

*Cristiane Maria de Borba*<sup>1</sup>, *Silvia R. Terra*<sup>1</sup>, *Moema Queiroz Vieira*<sup>1,2</sup>, *Henrique Biehl*<sup>2</sup>, *Aline G. Lérias*<sup>1</sup>, *Letícia F. Pettenuzzo*<sup>1</sup>, *Eduardo Chem*<sup>3</sup>, *Vera M. T. Trindade*, *Fátima T. Costa Rodrigues Guma*<sup>1,2</sup> (orient.) (UFRGS).

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

<sup>2</sup> Centro de Microscopia Eletrônica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS

<sup>3</sup> Irmandade Santa Casa de Misericórdia, Porto Alegre, RS

## INTRODUÇÃO

A principal função dos adipócitos é armazenar triglicerídios (TG), sintetizados a partir de ácidos graxos exógenos, em uma única gota lipídica central (GL) [1,2]. A GL é revestida por uma camada de lipídios polares e proteínas específicas, que modulam o seu metabolismo. Recentemente, mostramos a existência de gangliosídios na camada lipídica que circunda a GL [3]. Em adipócitos humanos uma sub-classe de caveolas é capaz de captar ácidos graxos e sintetizar TG diretamente na membrana plasmática (MP) [4]. O objetivo deste estudo foi demonstrar que durante a diferenciação adipogênica de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo humano (hMSC-TA) existe gênese de GLs na MP. Para tal, foram utilizadas técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e confocal (MC). Tanto para a MET quanto para a MC foram utilizadas hMSC-TA e pré-adipócitos (MSC-TA mantidas por 14 dias em meio adipogênico).

## MATERIAL E MÉTODOS

### ISOLAMENTO E CULTURA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS (hMSC)

O tecido adiposo humano, obtido de lipoaspiração eletiva, foi lavado com PBS estéril e tratado com 0,075% de colagenase do tipo I. O *pellet* das células tronco mesenquimais humanas (hMSC) foi ressuscitado e colocado em garrafas de cultura. O meio de cultura foi trocado a cada 3-5 dias até a população celular atingir a confluência. Para a diferenciação adipogênica, as hMSC em terceira passagem foram tratadas com 10 µM de insulina, 0,5 mM de isobutilmetilxantina, 1 µM de dexametasona e 200 µM de indometacina. O acúmulo de gotas lipídicas na diferenciação adipogênica foi quantificado pela marcação com *Oil-Red-O*.

### MICROSCOPIA ELETRÔNICA

As culturas foram tripsinizadas e, as células sedimentadas por centrifugação, lavadas duas vezes com tampão fosfato 0,1M (pH 7.3). Após, foram fixadas em uma solução fixadora de paraformaldeído 4%, glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0.1M (pH 7.3), pós fixadas em OSO<sub>4</sub> tamponado, desidratadas em concentrações ascendentes de acetona, e embebidas em resina araldite (Durcupan ACM, Fluka). Cortes ultrafinos: 70 nm (contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo) foram analisados no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) JEOL JEM 1200 EX II do CME-UFRGS.

### IMUNOCITOQUÍMICA

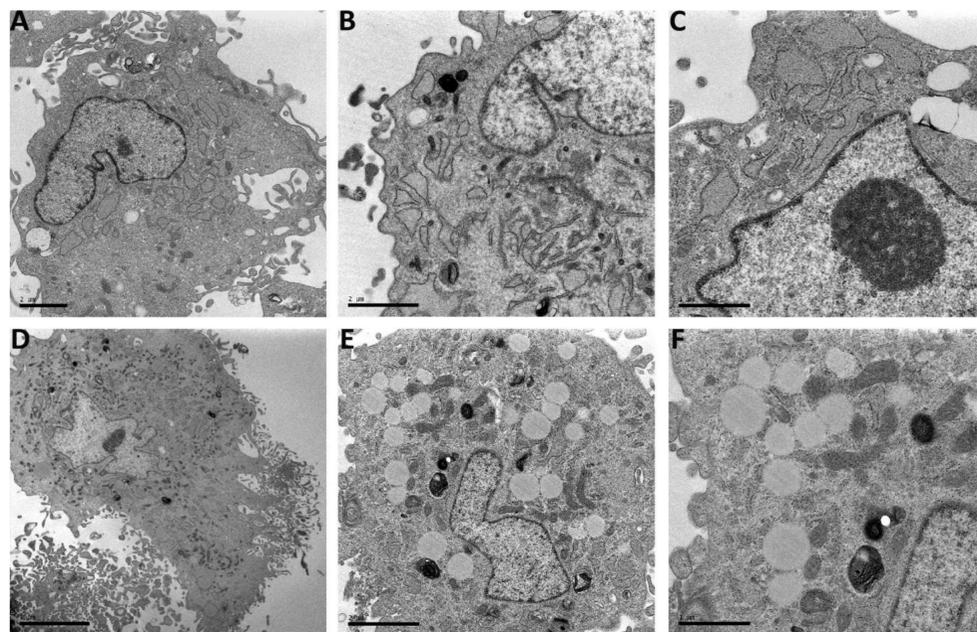
As hMSC-TA foram cultivadas sobre lamínulas até formarem uma monocamada semiconfluente. Após, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% (v/v), lavadas em PBS e incubadas em PBS com BSA 3% (v/v). Os anticorpos primários utilizados foram: *anti-ecto 5'-nucleotidase humana, policlonal*; *anti-disialogangliosídeo GD2, monoclonal (clone 14.G2a)* e *anti-monosialogangliosídeo-GM3, monoclonal (clone DH2)*. Os anticorpos secundários utilizados foram: *anti-IgG* de coelho ou camundongo, conjugados com Alexa-Fluor 405 ou 488. As gotas lipídicas foram coradas com *Oil Red-O*. As lâminas foram montadas com *Fluorsave* e as imagens foram obtidas usando microscópio Confocal Olympus FV1000 (MC) (Depto de Bioquímica, CME-UFRGS).

## RESULTADOS

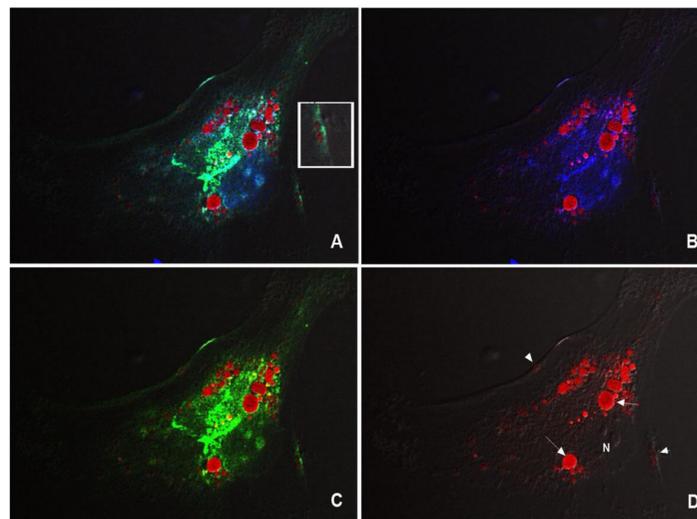
A análise ultraestrutural mostrou que as hMSC-TA (Fig.1A-C) apresentam cromatina bem condensada, citoplasma com poucas organelas, retículo endoplasmático rugoso desenvolvido, escasso complexo de Golgi, poucas mitocôndrias e lisossomas. Os pré-adipócitos (Fig.1D-F) são maiores, com mais mitocôndrias e estão em vários estágios de diferenciação. Verifica-se também a presença de GL próximas a MP. As análises por MC mostraram a presença de GLs nascentes na MP. (Fig.2A e B). Na superfície das GL verifica-se a presença dos gangliosídios GM3, GM1, GD2 e da ecto 5'-nucleotidase, comumente localizados na MP. Em adição, nas células mais diferenciadas, essas pequenas GL parecem penetrar no citoplasma para se dissolver em uma GL maior e perinuclear (Fig.3). Esses resultados são fortes indicativos de que durante a diferenciação adipogênica das hMSC-TA as GLs podem originar-se na MP, além da já clássica síntese no retículo endoplasmático.

## REFERÊNCIAS

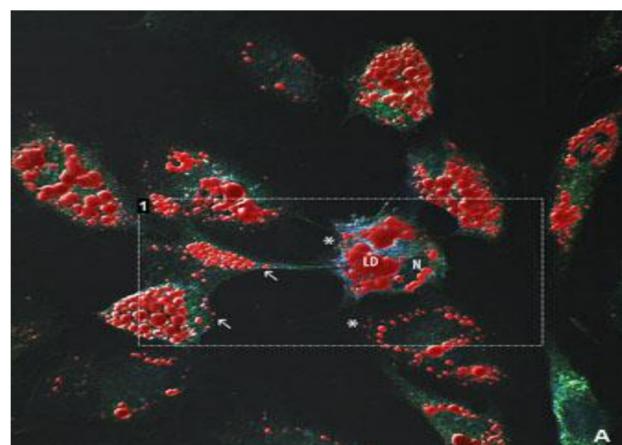
- [1] P. Strålfors, et al. *FEBS Lett.* 263 (1990) 153.
- [2] U. Ortegren, et al. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* 18 (2007) 344.
- [3] S.R. Terra, et al. *Acta Microscopica* 18\_3(2009) resumo n B07506.
- [4] A.Öst et al., *The Journal of Biological Chemistry* (2005) 5-8.



**Figura 1:** Micrografias Eletrônicas das hMSC-TA não diferenciadas (A,B,C) e diferenciadas (D,E,F).



**Figura 2: Microscopia Confocal de Fluorescência dos Pré-adipócitos:** GLs reveladas com Oil Red O (A, B e C), ecto-5' nucleotidase (B), GM3 (C), contraste de interferência (DIC) (D). (A) Merge das imagens B, C and D; o destaque representa GLs lipídicas nascentes na membrana plasmática. N, núcleo; seta, GI central; cabeça de seta, GLs nascentes na MP.



**Figura 3: Imunofluorescências dos pré-adipócitos:** As GLs foram coradas com Oil Red-O. N, núcleo; LD, GL grande e perinuclear; \*, GL pequena e periférica; setas, GL próxima a MP.

## CONCLUSÕES

- Nossos resultados foram importantes para maior entendimento dos mecanismos envolvidos na diferenciação adipogênica e biogênese de gotas lipídicas.
- Novas gotas lipídicas podem ser originadas na membrana plasmática das hMSC-TA durante a diferenciação adipogênica, além da clássica descrição de síntese a partir do retículo endoplasmático.
- Perspectivas: Microscopia Eletrônica de Transmissão através da técnica de *imunogold*.