

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

EXPRESSÃO DO GANGLIOSÍDIO GD2 NAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO PARA
ADIPÓCITOS OU OSTEÓBLASTOS

SÍLVIA RESENDE TERRA

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Co-Orientadora: Prof. Dra. Vera Maria Treis Trindade

Porto Alegre, 2010

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

EXPRESSÃO DO GANGLIOSÍDIO GD2 NAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DE TECIDO ADIPOSEO HUMANO DURANTE A DIFERENCIAÇÃO PARA
ADIPÓCITOS OU OSTEÓBLASTOS

SÍLVIA RESENDE TERRA

Orientadora: Prof. Dra. Fátima Costa Rodrigues Guma

Co-Orientadora: Vera Maria Treis Trindade

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

Porto Alegre

2010

“Aprendi com as primaveras a me deixar cortar e voltar inteira”.
Cecília Meireles, poetisa

AGRADECIMENTOS

À Professora. Fátima Costa Rodrigues Guma

Por acolher, ensinar e oferecer à oportunidade de trabalhar em uma área inovadora.

À Professora Vera Maria Treis Trindade

Pela amizade, auxílio na realização do projeto e na interpretação dos resultados.

Às Professoras Vanessa Schein e Letícia Pettenuzzo, principalmente pela amizade, orientação e ajuda na realização de experimentos de molecular, citometria de fluxo, microscopia confocal e análises estatísticas.

À todo o grupo do laboratório 21 e aos amigos que adquiri no Departamento de Bioquímica da UFRGS!

À todos os meus amigos e colegas de profissão pela amizade, companheirismo e compreensão.

À toda minha família, incluindo os cães e gatos!

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	7
2. ABSTRACT	8
3. LISTA DE ABREVIATURAS	9
4. INTRODUÇÃO	11
4.1. Células Tronco Mesenquimais.....	11
4.1.1 Critérios que caracterizam as MSCs.....	13
4.2. Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo.....	14
4.3. Gangliosídios.....	19
4.4. Gangliosídios e Células Tronco Mesenquimais.....	23
4.5. Hipótesesde trabalho.....	26
4.5.1. <i>Objetivos específicos</i>	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
5.1. Isolamento e cultivo.....	27
5.1.1. Aspéctos Éticos	28
5.2. Diferenciação.....	28
5.2.1. <i>Diferenciação adipogênica</i>	29
5.2.2. <i>Diferenciação osteogênica</i>	29
5.2.3. <i>Ensaio e formação de colônias (CFU)</i>	29
5.3. Ensaio de proliferação	29
5.4. Isolamento e análise dos gangliosídios	30
5.5. Análise por citometria de fluxo.....	30
5.6. Imunocitoquímica	31
5.7. PCR semi-quantitativo	32
5.8. PCR em tempo real	33
5.8. Análise estatística.....	33

6. RESULTADOS	34
7. DISCUSSÃO.....	45
8. CONCLUSÕES	51
9. PERSPECTIVAS.....	53
10. REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS	61
LISTA DE FIGURAS	62
LISTA DE TABELAS	63

1 RESUMO

As células tronco mesenquimais de tecido adiposo (MSCs-TA) são células progenitoras que residem entre adipócitos e contribuem para o *turnover* do tecido adiposo. Gangliosídeos são glicoensfigolipídios localizados na membrana das células, envolvidos na regulação do crescimento celular, interação de superfície, sinalização transmembrana e diferenciação celular. O gangliosídeo neural GD2 foi relatado como um marcador de superfície de células tronco mesenquimais de medula óssea e cordão umbilical, mas existem poucos dados sobre a expressão do GD2 em MSCs-TA indiferenciadas e nas diferenciadas para adipócito ou osteoblasto. Nosso principal objetivo foi estudar a expressão de gangliosídeos nas MSCs-TA, em especial o GD2, durante a diferenciação adipogênica e osteogênica. Para isso, as MSCs-TA foram isoladas de lipoaspirado humano, cultivadas e induzidas para diferenciação adipogênica e osteogênica. As análises foram feitas por HPTLC, microscopia confocal, citometria de fluxo e PCR em tempo real. Por HPTLC, as MSCs-TA indiferenciadas e MSCs-TA diferenciadas para adipócitos e osteoblasto mostraram aumento do perfil de gangliosídeos complexos. A microscopia confocal evidenciou os gangliosídeos GM3, GM1 e GD2 na superfície das células e, por citometria de fluxo, identificamos uma subpopulação de células GD2 positivas nas MSCs-TA e MSCs-TA diferenciadas para adipócito ou osteoblasto. Entretanto, o percentual de células GD2 positivas decresceu com a diferenciação. A expressão do mRNA da GD2 sintase aumentou na diferenciação adipogênica e diminuiu na diferenciação osteogênica. O GD2 é um substrato para a biosíntese de gangliosídeos complexos e o aumento da expressão da GD2 sintase pode estar relacionado com o aumento de gangliosídeos complexos que ocorre durante a diferenciação adipogênica.

Palavras chaves: MSCs-TA, diferenciação, gangliosídeos , GD2

2 ABSTRACT

Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue (MSCs-TA) are progenitor cells that reside between adipocytes, and contribute to the turnover of adipose tissue. Gangliosides are glycosphingolipids localized in cell membrane, involved in cell growth regulation, surface interaction, transmembrane signaling and differentiation. The neural ganglioside GD2 has been reported as surface marker for MSCs from bone marrow and umbilical cord, but sparse data exist about the expression of GD2 in MSCs-TA and during the differentiation to adipocytes and osteoblast. Our aim was to study the expression of gangliosides, in special of GD2 in MSCs-TA and during the adipogenic and osteogenic differentiation. Thus MSCs-TA were isolated from lipoaspirate, cultured and induced to adipogenic and osteogenic differentiation. Then, we examined the gangliosides expression by HPTLC, confocal microscopy, flow cytometry and real-time PCR. By HPTLC, the MSCs-TA and MSCs-TA differentiated into adipocytes and osteoblast demonstrate an increased complex gangliosides profile. The confocal microscopy showed the presence of GM3, GM1, and GD2 on the cell surface. By the flow cytometry, we identified a GD2 positive subpopulation in MSCs-TA and in MSCs-TA differentiated to adipocytes and osteoblast. However, the percentage of GD2 positive cells decreased with the differentiation. The expression of GD2 synthase mRNA increased during the adipogenic differentiation and decreased in osteogenic differentiation. GD2 is a substrate for the complex gangliosides biosynthesis, and the increase in GD2 synthase expression could be related with the increase in complex gangliosides that occurs during the adipogenic differentiation.

Key words: MSCs-TA, differentiation, gangliosides , GD2

3 LISTA DE ABREVIATURAS

CD - Marcadores de diferenciação de superfície celular

CEP - Conselho de ética em pesquisa

CFU-F - Unidades formadoras de colônia de fibroblastos

DIC - Contraste diferencial de interferência

FACS - Separação celular ativada por fluorescência

FDC-P1 - Linhagem precursora mielóide dependente de fator

FITC - Isotiocianato de fluoresceína

GSLs - Glicoensfigolipídios

hMSCs-TA - Célula tronco mesenquimal de tecido adiposo humano

HPTLC - Cromatografia em camada delgada de alta performance

HSCs - Célula tronco hematopoiética pluripotente

HsTBP- Proteína de ligação a TATA-Box

HUCFF - Hospital universitário Clemente Fraga Filho

ISCT - Sociedade internacional para terapia celular

MSCs - Células tronco mesenquimais

MSCs-MO - Células tronco mesenquimal de tecido de medula óssea

MSCs-UC - Células tronco mesenquimal de tecido de cordão umbilical

POH - Heteroplasia progressiva óssea

PPAR γ - Receptor ativador da proliferação de peroxissomos gama

SPT - Enzima serina palmitoil transferase

SSC - Dispersão lateral

SSEA - Antígenos embrionários específicos

INTRODUÇÃO

4. 1 Células Tronco Mesenquimais

O termo mesenquima descreve tecidos de origem mesodérmica embrionária que originam o sistema músculo-esquelético, sanguíneo, vascular, urogenital e tecido conjuntivo (incluindo a derme) (PROCKOP, 1997; NARDI & MEIRELES, 2006; SETHE et al, 2006). No entanto, as células sanguíneas derivam de uma população distinta das células tronco hematopoiética (HSCs) presentes na medula óssea, o que confere ambigüidade ao termo mesenquimal. Na prática as células tronco mesenquimais (MSCs) são um grupo heterogêneo de células estromais não hematopoiéticas multipotentes capazes de se diferenciar em linhagens celulares mesodérmicas e não mesodérmicas como: adipócitos, osteócitos, condrócitos, miócito, neurônios e astrócitos *in vitro* e *in vivo* (Figura 1) (GIORDANO et al, 2007).

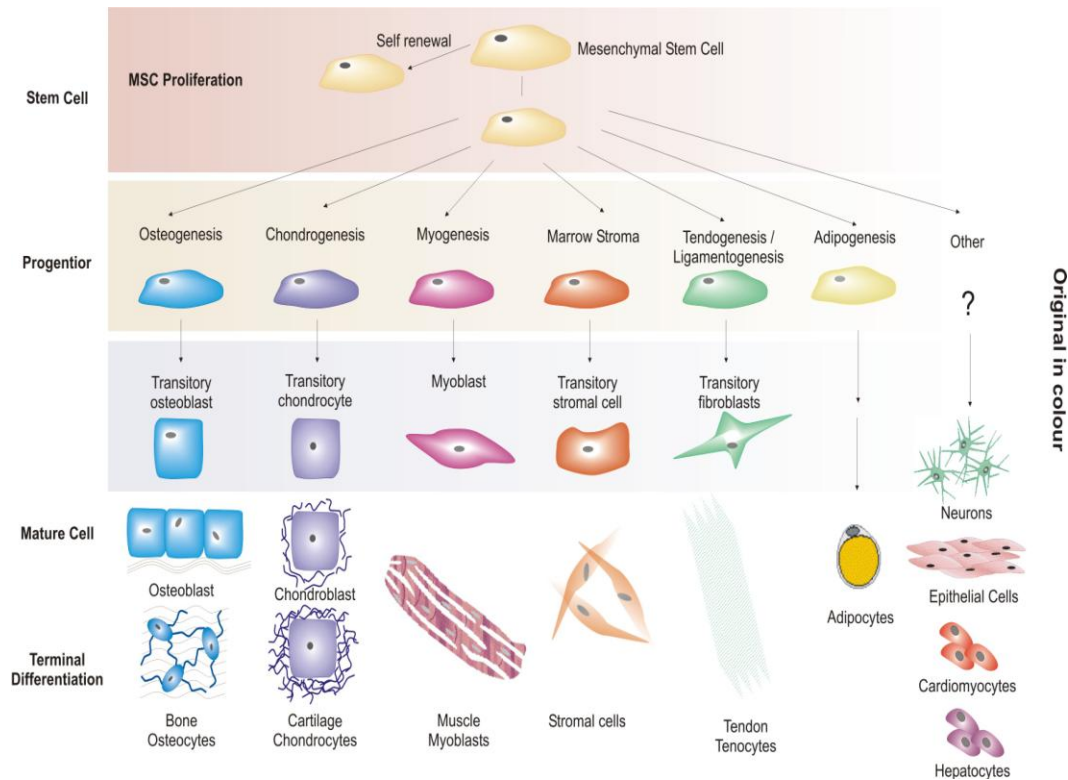


Figura 1: Potencial de diferenciação em múltiplas linhagens da MSCs: As MSCs são capazes de proliferar intensamente antes da diferenciação em vários tipos de tecidos mesenquimais e tipos celulares, como: ossos, cartilagem, músculo, estroma, tendão e tecido adiposo (Retirado de CAPLAN & BRUDER, 2001).

As MSCs possuem capacidade de autorrenovação, ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo seu estado indiferenciado. Essa característica proporciona uma reposição tecidual constante e quando necessário, após sinais do microambiente, essas células dão origem a progenitores comprometidos que gradualmente integram o tecido (NARDI & MEIRELES, 2006). Lesões teciduais também podem ativar este processo. O modelo não exclui a existência de células tronco tecido específico, entretanto se sugere que a aparente diversidade de uma porção de células tronco pós-natal pode ser atribuída a MSCs locais que se comportam como células tronco tecido específicas. Sendo assim, acredita-se que células tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo, principalmente, quando estes sofrem lesão ou injúria (FODOR, 2003).

A medula óssea é uma das fontes mais conhecidas e bem estudadas tanto de células tronco hematopoiéticas (HSCs) como de células tronco mesenquimais. O microambiente da medula óssea provê elementos que suportam hematopoiese e homeostase óssea. Este microambiente inclui uma população heterogênea de células: os macrófagos, fibroblastos, adipócitos, osteoprogenitoras, células endoteliais e células reticulares. Estas populações do estroma são mantidas por uma população de células tronco mesenquimais (PROCKOP, 1997; PITTENGER et al,1999). Assim, a medula óssea é o único órgão conhecido onde duas populações de células tronco adultas (hematopoética e mesenquimal) não só co-existem, mas cooperam (BIANCO et al, 2001). As propriedades das células tronco mesenquimais de medula óssea foram descritas primeiro por Friedenstein (1968) que padronizou o isolamento, caracterizou como células clonogênicas, aderentes em cultura de monocamada e as denominou CFU-Fs - Unidades Formadoras de Colônia de Fibroblastos (FRIEDENSTEIN et al, 1974)

As primeiras e subseqüentes pesquisas descreveram as MSCs de medula óssea humana e murina, mas células similares têm sido isolados de diferentes espécies e tecidos adultos tais como: cordão umbilical, tecido adiposo, fígado, membrana sinovial, pele, líquido amniótico, placenta, polpa dentária (KEATING, 2006).

Células isoladas da medula e outras fontes são amplamente denominadas tronco mesenquimais. Entretanto, o reconhecimento das propriedades biológicas dessa população parece não encontrar um critério geral aceito para atividade de célula tronco, gerando uma denominação científica inadequada e potencialmente confusa para o público leigo. Para esclarecer a terminologia e a inconsistência entre nomenclatura e propriedades biológicas, a *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), sugere que células aderentes ao plástico semelhantes a fibroblastos,

independente do tecido do qual foram isoladas, sejam denominadas célula mesenquimal estromal multiponte. O termo célula tronco mesenquimal (MSC) deve ser usado somente quando os critérios, estabelecidos pelo ISCT para caracterizar uma MSC sejam demonstrados (HORWITZ et al, 2005).

4.1.1 Critérios que caracterizam as MSCs:

- 1- Aderência ao plástico sob condições padrão de cultura
- 2- A Expressão de CD105, CD73, e CD90 e perda da expressão de CD45, CD34, CD14b ou CD11b, CD79 ou CD19 e HLA-DR
- 3- Apresentar capacidade de diferenciação para osteoblasto, adipócito e condrócito *in vitro*.

4.2 Células Tronco Mesenquimais de Tecido Adiposo Humana (hMSCs-TA)

O tecido adiposo deriva da camada mesodérmica do embrião e possui desenvolvimento tanto pré como pós-natal. Em humanos, microscopicamente, as primeiras evidências de adipócitos ocorrem durante o segundo trimestre. Em embriões suínos, anticorpos monoclonais têm identificado pré-adipócitos entre os dias 50 a 70 de gestação. Isto coincide com o aparecimento de células fibroblásticas contendo abundante retículo endoplasmático, citoplasma com alta relação núcleo/citoplasma, localização perinuclear das mitocôndrias e a presença de vacúolos lipídicos. Com a maturação, os adipócitos exibem acúmulo de lipídios unilocular e multilocular. A localização das células progenitoras adipogênicas, a origem e a correlação com as células endoteliais, pericitos ou compartimento estromal permanece controversa e por ser comprovada. Certamente, pré-adipocitos

e células endoteliais compartilham antígenos de superfície, consistente com uma origem comum (GIMBLE et al, 2007).

Os adipócitos apresentam uma grande dimensão (diâmetro de 50-130 μm) e constituem mais de 90% do volume do tecido adiposo, contudo, representam menos de 50% das células desse tecido (SUGA et al, 2008). Devido à rica microvasculatura do tecido adiposo, os adipócitos mantêm contato com os capilares, MSCs-TA, células do endotélio vascular, pericitos, fibroblastos, macrófagos e matriz extracelular (YOSHIMURA et al, 2006).

Desde a descoberta da leptina, o tecido adiposo é reconhecido como o maior órgão endócrino. Além de glicerol, ácidos graxos, leptina e adiponectina liberados pelos adipócitos, têm sido demonstrado que a maioria das adipocinas inflamatórias são liberadas por macrófagos residentes no tecido adiposo e pelas MSCs-TA (TRAYHURN et al, 2008).

Algumas patologias humanas sustentam o conceito que o tecido adiposo contém células progenitoras multipotentes. Crianças com uma doença rara conhecida como Heteroplasia Progressiva Óssea (POH) apresentam como sintomas a formação de osso ectópico no tecido adiposo subcutâneo. Análises histológicas desta patologia demonstram a presença de osteoblastos e condrócitos junto à adipócitos. A POH é um defeito hereditário autossômico dominante associado a mutações no gene responsável pelo acoplamento de receptores hormonais transmembrana com a adelinato ciclase (*GNAS1*). Através do estudo deste erro metabólico inato, foi demonstrada a potencialidade das MSCs-TA, para diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica (KAPLAN et al, 1994).

Vários tumores de tecidos moles fornecem evidências adicionais para a existência de MSCs-TA. Lipoma e lipossarcoma são o diagnóstico mais comum de

tumores de tecidos moles. Frequentemente, estes tumores ocorrem nos tecidos subcutâneo ou adiposo visceral e proliferam lentamente. O receptor ativador da proliferação de peroxissomos gama (PPAR γ), associado à diferenciação terminal de adipócitos, pode ser encontrado em todos os graus histológicos de lipossarcomas. Ligantes de PPAR γ incluem compostos naturais (ácidos graxos de cadeia longa e prostaglandinas) e sintéticos (tiazolidinedionas). *In vitro*, esses agentes podem induzir células de lipossarcoma a se diferenciarem em adipócitos (DEBROCK et al, 2003). Como base nessas observações, médicos têm usado tiazolidinediona por via oral para tratar pacientes com lipossarcoma, o que reduz a proliferação celular e aumenta a expressão de genes marcadores de adipócitos. Embora não tenha sido comprovada a eficácia dos ligantes de PPAR γ como quimioterápicos para pacientes com lipossarcoma, é consistente a hipótese de que lipossarcomas derivam de uma célula-tronco progenitora (TONTONNOZ et al, 1997).

O excesso de tecido adiposo é considerado um estado patológico que está associado a um maior risco de doenças cardiovasculares, a *diabetes mellitus* tipo 2 (DMT2), hipertensão arterial e alguns tipos de câncer (BENDER, 2006). Em todo o mundo, a incidência de indivíduos com sobrepeso e obesidade tem crescido a taxas alarmantes. Vários fatores podem contribuir para esta epidemia na genética, epigenética e em nível de comportamento. A obesidade é a maior evidência da existência de células-tronco dentro do tecido adiposo. Modelos *in vivo* de adipogênese sugerem que os adipócitos maduros são células terminais diferenciadas com capacidade limitada para a proliferação e replicação (CORNELIUS et al, 1994). Estudos com marcadores radioativos mostraram que a taxa de *turnover* para essas células dentro do tecido adiposo varia entre 6 a 15 meses em seres humanos e roedores (STRAWFORD et al, 2004). Presumivelmente,

uma população de células tronco dentro do tecido adiposo é responsável por substituir adipócitos maduros através da vida do indivíduo.

Alguns cientistas propuseram que um mecanismo homeostático ou "adipo-homeostático" mantém o volume total de tecido adiposo em um nível constante. Após rápida perda de peso resultante de dieta, exercício, ou lipoaspiração, o mecanismo "adipo-homeostático" é responsável pelo retorno ao nível inicial do volume total de tecido adiposo de um indivíduo (CONE, 1999). Por exemplo, a remoção cirúrgica de tecido adiposo subcutâneo em ratos desencadeia a formação de tecido adiposo novo (FAUST et al, 1977). Isso não ocorre somente através de um aumento no volume pré-existente de adipócitos, mas também através da geração de novos adipócitos a partir de um progenitor ou grupo de células-tronco. Estes precursores são comprometidos com a linhagem adipogênica por influência da população vascular estromal do tecido adiposo e adipócitos hipertrofiados, mas ainda não expressam marcadores de diferenciação terminal. O fenótipo de adipócito resulta da subsequente ativação de fatores de transcrição adipogênicos (Figura 2) (OTTO & LANE, 2005).

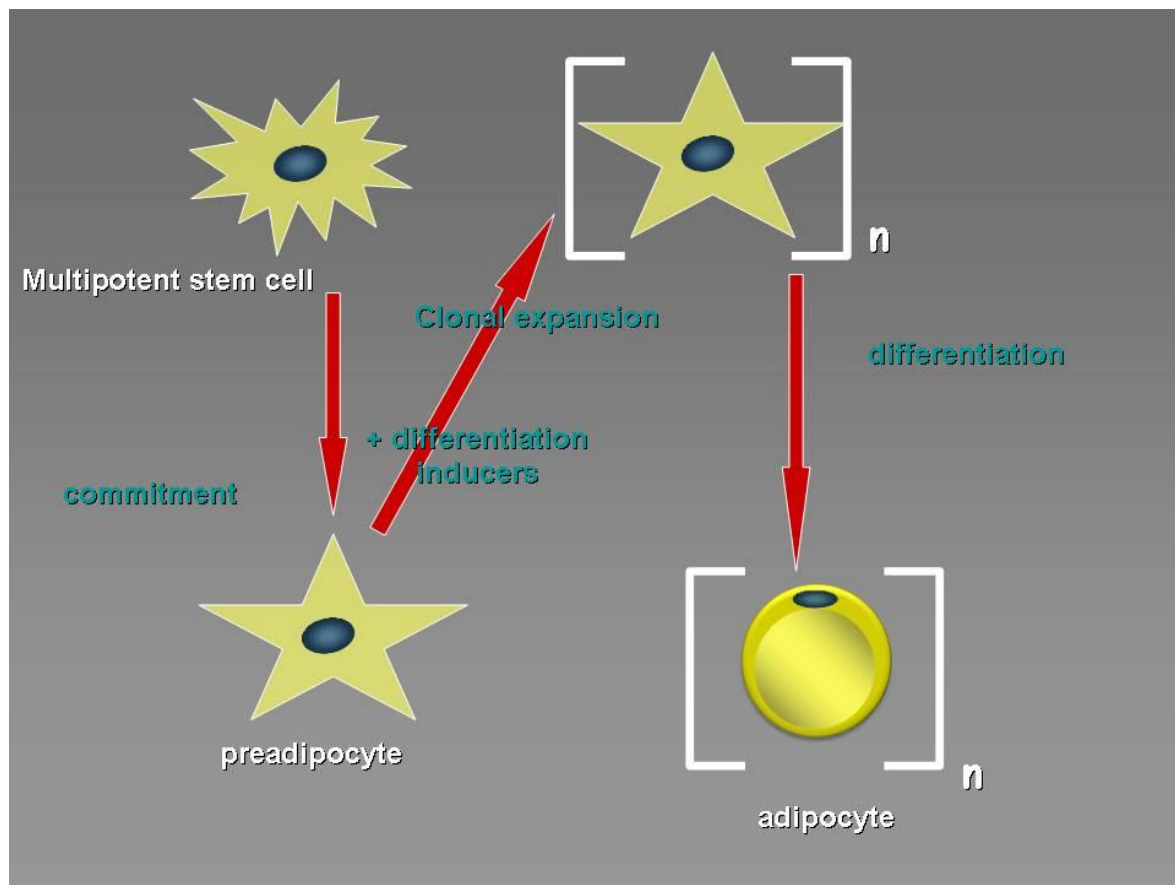


Figura 2: Principais fases da diferenciação adipogênica de MSC. Comprometimento das células tronco multipotentes para a linhagem adipogênica que origina o pré-adipócito. Exposição do pré-adipócito a indutores apropriados – desencadeia a expansão mitótica clonal. Após, ocorre a diferenciação terminal com a ativação de fatores de transcrição adipogênicos. (Retirado de OTTO & LANE, 2005).

Diversos grupos de pesquisa investigam o imunofenótipo de superfície das MSCs-TA humanas e de outras espécies. O perfil de expressão muda com o tempo de cultura, número de passagens e aderência ao plástico (MITCHELL et al, 2006). Apesar de algumas diferenças no isolamento e metodologia de cultivo, o imunofenótipo é relativamente constante entre os grupos de pesquisa (Tabela 1).

Tabela 1: Marcadores de superfície para as MSC (ZUK *et al.*, 2002; MICHELL *et al.*, 2006; MCINTOSH *et al.*, 2006 in GIMBLE *et al.* 2007).

Marcadores	Marcadores positivos	Marcadores negativos
Moléculas de adesão	CD29, CD49, CD54, CD105, CD166	CD11b ,CD18, CD50,CD56, CD62,CD9 CD104
Receptores	CD44, CD71	CD16
Enzimas	CD10, CD13, CD73, Aldeído Desidrogenase	
Moléculas da matrix extracelular	CD90, CD146, Colágeno tipo I e III, Osteopontina, Osteonectina	
Citoesqueleto	Actina de músculo liso, Vimentina	
Hematopoiético		CD14, CD31, CD45
Cascata de complemento	CD55 ,CD59	
Antígeno de Histocompatibilidade	HLA-ABC	HLA-DR
Células Tronco	CD34, ABCG2	
Células Estromais	CD29, CD44, CD73 CD90, CD166	

As MSCs-TA se assemelham as MSCs-MO e mesenquimais de músculo esquelético (YOUNG *et al.*, 1999). Comparações diretas entre MSCs-TA e MSCs-MO demonstram um imunofenótipo 90% idêntico (ZUK *et al.*, 2002). No entanto, diferenças na expressão de proteínas têm sido notadas entre MSCs-TA e MSCs-MO. Por exemplo, a glicoproteína CD34 está presente nas primeiras culturas de MSCs-TA, mas não nas MSCs-MO (PITTENGER *et al.*, 1999).

4. 3 Gangliosídios

Glicolipídios são moléculas de lipídios ligados a um ou mais carboidratos. Uma das características notáveis de glicolipídios é a diversidade estrutural, até agora, 172 glicosfingolipídios (GSLs) neutros, 24 GSLs sulfatados e 188 gangliosídios com variações na cadeia de carboidratos têm sido relatados em tecidos de vertebrados e órgãos. Sua complexidade pode aumentar quando variações em seus componentes lipofílicos são levadas em consideração. São encontrados em praticamente todas as células de vertebrados e fluidos corporais e estão localizadas principalmente, mas não exclusivamente, na membrana plasmática. São classificados, conforme a estrutura lipídica, em glicosfingolipídios (contendo ceramida) e glicoglicerolipídios (contendo glicerol) (YU et al, 2009).

Os glicosfingolipídios são compostos por uma porção ceramida hidrofóbica ancorada no folheto extracitosólico da membrana celular e uma porção glicídica hidrofílica exposta para o espaço extracelular (MACCIONI et al, 2002). A porção ceramida, precursora da síntese de glicosfingolipídios, é formada por uma base esfingóide e um ácido graxo. Sua síntese ocorre no folheto citosólico do retículo endoplasmático através da formação de 3-cetoesfinganina pela enzima serina palmitoil transferase (SPT). A partir da ceramida são formados vários esfingolipídios como: esfingomielina, glicosilceramida, galactosilceramida. A glicosilceramida pode ser convertida em lactosilceramida sendo esta o anábolo mais importante para a formação de glicosfingolipídios complexos. A lactosilceramida é substrato para a formação de esfingolipídios contendo unidades de ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico) denominados gangliosídios (LANGEVELD & AERTS, 2009). Por existir uma grande variedade de gangliosídios uma nomenclatura foi desenvolvida por Svennerholm (1963), um pioneiro na pesquisa sobre gangliosídios. De acordo com esta nomenclatura, G representa gangliosídeo, A para asialo, M-para monosialo, D-

para disialo e T-para trisialo-gangliosídeo. A lactosilceramida e cada um de seus derivados sialilados servem como precursores de gangliosídeos complexos da série *o*, *a*, *b* e *c* (Tabela 2).

Tabela 2: Estrutura e nomenclatura dos gangliosídeos baseado em Svennerholm (1963) (Adaptada de YU et al, 2009)

Abreviação	Série	Estrutura
Asialo-GM1	asialo	Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
Fucosyl-GM1		Fuc α 1,2Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GM3	a	Neu5Aca2,3,3Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GM2	a	GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GM1	a	Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GD1a	a	Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GalNAc-GD1a	a	GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GT1a	a	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GT1aa	a	Neu5Aca2,3Gal β 1,3(Neu5Aca2,6)GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GD3	b	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
9-O-acetil-GD3	b	Neu5,9Ac2 α 2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GD2	b	GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GD1b	b	Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GT1b	b	Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GQ1b	b	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GQ1ba	b	Neu5Aca2,3Gal β 1,3(NeuAca2,6)GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GT3	c	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GT2	c	GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GT1c	c	Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GQ1c	c	Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5 Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
GP1c	c	Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(Neu5Aca2,8Neu5Aca2,8Neu5Aca2,3)Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
SSEA-1		Gal β 1,4(Fuca1,3)GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
SSEA-3		Gal β 1,3GalNAc β 1,3Gal α 1,4Gal β 1,4Glc β 1,1Cer
SSEA-4		Neu5Aca2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,3Gal α 1,4Gal β 1,4Glc β 1,1Cer

As diferentes séries são caracterizadas pela ausência (série o), ou presença de: um (série a), dois (série b), ou três resíduos ácido siálico (série c) unidos aos resíduos de galactose interna e ou da extremidade não redutora do oligossacarídeo (TETTAMANTI & BASSI et al, 2003; LANGEVELD & AERTS, 2009) (Figura3).



Figura 3: Visão esquemática do metabolismo de Glicoesfingolípídios. G: Gangliosídeo, A: Asialo-, M: Monosialo-, D: Disialo- e T: Trisialo-gangliosídeo (LANGEVELD & AERTS, 2009).

Os gangliosídios estão localizados na face externa da membrana plasmática com a porção oligossacarídica voltada para a superfície celular e a porção ceramida

inserida na camada externa da membrana. Através dessa conformação os gangliosídeos são posicionados para interagir com células vizinhas, matrix extracelular, componentes do meio extracelular (MACCIONI et al, 1999; TETTAMANTI & BASSI et al, 2003). Estudos anteriores demonstram o envolvimento dos gangliosídeos na proliferação, diferenciação, crescimento, migração e interação com toxinas e vírus (ZELLER & MARCHASE, 1992; LLOYD & FURUKAWA, 1998). Na membrana plasmática os gangliosídeos podem se reunir e interagir com receptores, proteínas e colesterol formando microdomínios de membrana que participam do processo modulação de sinalização celular.

A hipótese de microdomínios de membrana foi formulada por Simons e Van Meer (1988) e comprovada uma década depois através de estudos que demonstraram o envolvimento dos gangliosídeos com a atividade de receptores de tirosinas quinase tais como: receptores para o fator crescimento epidermal (EGFR), receptor para fator derivado de plaquetas (PGFR), receptor para fator de crescimento de fibroblastos (FGFR), receptor para tiosina quinase A (trkA) e receptor de insulina (LAUC & HEFFER-LAUC, 2006).

4.4. Gangliosídeos e Células Tronco

Sabe-se que mudanças significativas no padrão de expressão de gangliosídeos ocorrem durante o desenvolvimento e diferenciação celular, sendo assim, os gangliosídeos tem sido freqüentemente usados como marcadores de desenvolvimento (YU et al, 2009).

Em células tronco embrionárias de camundongos de 14 dias, foi demonstrada a expressão dos gangliosídeos GM3, GM1 e GD1a. Após a diferenciação com ácido

retinóico ocorre, aumento da complexidade e da expressão de gangliosídios, com o predomínio do gangliosídio GD3 e dos gangliosídios sintetizados a partir dele (KIMBER et al, 1993).

Glicosíngolípídios neutros como: lactosíceramida, ceramida trihexosídeo, globosídeo e o antígeno de Forssman têm sido identificados em células tronco embrionárias. Na linhagem de célula tronco embrionária H7, em estudos por citometria de fluxo, foi revelada a presença dos antígenos embrionários específicos 3 e 4 (SSEA 3 e 4) da série globo dos glicosíngolípídios. Esses antígenos são *down-regulados* durante a diferenciação com concomitante aumento dos gangliosídios GD3, 9-O-acetil GD3 da série *b* e o GD2 da série *c* (DRAPER et al, 2002)

Em células tronco neurais de camundongo e humanas, a expressão do gangliosídio GD2 foi detectada por citometria de fluxo. Outro estudo mostrou por técnicas bioquímicas o predomínio de gangliosídio GD3 em células tronco neurais de camundongo. Já os gangliosídios da série *a* GM1 e GD1a não são detectados na célula tronco neuronal mas são *up-regulados* na diferenciação (KLASSEN et al, 2001; YANAGISAWA et al, 2004).

Recentemente foi caracterizada a expressão de gangliosídios em células tronco de tumores cerebrais, como: gliomas, neuroblastomas, astrocitoma e oligodendroglioma. Essas células tronco tumorais apresentam expressão de gangliosídios GT3, GT2, GQ1c da série *c*. Estes estudos demonstram que os gangliosídios da série *c* podem ser ferramentas úteis na identificação de células tronco tumorais (TCHOGHANDJIAN et al, 2009).

Em células tronco hematopoiéticas (HSCs), não foi observada a expressão de gangliosídios, provavelmente pelo baixo percentual dessas células na medula óssea. HSCs de camundongos constituem 0,004% do total de células mononucleares da

medula óssea. Os gangliosídeo GM3, GM2 e GD1a estão expressos em MSCs de polpa dentária, essas células compartilham características celulares e moleculares com MSC-MO. Em ambas a diferenciação neuronal aumenta a expressão do gangliosídeo GD3 (OSAWA et al., 1996).

Progenitores de linfócitos de isolados da medula óssea de rato apresentam 22,8% de monosialogangliosídios, 17,7% de diasialogangliosídios, 15,8% de sialogangliosídios, 19,3 % de trisialogangliosídios e 24,4% de tetrasialogangliosídios. A caracterização molecular desses gangliosídios ainda não foi realizada (YAMAZAKI et al., 2006). Em um estudo de nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a linhagem precursora mielóide FDC-P1 apresenta baixas quantidades de GM3 que é metabolizado para gangliosídios mais complexos das séries *a* e *b*. No mesmo trabalho foi mostrado que o principal gangliosídeo das FDC-P1 é o GM1 (ZIULKOSKI et al, 2006).

As células tronco mesenquimais (MSCs) positivas para o antígeno SSE-4 isoladas de humanos e camundongos apresentam potencial proliferativo e capacidade de diferenciação em adipócito e osteoblasto. Além disso, análises feitas por citometria de fluxo e imunocitoquímica revelaram que o gangliosídeo GD2 é especificamente expresso em MSCs-MO e está ausente em leucócitos CD45 positivos, células progenitoras hematopoiéticas CD34 positivas, células mielóides CD33 positivas, linfócitos T CD3 positivos e linfócitos B CD19 positivos (MARTINEZ, et al, 2007).

Dados recentes demonstram que células GD2 positivas, isoladas de medula óssea, por *beads* magnéticas, apresentam características de MSCs, como: a morfologia, a aderência ao plástico e a multipotencialidade para diferenciar em adipócito, osteoblasto e condrócitos. A presença de células GD2 positivas em MSCs

obtidas de outras fontes, como: tecido adiposo humano e cordão umbilical levou os autores a propor o gangliosídeo GD2 como um possível marcador molecular para as MSCs (MARTINEZ et al, 2007).

4.5 Hipóteses de trabalho

Com base no exposto acima, consideramos importante determinar as alterações na expressão de gangliosídeos que acompanham a diferenciação de culturas de hMSCs-TA em adipócitos e osteoblastos. Pretendemos determinar, se a exemplo do descrito para as células mesenquimais de medula óssea (MSCs-MO) e células mesenquimais de cordão umbilical (MSCs-UC), o gangliosídeo GD2 pode ser considerado como um marcador molecular para as MSCs-TA.

4.5.1 Objetivos Específicos

a) Estabelecer o perfil de gangliosídeos em hMSCs-TA humanas indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblastos.

b) Verificar a presença de células GD2 positivas nas hMSCs-TA e o comportamento dessa população durante a diferenciação adipogênica e osteogênica.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Isolamento e cultivo

As células foram obtidas de tecido adiposo humano através de lipossucção eletiva no Serviço de Cirurgia Plástica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Os lipoaspirados foram obtidos em condições de assepsia, lavados com PBS e tratados com 0,075% de collagenase tipo I em PBS por 30 min a 37°C.

A collagenase foi inativada com igual volume de DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB) e o material digerido centrifugado por 10 minutos. O pellet celular foi suspenso em DMEM com 10% de SFB e cultivado em frasco de cultura convencional. Após 24 horas de cultivo as células em suspensão foram retiradas com a troca de meio e as células mesenquimais obtidas por aderência ao plástico (ZUK et al, 2002) (Figura 4).

As Culturas MSCs-TA em 1ª passagem foram enviadas para o nosso laboratório, cultivadas em DMEM com 10% SFB e utilizadas a partir da 3º passagem.

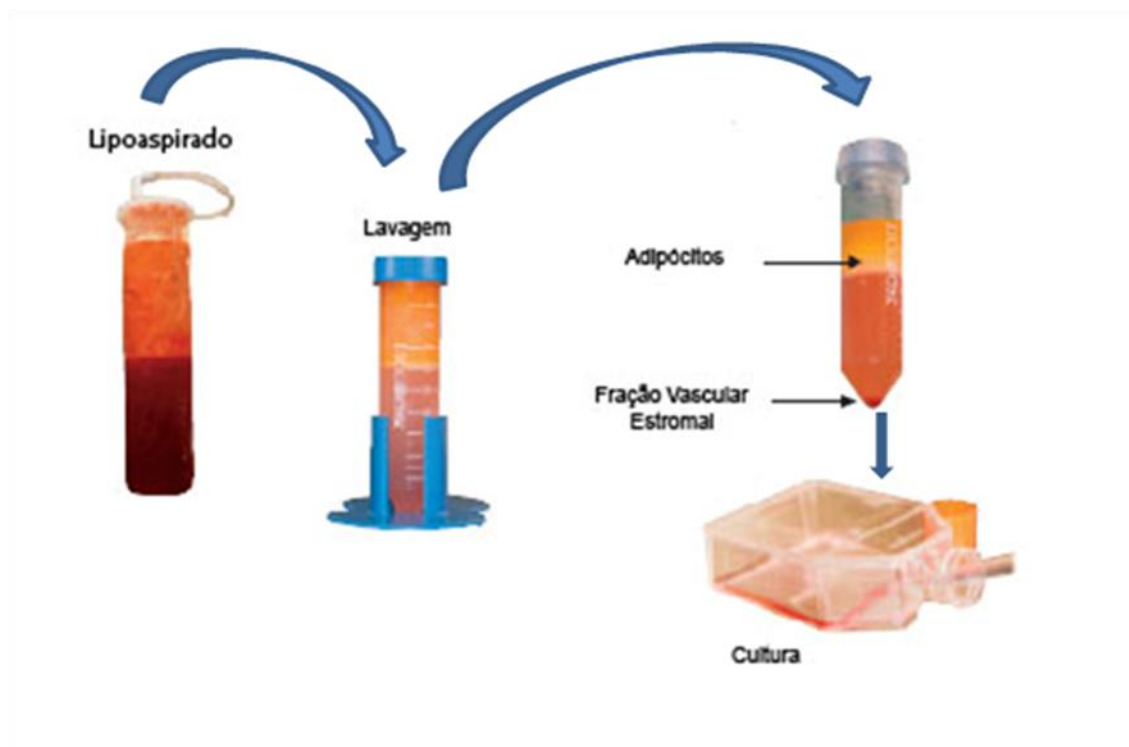


Figura 4: Processamento do lipoaspirado e isolamento das células tronco derivadas de tecido adiposo (Adaptado de GIMBLE *et al*, 2007).

5.1.1 Aspectos Éticos

Este trabalho faz parte do projeto "Interações Celulares no Microambiente Hematopoético: Controle de Proliferação, Diferenciação e Migração de Células Normais e Patológicas" que foi aprovado com o número 043/09 pelo Conselho de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (CEP-HUCFF) que exige o Termo de Consentimento Informado do paciente.

A implicação ética desse projeto é a obtenção de material biológico de tecidos humanos que, deve ser ressaltado, são descartados, não havendo, portanto, risco ou prejuízo para os pacientes nem coletas destinadas somente a obtenção de material para pesquisa.

Neste trabalho foram utilizadas culturas de MSC-TA de 4 pacientes, conforme tabela 3. Em todos os experimentos foram utilizadas culturas entre a 3^a e a 6^a passagem.

Tabela 3: Sexo, idade e local de coleta dos pacientes

Paciente	Sexo	Idade	Local de coleta
1	Feminino	35 anos	abdômen
2	Feminino	49 anos	dorso
3	Feminino	43 anos	abdômen
4	Feminino	39 anos	lateral da coxa

5.2 Ensaio de Diferenciação

5.2.1 Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 μM de insulina, 1 μM de dexametasona e 200 μM de indometacina por 7, 14 e 21 dias (ZUK et al, 2002). A diferenciação foi acompanhada por observação diária em microscópio de contraste de fase e pela coloração das gotas lipídicas citoplasmáticas com *Oil Red O*.

5.2.2 Diferenciação Osteogênica

Para a diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em DMEM com 10% SFB, 50 μM de ácido ascórbico, 0,1 μM de dexametasona e 10^{-2} M de β -glicerofosfato, por 7, 14 e 21 dias. A diferenciação foi acompanhada por observação diária em microscópio de contraste de fase e pela coloração dos depósitos de cálcio com *Alizarina Red S* (ZUK et al, 2002).

5.2.3 Ensaio de formação de colônia (CFU)

As MSC-TA foram semeadas em baixa densidade (100 células/cm²) em placa de 34 mm/diâmetro. As colônias foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com azul de toluidina 0,2%. O número total de CFU foi contado após 14 dias (BOCHEV et al, 2008).

5.4. Ensaio de proliferação

As MSC-TA foram semeadas em triplicata na concentração de 1×10^4 células por poço em placa de 24 poços. O número total de células foi contado em câmara de Neubauer após 24, 48, 96, 144 horas de cultivo (JURGENS et al, 2008).

5.5 Isolamento e análise dos gangliosídios

Culturas semi-confluentes de MSCs-TA indiferenciadas ou diferenciadas para adipócitos e osteoblastos foram incubadas com $1 \mu\text{Ci/mL}$ de $[^{14}\text{C}]$ galactose por 12 horas. Os lipídios foram extraídos com clorofórmio/metanol (2:1, v/v) (ZURITA et al, 2001) e os gangliosídios purificados em coluna Sep-pack C18. O eluato foi submetido à HPTLC usando dois sistemas sucessivos: clorofórmio/metanol (4:1, v/v) e clorofórmio/metanol/ CaCl_2 0,25% aquoso (60:36:8, v/v), segundo Nores (1994). As bandas radioativas foram visualizados por autoradiografia, e quantificados por densitometria usando o software Gene Snap do sistema de captura de imagens Geliance 600 (PerkinElmer). Os padrões co-cromatografados com as amostras, foram visualizados por revelação com Resorcinol-HCl (WILLIAMS & MCCLUER, 1980).

5.6. Análise por citometria de fluxo

Para a análise por citometria de fluxo, foram utilizadas culturas de MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas por 14 dias para adipócito e osteoblasto. As células foram tripsinizadas e os pellets celulares suspensos em PBS gelado contendo 7% de

soro de cabra na concentração de 1×10^5 células /mL. Após, as células foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal murino anti-GD2 humano (clone 14.G2A, BD Bioscience) na diluição de 1:10 em PBS com 7% de soro de cabra ou com anti-CD 117 humano FITC-conjugado. A suspensão celular foi incubada por 30 minutos a 4°C. A revelação da marcação com anti-GD2 foi feita com anticorpo secundário anti- IgG murino produzido em cabra conjugado com Alexa Fluor 488 (Invitrogen) na diluição de 1:35, por mais 30 minutos. Como controle, células foram marcadas apenas com anticorpo secundário.

A relação entre expressão de GD2 e a diferenciação adipogênica e osteogênica foi determinada usando-se tecnologia FACS. O citofluorômetro foi ajustado para analisar a granulosidade citoplasmática (SSC – Side Scatters) e a fluorescência no canal FL1-H. A amperagem e a voltagem e foram ajustadas pelas células controle (MSC-TA indiferenciadas, marcadas apenas com o anticorpo secundário).

Todas as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur (BD Biosciences) usando o programa CellQuest (BD Biosciences).

5.7 Imunocitoquímica

Para os experimentos de imunocitoquímica as hMSCs-TA foram semeadas e diferenciadas sobre lamínulas de vidro colocadas dentro de placas de cultura. Após as células foram fixadas em paraformaldeído tamponado 4% (v/v) por 30 min, lavadas em PBS e bloqueadas com PBS/BSA 3% por 1 hora a 37° C. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-GM3 sobrenadante de hibridoma (DH2), anticorpo primário monoclonal anti-GD2 murino (clone 14.G2A). Os anticorpos secundários foram: anti-IgG murino produzido em cabra conjugados com Alexa Fluor 488 ou 555

(Invitrogen) na diluição de 1:200. A marcação das células apenas anticorpo secundário foi utilizada como controle.

Para marcar o GM1, as células foram incubadas com 10µg/mL da subunidade β da toxina colérica conjugada a FITC. As gotículas de lipídios foram coradas com solução *Oil Red O* em propilenoglicol por 10 min a 37°. As imagens foram obtidas no microscópio confocal FluoView™ FV1000.

5.8. PCR semi-quantitativo (*sq-PCR*)

O mRNA total das MSCs-TA não diferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblastos por 7, 14 e 21 dias foi extraído utilizando-se o kit RNAqueos (livre de fenol/clorofórmio) (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado utilizando-se de 0,5 µg de RNA tratado com DNase I (Invitrogen, USA), utilizando-se o kit SuperScript Reverse Transcriptase 1st Strand System cDNA (Invitrogen, USA). Os primers utilizados foram: para o gene de interesse GD2 sintase: 5'CCA ACT CAA CAG GCA ACT AC-3' (forward) e 5' GAT CAT AAC GGA GGA AGG TC-3 (reverse) e o para o gene constitutivo Tata Box Binding Protein (HsTBP) 5' TGC ACA GGA GCC AAG AGT GAA--3'(forward) e 5'CAC ATC ACA GCT CCC CAC CA-3' (reverse).

As reações de *sq-PCR* foram executadas em termociclador (Veriti, Applied-Biosystems, USA) utilizando-se para a reação de PCR o kit Go Taq Colorless Master Mix (Promega). As reações foram feitas em 25 µl contendo o cDNA e 100 pmol de cada primer específico (*forward* e *reverse*) nas seguintes condições: 10 minutos a 95°C para ativação da Taq DNA Polymerase, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos (abertura da fita), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 30 segundos

(extensão). A análise e quantificação foi realizada em gel de agarose 1,5% e as imagens obtidas no software Gene Snap do sistema de captura de imagens Geliance 600 (PerkinElmer).

5.9 PCR em tempo real (*q-PCR*)

A extração do mRNA total, o tratamento com Dnase e a síntese do cDNA das MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblastos por 7, 14 e 21 dias foi realizado como descrito para o PCR semi-quantitativo (*sq-PCR*). Os primers utilizados foram os mesmos citados acima.

As reações de *q-PCR* foram executadas em triplicata para cada amostra usando-se termociclador (Step One Plus, Applied-Biosystems, USA) e o kit Power SYBR Green PCR (Applied-Biosystems, USA). As reações foram feitas em 20 µl contendo o cDNA e 100 pmol de cada primer específico (*forward* e *reverse*) nas seguintes condições: 10 minutos a 95°C para ativação da Taq DNA Polymerase, 50 ciclos a 95°C por 10 segundos, 60°C por 10 segundos (anelamento), e 72°C por 10 segundos (extensão). A quantificação foi realizada através do método da curva padrão ou o método do $\Delta\Delta CT$ (Livak et al, 2001) e o gene normalizador utilizado foi o HsTBP.

5.9. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis utilizando Mann-Whitney para comparar as hMSCs-TA diferenciadas por 7,14 e 21 dias para adipócito e osteoblasto com as hMSCs-TA indiferenciadas. As análises foram feitas usando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Science).

6. RESULTADOS

Usando os protocolos descritos anteriormente isolamos e cultivamos MSCs-TA de lipoaspirado humano. Com a finalidade de demonstrar que a fração vascular estromal isolada dos lipoaspirados correspondia as MSCs-TA, inicialmente, foi comprovada a capacidade de diferenciação, para adipócitos pela formação de gotículas de lipídios coradas com *Oil Red O* (Figura 5b) e para osteoblastos pela intensa formação de precipitados de cálcio, corados com *Alizarina Red S* (Figura 5c). A capacidade clonogênica das MSCs-TA foi evidenciada no ensaio de formação de colônias (CFU-F). Após 14 dias de cultura foram contadas 15 a 16 colônias por 100 células plaqueadas (Figura 6).

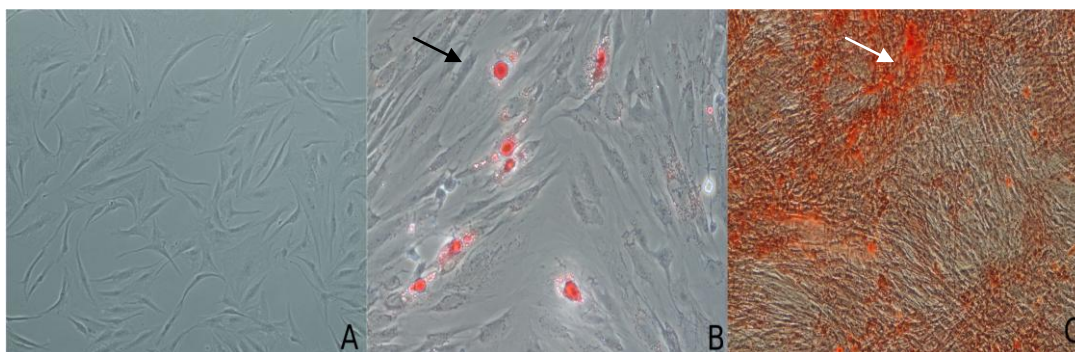


Figura 5: Ensaio de diferenciação (a) MSC-TA indiferenciada; (b) Diferenciação adipogênica de 21 dias das MSC-TA - gotas lipídicas coradas com *Oil Red O* (seta preta) (c) Diferenciação osteogênica de 21 dias das MSC-TA- precipitados de cálcio corado com *Alizarina Red S* (seta branca). Aumento 400x

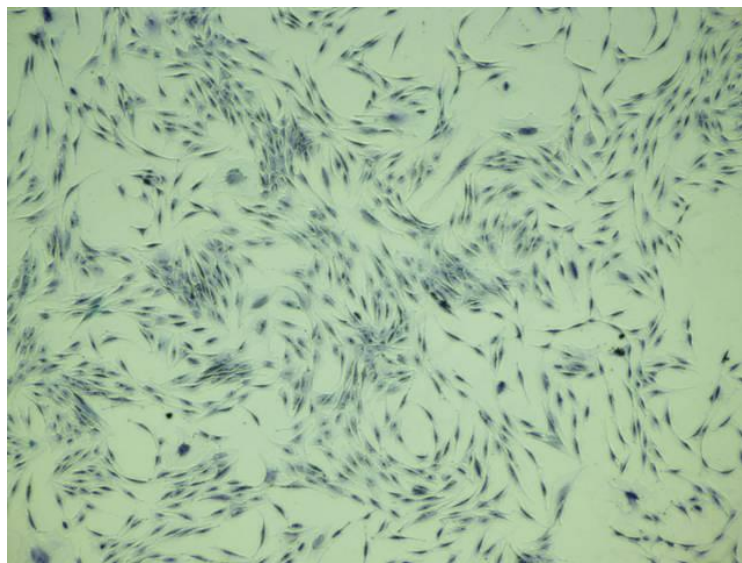


Figura 6: Perfil do CFU das MSC-TA. Após 14 dias de cultura as CFU-F foram coradas com azul de toluidina 0,2% (média de 15-16 colônias por 100 células plaqueadas). Imagem representativa de três experimentos independentes. Aumento de 100x.

Após comprovar a capacidade de diferenciação e o potencial clonogênico, determinamos algumas características imunofenotípicas das MSCs-TA. Como esperado, as MSCs-TA foram negativas para CD117 e positivas para CD73 (dados não mostrados). Além disso, as MSCs-TA expressam o gangliosídeo GD2 que recentemente foi descrito como marcador de MSCs (Figura 7).

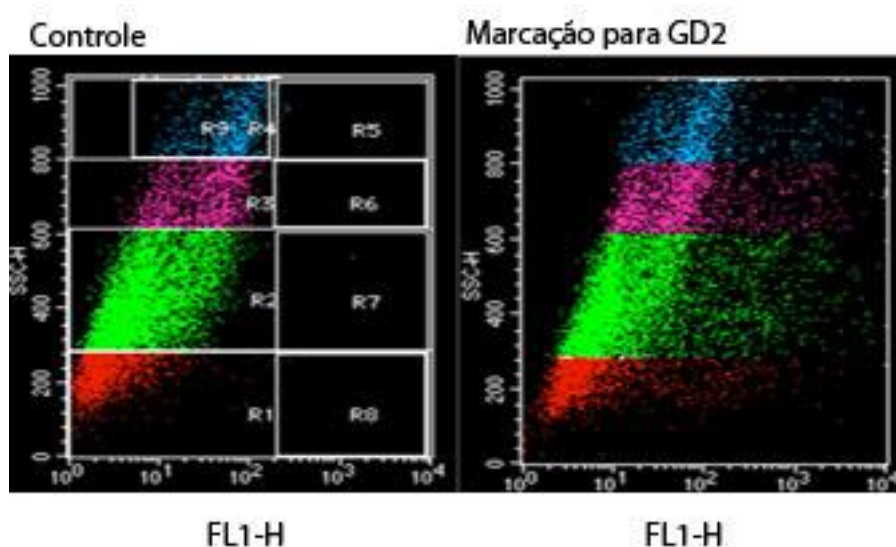


Figura 7: Análise por FACS da expressão de GD2 por culturas de MSC-TA. Dot plots de SSC (granulosidade, eixo y) versus FL1-H (fluorescência verde, eixo x). O eixo y (SSC) foi dividido em 4 regiões de granulosidade crescente (R1 até R4). O eixo x (FL1-H) corresponde à intensidade de fluorescência. As células positivas para GD2 estão distribuídas entre as regiões R5 e R8. Controle, MSC-TA incubadas apenas com o anticorpo secundário.

No ensaio de proliferação observamos que número de células triplica entre 24 e 96 horas de cultura. Após, a velocidade de proliferação diminui, alcançando um platô entre 96 e 144 horas, quando as culturas atingem a confluência (Figura 8).

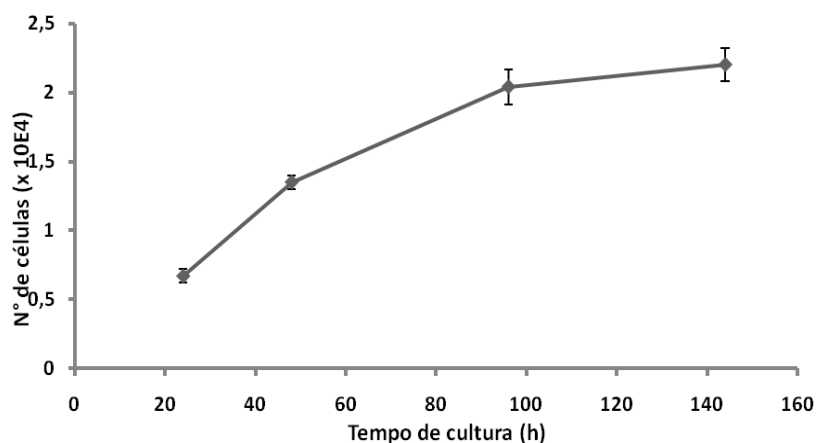


Figura 8: Ensaio de proliferação das MSCs-TA. A proliferação foi avaliada por contagem das células em câmara de Neubauer, 24, 48, 96 e 144h após a semeadura. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados estão expressos como média \pm EP.

Os experimentos descritos acima comprovaram que após a seleção por sucessivas passagens em cultura, a fração estromal vascular isolada dos lipoaspirados humanos correspondia as MSCs-TA. Sendo assim, todos os experimentos foram realizados com culturas entre a 3ª e a 6ª passagem que apresentavam as características de MSCs estabelecidas pela *International Society for Cellular Therapy* (ISCT).

O perfil e a análise da expressão relativa dos gangliosídios presentes nas MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblastos estão mostrados na figuras 9 e 10. O principal gangliosídio das células indiferenciadas é o GM3. Os resultados demonstram que com a diferenciação para adipócito e osteoblasto ocorre um aumento da complexidade dos gangliosídios expressos. Na diferenciação adipogênica verifica-se o desaparecimento da banda correspondente a um glicolípido neutro que migra logo após o GM3.

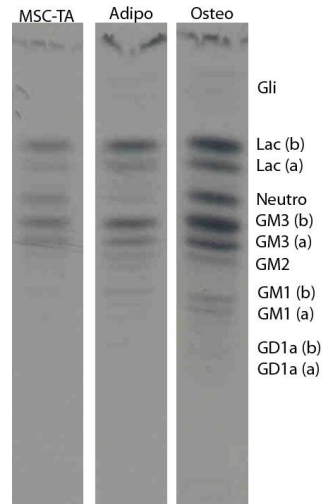


Figura 9: HPTL dos glicoesfingolípídios extraídos de MSCsTA, pré-adipócitos e osteoblastos.

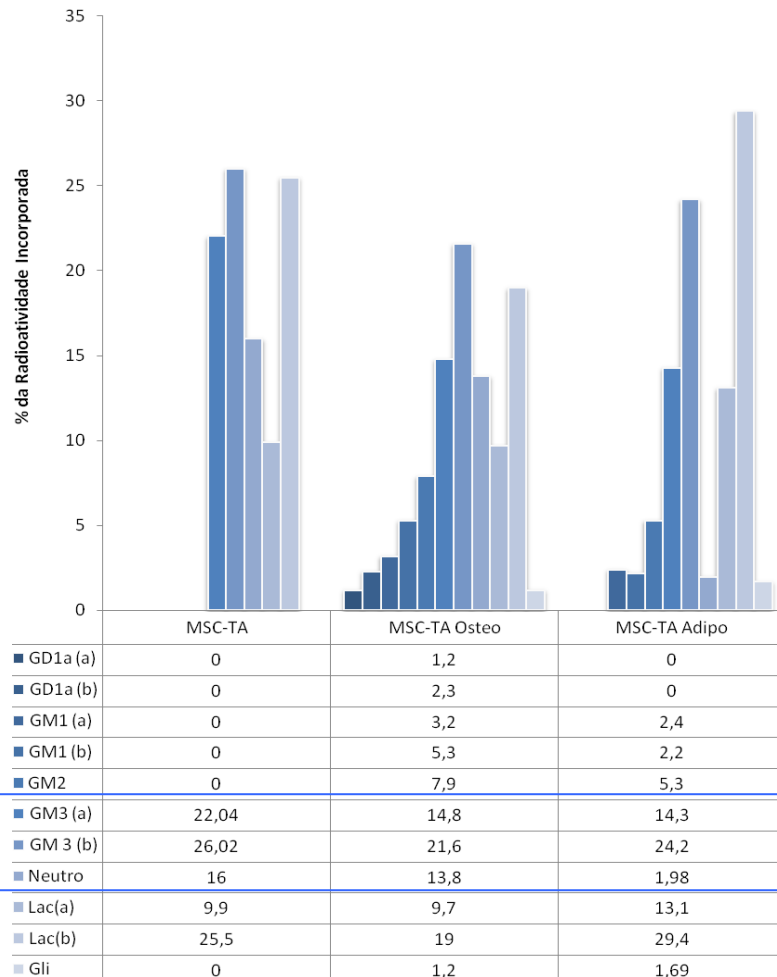


Figura 10: Análise densitométrica da expressão de gangliosídios. O retângulo evidencia a expressão relativa do gangliosídeo GM3 e do glicoesfingolípídio neutro nas MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblasto.

A expressão de gangliosídios pelas MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblastos também foi determinada por imunocitoquímica, utilizando microscopia confocal. Na figura 11, observamos a distribuição dos gangliosídios GD2 e GM1 na membrana plasmática e processos celulares das MSCs-TA indiferenciadas. A figura 12 mostra a distribuição uniforme do gangliosídeo GM1 na membrana plasmática e a localização do gangliosídeo GM3 na região perinuclear e nos processos celulares das MSCs-TA indiferenciadas. Nas figuras 13 e 14 podemos observar a distribuição dos gangliosídios GD2, GM1 e GM3 na membrana plasmática e processos celulares das MSCs-TA diferenciadas para osteoblastos. As figuras 15 e 16 representam MSCs-TA diferenciadas para adipócitos. O gangliosídeo GM3 se localiza, preferencialmente, na membrana plasmática (Figura 15). A figura 16 mostra a presença e colocalização dos gangliosídios GD2 e GM1 em torno das gotas lipídicas. A reconstituição tridimensional obtida a partir de uma varredura em eixo Z comprova a presença do gangliosídeo GM1 em torno das gotas lipídicas (Figura 17).

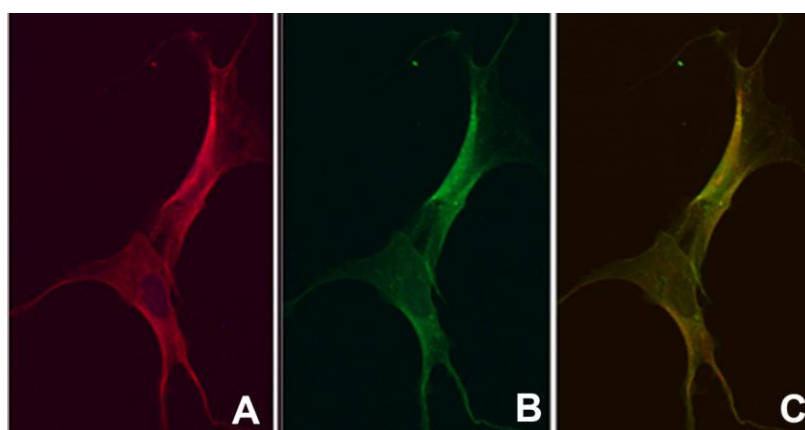


Figura 11: MSC-TA indiferenciadas (a) GD2, (b) GM1, (c) sobreposição de a e b. Aumento 600x.

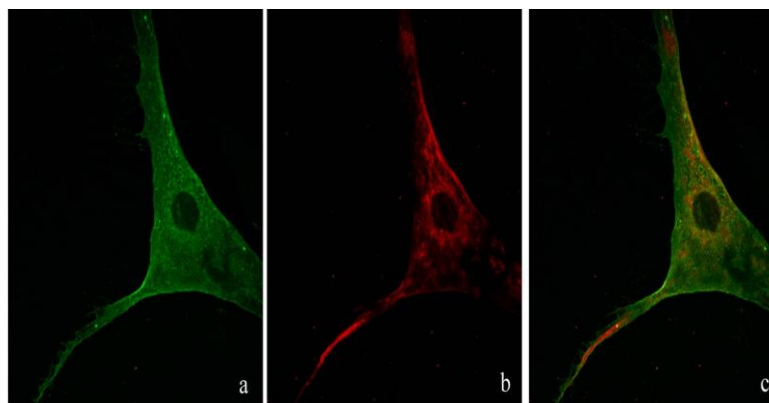


Figura 12: MSC-TA indiferenciadas (a) GM1, (b) GM3, (c) sobreposição de a e b. Aumento 600x.

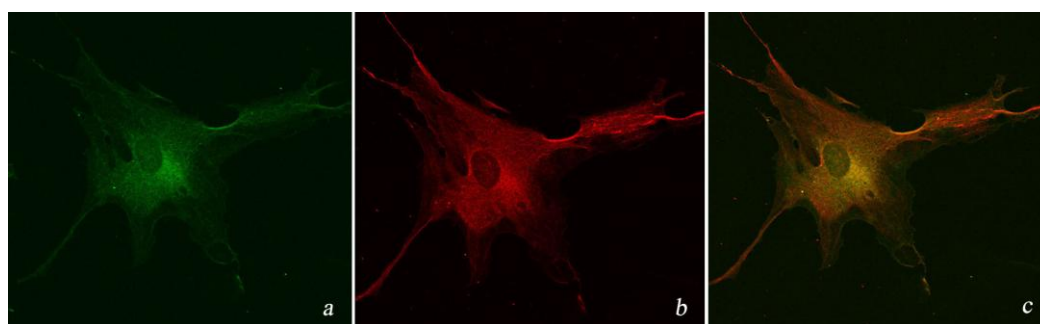


Figura 13: MSC-TA diferenciada para osteoblasto. a) GM1, b) GD2, c) sobreposição de a e b. Aumento 600x

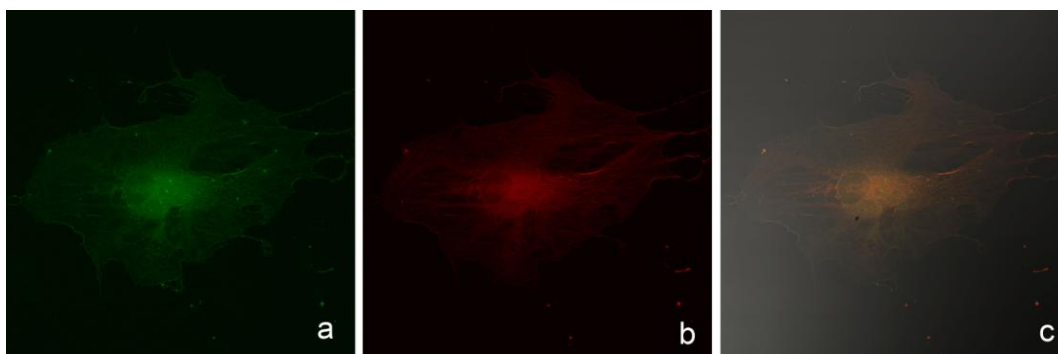


Figura 14: MSC-TA diferenciada para osteoblasto a) GM1, b) GM3 e c) sobreposição de a e b. Aumento 600x.

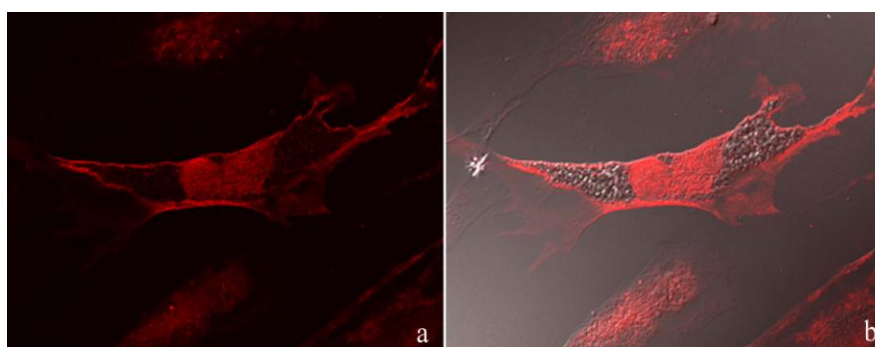


Figura 15: MSC-TA diferenciada para adipócito. a) GM3, b) GM3 e contraste diferencial de interferência (DIC), evidenciando as gotas lipídicas citoplasmáticas. Aumento 600x.

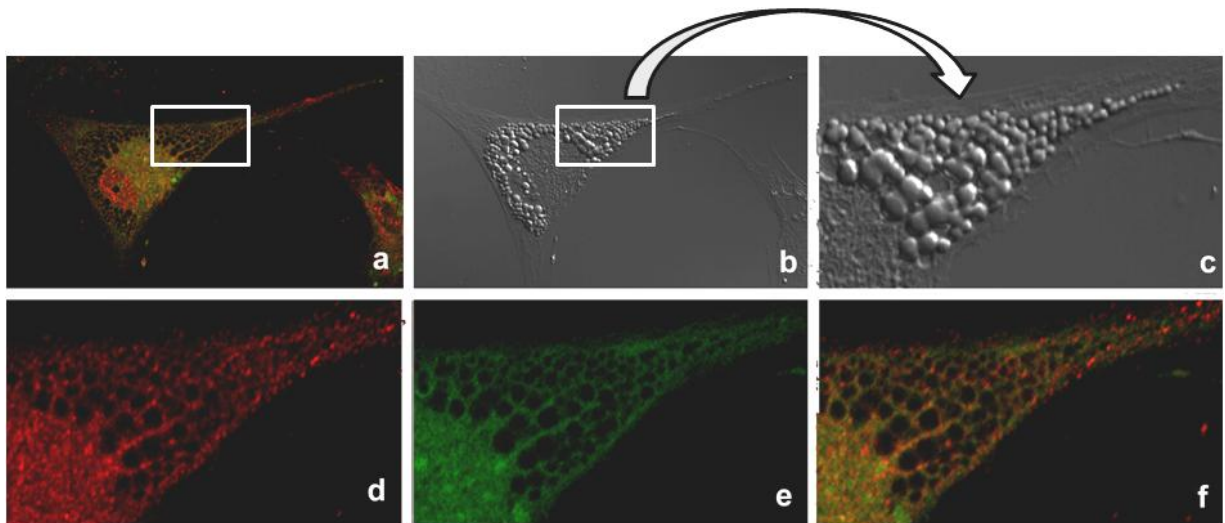


Figura 16: (a) Sobreposição da marcação para GM1 (verde) e GD2 (vermelho), (b) imagem em contraste diferencial de interferência (DIC) mostrando as gotas lipídicas citoplasmáticas e (c, d, e, f) ampliação da região retangular selecionada em b (c) DIC, (d) GD2, (e) GM1 (f) sobreposição das imagens (d) e (e). Em a e b o aumento de 600x.

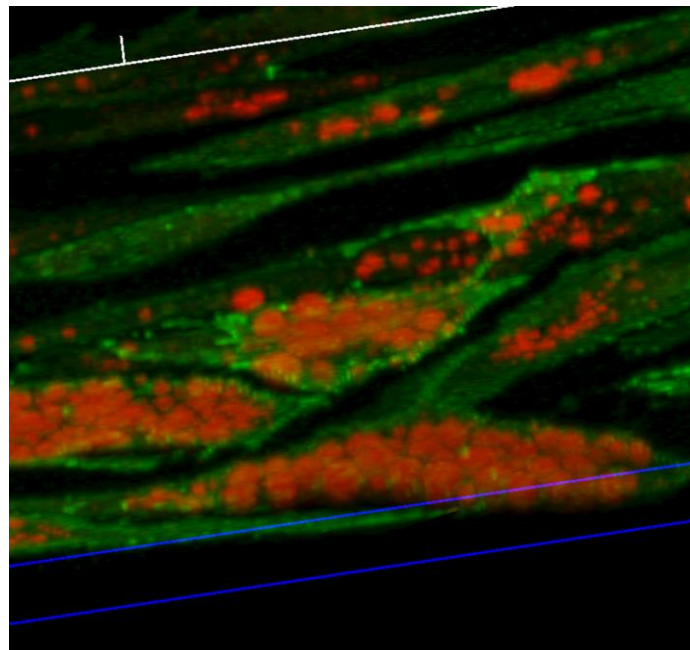


Figura 17: Reconstituição tridimensional de imagens obtidas por varredura no eixo Z, mostrando a presença do gangliosídeo GM1 em torno das gotas lipídicas coradas com *Oil Red O*.

A análise por citometria de fluxo mostrou a existência de uma subpopulação de células GD2 positivas nas MSCs-TA indiferenciadas, como já descrito para MSCs-MO e MSCs-UC. Neste trabalho nós mostramos, pela primeira vez, que essa

subpopulação se mantém na diferenciação para adipócito e osteoblastos, embora em diferentes proporções (Figura 18).

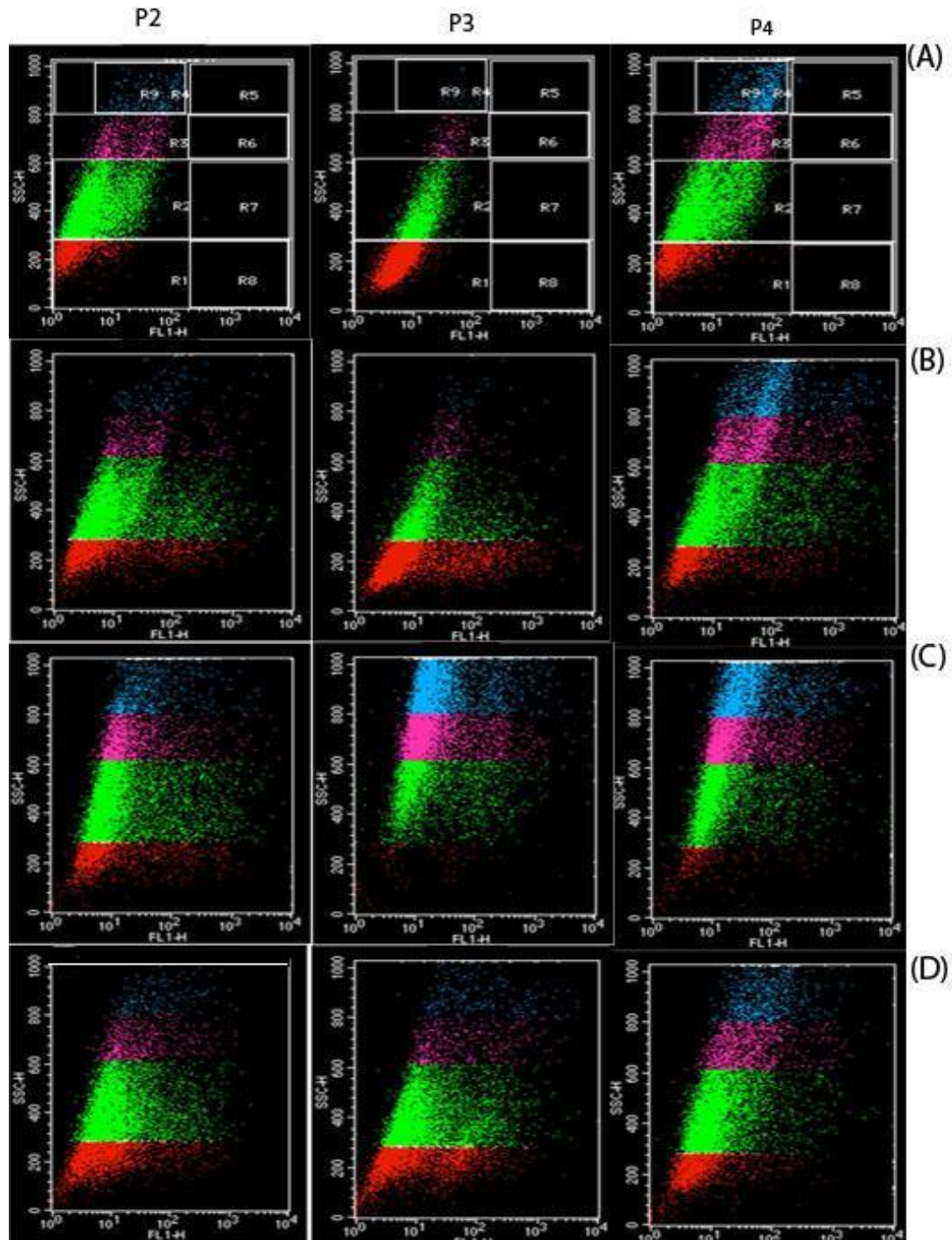
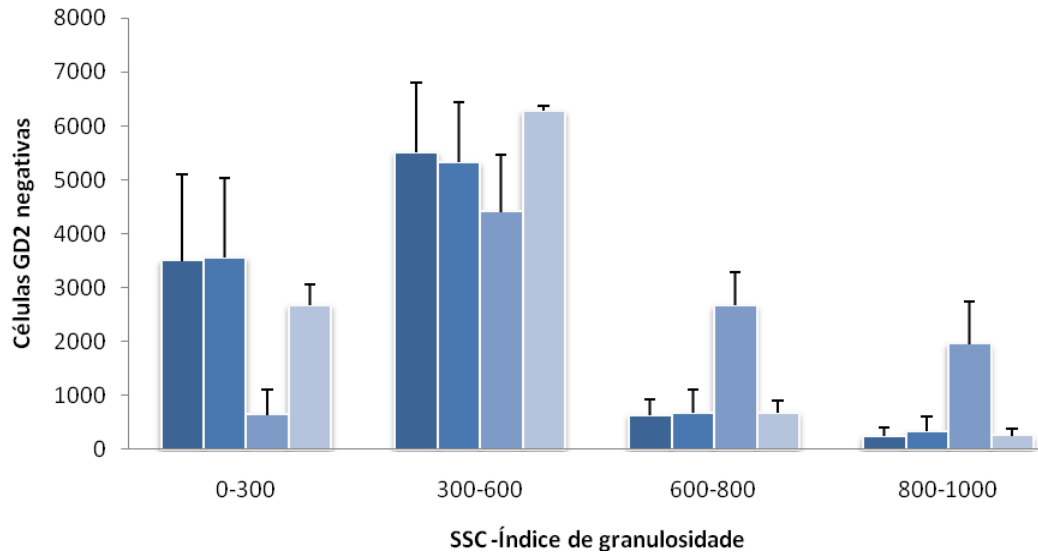


Figura 18: Análise por citometria de fluxo das MSC-TA indiferenciadas e diferenciadas por 14 dias para adipócitos ou osteoblastos. P2, P3 e P4 representam células obtidas dos pacientes 2, 3 e 4. Dot plots de SSC (granulosidade, eixo y) versus FL1-H (fluorescência verde, eixo x). O eixo y (SSC) foi dividido em 4 regiões de granulosidade crescente (R1 até R4). O eixo x (FL1-H) corresponde à intensidade de fluorescência. As células positivas para GD2 estão distribuídas entre as regiões R5, R6, R7 e R8. (A) controle, MSC-TA incubadas apenas com o segundo anticorpo, (B) MSC-TA indiferenciadas marcadas para GD2, (C) MSC-TA diferenciadas para adipócitos, (D) MSC-TA diferenciadas para osteoblastos.

A relação direta entre o aumento do índice de granulosidade (SSC) e a diferenciação adipogênica foi descrita por Lee et al (2004). Neste estudo, usamos o método proposto pelos autores citados, para relacionar a expressão de GD2 com a diferenciação das MSCs-TA. As figuras 19 A e B representam a quantificação dos dotplots apresentados na figura 18. Os resultados apresentados na Figura 19 (A) mostram que na diferenciação adipogênica das MSCs-TA GD2 negativas, o acúmulo de gotas lipídicas está diretamente relacionado com o aumento do número de células com altos valores de granulosidade ($SSC \geq 600-1000$). Observa-se também, que na subpopulação GD2 negativa a maior parte das células, indiferenciadas e diferenciadas, possui granulosidade intermediária, com SSC entre 300 e 600.

A subpopulação GD2 positiva corresponde a aproximadamente 15 % do total de MSCs-TA e a maior parte das células apresentam SSC entre 600 e 800 (Figura 19B). Na diferenciação adipogênica, verifica-se uma diminuição no número de células na faixa de alta granulosidade (SSC 800-1000), onde estariam as células com maior número de gotas lipídicas ou mais diferenciadas. Já, na diferenciação osteogênica observa-se um decréscimo na população GD2 positiva.

(A)



(B)

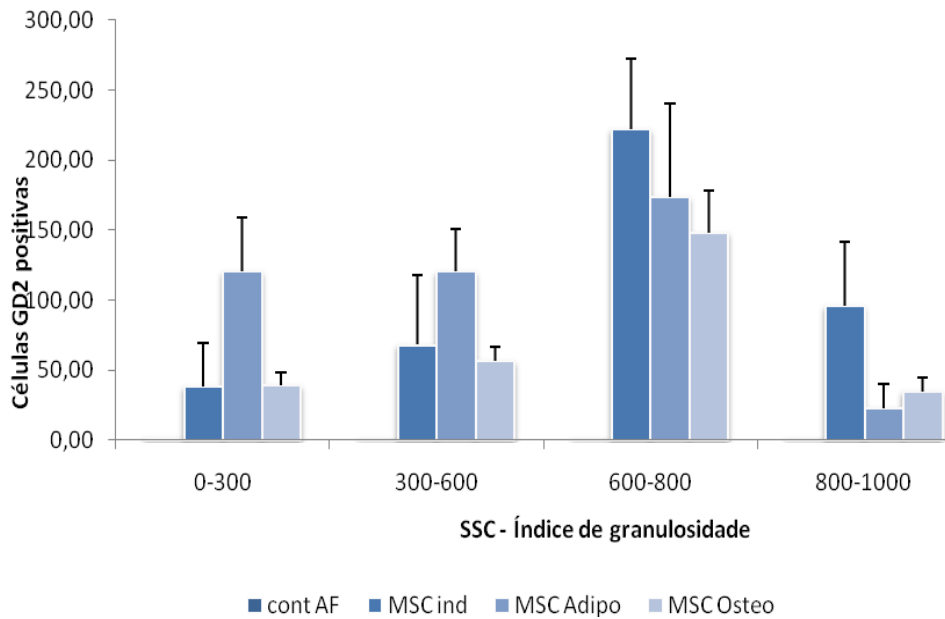


Figura 19: Comparação entre os índices de granulidade das células controle (cont AF) com as MSC-TA indiferenciadas (MSC ind), MSC-TA diferenciadas para adipócitos (MSC Adipo) e para osteoblastos(MSC Osteo) (A) População GD2 negativa: (B) População GD2 positiva.

Por PCR semi-quantitativo (*sqPCR*) determinamos a expressão do mRNA da enzima GD2 sintase nas MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócito e osteoblasto por sete, 14, 21 dias. A Figura 20 mostra a presença de uma banda de 230bp, correspondente ao transcrito esperado para o mRNA da GD2 sintase (Figura 20). Além disso, verifica-se a presença de outras bandas que sugerem a ocorrência de transcritos alternativos ou a inespecificidade do par de primers.

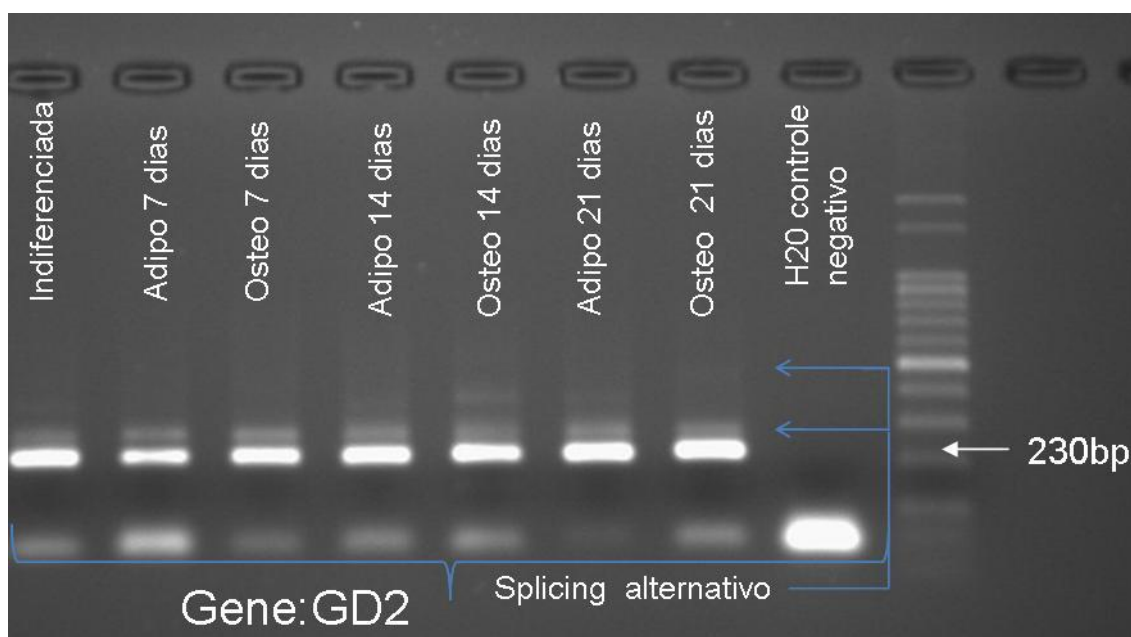
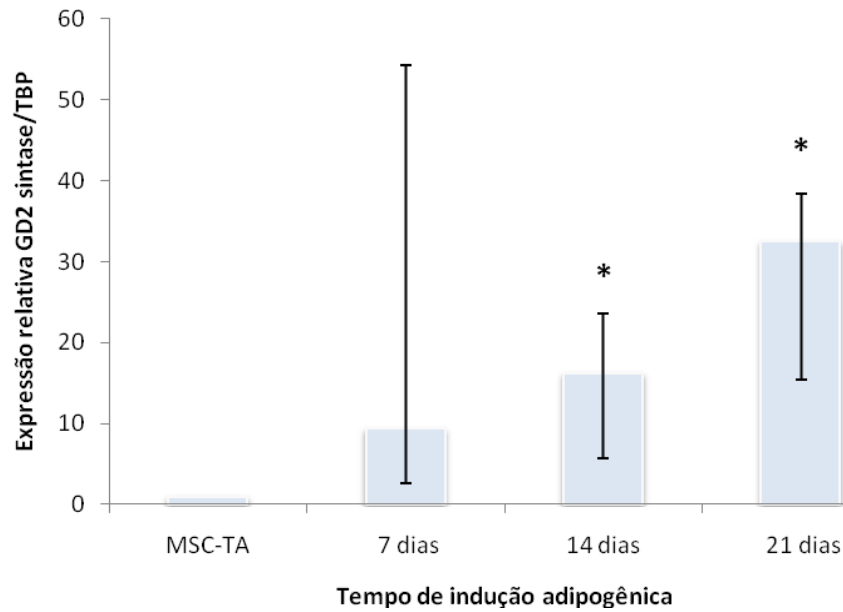


Figura 20: *sq-PCR* do mRNA da GD2 sintase em MSCs-TA indiferenciadas e submetidas à diferenciação para adipócitos e osteoblastos por sete, 14 e 21 dias. A última coluna, à direita, representa o marcador de pares de base e a banda mais forte corresponde a 500 bp.

Por PCR em tempo real (*qPCR*) quantificamos a expressão do mRNA da GD2 sintase nas MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócito e osteoblasto por sete, 14, 21 dias. Os resultados demonstram que a partir do 14º dia de diferenciação adipogênica ocorreu um aumento da expressão do mRNA da GD2 sintase (Figura 21A). Na diferenciação osteogênica houve um decréscimo na expressão do mRNA da GD2 sintase a partir de sete dias (Figura 21B).

(A)



(B)

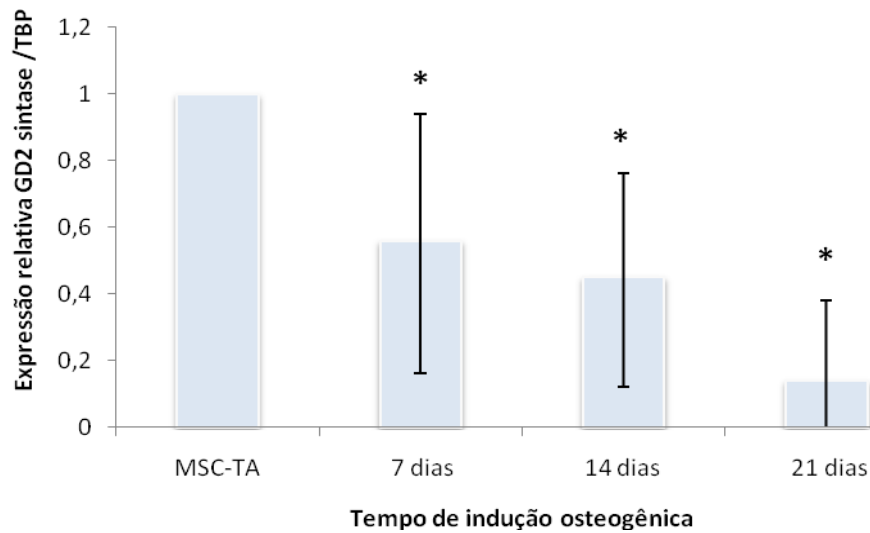


Figura 21: Expressão da GD2 sintase por q-PCR: O mRNA total foi obtido separadamente de culturas de MSC-TA dos pacientes 1, 2, 3 e 4 indiferenciadas e diferenciadas por 7, 14 e 21 dias para adipócitos e osteoblastos. Cada cDNA foi testado em triplicata. Os dados representam a mediana \pm intervalos interquartis (Q25 e Q75) dos níveis de expressão calculados pelo método do $\Delta\Delta CT$ e o gene controle utilizado foi HsTBP. * $p < 0,05$ comparado com MSC-TA (células indiferenciadas).

7. DISCUSSÃO

As MSCs sob condições específicas de cultivo *in vitro* podem ser direcionadas para diferenciação em adipócito, condrócito, osteoblasto, miócito e neurônios. Os mecanismos que direcionam as MSCs para determinada linhagem são em grande parte desconhecidos. O microambiente tecidual onde estão localizadas as MSCs *in vivo* constitui uma unidade básica de tecido fisiológico. Dentro dessa unidade, o contato célula-célula, célula-matriz extracelular e interações com fatores solúveis cria um sistema dinâmico responsável pela geração e manutenção e diferenciação das MSCs. Estas características fazem com que estas células tenham um grande potencial para várias aplicações terapêuticas, como participar de regeneração tecidual, corrigir distúrbios hereditários, diminuir respostas inflamatórias crônicas e liberar agentes biológicos (BYDLOWSKI et al., 2009).

Inicialmente, demonstramos que as MSC-TA isoladas de lipoaspirados humanos de diferentes origens anatômicas apresentavam as características de MSC estabelecidas pelo ISCT, como: a capacidade de aderência ao plástico em cultura, o potencial de diferenciação adipogênico evidenciado pela forte coloração das gotículas lipídicas com *Oil Red O* e o potencial de diferenciação osteogênico evidenciado pela formação de precipitados de cálcio corados com *Alizarina Red S*. Quando semeadas em baixa densidade, as culturas apresentaram capacidade clonogênica, formando cerca de 15 CFU-F por 100 células plaqueadas. No ensaio de proliferação, as MSCs se expandiram e triplicaram no período de 24 para 96 horas, após as células atingirem a confluência e ocorreu uma diminuição na velocidade de proliferação. Quanto às características imunofenotípicas, as MSC-TA foram negativas para CD-117 e positivas para o gangliosídeo GD2.

A identificação de marcadores moleculares para as MSCs, especialmente aqueles localizados na membrana plasmática, torna-se cada vez mais importante para o isolamento e classificação de determinadas populações de células-tronco. Recentemente, Yu e colaboradores (2009) revisaram os padrões de expressão e a função dos glicosfingolípídios presentes nos microdomínios de membrana de células tronco embrionárias, hematopoiéticas, mesenquimais e neurais. Em suas conclusões, os autores propuseram que glicosfingolípídios detectados, especificamente, em diferentes tipos de células-tronco sejam usados como marcadores moleculares para essas células. Como já demonstrado para MSC derivadas de medula óssea (MSC-MO) e de cordão umbilical (MSC-UC) (MARTINEZ, et al, 2007; XU et al, 2009), nós identificamos e quantificamos por citometria de fluxo, nas culturas de MSC-TA humanas uma sub-população positiva para GD2.

Estudos anteriores analisaram o conteúdo gangliosídeos na diferenciação de MSCs de polpa dentária durante a diferenciação osteogênica e neural através extração, purificação e análise por HPTLC (KIM et al, 2008; RYU et al, 2009). Neste estudo, determinamos o perfil de síntese de glicosfingolípídios em MSCs-TA humanas indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e para osteoblastos através de marcação metabólica com [¹⁴C] galactose, extração, purificação e análise por HPTLC.

O principal gangliosídeo expresso pelas MSCs-TA indiferenciadas é o GM3. A diferenciação aumentou a complexidade dos gangliosídeos; GM2, GM1 e GD1a foram identificados nos extratos lipídicos marcados radioativamente, tanto de células diferenciadas para adipócitos quanto nos extratos lipídicos de células diferenciadas para osteoblastos. Foi verificada a presença de glicosil e lactosil ceramida e de um

glicoesfingolípido neutro que migra entre o GM3 e a lactosil ceramida. Nas MSCs-TA diferenciadas para adipócito houve uma grande diminuição na expressão do glicoesfingolípido neutro. O perfil de expressão de gangliosídios nas MSC-TA está em concordância com o descrito por Ryu e colaboradores (2009) que demonstraram a expressão do GM3, GM2 e GD1a em MSCs humanas de polpa dentária durante a diferenciação neural. Nossos resultados diferem de Kim et al (2008) que observou um diminuição no gangliosídeo GM3 e um aumento no gangliosídeo GD1a na diferenciação osteogênica. A expressão do gangliosídeo GM1 também foi demonstrada na diferenciação neural de células tronco embrionárias e MSCs de medula óssea de camundongo (KWAK et al, 2006).

Por imunocitoquímica, podemos comprovar a presença e localização dos gangliosídios GM3, GM1 e GD2 na membrana plasmática, região perinuclear e processos celulares das MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócitos e osteoblastos.

Por microscopia confocal, obtivemos várias imagens que indicam a presença dos gangliosídios GM1 e GD2 em torno das gotas lipídicas citoplasmáticas das MSC-TA diferenciadas para adipócitos. A reconstituição tridimensional obtida a partir de uma varredura em Z, reforça esses resultados, mostrando claramente “clusters” do gangliosídeo GM1 na periferia das gotas lipídicas coradas com *Oil Red O*. As gotas lipídicas são organelas dinâmicas contendo lipídios neutros circundados por uma monocamada de fosfolipídios, colesterol e proteínas como caveolinas e perilipinas (Olofsson et al, 2009). Pouco se sabe sobre a presença de gangliosídios circundando as gotas lipídicas citoplasmáticas. Na literatura encontramos apenas um trabalho mostrando a presença do gangliosídeo GM4 na hemi-membrana que

encapsula as gotas lipídicas presentes em hepatócitos de várias espécies de tubarão (LI et al, 2002).

A captação de ácidos graxos, a síntese de triacilgliceróis e a formação de gotas lipídicas foram demonstradas por um subtipo de caveolas em adipócitos isolados de ratos (OST et al, 2005). Os autores mostraram que esse subtipo especial de caveolas contém todas as enzimas necessárias para sintetizar triacilgliceróis a partir de ácidos graxos e glicerol-3-fosfato. Nossos resultados, mostrando a presença dos gangliosídios GM1 e GD2 em torno das gotas lipídicas de MSC-TA, nos permitem sugerir formação de gotas lipídicas na membrana plasmática nessas células. Essa hipótese é reforçada por resultados preliminares, não apresentados neste trabalho, que mostram a co-localização do GM1 com as proteínas flotilina1 e ecto- 5' nucleotidase que são características de caveolas.

Os modelos propostos para formação de gotas lipídicas no retículo endoplasmático propõem que o acúmulo de triacilgliceróis se dá entre as duas camadas da membrana do retículo endoplasmático, originando gotas circundadas apenas por uma monocada lipídica (OHSAKI et al, 2009). Desta forma, sugerimos que na diferenciação adipogênica das MSC-TA, as gotas são formadas nas caveolas e a monocamada lipídica, que as circunda, são derivadas desse microdomínio de membrana rico em gangliosídios.

A análise por citometria de fluxo demonstrou que as MSCs-TA são células heterogêneas em relação à granulosidade e que existe uma subpopulação de células GD2 positiva. Estes resultados estão de acordo com os dados encontrados em MSCs-MO e MSCs-UC indiferenciadas (MARTINEZ et al, 2007; XU et al, 2009). Em nossos resultados mostramos que a subpopulação GD2 positiva, embora pequena, se mantém após a diferenciação adipogênica e osteogênica. O aumento

de células nas faixas de alta granulosidade (600-1000) na diferenciação adipogênica está diretamente relacionado com o acúmulo citoplasmático de gotas lipídicas, de acordo com o descrito para adipócitos 3T3-L1 (LEE et al, 2004).

A maior parte das células GD2 negativas, indiferenciadas e diferenciadas, apresenta baixa granulosidade (cerca de 70% das células estão na faixa de 300 a 600). Já na população GD2 positiva, a maioria das células, indiferenciadas e diferenciadas, apresenta granulosidade na faixa de 600 a 800. No entanto, podemos observar que nas células diferenciadas para adipócitos um acúmulo de células GD2 positivas nas faixas de baixa granulosidade, que corresponderia a células menos diferenciadas, com poucas gotas lipídicas. Verifica-se, também, uma diminuição na população GD2 positiva após a diferenciação osteogênica.

A análise por PCR semi-quantitativo (*sq*-PCR) demonstrou que tanto as MSCs-TA indiferenciadas como as diferenciadas expressam o mRNA da enzima GD2 sintase. Por PCR em tempo real (*q*-PCR) verificamos o aumento da expressão da GD2 sintase a partir do 14^o dia de indução adipogênica. Já na diferenciação osteogênica observamos a diminuição da expressão a partir do 7^o dia de indução em relação às MSC-TA indiferenciadas. A expressão da GD2 sintase apresentou diferença entre os pacientes, possivelmente, por fatores que incluem idade, peso e, principalmente, local de coleta. Esse é o primeiro trabalho que demonstra a expressão da GD2 sintase por *sq*-PCR e por *q*-PCR nas células MSCs-TA diferenciadas para adipócito e osteoblastos.

A GD2 sintase é uma enzima intermediária na rota de síntese de gangliosídeos mais complexos. O aumento da expressão da GD2 sintase observado nas MSCs-TA diferenciadas para adipócitos pode estar relacionado com a formação de

gangliosídios mais complexos e não com um aumento do conteúdo de GD2, como mostra o perfil de gangliosídios obtido por HPTLC.

8. CONCLUSÕES

- 1- Após o isolamento e cultivo da fração estromal vascular do lipoaspirado humano, foi comprovada a multipotencialidade, clonogenicidade e capacidade de proliferação das MSCs-TA humanas *in vitro* através da aderência ao plástico, ensaios de diferenciação adipogênico e osteogênico, ensaio de formação de colônias (CFU) e do ensaio de proliferação.
- 2- A análise por HPTLC demonstrou que o principal gangliosídeo das células indiferenciadas é o GM3. Em ambas as diferenciações (adipogênica e osteogênica) ocorreu um aumento da complexidade dos gangliosídios. Na diferenciação adipogênica verificou-se o desaparecimento da banda correspondente a um glicolipídeo neutro e o aumento do mesmo glicolipídeo neutro na diferenciação osteogênica.
- 3- Por imunocitoquímica ficou evidenciada a expressão e distribuição dos gangliosídios GM3, GM1 e GD2 na membrana plasmática, região perinuclear e processos celulares das MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócito e osteoblasto. Na diferenciação adipogênica das MSCs-TA, observamos a presença de gangliosídios em torno das gotas lipídicas.

- 4- A análise por citometria de fluxo demonstrou que as MSCs-TA são heterogêneas em relação ao índice de granulosidade e apresentam uma subpopulação positiva para GD2 em MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócito ou osteoblasto.

- 5- Por PCR semi-quantitativo (sq-PCR) e por PCR em tempo real (q-PCR) verificamos a expressão da enzima GD2 sintase nas MSCs-TA indiferenciadas e diferenciadas para adipócito e osteoblasto. Na indução adipogênica ocorreu um aumento da expressão da GD2 sintase a partir do 14º dia em relação as MSCs-TA indiferenciadas. Já na diferenciação osteogênica, ocorreu diminuição da expressão da GD2 sintase desde os 7 dias de indução.

9. PERSPECTIVAS

- 1- Relacionar as velocidades de diferenciação adipogênica e osteogênica das MSCs-TA isoladas de diferentes localizações anatômicas por lipoaspiração.
- 2- Isolar a população de MSC-TA GD2 positiva e determinar suas características de multipotencialidade, clonogenicidade e proliferação.
- 3- Comprovar com o uso de técnicas de microscopia eletrônica (imunogold) a presença de gangliosídeos na monocamada lipídica que circunda as gotas lipídicas citoplasmáticas das MSC-TA diferenciadas para adipócitos.
- 4- Investigar a importância da expressão do glicolípido neutro na diferenciação osteogênica e ausência de expressão na diferenciação adipogênica das MSCs-TA.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

B.D. LAKE; H.J. GOODWIN. Lipids. In: I. Smith and J.W.T. Seakings, (Editors). Chromatographic and Eletrophoretic Techniques. *Paper and Thin Layer Chromatography* vol. 1, William Heinemann Medical Books Ltd, London p. 345–366,1976.

BYDLOWSKI, S. *et al.* Características biológicas das células tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* v. 31, p.25-35, 2009.

BIANCO, P. *et al.* Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* , v. 19, n. 3, p. 180-92, 2001.

BOCHEV, I. *et al.* Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. *Cell Biol Int* , v. 32, n. 4, p. 384-93, 2008.

CAPLAN S., BRUDER P. S. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*. n. 6, p.259-64, 2001

CONE, R. D. The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* , v. 10, n. 6, p. 211-216, 1999.

CORNELIUS, P. *et al.* Regulation of adipocyte development. *Annu Rev Nutr* , v. 14, p. 99-129, 1994.

DEBROCK, G. *et al.* A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* , v. 89, n. 8, p. 1409-12, 2003.

DRAPER, J. S. *et al.* Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. *J Anat* , v. 200, n. Pt 3, p. 249-58, 2002.

FAUST, I. M. *et al.* Adipose tissue regeneration following lipectomy. *Science* , v. 197, n. 4301, p. 391-3, 1977.

FODOR, W. L. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* , v. 1, p. 102, 2003.

Friedenstein A.J, *et al.* Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* , v6, n.2, p. 230-47, 1968.

FRIEDENSTEIN, A. J. *et al.* Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* , v. 17, n. 4, p. 331-40, 1974.

GIMBLE, J. M. *et al.* Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res* , v. 100, n. 9, p. 1249-60, 2007.

GIORDANO, A. *et al.* From the laboratory bench to the patient's bedside: an update on clinical trials with mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* , v. 211, n. 1, p. 27-35, 2007.

HORWITZ, E. M. *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* , v. 7, n. 5, p. 393-5, 2005.

JURGENS, W. J. *et al.* Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell Tissue Res* , v. 332, n. 3, p. 415-26, 2008.

KAPLAN, F. S. *et al.* Heterotopic Ossification: Two Rare Forms and What They Can Teach Us. *J Am Acad Orthop Surg* , v. 2, n. 5, p. 288-296, 1994.

KEATING, A. Mesenchymal stromal cells. *Curr Opin Hematol* , v. 13, n. 6, p. 419-25, 2006.

KIM, S.M.*et al.* Effects of gangliosides on the differentiation of human mesenchymal stem cells into osteoblasts by modulating epidermal growth factor receptors. *Biochem.Biophys Res.Commun.* .v 37, n.11, p. 866-71, 2008.

KIMBER, S. J. *et al.* Carbohydrate antigen expression in murine embryonic stem cells and embryos. II. Sialylated antigens and glycolipid analysis. *Histochem J* , v. 25, n. 9, p. 628-41, 1993.

KLASSEN, H. *et al.* Surface markers expressed by multipotent human and mouse neural progenitor cells include tetraspanins and non-protein epitopes. *Neurosci Lett* , v. 312, n. 3, p. 180-2, 2001.

KWAK, D. H. *et al.* Dynamic changes of gangliosides expression during the differentiation of embryonic and mesenchymal stem cells into neural cells. *Exp Mol Med* , v. 38, n. 6, p. 668-76, 2006.

LANGVELD, M.; AERTS, J. M. Glycosphingolipids and insulin resistance. *Prog Lipid Res* , v. 48, n. 3-4, p. 196-205, 2009.

LAUC, G.; HEFFER-LAUC, M. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Biochim Biophys Acta* , v. 1760, n. 4, p. 584-602, 2006.

LEE, Y. H. *et al.* Simple flow cytometric method used to assess lipid accumulation in fat cells. *J Lipid Res* , v. 45, n. 6, p. 1162-7, 2004.

LI, Y. T. *et al.* Association of GM4 ganglioside with the membrane surrounding lipid droplets in shark liver. *J Lipid Res* , v. 43, n. 7, p. 1019-25, 2002.

LLOYD, K. O.; FURUKAWA, K. Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. *Glycoconj J* , v. 15, n. 7, p. 627-36, 1998.

MACCIONI, H. J. *et al.* Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus. *Biochim Biophys Acta* , v. 1437, n. 2, p. 101-18, 1999.

MACCIONI H.J.F. *et al.* Understanding the stepwise synthesis of glycolipids. *Neurochem Res* , v. 27, n. 7-8, p. 629-36, 2002.

MARTINEZ, C. *et al.* Human bone marrow mesenchymal stromal cells express the neural ganglioside GD2: a novel surface marker for the identification of MSCs. *Blood* , v. 109, n. 10, p. 4245-8, 2007.

MCINTOSH, K. *et al.* The immunogenicity of human adipose derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. n.24, 1245–1253, 2006.

MITCHELL, J. B. *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* , v. 24, n. 2, p. 376-85, 2006.

NARDI, N. B.; DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol* , n. 174, p. 249-82, 2006.

OHSAKI, Y. *et al.* Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: from the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* , v. 1791, n. 6, p. 399-407, 2009.

OLOFSSON, S. O. *et al.* Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta* , v. 1791, n. 6, p. 448-58, 2009.

OSAWA, M. *et al.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* , v. 273, n. 5272, p. 242-5, 1996.

OST, A. *et al.* Triacylglycerol is synthesized in a specific subclass of caveolae in primary adipocytes. *J Biol Chem* , v. 280, n. 1, p. 5-8, 2005.

OTTO, T. C.; LANE, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. *Crit Rev Biochem Mol Biol* , v. 40, n. 4, p. 229-42, 2005.

PITTINGER, M. F. *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* , v. 284, n. 5411, p. 143-7, 1999.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* , v. 276, n. 5309, p. 71-4, 1997.

STRAWFORD, A. *et al.* Adipose tissue triglyceride turnover, de novo lipogenesis, and cell proliferation in humans measured with $2\text{H}_2\text{O}$. *Am J Physiol Endocrinol Metab* , v. 286, n. 4, p. E577-88, 2004.

SUGA, H. *et al.* Numerical measurement of viable and nonviable adipocytes and other cellular components in aspirated fat tissue. *Plast Reconstr Surg* , v. 122, n. 1, p. 103-14, 2008.

TCHOGHANDJIAN, A. *et al.* A2B5 Cells from Human Glioblastoma have Cancer Stem Cell Properties. *Brain Pathol* , 2009.

TETTAMANTI, G. *et al.* Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie* , v. 85, n. 3-4, p. 423-37, 2003.

TONTONOZ, P. *et al.* Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* , v. 94, n. 1, p. 237-41, 1997.

TRAYHURN, P. *et al.* Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* , v. 100, n. 2, p. 227-35, 2008.

WILLIAMS, M. A.; MCCLUER, R. H. The use of Sep-Pak C18 cartridges during the isolation of gangliosides. *J Neurochem* , v. 35, n. 1, p. 266-9, 1980.

XU, J. *et al.* Neural ganglioside GD2 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells in umbilical cord. *Cell Physiol Biochem* , v. 23, n. 4-6, p. 415-24, 2009.

YAMAZAKI, S. *et al.* Cytokine signals modulated via lipid rafts mimic niche signals and induce hibernation in hematopoietic stem cells. *EMBO J* , v. 25, n. 15, p. 3515-23, 2006.

YANAGISAWA, M. *et al.* Roles of lipid rafts in integrin-dependent adhesion and gp130 signalling pathway in mouse embryonic neural precursor cells. *Genes Cells* , v. 9, n. 9, p. 801-9, 2004.

YOSHIMURA, K. *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* , v. 208, n. 1, p. 64-76, 2006.

YOUNG, H. E. *et al.* Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I. *Proc Soc Exp Biol Med* , v. 221, n. 1, p. 63-71, 1999.

YU, R. K. *et al.* Membrane glycolipids in stem cells. *FEBS Lett* , 2009.

XU, J. *et al.* Neural Ganglioside GD2 Identifies a Subpopulation of Mesenchymal Stem Cells in Umbilical Cord. *Cell Physiol Biochem*, v. 23, n.4-6, p. 2009.

ZELLER, C. B.; MARCHASE, R. B. Gangliosides as modulators of cell function. *Am J Physiol* , v. 262, n. 6 Pt 1, p. C1341-55, 1992.

ZIULKOSKI, A. L. *et al.* Gangliosides of myelosupportive stroma cells are transferred to myeloid progenitors and are required for their survival and proliferation. *Biochem J* , v. 394, n. Pt 1, p. 1-9, 2006.

ZUK, P. A. *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* , v. 13, n. 12, p. 4279-95, 2002.

ZURITA, A. R. *et al.* Modulation of epidermal growth factor receptor phosphorylation by endogenously expressed gangliosides. *Biochem J* , v. 355, n. Pt 2, p. 465-72, 2001.

ANEXOS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Potencial de diferenciação em múltiplas linhagens da MSCs	12
Figura 2 Principais fases da diferenciação adipogênica de MSCs	18
Figura 3 Visão esquemática do metabolismo de Glicensfingolipídios	22
Figura 4 Processamento do lipoaspirado e isolamento das MSCs-TA.....	27
Figura 5 Ensaio de diferenciação	34
Figura 6 Perfil do CFU das MSCs-TA.	35
Figura 7 Análises por FACS da expressão de GD2 por culturas de MSCs-TA	35
Figura 8 Ensaio de proliferação das MSCs-TA	36
Figura 9 HPTL dos glicoesfingolipídios extraídos de MSCs-TA	37
Figura 10 Análises densitométrica da expressão de gangliosídios	37
Figura 11 MSCs-TA indiferenciadas	38
Figura 12 MSCs-TA indiferenciadas	39
Figura 13 MSCs-TA diferenciada para osteoblasto	39
Figura 14 MSCs-TA diferenciada para osteoblasto	39
Figura 15 MSCs-TA diferenciada para adipócito	40
Figura 16 Gotas lipídicas citoplasmáticas	40
Figura 17 Reconstituição tridimensional de imagens obtidas por varredura em Z	40
Figura 18 Análise por citometria de fluxo das MSC-TA indiferenciadas e diferenciadas	41
Figura 19 Comparação entre os índices de granulosidade	42
Figura 20 sq-PCR da GD2 sintase	43
Figura 21 Expressão da GD2 sintase por q-PCR	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Marcadores de superfície para as MSCs	19
Tabela 2 Estrutura e nomenclatura dos gangliosídios	21
Tabela 3 Sexo, idade e local de coleta dos pacientes	28