DRP1 mRNA expression and did not alter OPA1 and RnR2 expression. Dynamin 1-like protein (DRP1), an important regulator of mitochondrial fission, also enriched in MAM, is a cytosolic GTPase that is recruited to mitochondria to form a constriction ring that drives the fragmentation process. GTPases such as mitofusin 1 (MNF1) and 2 (MNF2) and optic atrophy protein 1 (OPA1) control the opposite process, mitochondrial fusion. Therefore, sites of ER-mitochondria contact are critically implicated in mitochondrial life cycle and are maintained by mitofusins (MNF), which form a dimeric bridge that tethers both organelles (Lopez-Crisosto, Pennanen et al. 2017). Mitochondrial dynamics also controls organelle content. In a recent study, Drp1-knockout cardiomyocytes have elongated mitochondria and are more prone to undergo mitophagy than wild type cells, suggesting that a normal fusion-fission cycle is essential for the maintenance of the mitochondrial content (Song, Gong et al. 2015). Another work showed that Cav-1-PKA-DRP1 axis as a key regulator of organelle communication during ER stress in HeLa cells (Bravo-Sagua, Parra et al. 2019). Indeed, Leonard et al was proposed a new classification of mitochondrial morphology: puncta, rod, network and large and round (Leonard, Cameron et al. 2015). Through these parameters we classify ours results and we confirm that both exogenous expression and knockdown of Cav-1 in GRX cells changed the mitochondrial network. Mitochondrial network in GRX cells appears to be more punctual. However, in $\text{GRX}^{\text{GFPshCav1}}$ it appears more rod shaped and a network, whereas in $\text{GRX}^{\text{EGFP-Cav1}}$ it

appears larger and rounder. Another interesting result is the enhanced of ATP linked and basal respiration in GRX^{EGFP-Cav1} in accordance with changing of mitochondrial network morphology, as the mitochondrial potential may dissipate through the network. These results are in accordance with the TEM analysis where the same changes in mitochondrial morphology were observed.

In conclusion, we provided evidence by immunogold labeling that Cav-1 is present in mitochondria, ER and MAM in the hepatic stellate cell. We additionally explore the role of Cav-1 in MAM morphology and ER-mitochondria dynamics. Also, the link with ER stress, miscommunication of organelles, mitochondrial respiration, size, network and cholesterol content are associated with liver disease. Altogether, the interplay of Cav-1 in MAM, cell metabolism and function are a connection with new possible targets of treatments for liver diseases.

5) REFERENCES

- Annunziata, I., R. Sano, et al. (2018). "Mitochondria-associated ER membranes (MAMs) and lysosomal storage diseases." *Cell Death Dis* 9(3): 328.
- 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.
- Bosch, M., M. Mari, et al. (2011). "Mitochondrial cholesterol: a connection between caveolin, metabolism, and disease." *Traffic* 12(11): 1483-1489.
- Bravo-Sagua, R., V. Parra, et al. (2019). "Caveolin-1 impairs PKA-DRP1-mediated remodelling of ER-mitochondria communication during the early phase of ER stress." *Cell Death Differ* 26(7): 1195-1212.
- Fernandez-Rojo, M. A. and G. A. Ramm (2016). "Caveolin-1 Function in Liver Physiology and Disease." *Trends Mol Med* 22(10): 889-904.
- Fridolfsson, H. N., D. M. Roth, et al. (2014). "Regulation of intracellular signaling and function by caveolin." *FASEB J*.
- Grun, L. K., N. D. R. Teixeira, Jr., et al. (2018). "TRF1 as a major contributor for telomeres' shortening in the context of obesity." *Free Radic Biol Med* 129: 286-295.
- 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.
- Ilha, M., K. D. S. Moraes, et al. (2019). "Exogenous expression of caveolin-1 is sufficient for hepatic stellate cell activation." *J Cell Biochem*.
- Jang, D. H., S. C. Seeger, et al. (2017). "Mitochondrial dynamics and respiration within cells with increased open pore cytoskeletal meshes." *Biol Open* 6(12): 1831-1839.

- Leonard, A. P., R. B. Cameron, et al. (2015). "Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning." *Biochim Biophys Acta* 1853(2): 348-360.
- Li, S., H. Pan, et al. (2018). "Mitochondrial Dysfunctions Contribute to Hypertrophic Cardiomyopathy in Patient iPSC-Derived Cardiomyocytes with MT-RNR2 Mutation." *Stem Cell Reports* 10(3): 808-821.
- Lopez-Crisosto, C., C. Pennanen, et al. (2017). "Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology." *Nat Rev Cardiol* 14(6): 342-360.
- 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.
- Martin, L. A., B. E. Kennedy, et al. (2016). "Mitochondrial cholesterol: mechanisms of import and effects on mitochondrial function." *J Bioenerg Biomembr* 48(2): 137-151.
- 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.
- Mishra, P. and D. C. Chan (2014). "Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(10): 634-646.
- 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.
- Pesta, D. and E. Gnaiger (2012). "High-resolution respirometry: OXPHOS protocols for human cells and permeabilized fibers from small biopsies of human muscle." *Methods Mol Biol* 810: 25-58.
- Rieusset, J. (2018). "The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: an update." *Cell Death Dis* 9(3): 388.
- Sala-Vila, A., I. Navarro-Lerida, et al. (2016). "Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice." *Sci Rep* 6: 27351.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." *Nat Protoc* 3(6): 1101-1108.
- Shi, Y., S. H. Tan, et al. (2015). "Critical role of CAV1/caveolin-1 in cell stress responses in human breast cancer cells via modulation of lysosomal function and autophagy." *Autophagy* 11(5): 769-784.
- Singh, S., S. Liu, et al. (2016). "Caveolin-1 is upregulated in hepatic stellate cells but not sinusoidal endothelial cells after liver injury." *Tissue Cell* 48(2): 126-132.
- Song, M., G. Gong, et al. (2015). "Interdependence of Parkin-Mediated Mitophagy and Mitochondrial Fission in Adult Mouse Hearts." *Circ Res* 117(4): 346-351.
- Thome, M. P., E. C. Filippi-Chiela, et al. (2016). "Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy." *J Cell Sci* 129(24): 4622-4632.
- Tsuchida, T. and S. L. Friedman (2017). "Mechanisms of hepatic stellate cell activation." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14(7): 397-411.

Vandesompele, J., K. De Preter, et al. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol* 3(7): RESEARCH0034.

Yokomori, H., W. Ando, et al. (2019). "Caveolin-1 is related to lipid droplet formation in hepatic stellate cells in human liver." *Acta Histochem* 121(2): 113-118.

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.

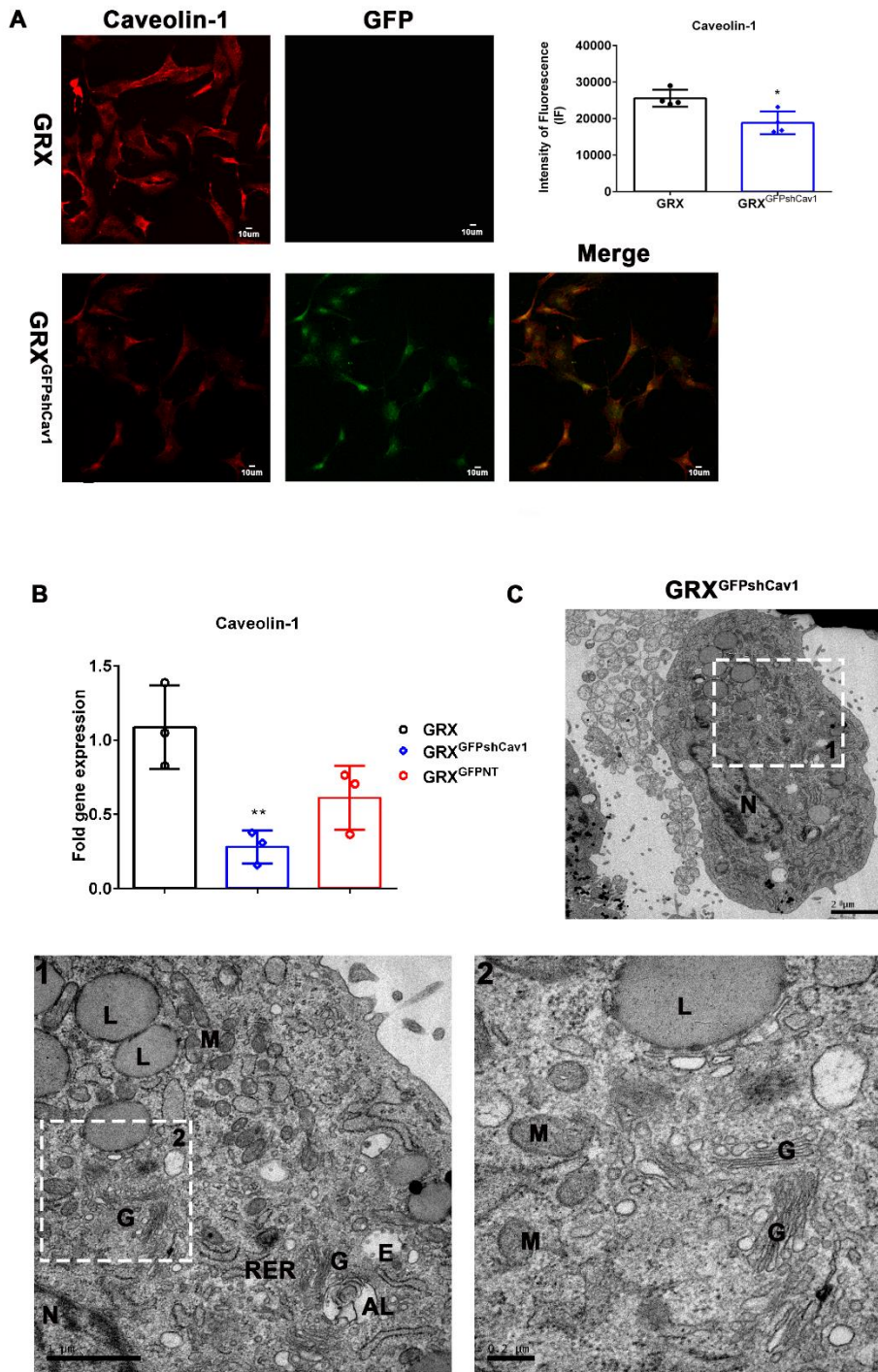
Acknowledgments

Mariana Ilha is a recipient of PhD degree fellowship from CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brazil). F.C.R. Guma, G. Lenz, L.A. Meira Martins, F. Barbe-Tuana and F. Rodhen are recipients of a research fellowship from CNPq. The authors thank Dr. J.L. Daniotti for the donation of pCav1EGFP plasmid. This work was supported by CAPES, MCT/CNPq Universal (423712/2016-0), PqG/FAPERGS 1952-2551/13 and PROPESQ-UFRGS

CONFLICT OF INTERESTS

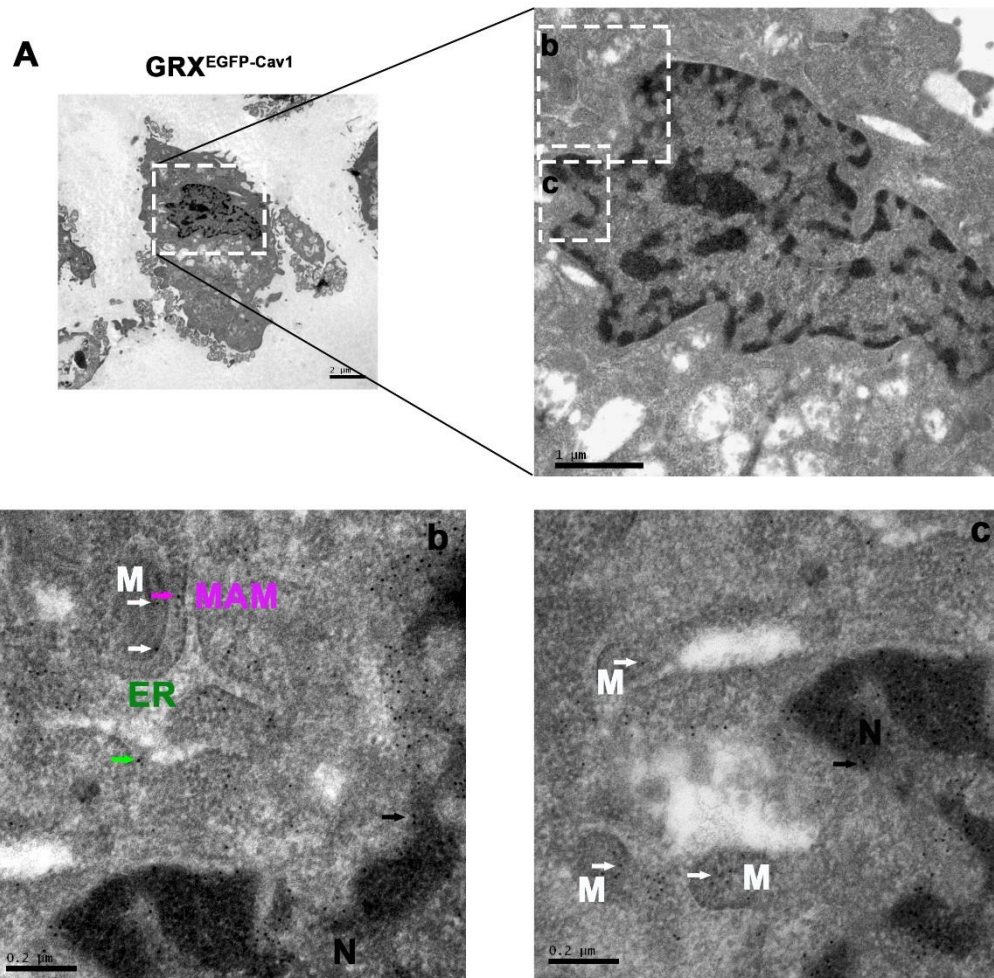
All authors declare no conflicts of interest

Supplementary figure 1



Supplementary figure 1: The Successful for transduction shRNA in order to silencing Cav-1 in GRX cell line. A) Cells were immunolabelled for Caveolin-1 with monoclonal anti-(Cav-1) antibodies with Alexa Fluor 555 secondary antibodies by confocal microscopy. The intensity of fluorescence (IF) was measured using ImageJ. The green GFP and decreasing of immunolabelled red Caveolin-1 confirm the success of knockdown when compared with GRX. Values are means \pm SD from random fields as described in Material and Methods. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$. Scale bar 10 μ m. C) Total mRNA of Caveolin-1 was graphically presented. D) Ultrastructural analysis assessed by TEM: Nucleus (N), mitochondria (M), lipid droplet (L), Golgi complex (G), primary endosome (E), rough endoplasmic reticulum (RER), autophagolysosome (AL). Scale bars, 2 μ m, 1 μ m, and 0,2 μ m.

Supplementary figure 2



Supplementary figure 2: Transmission electron micrographs showing $GRX^{EGFP-Cav1}$ cells. A) Immunogold particles indicating caveolin-1 are found in nucleus (N), cytoplasmic, mitochondria (M) endoplasmic reticulum (ER) and MAM. Black arrow in heterochromatin, white arrow in mitochondria, green arrow in RE and pink arrow in MAM. Magnification 2,1 and 0,2 μm .

6. Discussão

Atualmente, as doenças crônicas do fígado (DCF) têm um impacto altíssimo nos gastos com a saúde pública, contribuindo significativamente com as grandes taxas de mortalidade mundial (Fernandez-Rojo and Ramm 2016). Alarmantemente, as taxas globais são de 844 milhões de pessoas com DCF, com uma letalidade de 2 milhões de mortes por ano em decorrência a estas doenças (Marcellin and Kutala 2018). Estão entre elas: a esteatose hepática, hepatites virais, esteatose não alcoólica, cirrose e por fim o câncer hepático. Assim, a fibrose hepática é uma característica comum dessas doenças e ela se caracteriza pelo excesso de produção de matriz extracelular (MEC), formando uma cicatriz fibrosa, na qual o órgão fica enrijecido, perdendo suas propriedades saudáveis (Pellicoro, Ramachandran et al. 2014). Além disso, o fígado tem uma forma única de se adaptar aos danos, regenerando-se a cada nova lesão. Este desequilíbrio na produção de MEC prejudica o fluxo sanguíneo das veias e artérias, os sinusóides hepáticos (do inglês, *liver sinusoidal endothelial cells*, LSECs) perdem suas fenestras, tornando o tecido menos irrigado e com menor potencial de ação para suas funções vitais, sendo estes eventos perigosos e clinicamente relevantes (Elsharkawy, Oakley et al. 2005).

Devido a isto, as células estreladas hepáticas (HSCs) têm chamado muito a atenção dos pesquisadores por ela ser a principal orquestradora da produção desta MEC no fígado. Esta importante célula organiza e modula a produção decorrida das lesões, equilibrando tanto a produção quanto a degradação desta MEC, através de uma sinalização minuciosa com outras células do fígado e outros fatores pró e anti-inflamatórios. Lesões crônicas e agudas acabam prejudicando o órgão e por sua vez ativam as HSCs que procuram secretar a MEC para a regeneração tecidual (Guyton and Hall, 2006). A ativação das HSCs é devida à resposta a sinais liberados pelos hepatócitos, macrófagos residentes no fígado, células *natural killer* (NK), LSECs, plaquetas e células B, como por exemplo TGF- β , ROS e extravasamento de conteúdos celulares (por apoptose e/ou necrose). Nessas condições as HSCs transdiferenciam-se do fenótipo quiescente armazenador de vitamina A, para o fenótipo de miofibroblasto. Algumas características importantes desta ativação são: o aumento do número de células no tecido, a perda de contractilidade, a fibrogênese, a menor degradação da matriz alterada, a quimiotaxia e a sinalização inflamatória no microambiente onde ela está inserida. Posto isto, alguns marcadores e sinalizadores das HSCs no contexto da ativação e das doenças hepáticas, são: aumento do estresse de retículo endoplasmático, perda das gotas de retinóis, estímulo do colesterol, estresse oxidativo, aumento da autofagia, aumento da expressão de alguns receptores celulares,

modificação de histonas e metilação do DNA. Alguns marcadores clássicos também são encontrados na ativação destas células, tais como α SMA, Col-I, desmina e GFAP (Tsuchida and Friedman 2017).

Desde a descoberta da família das caveolinas em 1992, muito se tem descoberto sobre estas importantes proteínas. Inicialmente se pensava que elas compunham somente as caveolas, que são pequenas invaginações da membrana plasmática, primeiramente visualizadas em 1953 por George Palade por MET em epitélio sanguíneo. Anos se passaram e muitos pesquisadores esclareceram, que não somente são pertencentes as caveolas e aos *rafts* lipídicos, como também constituem, uma indispensável proteína presentes em todas as organelas celulares. Várias evidências têm mostrado que elas têm funções fora das caveolas, tais como reguladoras de atividades celulares, transportes de lipídeos, expressão gênica e função mitocondrial (Fridolfsson 2014). Como as caveolinas são determinantes nas transduções de sinais como plataformas de sinalização e na fisiologia celular, muitos estudos vêm sendo feitos para descobrir as suas funções em doenças tais como, cânceres, lipodistrofias, doenças neurodegenerativas, cardíacas, fibroses de diversos órgãos e DCF. Em alguns trabalhos, vimos que a Cav-1 está superexpressa em doenças hepáticas, tais como cirrose e esteatose hepática. Nesta tese, queremos demonstrar a interação e a influência da superexpressão e do silenciamento da Cav-1 nas HSCs, importantes células responsáveis pela produção e homeostasia de MEC, e assim futuramente, podendo ser um potencial alvo terapêutico.

No capítulo I, demonstramos que a superexpressão de Cav-1 nas células GRX causou aumento da expressão de proteínas clássicas marcadoras de ativação, como α SMA, Col-I e GFAP, modulou citoesqueleto de actina e aumentou a quantidade de colesterol livre, concluindo-se que a Cav-1 ativou ainda mais a linhagem GRX^{EGFP-Cav1}. Do mesmo modo, a superexpressão de Cav-1 aumentou a migração celular, sendo outro fator importante para ativação das HSCs. Ademais, com o padrão de migração do experimento do *wound healing* vimos que a superexpressão de Cav-1 modificou a adesão celular. Apesar do cálculo de proliferação não ter dado diferença significativa, a adesão celular foi superior nas células GRX^{EGFP-Cav1} em comparação a GRX. Da mesma maneira, a expressão de proteínas do complexo de adesão como integrina β 1 e paxilina, também tiveram maior expressão. Outra marcadora de ativação celular das HSCs, é a integrina β 1 que se liga com a Cav-1 e a paxilina em um complexo de adesão celular, corroborando assim também com os resultados anteriores das expressões de proteínas clássicas de ativação. Com isso,

o aumento da endocitose, o aumento da presença de lisossomos e de autofagossomos indicam que a superexpressão de Cav-1 foi suficiente para ativação das HSCs, mostrando que além de um ótimo modelo para estudos *in vitro* de doenças hepáticas, também propomos que esta proteína pode ser um marcador molecular para a ativação das HSCs.

No capítulo II, depois de mostrar que a linhagem GRX^{EGFP-Cav1} pode ser um modelo de estudo para as doenças hepáticas, desenvolvemos as culturas de esferoides em um microambiente em 3D. Hoje em dia, as culturas de esferoides têm chamado muito a atenção dos pesquisadores, pois elas podem mimetizar um microambiente com interação em três dimensões, sendo mais fiéis aos modelos humanos, do que modelos de interações e cultura 2D (Vinci, Gowan et al. 2012). Além disso, estudos com esferoides de carcinoma hepatocelular e HSCs mostram que as HSCs ativadas transformam o seu microambiente tumoral mais resistente através da superexpressão e liberação de VEGF α e MMP-9 aos fármacos que poderiam deter a angiogênese do tumor. As proteínas relacionadas com o microambiente tumoral e com a produção de MEC desempenham importantes papéis na estrutura e função do fígado saudável e nas doenças hepáticas, sendo o Col-I a principal delas. A composição e estrutura de MEC anormais em tumores sólidos são os maiores obstáculos para a penetração de drogas antitumorais (Song, Kim et al. 2016). A superexpressão de Cav-1 nas células GRX^{EGFP-Cav1}, modulou a afinidade célula a célula, transformando os esferoides maiores em comparação a GRX. O aumento da expressão de proteínas como integrina β 1, Col-I e α SMA, também corroboram com o aumento da adesão celular e da afinidade, pois elas participam do complexo de adesão junto com a Cav-1. A linhagem GRX^{EGFP-Cav1} por ser uma linhagem de HSCs ativadas também poderiam ser alvos de estudos para reversão do fenótipo ou a entrada em apoptose/necrose com fármacos e drogas contra as doenças hepáticas. Nos experimentos de migração celular dos esferoides no plástico, vimos que a superexpressão de Cav-1 aumentou a afinidade célula a célula e diminuiu a migração de células provenientes dos esferoides. Com isso, vimos através das análises de MET outra característica interessante da cultura dos esferoides, qual seja a modificação da interação célula a célula tanto na parte da camada cortical quando na parte da região medular dos esferoides. A parte interna ou medular é caracterizada pela diminuição da concentração de oxigênio disponível, obtendo-se um ambiente de hipóxia. Consequentemente, as células apresentaram secreção de MEC, células em necrose com extravasamento celular e em apoptose com seus núcleos picnóticos e eletrondensos, diminuição do contato celular, elevação dos

processos de morte celular e por fim mimetização de um ambiente tumoral. Já na parte cortical dos esferoides houve diferenças bem marcantes em relação às duas linhagens celulares. A GRX mostrou uma camada de células intactas com os contatos celulares ainda presentes, enquanto que a $GRX^{EGFP-Cav1}$ mostrou já na borda células com aspecto de apoptose/necrose, com a presença de processos autofágicos, autolisossomos e muita concentração de MEC. Pelas análises de MEV, podemos visualizar esta produção e concentração de MEC em ambas as linhagens. Assim, podemos concluir que a diminuição da quantidade de células na migração sobre o plástico na $GRX^{EGFP-Cav1}$ foi devido ao aumento de vias de morte celular já na parte cortical dos esferoides, corroborando assim os resultados de ativação/ reversão por apoptose das HSCs. Outro resultado interessante obtido com a imunocitoquímica e na imunomarcação com ouro coloidal de Cav-1 foi a marcação proveniente no núcleo, mais especificamente na heterocromatina celular (parte mais eletrondensa do núcleo). A presença da Cav-1 no núcleo é descrita como reguladora gênica de várias proteínas e receptores celulares. Os receptores PDGF e EGF aparecem nas caveolas da membrana plasmática são translocados para o núcleo por endocitose na ativação celular. A VEGF estimula o crescimento celular e a migração pela sinalização de dois receptores tirosina quinase e a ativação de eNOS, no qual colocalizam com as caveolinas nas caveolas. Quando ativadas, os receptores de VEGF, eNOS e Cav-1 são translocados para o núcleo para controlar a produção de óxido nítrico e a ativação gênica. Estes resultados corroboram com a ativação das HSCs e com a localização de Cav-1 na heterocromatina celular e da GFAP no citoplasma, modulando receptores e as respostas da metilação do DNA que também regulam o ciclo celular (Fridolfsson, Roth et al. 2014).

No capítulo III desta tese, estabelecemos a linhagem silenciada para a Cav-1, $GRX^{GFPshCav1}$, obtendo uma diminuição de 74% de expressão do RNAm. Com isso, tínhamos os três panoramas de expressão, isto é, a linhagem controle GRX, a linhagem silenciada $GRX^{GFPshCav1}$ e a linhagem que superexpressa a Cav-1, $GRX^{EGFP-Cav1}$, além das linhagens controle de silenciamento GRX^{GFPNT} e de superexpressão, $GRX^{EGFPpCineo}$. A linhagem silenciada para a Cav-1, $GRX^{GFPshCav1}$, mostrou-se diferentemente das outras células. Através das imagens de MET, observamos que o silenciamento da Cav-1 modificou a complexidade citoplasmática, mostrando uma maior quantidade de gotas lipídicas, complexo de Golgi e mitocôndrias menores em comparação a $GRX^{EGFP-Cav1}$ e GRX. A Cav-1 está presente em todas as organelas celulares, tendo um importante papel na regulação de eventos de sinalização que influenciam a homeostase celular (Parton and

dal Pozo 2013). Além do mais, nossos resultados da influência da Cav-1 na respiração celular mostraram que tanto a superexpressão quanto o silenciamento da Cav-1 induzem um aumento da respiração ligada ao ATP, sem modificar o *próton leak* e a marcação de Mitotracker® Red, demonstrando que a Cav-1 não só regula os mecanismos de respiração celular como mantém a integridade de membranas de mitocôndria. Alguns autores também sugerem que as caveolinas junto com outras proteínas como as TRIM72/MG53 são motores para o reparo de membranas celulares na adaptação de estresses, inclusive em membranas das mitocôndrias para preservar mecanismos celulares. A associação física e transferência de caveolinas entre as caveolas e a mitocôndria é uma resposta a um processo celular conservado que confere proteção ao dano celular (Schilling and Patel 2016). Outros resultados interessantes da respirometria pela técnica do OROBOROS demonstraram que a superexpressão de Cav-1 aumentou significativamente a respiração basal, a capacidade de reserva, a capacidade respiratória e a respiração extra-mitocondrial, mostrando que o aumento da expressão de Cav-1 interfere nos processos vitais e fisiológicos das HSCs ativadas aumentando a eficiência da transferência de elétrons e da maquinaria energética, o que poderia ser um indicativo da formação de supercomplexos da cadeia respiratória, sem aumentar o vazamento de prótons, e sem causar danos nas mitocôndrias. As caveolinas dentro das mitocôndrias influenciam componentes da cadeia transportadora de elétrons e alteram as membranas mitocondriais, interferindo na permeabilidade de poros e coordenando a apoptose (Fridolfsson, Roth et al. 2014). Concomitante com o aumento da respiração ligada a ATP nas células que superexpressam a Cav-1, também há aumento significativo de colesterol mitocondrial, tamanho das mitocôndrias e estresse de RE. A mitocôndria demanda colesterol para a sua biogênese e para a manutenção de membrana. A transferência de colesterol para a membrana de mitocôndrias se dá pela Cav-1 através das MAMs, sendo uma das principais orquestradoras da eficiência da produção de ATP pelo ciclo de Krebs, junto com a liberação de Ca^{2+} (Lopez-Crisosto, Pennanen et al. 2017). O aumento de colesterol mitocondrial é associado com a diminuição de níveis de antioxidantes e uma mudança na fosforilação oxidativa, no que são relacionadas com várias condições fisiopatológicas (Martin, Kennedy et al. 2016). O RE é o primeiro sitio de síntese de proteínas transmembranas, de rotas de secreção, lipídeos e síntese de colesterol. As proteínas sintetizadas pelos ribossomos ancoram na superfície do RE para o controle de qualidade. Em um estudo realizado por Sala-Villa *et al*, o grupo mostrou que a disfunção das MAMs está relacionada com as doenças do fígado como hepatoesteatose, hepatites virais e câncer

hepático, devido a sua exagerada sinalização de inflamação e proteostase (Sala Villa et al, 2016). Nosso grupo mostrou que a superexpressão de Cav-1 aumentou a presença de estresse de RE, autofagossomos e autofagolisossomos, elevando seu metabolismo para a ativação da HSC (Ilha, Moraes et al. 2019). Igualmente, as caveolinas e os rafts lipídicos contidos no RE têm demonstrado um papel crucial na formação de autofagossomos através do recrutamento de reguladores autofágicos (Lopez-Crisosto, Pennanen et al. 2017). O RE faz comunicação com outras organelas como também os lisossomos, chamados de contatos entre RE e lisossomos. O aumento do tamanho dos lisossomos nas células que superexpressam a Cav-1 está em acordo com a ativação das HSCs e o aumento de colesterol mitocondrial, já que os processos de transferência de lipídios também se dão nestes contatos (Cabukusta and Neefjes 2018).

Curiosamente, conseguimos mostrar que tanto a superexpressão quanto o silenciamento de Cav-1 mudaram a dinâmica da rede mitocondrial e a comunicação dos contatos entre RE e as mitocôndrias em comparação com a GRX. As mitocôndrias são importantes organelas enérgicas que alteram a sua organização em resposta a diferentes estímulos sendo reguladoras centrais em vários processos biológicos, tais como bioenergética e apoptose celular, nos quais a rede e a morfologia mitocondrial são participantes nestes eventos celulares (Nagdas and Kashatus 2017). Estas organelas são formadas pela membrana interna (do inglês, *inner mitochondrial membrane*, IMM), pelo espaço entre membranas, pela membrana externa (do inglês, *outer mitochondrial membrane* OMM) e pela matrix. As redes mitocondriais existem em distintas morfologias que variam desde, altamente interconectadas, redes alongadas a altamente fragmentadas e pontuais. Em condições homeostáticas, a rede mitocondrial é constantemente balanceada com as ocorrências de fissão e fusão, e o equilíbrio destas atividades resultam na mistura de uma rede heterogênea (Nagdas and Kashatus 2017). Em nossos resultados vimos que a superexpressão de Cav-1 mudou a morfologia das mitocôndrias e da rede mitocondrial de pontual, nas GRX, para uma rede com mitocôndrias mais arredondadas, com diâmetro maior nas GRX^{EGFP-Cav1}, o que pode ser um indicativo de uma rede mais fragmentada, facilitando assim o transporte pelo citoesqueleto de actina de mitocôndrias para áreas onde a demanda energética é maior. Por outro lado, vimos que o silenciamento da Cav-1 também mudou a morfologia das mitocôndrias e das redes mitocondriais, passando de pontual, GRX, para uma rede mais tubular e alongada na GRX^{GFPshCav1}, aumentando também a respiração ligada a ATP. Ademais, a superexpressão de Cav-1

diminuiu a DRP1 (do inglês, *dynamain-related protein 1*) uma importante GTPase que medeia os processos de fissão, formando um anel constritor ao redor da mitocôndria. Sem alterar outras proteínas como a MNF1 (do inglês, *mitofusin 1*), OPA1 (do inglês, *optic atrophy 1*) e RnR2 (do inglês, *RNA ribosomal 2*), a diminuição da DRP1 é um indicativo que diminuíram os processos de fissão, enquanto que os processos de fusão se mantiveram constantes. Isto poderá explicar também a morfologia das mitocôndrias serem maiores e mais arredondadas, vistas tanto na marcação da rede mitocondrial pelo Mitotracker® Red como na MET.

Da mesma forma, através da MET vimos também os contatos das mitocôndrias com o RE, chamados de MAMs. Estes importantes contatos, ricos em Cav-1, além de fazer a biossíntese de fosfolipídios e a transferência do Ca^{2+} do RE para a mitocôndria, também participam dos processos de fissão e fusão das mitocôndrias, já que os túbulos do RE circulam a mitocôndria juntos com o citoesqueleto de actina e a DRP1, auxiliando os processos de fissão (Mishra and Chan 2014). Com a superexpressão de Cav-1 vimos que o aumento de estresse de RE está intimamente ligado com a ativação das HSCs, podendo estar interferindo nos processos de fissão, já que a diminuição da expressão de DRP1 junto com os maiores e mais espaçados túbulos dos RE, dificultariam a excisão das mitocôndrias. Por outro lado, o silenciamento da Cav-1 não mudou os níveis de expressão DRP1 e os contatos do RE com a mitocôndria parecem mais aproximados. Junto com os resultados de diminuição do tamanho das mitocôndrias, parece que os RE junto com as MAMs estão auxiliando na excisão das mitocôndrias para permanecerem entidades menores.

O envolvimento da Cav-1 nas rotas energéticas e metabólicas, no transporte de colesterol e nas sinalizações com outras importantes proteínas, sinaliza a possibilidade de que a Cav-1 seja um marcador molecular para a ativação das HSCs, possíveis alvos terapêuticos e para estudos das doenças crônicas do fígado. A fim de sanar dúvidas e contribuir para os avanços da pesquisa básica mundial, testes e estudos com o modelo *in vitro* da GRX^{EGFP-Cav1} poderão trazer mais respostas para muitas das perguntas que ainda se encontram na literatura científica.

7. Conclusões

Esta tese apresentou os resultados obtidos no estudo da fisiologia da Cav-1 na linhagem GRX, como importante ferramenta de estudo para as doenças crônicas hepáticas. Como importantes contribuições para o tema de pesquisa desenvolvido nesta tese destacam-se:

- O estabelecimento de uma linhagem estável que superexpressa a Cav-1 a $GRX^{EGFP-Cav1}$, sendo um novo modelo *in vitro* de HSCs ativadas para futuros estudos de doenças crônicas hepáticas.

- Através dos resultados de ativação das HSCs estamos propondo que a Cav-1 seja um marcador molecular para ativação das HSCs.

- O desenvolvimento da cultura de esferoides nos trouxe outro panorama de estudo para a interação com o microambiente em 3D e as proteínas de MEC, podendo ser também modelo para estudos de doenças crônicas, junto com a influência de outras drogas, fármacos ou culturas celulares.

- O estabelecimento da linhagem estável silenciada para a Cav-1, $GRX^{GFPshCav-1}$, para comparar e estudar as três fisiologias de interação com a Cav-1

- A superexpressão e o silenciamento da Cav-1 aumentaram a respiração celular ligada ao ATP, sem danificar a mitocôndria ou causar ruptura de membrana. Além do mais, a superexpressão de Cav-1 aumentou todos os parâmetros de respiração, o colesterol mitocondrial e a atividade lisossomal.

- A superexpressão e o silenciamento de Cav-1 modificou a morfologia e a rede mitocondrial, mostrando uma estreita relação da respiração celular com a morfologia mitocondrial.

- A superexpressão e o silenciamento da Cav-1 transformou a morfologia das MAMs e o espaçamento entre a mitocôndria e o RE.

8. *Perspectivas*

Para a continuação deste trabalho mais estudos precisam ser realizados para a compreensão do papel da Cav-1 na fisiologia nas células estreladas hepáticas (HSC) e nas doenças crônicas do fígado. Como perspectivas futuras e tendo como base os resultados obtidos até agora no trabalho de caracterização das linhagens GRX^{EGFP-Cav1} e GRX^{GFPshCav1}, pretendemos determinar como a superexpressão e o silenciamento da Cav-1 interferem no estado de ativação, indução de apoptose e modelos para testes de drogas com o desenvolvimento da cultura de esferoides e microambinete 3D.

- Avaliar a influência do silenciamento de Cav-1 sobre os marcadores clássicos de ativação das células GRX^{GFPshCav1}, tais como Col-I, α SMA, desmina e GFAP.

- Avaliar a influência do silenciamento e da superexpressão de Cav-1 sobre a indução de apoptose por marcadores como ATG7, LC3I, LC3II e entre outros.

- Avaliar a influência do silenciamento e da superexpressão de Cav-1 no desenvolvimento de culturas de esferoides com aplicação de fármacos e/ou agentes estressores que podem induzir morte por apoptose/necrose e citotoxicidade celular, usando estes modelos celulares de interação 3D para pesquisa de drogas tanto para reversão de fenótipos, quanto para morte de células ativadas.

- Avaliar a influência da superexpressão e o silenciamento de Cav-1 na rede mitocondrial, proteínas mitocondriais e concentração de Cav-1 e colesterol nas MAMs.

9. Referências

- Asrani, S. K., H. Devarbhavi, et al. (2019). "Burden of liver diseases in the world." *J Hepatol* 70(1): 151-171.
- Bataller, R. and D. A. Brenner (2005). "Liver fibrosis." *J Clin Invest* 115(2): 209-218.
- Bitencourt, S., F. C. de Mesquita, et al. (2012). "Capsaicin induces de-differentiation of activated hepatic stellate cell." *Biochem Cell Biol* 90(6): 683-690.
- 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.
- Bosch, M., M. Mari, et al. (2011). "Mitochondrial cholesterol: a connection between caveolin, metabolism, and disease." *Traffic* 12(11): 1483-1489.
- Cabukusta, B. and J. Neefjes (2018). "Mechanisms of lysosomal positioning and movement." *Traffic* 19(10): 761-769.
- Carotti, S., S. Morini, et al. (2008). "Glial fibrillary acidic protein as an early marker of hepatic stellate cell activation in chronic and posttransplant recurrent hepatitis C." *Liver Transpl* 14(6): 806-814.
- Cokakli, M., E. Erdal, et al. (2009). "Differential expression of Caveolin-1 in hepatocellular carcinoma: correlation with differentiation state, motility and invasion." *BMC Cancer* 9: 65.
- 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.
- de Mesquita, F. C., S. Bitencourt, et al. (2013). "Fructose-1,6-bisphosphate induces phenotypic reversion of activated hepatic stellate cell." *Eur J Pharmacol* 720(1-3): 320-325.
- Elias, M. B., F. L. Oliveira, et al. (2019). "Lycopene inhibits hepatic stellate cell activation and modulates cellular lipid storage and signaling." *Food Funct*.
- 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.
- Fernandez-Rojo, M. A. and G. A. Ramm (2016). "Caveolin-1 Function in Liver Physiology and Disease." *Trends Mol Med* 22(10): 889-904.
- 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.
- Friedman, S. L. (2003). "Liver fibrosis -- from bench to bedside." *J Hepatol* 38 Suppl 1: S38-53.

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.

Gupta, R., C. Toufaily, et al. (2014). "Caveolin and cavin family members: Dual roles in cancer." *Biochimie* 107PB: 188-202.

Guyton, A. C. and Hall, J. E. (2017). *Tratado de Fisiologia Médica* 13^o edição. Elsevier. Rio de Janeiro.

Gvaramia, D., M. E. Blaauboer, et al. (2013). "Role of caveolin-1 in fibrotic diseases." *Matrix Biol.*

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.

Heymann, F. and F. Tacke (2016). "Immunology in the liver--from homeostasis to disease." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 13(2): 88-110.

Ilha, M. (2012). *Estudo da expressão da Caveolina-1 em células estreladas hepáticas (GRX), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.*

Ilha, M. (2015). "Papel da Caveolina-1 na Capacidade de Migração e Proliferação de Células Estreladas Hepáticas." *Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Dissertação de Mestrado.*

Ilha, M., K. D. S. Moraes, et al. (2019). "Exogenous expression of caveolin-1 is sufficient for hepatic stellate cell activation." *J Cell Biochem.*

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.

Ji, D. G., Y. Zhang, et al. (2018). "Cav-1 deficiency promotes liver fibrosis in carbon tetrachloride (CCl₄)-induced mice by regulation of oxidative stress and inflammation responses." *Biomed Pharmacother* 102: 26-33.

Junqueira, L. C. and J. Carneiro (2017). *Histologia Básica* 13^o edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro.

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.

Li, M., D. Chen, et al. (2017). "Caveolin1 protects against diet induced hepatic lipid accumulation in mice." *PLoS One* 12(6): e0178748.

Lieberman, M. and A. D. Marks (2013). *Basic Medical Biochemistry- A clinical approach.*

Lopez-Crisosto, C., C. Pennanen, et al. (2017). "Sarcoplasmic reticulum-mitochondria communication in cardiovascular pathophysiology." *Nat Rev Cardiol* 14(6): 342-360.

Marcellin, P. and B. K. Kutala (2018). "Liver diseases: A major, neglected global public health problem requiring urgent actions and large-scale screening." *Liver Int* 38 Suppl 1: 2-6.

Martin, L. A., B. E. Kennedy, et al. (2016). "Mitochondrial cholesterol: mechanisms of import and effects on mitochondrial function." *J Bioenerg Biomembr* 48(2): 137-151.

Mishra, P. and D. C. Chan (2014). "Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(10): 634-646.

Nagdas, S. and D. F. Kashatus (2017). "The Interplay between Oncogenic Signaling Networks and Mitochondrial Dynamics." *Antioxidants (Basel)* 6(2).

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 (2018). *Lehninger Princípios de Bioquímica 7º edição*. Editora Artmed Porto Alegre.

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.

Pellicoro, A., P. Ramachandran, et al. (2014). "Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ." *Nat Rev Immunol* 14(3): 181-194.

Pinheiro-Margis, M., R. Margis, et al. (1992). "Collagen synthesis in an established liver connective tissue cell line (GRX) during induction of the fat-storing phenotype." *Exp Mol Pathol* 56(2): 108-118.

Rothberg, K. G., J. E. Heuser, et al. (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." *Cell* 68(4): 673-682.

Sala-Vila, A., I. Navarro-Lerida, et al. (2016). "Interplay between hepatic mitochondria-associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice." *Sci Rep* 6: 27351.

Schilling, J. M. and H. H. Patel (2016). "Non-canonical roles for caveolin in regulation of membrane repair and mitochondria: implications for stress adaptation with age." *J Physiol* 594(16): 4581-4589.

Schuppan, D., M. Ashfaq-Khan, et al. (2018). "Liver fibrosis: Direct antifibrotic agents and targeted therapies." *Matrix Biol* 68-69: 435-451.

Singh, S., S. Liu, et al. (2016). "Caveolin-1 is upregulated in hepatic stellate cells but not sinusoidal endothelial cells after liver injury." *Tissue Cell* 48(2): 126-132.

Song, Y., S. H. Kim, et al. (2016). "Activated hepatic stellate cells play pivotal roles in hepatocellular carcinoma cell chemoresistance and migration in multicellular tumor spheroids." *Sci Rep* 6: 36750.

Sonnino, S. and A. Prinetti (2009). "Sphingolipids and membrane environments for caveolin." *FEBS Lett* 583(4): 597-606.

Tennakoon, A. H., T. Izawa, et al. (2013). "Characterization of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-expressing hepatic stellate cells and myofibroblasts in thioacetamide (TAA)-induced rat liver injury." *Exp Toxicol Pathol* 65(7-8): 1159-1171.

Tsuchida, T. and S. L. Friedman (2017). "Mechanisms of hepatic stellate cell activation." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 14(7): 397-411.

Vinci, M., S. Gowan, et al. (2012). "Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation." *BMC Biol* 10: 29.

Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." *J Pathol* 214(2): 199-210.

Yamazaki, H., M. Oda, et al. (2013). "Relation between ultrastructural localization, changes in caveolin-1, and capillarization of liver sinusoidal endothelial cells in human hepatitis C-related cirrhotic liver." *J Histochem Cytochem* 61(2): 169-176.

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.

Zhou, Z., M. J. Xu, et al. (2016). "Hepatocytes: a key cell type for innate immunity." *Cell Mol Immunol* 13(3): 301-315.

Zou, H., E. Stoppani, et al. (2011). "Caveolin-1, cellular senescence and age-related diseases." *Mech Ageing Dev* 132(11-12): 533-542.