

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

ESTUDO DA EXPRESSÃO DA CAVEOLINA-1 EM CÉLULAS ESTRELADAS
HEPÁTICAS (GRX)

MARIANA ILHA

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

ESTUDO DA EXPRESSÃO DA CAVEOLINA-1 EM CÉLULAS ESTRELADAS
HEPÁTICAS (GRX)

MARIANA ILHA

Trabalho de conclusão do curso de
graduação como requisito parcial para
obtenção do grau de bacharel em Ciências
Biológicas.

Professora: Fátima Costa Rodrigues Guma.

Porto Alegre

2012

Agradecimentos

Para a realização deste trabalho foi imprescindível o apoio de algumas pessoas, às quais eu gostaria de agradecer de coração.

Primeiramente aos meus pais, Nelson e Adriane, fonte de orgulho e inspiração. Pela frase: “Basta querer”!

Aos meus avós, Arno e Lourdes, que me ajudaram e me acolheram tantas vezes em sua casa, para ajuda neste trabalho, além de um bom chimarrão e filosofias de vida.

Aos meus avós, Henrique e Walmy, que me motivaram tanto nos estudos quanto no voleibol.

Aos meus irmãos, Gustavo e Felipe, que se dedicaram a me apoiar e me mostram todos os dias que tudo é possível quando vamos atrás do que queremos.

Ao Eduardo Nunes pela ajuda com as imagens deste trabalho, pelo carinho e amor.

À minha família por ser um porto seguro e super unida.

À minha orientadora Fátima Costa Rodrigues Guma, pela orientação e por me apoiar todos os anos que eu trabalhei na bioquímica.

Ao meu amigo e colega Leo Meira, pela orientação e a super ajuda com o trabalho de conclusão.

Às professoras Florencia Barbé-Tuana e Vanessa Schein, que me ensinaram muitas das técnicas utilizadas neste trabalho, que também serão muito úteis no futuro.

Aos meus colegas do laboratório 21, pela ajuda no trabalho e pelas conversas do dia a dia, no qual cada um teve uma colaboração especial.

Aos meus amigos que tiveram que entender que para a realização deste trabalho, eu tive que me afastar um pouco momentaneamente, mas que logo voltamos à vida.

Às minhas amigas de voleibol, que compartilham de um mesmo vício, o gosto pelo esporte, que completa um pouco mais a minha vida.

Todos os dias, sob todos os pontos de vista, serei cada vez melhor!

Henrique Sommer Ilha

Resumo

A fibrose hepática está entre as doenças que mais causam mortes no mundo, e é caracterizada pelo acúmulo de matriz extracelular fibrótica, cuja presença danifica as funções do fígado. As células estreladas hepáticas (HSC) participam ativamente deste processo, modificando seu fenótipo quiescente, rico em lipídios no citoplasma, para o fenótipo ativado, em resposta ao insulto hepático. A fibrose hepática pode causar uma insuficiência hepática e hipertensão portal, causando uma modificação da arquitetura hepática. A linhagem GRX é um modelo de HSC ativadas. As caveolas são pequenas invaginações que ocorrem na membrana plasmática com um tamanho entre 50-100nm. Estas estruturas possuem um formato de U ou vesículas e ocorrem em todos os tipos celulares. As caveolas são caracterizadas como microdomínios de membrana ou *rafts* lipídicos, que são regiões especialmente ricas em glicosfingolipídeos, colesterol e proteínas GPI-ancoradas. As caveolas têm importantes papéis na fisiologia das células como: transcitose, endocitose, pinocitose, homeostase do colesterol, rotas de transdução de sinais, migração celular, controle do ciclo celular e polaridade celular. As principais proteínas que compõem as caveolas são da família das caveolinas, sendo a mais importante a caveolina-1 (Cav)-1, que junto com a caveola, desempenha importantes funções na célula. A Cav-1 é uma proteína estrutural de membrana presente em todos os tipos celulares, que estabiliza estes domínios de membrana, contribuindo para a manutenção de proteínas residentes nas caveolas. Em fígados cirróticos, é encontrado um aumento da expressão da Cav-1 nas células endoteliais sinusoidais e nas HSCs, sugerindo que o aumento da expressão da Cav-1 pode estar relacionado com a hipertensão portal que acompanha o processo de fibrose. No presente trabalho, foi feita uma superexpressão da Cav-1 associada com a proteína fluorescente EGFP através do método de transfecção com o plasmídeo pCavEGFP em células GRX. Para isso, foi estabelecido um protocolo de transfecção onde obtivemos uma linhagem permanente que expressa a Cav-1 fluorescente, denominada GRX^{GFP-Cav}. Por microscopia óptica, foi observado que as células GRX^{GFP-Cav} apresentam uma morfologia alterada em relação às células GRX. Dados de *imunoblotting* comprovaram que houve aumento da expressão da Cav-1 nas GRX^{GFP-Cav}. Experimentos de colocalização nas células transfectadas, utilizando o anticorpo para Cav-1 conjugado a um segundo anticorpo que emite fluorescência vermelha, comprovaram o sucesso da transfecção. Uma vez que esta proteína desempenha um importante papel no estado de ativação das HSC, as células transfectadas são uma excelente ferramenta para o estudo da fibrose hepática através da microscopia confocal.

Abstract

Hepatic fibrosis is among the diseases that cause most deaths in the world, and is characterized by the accumulation of fibrous extracellular matrix, which presence damages the liver functions. The hepatic stellate cells (HSC) actively participate in this process by modifying their quiescent phenotype, featured for presenting lipid-rich cytoplasm, to an activated phenotype in response to liver injury. Hepatic fibrosis can cause liver failure and portal hypertension, leading to modification of hepatic architecture. The GRX cell line is an activated HSC model. Caveolae are small invaginations (50 to 100nm) on the plasma membrane. These structures have a U or vesicles shape, and occur on all cell types. The caveolae are characterized as membrane microdomains or lipid rafts, regions that are especially rich in glycosphingolipids, cholesterol and GPI-anchored proteins. Caveolae play important roles in the physiology of cells such as transcytosis, endocytosis, pinocytosis, cholesterol homeostasis, signal transduction pathways, cell migration, cell cycle control, and cell polarity. The major proteins that make up the family of caveolae are caveolins, the most important being the caveolin-1 (Cav) -1, which along with caveolae, plays important roles in the cell. The Cav-1 is a structural membrane protein that stabilizes membrane present in all cell types, helping to maintain protein residing in caveolae. In cirrhotic livers, it is found an increased expression of CAV-1 in sinusoidal endothelial cells and HSC, suggesting that CAV-1 may be associated with portal hypertension accompanying the process of fibrosis. In the present study, it was established a protocol for inserting a Cav-1 with EGFP-conjugated gene by transfecting a DNA plasmid into GRX cells. Through this technique, we obtained the permanent cell line which express Cav-1 fluorescent called GRX^{GFP-Cav}. By optical microscopy, it was observed that GRX^{GFP-Cav} cells exhibit an altered morphology compared to GRX wild type. Immunoblotting data showed that there was an increased expression of Cav-1 in GRX^{GFP-Cav}. Colocalization analysis in transfected cells, using antibody to CAV-1 conjugated to a second antibody that emits red fluorescence, proved the success of the technique. Since this protein plays an important role in the activation state of HSC, the transfected cells are an excellent tool for the study of liver fibrosis by confocal microscopy.

Sumário

1. Introdução	7
1.1 O Fígado.....	7
1.2 A Fibrose Hepática e as Células Estreladas Hepáticas (HSC)	9
1.3 As Células GRX.....	10
1.4 Caveolas, Caveolina e a de-diferenciação das Células GRX para o Estado Quiescente das HSC.....	11
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos.....	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1 Linhagem Celular GRX	17
3.2 Estabelecimento de uma Linhagem Estável e Superexpressora da Caveolina-1 – GRX ^{GFP-Cav}	17
3.3 Microscopia Óptica	19
3.4 Western Blotting	19
3.5 Imunocitoquímica e Microscopia Confocal	20
3.6 Descarte de Material Contaminado:	21
4. Resultados	21
4.1 Transfecção das Células GRX com Plasmídeo pCavEGFP	21
4.2 Imagens de Microscopia Óptica.....	22
4.3 Western Blotting	22
4.4 Microscopia Confocal	23
5. Discussão e Conclusões	26
6. Suporte Financeiro	27
7. Referências.....	28

1. Introdução

1.1 O Fígado

O fígado é o segundo maior órgão do corpo, situado na cavidade abdominal abaixo do diafragma, sendo o órgão no qual os nutrientes absorvidos no trato digestivo são processados para a utilização por outros órgãos. O sangue chega ao fígado através da veia porta e da artéria hepática (Junqueira e Carneiro, 2008).

A unidade funcional do fígado é o lóbulo hepático. Nesta unidade, as células se dispõem em placas orientadas radialmente. Cada placa é constituída por uma só camada de hepatócitos. Cada lóbulo é uma massa poliédrica de tecido hepático com cerca de 0,7 por 2 mm de tamanho. Os lóbulos se encostam uns nos outros em quase toda sua extensão. No entanto, em algumas regiões, os lóbulos ficam separados por tecido conjuntivo e vasos. Estas regiões ocupam os cantos do poliedro e recebem o nome de espaços-porta (Figura 1) (Bataller e Brenner, 2005).

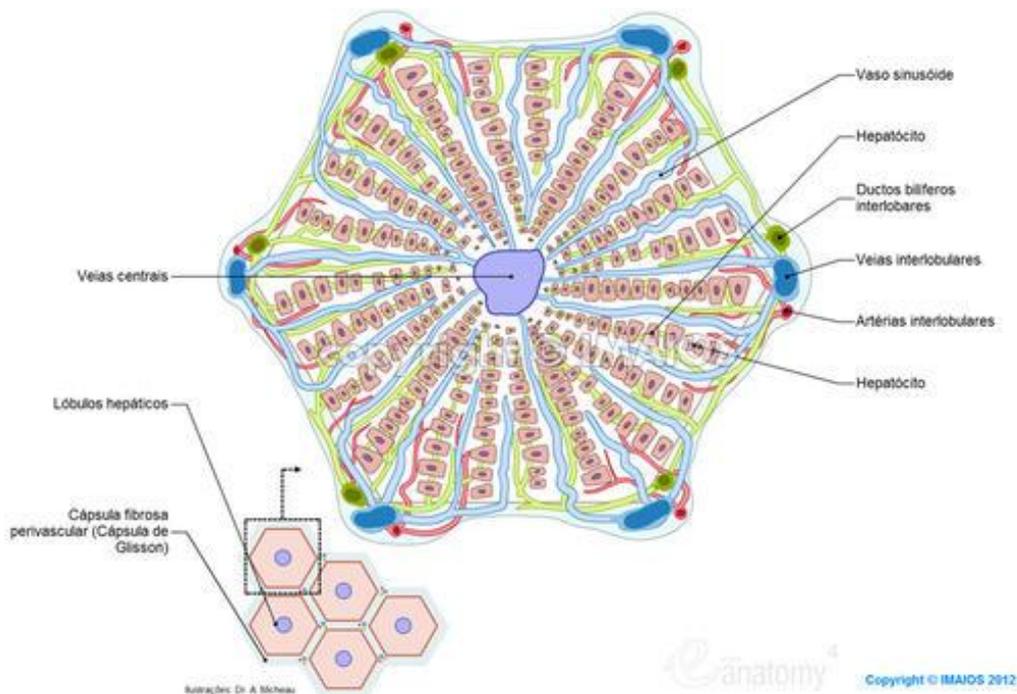


Figura 1. Estrutura do lóbulo hepático: Retirado de <http://www.imaios.com/br/e-Anatomy/Torax-Abdome-Pelve/Sistema-digestorio-Ilustracoes>, em 02/12/2012.

Os sinusóides são capilares que ocupam o espaço entre as placas de hepatócitos, que desembocam em uma veia localizada no centro do lóbulo chamada veia centrolobular, que é o ramo inicial da veia hepática. As paredes dos sinusóides são revestidas de células endoteliais típicas e macrófagos que, no fígado, recebem o nome de células de Kupffer. Estas células tem função fagocitária e pertencem ao sistema de retículo endotelial. O espaço estreito que separa o sinusóide dos hepatócitos recebe o nome de espaço de Disse, que é composto por fibras reticulares. Devido à sua dimensão reduzida, o Espaço de Disse é somente visualizado com o advento da microscopia eletrônica (Junqueira e Carneiro, 2008). Um terceiro tipo de célula na parede do sinusóide é a chamada célula de Ito ou célula estrelada hepática (HSC, do inglês *hepatic stellate cells*) que desempenha um papel importante na cicatrização do fígado (Friedman, 2008a)(Figura 2).

As HSC possuem longas projeções citoplasmáticas que circundam as células endoteliais fazendo o contato com os hepatócitos. São caracterizadas por apresentarem gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC), sendo responsáveis pelo armazenamento de ésteres de retinol e pela liberação controlada de vitamina A (retinol). Uma função importante das HSC é a renovação da matriz extracelular através do controle da secreção de metaloproteinases e seus inibidores, bem como a manutenção da homeostasia do espaço sinusoidal pelos fatores parácrinos, autócrinos, justácrinos e de quimiotratante envolvidos (Bataller e Brenner, 2005).

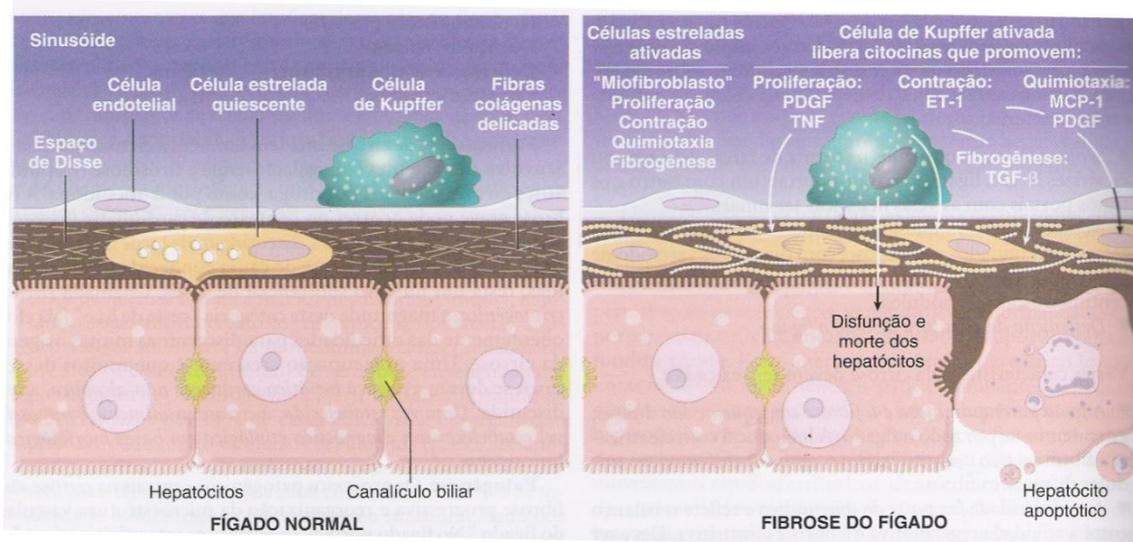


Figura 2. Estrutura histológica do Espaço de Disse e células associadas. Retirado de <http://www.ebah.com.br/content/ABAAABvUwAH/cirroze> em 21/12/2012.

1.2 A Fibrose Hepática e as Células Estreladas Hepáticas (HSC)

As doenças crônicas do fígado estão entre as maiores causas de morte no mundo (Elsharkawy, Oakley *et al.*, 2005). A cirrose representa o estágio final de diversas doenças hepáticas crônicas e é caracterizada pela presença de fibrose e conversão da arquitetura hepática normal em nódulos estruturalmente anormais. O dano agudo ao fígado acarreta em regeneração dos hepatócitos apoptóticos e necróticos. Já os danos crônicos acarretam no estado de fibrose hepática (Gines, Cardenas *et al.*, 2004). A fibrose hepática é definida pelo crescimento excessivo, endurecimento e/ou cicatrização de vários tecidos hepáticos. A essa patologia, é atribuído o excesso da deposição de componentes de matriz extracelular, que incluem as glicoproteínas, proteoglicanos e colágenos do tipo I e III, acarretando em mudança da morfologia e da funcionalidade do fígado. A fibrose é o resultado de reações inflamatórias crônicas induzidas por uma variedade de estímulos, incluindo infecções persistentes, reações auto-imunes, reações alérgicas, insultos químicos, radiações e injúria tecidual (Wynn, 2008). O consumo excessivo de álcool, a hepatite C e a esteatose não alcoólica aparecem como sendo as principais causas de cirrose decorrente de fibrose nos países ocidentais (Gines, Cardenas *et al.*, 2004).

No fígado sadio, as HSC apresentam um fenótipo quiescente lipocítico com baixa taxa de proliferação e de produção de colágeno tipo I. Em estados patológicos, o dano ao parênquima hepático é seguido de um processo inflamatório e pró-oxidativo, que leva a um desequilíbrio da produção e da degradação de matriz extracelular e à ativação das HSC para o fenótipo de miofibroblasto, que passam a apresentar diversas alterações fisiológicas (Figura 3). Com esta passagem do fenótipo quiescente para o fenótipo miofibroblastóide ativado, as HSC se tornam mais proliferativas, perdem a sua capacidade de armazenar gotas lipídicas, sofre uma reorganização no citoesqueleto, e passa a apresentar os filamentos de actina na forma de fibras de estresse. Neste estado, as HSC são as principais responsáveis pelo desenvolvimento da fibrose hepática (Hautekeete e Geerts, 1997; Friedman, 2000).

Os processos de regeneração do fígado são inicialmente benéficos e envolvem a substituição das células lesadas por outras saudáveis do mesmo tipo. A regeneração se torna patogênica quando acontece um desequilíbrio na deposição da matriz extracelular, resultando na substituição permanente do tecido sadio, pela cicatriz fibrosa. Nas

doenças crônicas do fígado, a remodelação extensiva do tecido e a fibrose podem ter como consequência a falência do órgão e a morte do indivíduo (Wynn, 2008).

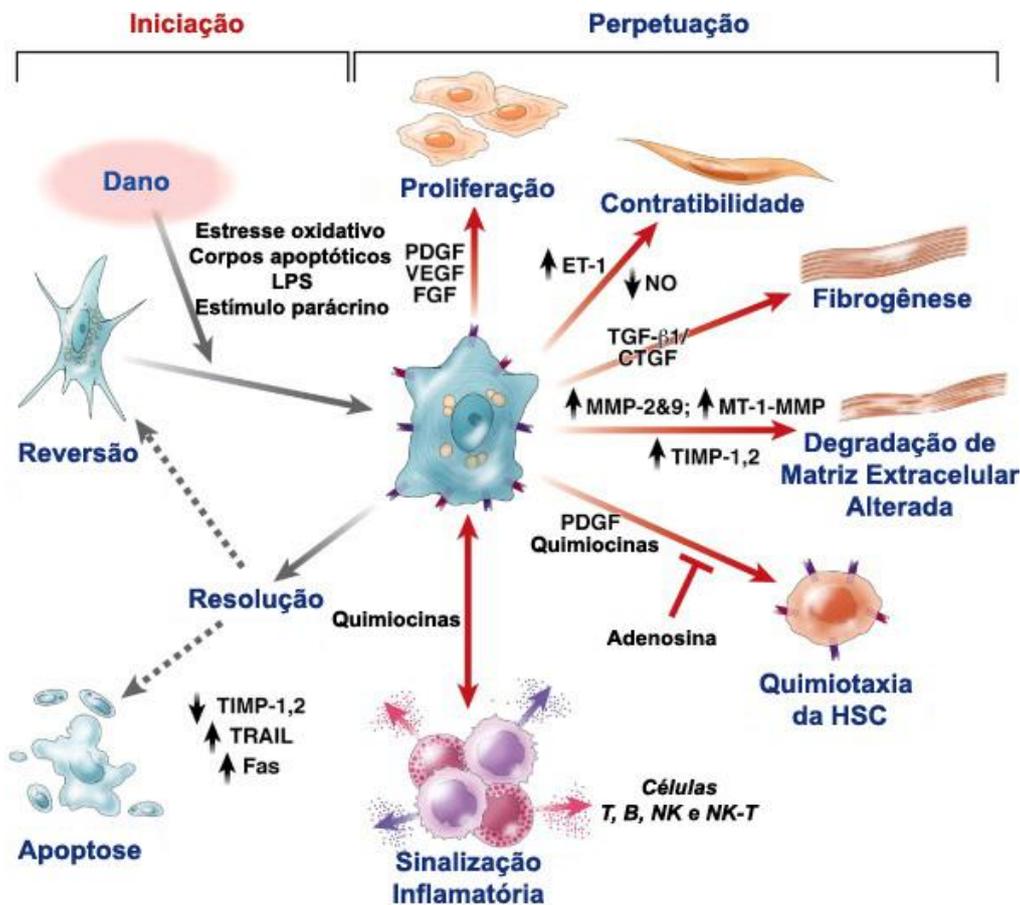


Figura 3. Ativação das HSC e alterações fisiológicas. Traduzida de (Friedman, 2008b).

1.3 As Células GRX

A linhagem celular GRX foi estabelecida a partir de granulomas induzidos em fígados de camundongos C3H/HeN, através da penetração transcutânea da cercaria *Schistosoma mansoni* (Borojevic, Monteiro *et al.*, 1985). A cultura primária de células desses granulomas gerou esta linhagem de células miofibroblastóides com características de HSC ativadas. Esta linhagem possui as seguintes propriedades: alta taxa de proliferação, capacidade de secretar colágeno tipo I e outras proteínas de matriz extracelular, o que lhe confere características bioquímicas e biológicas de um miofibroblasto (Borojevic, Guaragna *et al.*, 1990). As células GRX podem ser induzidas, por meio de tratamento com drogas como indometacina e retinol, a acumular gotas lipídicas, adquirindo um fenótipo semelhante às HSC quiescentes, diminuindo a

capacidade de proliferação e da produção de colágeno tipo I (Margis, Pinheiro-Margis *et al.*, 1992). Da mesma forma, essas células podem ser induzidas a um fenótipo mais ativado através de tratamento com mediadores inflamatórios e pró-oxidantes (Guimaraes, Franceschi *et al.*, 2006). A GRX torna-se, portanto, um modelo interessante para o estudo dos mecanismos que envolvem o desenvolvimento da fibrose hepática.

1.4 Caveolas, Caveolina e a de-diferenciação das Células GRX para o Estado Quiescente das HSC

As caveolas são pequenas invaginações que ocorrem na membrana plasmática com um tamanho de 50-100nm, tendo sido estudadas há mais de 50 anos através da microscopia eletrônica (figura 4) (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008). Estas organelas estão presentes na maioria dos tipos celulares e nos diferentes tecidos dos mamíferos, sendo particularmente abundantes em células endoteliais, células fibroblastóides, (Mastrodonato, Calamita *et al.*, 2011) adipócitos e pneumócitos do tipo I (Sowa, 2012).

Isoladas, as caveolas aparecem como vesículas na célula ou com forma de U na superfície celular (figura 4A e 4B) (Cohen, Razani *et al.*, 2004). São caracterizadas como microdomínios de membrana ou *rafts* lipídicos, regiões especialmente ricas em glicosíngolipídeos, colesterol e proteínas GPI-ancoradas (proteínas ligadas a glicosilfosfatidil inositol) (Nelson e Cox, 2007). Estas organelas participam de vários papéis na fisiologia celular, servindo de plataforma para diferentes caminhos de sinalização tais como: pinocitose, transcitose e endocitose independente de clatrina. Da mesma forma, as caveolas atuam como sensores de estresse mecânico (Parat e Riggins, 2012), participam da homeostase do colesterol, de rotas de transdução de sinal, da migração celular e do controle do ciclo e da polaridade celular (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008).

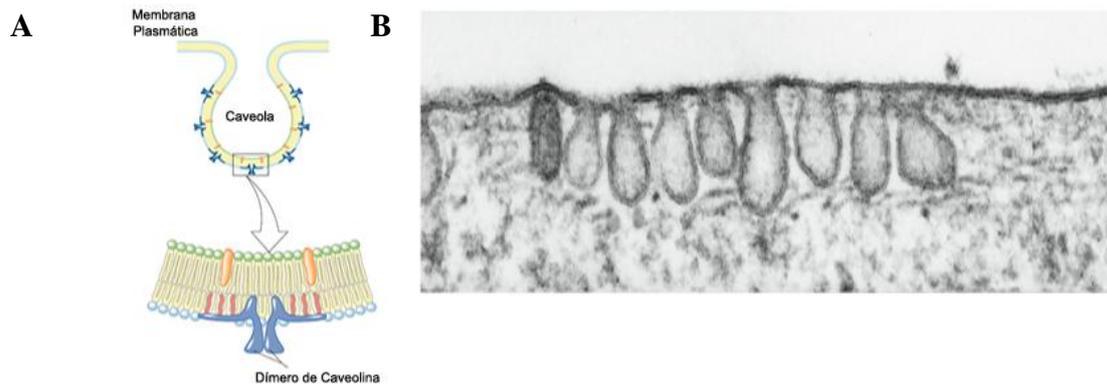


Figura 4 A. Esquema da curvatura da Caveola, retirado de (Nelson e Cox, 2007). B. Micrografia de caveolas na membrana plasmática de fibroblastos, retirado de (Alberts, Johnson *et al.*, 2010)

As principais proteínas estruturais das caveolas são as caveolinas, uma família de proteínas que tem uma porção hidrofóbica que se insere na membrana do lado citosólico, sendo a mais importante a caveolina -1 (Cav-1) (Parat e Riggins, 2012). As caveolinas estabilizam esses domínios de membrana, contribuindo para a manutenção de proteínas residentes nas caveolas. A presença dessa proteína e a sua ligação com o colesterol da membrana força a bicamada lipídica a curvar-se para dentro, formando as caveolas (Nelson e Cox, 2007).

Em contraste com as vesículas revestidas de clatrina, COPI e COPII, acredita-se que as caveolas, devido a sua composição lipídica, participem das vias endocíticas sem necessidade da formação de revestimento protéico citosólico. As caveolas, com seu carregamento, se destacam da membrana plasmática utilizando a dinamina e podem entregar os seus conteúdos para compartimentos semelhantes à endossomos, também chamadas de caveossomos, ou para a membrana plasmática do lado oposto em uma célula polarizada, no processo de transcitose. Por serem proteínas integrais de membrana, as caveolinas não se dissociam das vesículas após a endocitose: elas são liberadas nos compartimentos alvo e mantidas em domínios especiais nas membranas. As moléculas que entram na célula através dos caveossomos evitam os endossomos e lisossomos, e com isso ficam protegidas da exposição a pHs baixos e a hidrolases lisossomais (Alberts, Johnson *et al.*, 2010).

A caveolina-1 (Cav-1) é uma proteína integral de membrana de 22 kDa que contém 178 aminoácidos, tendo um domínio transmembrana de 32 aminoácidos hidrofóbicos (resíduos 102-134) no formato de um “grampo de cabelo”, com as terminações NH₂ e COOH voltados para o citoplasma (Ogi, Yokomori *et al.*, 2003).

Três grupamentos palmitoil, na Cys133, Cys143 e Cys156, são essenciais para seu ancoramento na membrana plasmática. No domínio N- terminal existe um domínio ligante de colesterol e sítios importantes de fosforilação de serina e tirosina (Parat e Riggins, 2012). Uma região de 20 aminoácidos (resíduos 81-101), conhecida como domínio estruturante ou *Cav1 scaffolding domain* (CSD), intermedia a interação com vários reguladores de sinalização intracelulares como receptores ligados a proteína G (GPCRs), receptores de tirosinas cinases, Src cinases e etc (Figura 5) (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008).

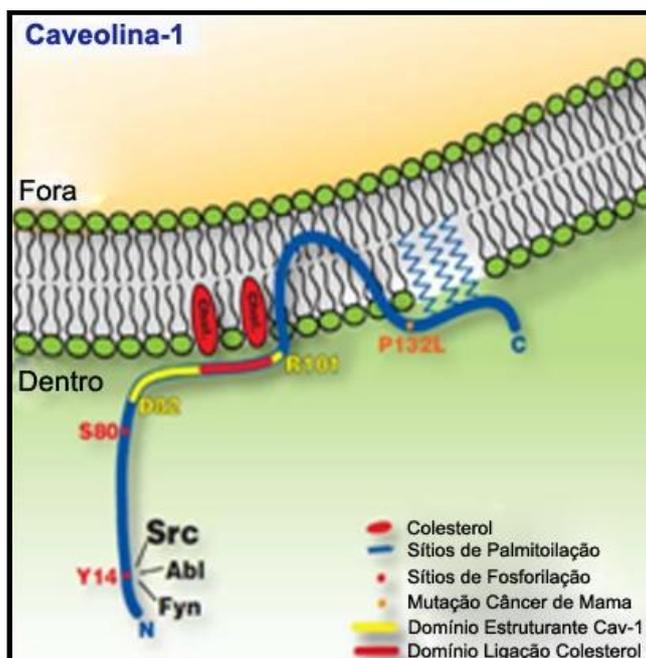


Figura 5 Topologia da Cav-1 na membrana. As regiões N e C terminais são direcionadas para o citoplasma celular. Traduzida de (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008).

Experimentos demonstraram que a região hidrofóbica (resíduos 102-134) não é essencial para a ligação da Cav-1 com a membrana. Duas regiões que flanqueiam o domínio central hidrofóbico, resíduos 82-101 e resíduos 135-150, são os que têm alta afinidade com a membrana. Estas regiões são chamadas de N-MAD, com terminal NH₂, e C-MAD, com terminal COOH (Cohen, Razani *et al.*, 2004). A Cav-1 é sintetizada no retículo endoplasmático e é transportada até o Complexo de Golgi, em um processo dependente de COPII (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008), também a sua expressão é suficiente e necessária para dirigir a formação morfológica das caveolas (Cohen, Razani *et al.*, 2004). Aproximadamente 144 moléculas de caveolinas formam uma única estrutura da caveola (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008).

Duas isoformas da Cav-1 foram descritas *in vivo*: a α -caveolina, que contém resíduos de 1-178, e a β -caveolina, que contém resíduos de 32-178. A Cav-1 faz parte de um grupo multigênico de proteínas, havendo duas outras proteínas a Caveolina-2 (Cav-2) e a Caveolina-3(Cav-3), A Cav-2 forma um complexo hetero-oligomérico com a Cav-1, mas não é essencial para a biogênese das caveolas. A Cav-3 foi primariamente localizada nos tecidos musculares, sendo expressa também nas células gliais, exercendo um papel importante na biogênese das caveolas (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008).

O gene da Cav-1 foi mapeado no cromossomo humano 7q31. Por estar em um sítio frágil, podem ocorrer deleções que acarretam em câncer em humanos. A mutação e a perda da expressão da Cav-1 foram descritas em muitos tipos de cânceres, tais como: câncer de mama, de ovário, de pequenas células de pulmão, de pequenas células da bexiga e carcinomas de colo-retal. Por outro lado, a superexpressão da Cav-1 e o consequente aumento de secreção da proteína podem levar ao câncer de próstata, contribuindo para a angiogênese, o crescimento e a metástase do tumor (Parat e Riggins, 2012).

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

Além de ser encontrada na membrana plasmática, a Cav-1 podem estar presentes em mitocôndrias, gotas lipídicas, grânulos de células secretórias exócrinas e peroxissomos do fígado. A Cav-1 existe também na forma solúvel, nomeada de proteína citosólica, ou associada com produtos secretórios. Há estudos que demonstram que a Cav-1 também está envolvida no tráfico de colesterol intracelular, lipogênese e lipólise. As gotas lipídicas citoplasmáticas (GLC) consistem em um núcleo apolar de lipídeos encapsulados em uma monocamada de fosfolipídeos e colesterol, associado com um grupo de proteínas, incluindo a Cav-1. A Cav-1, encontrada no citosol, transloca-se nos compartimentos intracelulares em resposta a estímulos específicos, sendo importante no tráfico de colesterol (Mastrodonato, Calamita *et al.*, 2011). Em células da linhagem de

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

Em fígados cirróticos, foi encontrado um aumento da expressão da Cav-1 nas células endoteliais sinusoidais e nas HSCs. Os autores sugerem que o aumento da expressão da Cav-1 possa estar relacionado com a hipertensão portal que acompanha o processo de fibrose (Yokomori, Oda *et al.*, 2002). As células GRX são HSC ativadas que podem, por ação de substâncias como indometacina (Guaragna, Trugo *et al.*, 1991), retinol (Margis e Borojevic, 1989) e licopeno (Teodoro, Perrone *et al.*, 2009), voltar a expressar características de HSC quiescentes, acumulando lipídeos em GLC. Devido a capacidade de modulação fenotípica da linhagem GRX, e considerando a importância da Cav-1 na fisiopatologia hepática a qual essa célula está envolvida, no presente trabalho foi estabelecida uma linhagem estável de células GRX que expressa GFP-Cav-1 (caveolina-1 ligada à proteína fluorescente verde). Desta forma, será possível ter uma ferramenta experimental interessante para aprofundar nossos estudos sobre os processos que controlam o estado de ativação das células estreladas hepáticas e o envolvimento da Cav-1 nesse contexto.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Estabelecer uma linhagem estável de células GRX que superexpresse GFP-Cav-1 (Caveolina -1 associada a proteína verde fluorescente, denominada GRX^{GFP-Cav}).

2.2 Objetivos Específicos

- Demonstrar através da técnica de Western Blot a superexpressão da Cav-1.
- Através de microscopia confocal determinar a localização da Cav-1, nas células GRX^{GFP-Cav}.
- Através da imunocitoquímica, comprovar a eficiência da transfecção da Cav-1

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagem Celular GRX

A linhagem celular GRX foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (HUCFF, UFRJ, RJ) e foi cultivada em DMEM suplementado com 5% Soro Fetal Bovino sob atmosfera de CO₂ a 37°C.

3.2 Estabelecimento de uma Linhagem Estável e Superexpressora da Caveolina-1 – GRX^{GFP-Cav}

O plasmídeo recombinante pCav1EGFP (gentilmente doado pelo Dr. J. Danotti) foi utilizado para transfectar a linhagem celular GRX. Porém, antes de sua utilização e para a amplificação do plasmídeo, o mesmo foi utilizado para transformar as células competentes JM109.

Alíquotas de 200µl de células competentes JM109 (previamente produzidas pelo nosso laboratório) foram descongeladas do *freezer* -80°C e incubadas por 30 minutos no gelo. Depois de passado esse período, foi adicionado 2µl do vetor de interesse (pCav1EGFP) e foi incubado por mais 30 minutos no gelo. Posteriormente, as células foram submetidas a choque térmico por 1min a 42°C em banho maria e colocadas rapidamente no gelo por 2 minutos. Para recuperar as células, foram adicionados 250µl de meio S.O.C equilibrado a temperatura ambiente sem antibiótico, e os tubos foram incubados durante 1hora a 37°C com agitação (250 RPM). Passado esse período as bactérias foram semeadas em meio LB Agar suplementadas com 50 µg/ml de ampicilina e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C durante a noite para o isolamento de colônias recombinantes.

Passadas as 24 horas de incubação em estufa bacteriológica, foram picadas duas colônias isoladas que foram semeadas em 5 ml de meio LB com ampicilina, para isolamento e purificação do plasmídeo pCav1EGFP (Amp^R) com kit comercial (*Purelink quick miniprep*, Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante.

Basicamente, as células foram centrifugadas a 12.000 xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em 250µl de tampão suplementado com RNase A. Foram adicionados mais 250µl de tampão de lise, que foi

misturado suavemente por inversão e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Logo depois, o tampão de precipitação foi adicionado, misturado por inversão suave e centrifugando por 10 minutos a 13.000 xg. O sobrenadante foi transferido para as colunas previamente montadas, e centrifugado a 12.000 xg por apenas 1 minuto. O líquido do tubo de coleta foi descartado, e foram adicionados 500µl de tampão de lavagem, as colunas incubadas por 1 minuto centrifugadas a 12.000 xg por 1 minuto, após descartando-se o líquido previamente coletado. Em seguida, foram colocados 700µl de tampão de lavagem e centrifugados a 12.000 xg por um minuto. Foi descartado o líquido e as colunas colocadas em novos tubos estéreis de recoleção. Para a eluição do plasmídeo foi adicionado 75µl de tampão TE pré-aquecido a 70°C no centro da coluna, incubados por 1 minuto e centrifugados a 12.000 xg por 2 minutos para a recuperação do DNA. Todo o procedimento foi realizado a temperatura ambiente. O DNA isolado foi quantificado no Biofotômetro-Plus (Eppendorf).

Para a realização da transfecção, foram semeadas 24 horas antes, uma placa de 24 poços com células GRX na confluência máxima de 50%. A transfecção foi realizada utilizando o reagente comercial Lipofectamine™ (Invitrogen) diluído em meio DMEM sem soro. A lipofectamina é uma mistura de lipídeos anfipáticos que formam uma miscella com o plasmídeo, encapsulando-o. Assim, a mistura do plasmídeo com lipofectamina, em contato com as células a serem transfectadas, funde-se com a membrana plasmática celular, liberando seu conteúdo, o plasmídeo, no citoplasma celular.

Para determinar as condições ideais de transfecção, ou seja, a proporção adequada entre lipofectamina e quantidade de DNA, foi realizada uma curva de concentração da lipofectamina e do plasmídeo pCav1EGFP. A placa de 24 poços, onde foi realizada a curva de concentração, ficou como desenhado no seguinte esquema:

Controle GRX	LPF 0,5 GRX	LPF 0,5 DNA 0,2ng	LPF 0,5 DNA 0,3ng	LPF 0,5 DNA 0,4ng	G418 GRX
Controle GRX	LPF 1,0 GRX	LPF 1,0 DNA 0,2ng	LPF 1,0 DNA 0,3ng	LPF 1,0 DNA 0,4ng	G418 GRX
Controle GRX	LPF 1,5 GRX	LPF 1,5 DNA 0,2ng	LPF 1,5 DNA 0,3ng	LPF 1,5 DNA 0,4ng	G418 GRX
Controle GRX	LPF 2,0 GRX	LPF 2,0 DNA 0,2ng	LPF 2,0 DNA 0,3ng	LPF 2,0 DNA 0,4ng	G418 GRX

Após 72 horas da transfecção, todas as células (exceto as GRX controle, e o controle com a LPF marcadas em cinza) foram cultivadas na presença de 1000 µg/ml de geneticina (G418), que atua como um agente seletivo para a cultura celular que está superexpressando o gene de interesse, uma vez que a célula transfectada é resistente a esse antibiótico. A partir da 4ª semana de cultura, a concentração de G418 foi reduzida pela metade (500 µg/ml) e mantida durante toda a cultura celular.

3.3 Microscopia Óptica

As células GRX e GRX^{CavGFP} aderidas a garrafas plásticas foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico invertido (Nikon Eclipse TE300), em aumentos de 100x e 200x, para a análise de morfologia.

3.4 Western Blotting

A técnica de Western Blotting foi realizada para avaliar se as células transfectadas superexpressaram a proteína Cav-1. Para isso, foi feita uma placa de GRX e GRX^{CavGFP} com confluência inicial de 5×10^5 células. Quando estavam com uma confluência de mais de 80% nos poços, as células foram raspadas com PBS gelado, centrifugadas, ressuspensas em tampão Laemmli com β-mercaptoetanol e aquecidas a 100° C por 10 minutos. Para a preparação da eletroforese foi feito um gel de Bis-Acrilamida 8%. Após a separação das proteínas, foi feita uma transferência destas proteínas do gel para membrana de nitrocelulose. Para avaliar a expressão proteica, foram utilizados o anticorpo para caveolina-1 e, como parâmetro de normalização, o anticorpo para proteína constitutiva β-Actina (ambos da Santa Cruz Biotechnology, California, EUA). Ambos os anticorpos primários foram diluídos (1:200 para cav-1,

1:1000 para a β -Actina) em tampão TBS 0,1% Tween 5% leite desnatado conforme instrução do fabricante e foram colocados sobre a membrana de nitrocelulose por aproximadamente 16 horas. A revelação em filme foi feita por quimioluminescência, utilizando anticorpos secundários específicos associados à peroxidase, também diluídos em tampão TBS 0,1% Tween 5% leite desnatado (1:1000). As bandas foram quantificadas usando o *software* AlphaEaseFC.

3.5 Imunocitoquímica e Microscopia Confocal

As células GRX e GRX^{CavGFP} foram semeadas sobre lamínulas de vidros estéreis dispostas em uma placa de 24 poços. Para melhorar os resultados, foi colocada uma densidade baixa de células. Depois de 2 dias de cultura, o meio foi retirado, as células foram lavadas com 300 μ l de PBS por duas vezes. As células foram fixadas com 2% de paraformaldeído em PBS diluído em DMEM por 10 minutos, seguido de fixação com 4 % de paraformaldeído em PBS por 20 minutos. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com PBS por cinco minutos.

Antes da marcação com anticorpo para caveolina-1, as células foram permeabilizadas com uma solução de triton de 0,05% por aproximadamente 1 hora no agitador em baixa rotação. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos por lavagem) e incubadas com o anticorpo primário anti-Caveolina1 (Santa Cruz Biotechnology, California, EUA) por aproximadamente 16 horas a 4°C. Posteriormente, as células foram novamente lavadas e marcadas por 90 minutos com anticorpo secundário IgG Alexa Fluor 555 (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA), que emite fluorescência no espectro vermelho. Após novas lavagens com PBS, as lamínulas foram dispostas sobre lâminas histológicas usando o meio de montagem *Prolong anti-fade* (Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA, USA). As imagens foram obtidas no Microscópio confocal FV 1000- Olympus, deconvoluídas e analisadas pelo *software ImageJ* (National Institutes of Health, Rockville Pike, Bethesda, Maryland, EUA), um programa de domínio público.

3.6 Descarte de Material Contaminado:

As placas de cultura contendo resíduos microbiológicos foram devidamente autoclavadas e descartadas em lixo apropriado para materiais infectantes, tendo em vista que não perderam as características de material de laboratório após o procedimento de esterilização. Os demais materiais utilizados como ponteiras e tubos plásticos foram esterilizados em hipoclorito e, posteriormente, descartados em lixo para materiais infectantes.

4. Resultados

4.1 Transfecção das Células GRX com Plasmídeo pCavEGFP

O DNA isolado foi quantificado no Biofotômetro-Plus (Eppendorf). A concentração final obtida foi de 229 ng/ml.

Na avaliação das condições ideais de transfecção, concluiu-se que houve um aumento de células verdes na cultura que recebeu 2,0µl de lipofectamina e 0,3 ng/ml de DNA. A partir deste dado, foi estabelecido um protocolo para as transfecções. O plasmídeo transfectado apresenta um gene que é resistente ao antibiótico utilizado para a cultura destas células, o G418, logo as células que não contém o plasmídeo morrem. O G418 atua interferindo na síntese protéica e é utilizado como um agente seletivo para a cultura celular que expressa o plasmídeo de interesse, no caso pCavEGFP. O controle de células GRX na presença de G418 morreu, como o esperado, enquanto que as células transfectadas não (dado não apresentado). Nos primeiros dias de transfecção, houve uma diminuição da viabilidade celular. A partir de 30 dias de cultura com meio G418, a viabilidade celular é aumentada, o que atestou o sucesso da transfecção e da criação de uma linhagem permanente e superexpressora da Caveolina-1 nas células GRX.

4.2 Imagens de Microscopia Óptica

Por meio de microscopia óptica, foram observadas mudanças na morfologia das células transfectadas comparadas com as células controle. As GRX^{CavGFP} apresentam um citoplasma mais “estrelado” ou “arredondado” (Figura 6).

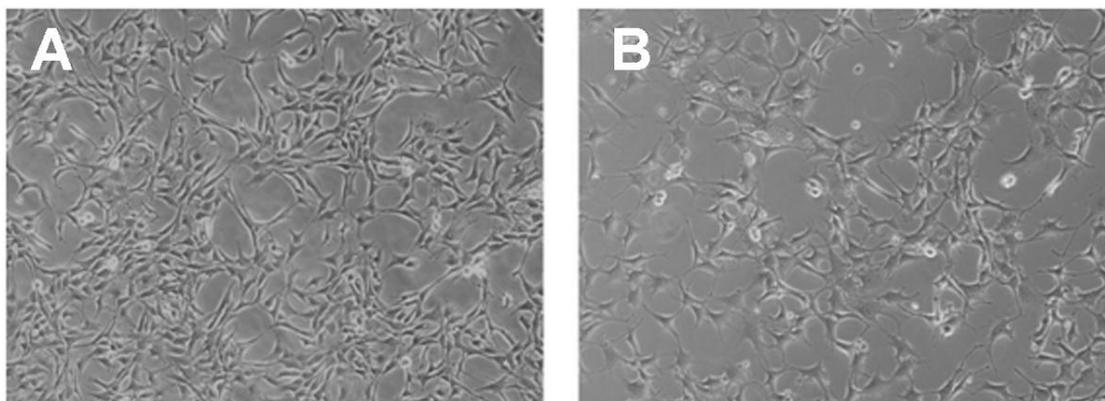


Figura 6. Microscopia óptica, aumento 100x. **A.** Célula GRX, com fenótipo mais alongado. **B.** GRX^{CavGFP} , apresentando citoplasma mais arredondado.

4.3 Western Blotting

Pela análise de Western Blot, foi revelado um aumento de Cav-1 nas células GRX^{CavGFP} em comparação às células GRX (Figura). Utilizando-se o *software* AlphaEase FC (Alpha Innotech Corporation), foi obtido o valor de intensidade de pixels das bandas e, assim, calculada a razão entre Cav-1 e β -actina, confirmando um aumento de aproximadamente 83% na expressão Cav-1 nas células GRX^{CavGFP} .

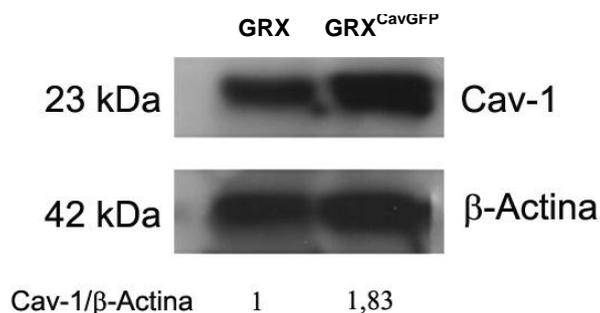


Figura 7: Imunoquantificação de Cav-1 e β -actina por Western Blot em células GRX e GRX^{CavGFP}

4.4 Microscopia Confocal

A microscopia confocal é uma ferramenta muito útil para se atestar o sucesso do presente trabalho. As células superexpressoras codificam Cav-1 com EGFP, uma proteína que emite fluorescência no espectro verde. As primeiras imagens obtidas mostraram que o procedimento funcionou porque mostram as células transfectadas com diversos pontos verdes, correspondendo a Cav-1. Foi possível visualizar que a esta proteína está distribuída na membrana plasmática e no citoplasma (Figura 8A).

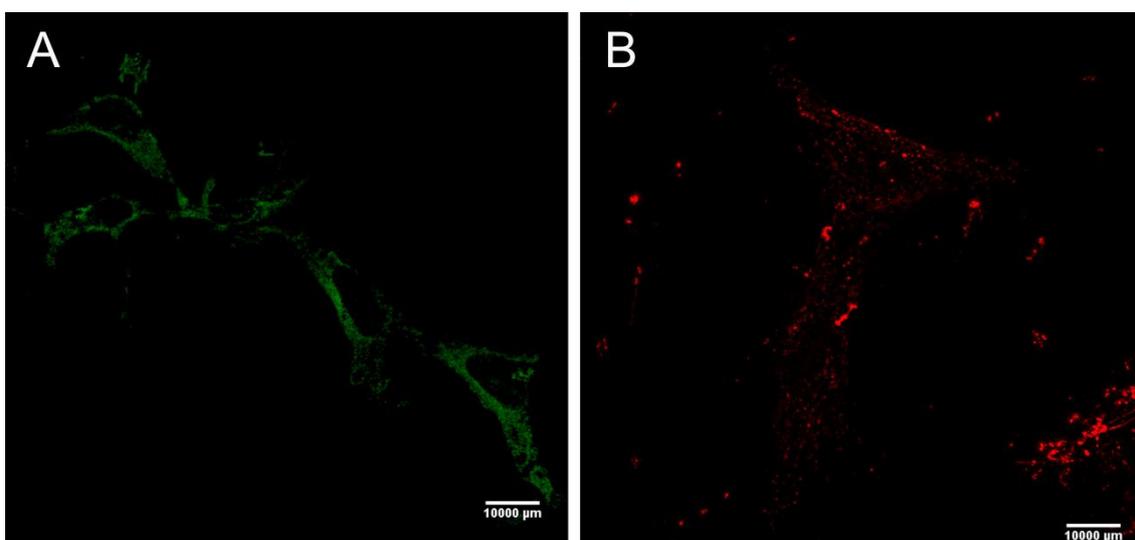


Figura 8. A Distribuição de Cav-1 na membrana plasmática e citoplasma. **A:** Células transfectadas GRX^{CavGFP} mostrando a localização da Cav-1 pelos pontos em verde na superfície celular e citoplasma. **B:** Células GRX marcadas com anticorpo primário anti-caveolina1 e anticorpo secundário Alexa Fluor 555, mostrando a distribuição da Cav-1 pelos pontos em vermelho.

Para se ter certeza de que as imagens obtidas mostram realmente a Cav-1-EGFP, as células foram marcadas, utilizando a técnica de imunocitoquímica, com anticorpo para Cav-1 e, posteriormente, marcadas com um anticorpo secundário que emite fluorescência no espectro vermelho. As imagens de microscopia confocal mostraram que a marcação com anticorpo para Cav-1 funcionou perfeitamente (Figura 8B).

Através de análise de colocalização, é possível estabelecer se duas moléculas estão compartilhando um mesmo espaço por meio da sobreposição de cores, que forma uma terceira cor. Por se tratar da mesma proteína, traduzida com a cor verde e marcada com anticorpo com a cor vermelha, o resultado dessa técnica são imagens que devem

mostrar a Cav-1 em pontos de cor laranja. Através do *software* ImageJ, foi possível calcular os coeficientes de Pearson e de Manders. O coeficiente de Pearson mede o grau da correlação (e a direção dessa correlação, se positiva ou negativa) entre duas variáveis. Desta forma, o valor de -1 aponta uma correlação negativa perfeita, o valor 0 se refere a variáveis que independem linearmente uma da outra e o valor 1 aponta uma correlação positiva. O coeficiente de Manders também mede correlação entre duas variáveis, no entanto, o valor 0 se refere a uma correlação negativa enquanto o valor 1 se refere a uma correlação positiva.

As análises de colocalização mostraram que a GRX^{CavGFP} marcada com anticorpo para Cav-1 em vermelho tiveram diversos pontos com correlação positiva, com coeficiente de Pearson igual a 0,849 e coeficiente de Manders igual a 0,833, indicando o sucesso da técnica de transfecção estabelecida (Figura 9).

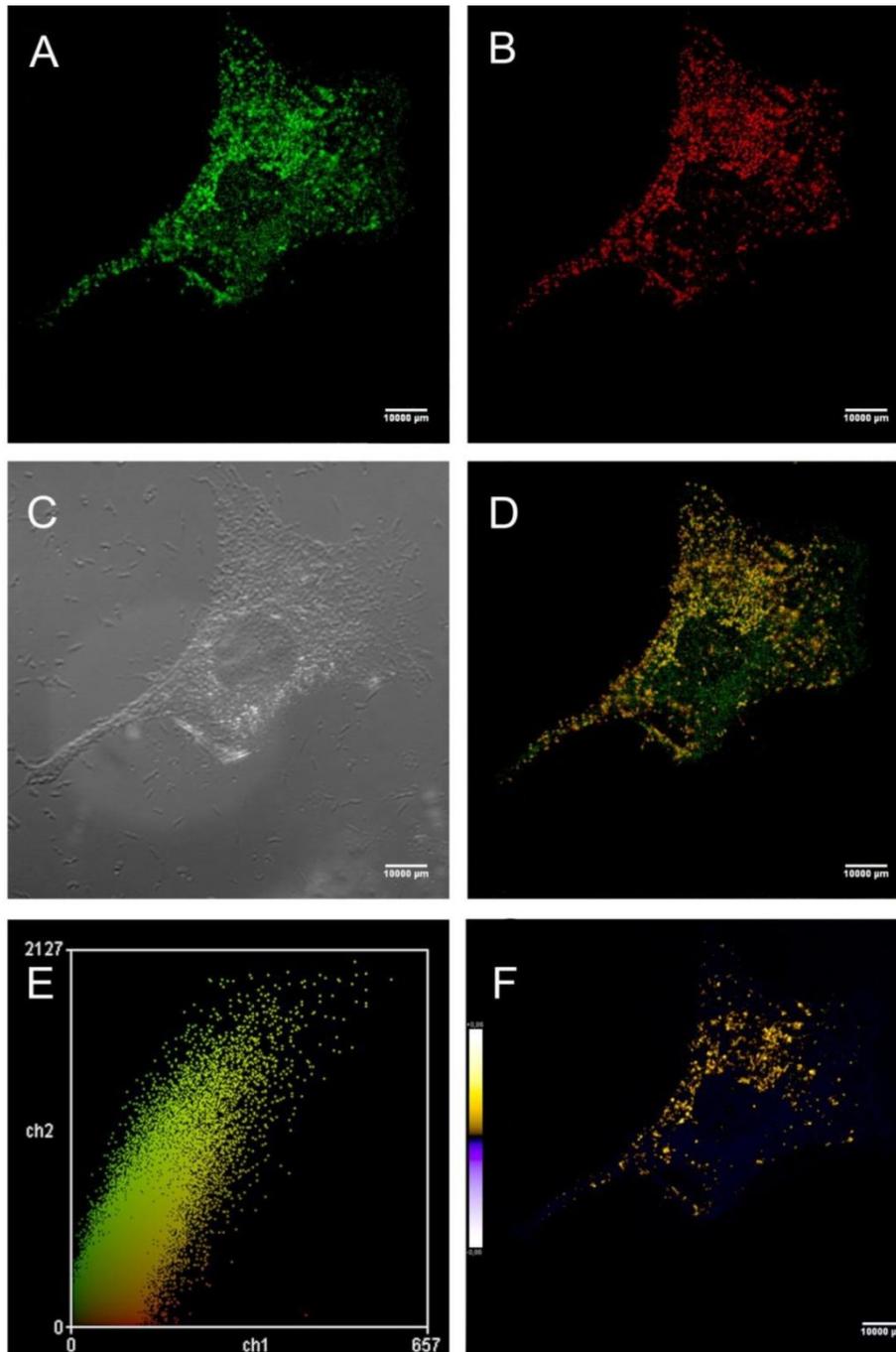


Figura 9: Análise por Microscopia Confocal: As células GRX^{CavGFP} que emite fluorescência verde, foram marcadas com anticorpo para Cav-1 e com anticorpo secundário ALEXA 555, que emite fluorescência na cor vermelha. **A.** Imagem de microscópio confocal com laser excitando a proteína Cav-1/EGFP transfetada. **B.** A Imagem de microscópio confocal com laser excitando a proteína Cav-1/EGFP marcada com anticorpo. **C.** DIC. **D.** Sobreposição de imagens. Os pontos de cor laranja indicam uma correlação positiva entre as duas marcações, atestando o bom funcionamento da técnica de transfecção. **E.** Gráfico de emissão de fluorescência. Os pontos em forma de cometa indicam a correlação positiva. **F.** Produto da diferença das médias de emissão de fluorescência: Pontos da cor laranja indicam onde ocorrem predominantemente a colocalização.

5. Discussão e Conclusões

As doenças crônicas do fígado estão entre as maiores causas de mortalidade humana. Neste contexto, a fibrose hepática e a cirrose representam as manifestações patológicas mais comuns e figuram entre os maiores problemas mundiais de saúde (Elsharkawy, Oakley *et al.*, 2005). A Cav-1 é uma proteína integral de membrana presente nas Caveolas, que são pequenas invaginações que ocorrem na membrana plasmática ricas em glicosíngolipídeos, colesterol e proteínas GPI-ancoradas (Goetz, Lajoie *et al.*, 2008). Em fígados cirróticos, é encontrado um aumento da expressão da Cav-1 nas células endoteliais sinusoidais do fígado e nas HSC, o que sugere um importante papel dessa proteína no desenvolvimento da fibrose hepática (Yokomori, Oda *et al.*, 2002).

A microscopia confocal é uma técnica muito utilizada, podendo ser aplicada para diversos fins de análise, tanto quantitativos quanto qualitativos. Trata-se de um instrumento interessante para se avaliar, por exemplo, o tráfego de proteínas ou as alterações fisiológicas e morfológicas celulares, sendo muito útil na complementação de resultados obtidos por outras técnicas (Biehl, 2011). Da mesma maneira, a introdução de DNA heterólogo em células eucarióticas possibilita uma série de aplicações (Groll, 2003). A transfecção de proteínas de interesse associado a uma proteína fluorescente produz um resultado eficiente e preciso, tornando-se uma técnica importante de investigação. O estabelecimento desta técnica para as células GRX, ainda não foi encontrada na literatura, sendo ela uma grande ferramenta científica para os demais estudos. Para estabelecer um protocolo adequado de transfecção, foram utilizadas diferentes concentrações de lipofectamina e DNA contendo Cav-1 acoplado a proteína EGFP para testar a mais eficiente. Este teste se faz necessário porque a lipofectamina é um reagente essencial para encapsular e transportar o DNA para o citoplasma, e esse processo é muito agressivo, diminuindo consideravelmente a viabilidade celular.

Estabelecido o protocolo ideal para transfecção, o sucesso da técnica pode ser atestado por diferentes meios. Por microscopia ótica, foi possível visualizar diferenças de morfologia claras entre as linhagens transfectadas ou não, o que pode sugerir uma mudança na estrutura do citoesqueleto da célula que resultou em um fenótipo mais estrelado. Considerando que esse fato pode ter relação com o estado de ativação das HSC, alguns testes devem ser feitos para investigar como a inserção de DNA que

superexpressa a Cav-1 influencia nesta alteração. A quantificação proteica da Cav-1, por meio da técnica de imunoblotting, confirmou que as células transfectadas apresentam mais proteína do que as células GRX. A técnica de imunocitoquímica em microscopia confocal, por fim, revelou que o protocolo estabelecido funcionou bem, uma vez que os coeficientes de correlação, tanto de Pearson quanto de Manders, revelaram-se altos.

Sabendo que a Cav-1 está envolvida no controle de rotas de transdução de sinal, no transporte de colesterol do retículo endoplasmático para a membrana plasmática, e que o aumento da sua expressão implica em mais colesterol na membrana plasmática, o estabelecimento da linhagem GRX^{CavGFP} será importante para investigações futuras que envolvem relacionar o aumento da quantidade de Cav-1 com as possíveis alterações fisiológicas ou celulares associadas.

6. Suporte Financeiro

Este trabalho teve apoio e financiamento da CAPES, CNPq, FAPERGS.

7. Referências

- ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: ARTMED, 2010.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **J Clin Invest**, v. 115, n. 2, p. 209-18, Feb 2005.
- BIEHL, H. B. **Implementação de técnicas para avaliação da dinâmica mitocondrial por microscopia confocal no centro de microscopia eletrônica da UFRGS**. 2011. 27 (Trabalho de Conclusão de Curso - Biologia). Centro de Microscopia Eletrônica UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BLOUIN, C. M. et al. Regulated association of caveolins to lipid droplets during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 376, n. 2, p. 331-5, Nov 14 2008.
- BOROJEVIC, R. et al. In vitro induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line-GRX. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 26, n. 4, p. 361-8, Apr 1990.
- _____. Establishment of a continuous cell line from fibrotic schistosomal granulomas in mice livers. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 21, n. 7, p. 382-90, Jul 1985.
- COHEN, A. W. et al. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. **Diabetes**, v. 53, n. 5, p. 1261-70, May 2004.
- ELSHARKAWY, A. M.; OAKLEY, F.; MANN, D. A. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. **Apoptosis**, v. 10, n. 5, p. 927-39, Oct 2005.
- FRIEDMAN, S. L. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. **J Biol Chem**, v. 275, n. 4, p. 2247-50, Jan 28 2000.
- _____. Hepatic fibrosis -- overview. **Toxicology**, v. 254, n. 3, p. 120-9, Dec 30 2008a.
- _____. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiol Rev**, v. 88, n. 1, p. 125-72, Jan 2008b.
- GINES, P. et al. Management of cirrhosis and ascites. **N Engl J Med**, v. 350, n. 16, p. 1646-54, Apr 15 2004.
- GOETZ, J. G. et al. Caveolin-1 in tumor progression: the good, the bad and the ugly. **Cancer Metastasis Rev**, v. 27, n. 4, p. 715-35, Dec 2008.
- GROLL, A. V. **Lipídios catiônicos anfífilos como neutralizadores da carga elétrica do DNA para transfecção in vitro de células eucarióticas**. 2003. 102 (Mestrado). Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GUARAGNA, R. M.; TRUGO, L.; BOROJEVIC, R. Neutral lipid synthesis and accumulation during in vitro induction of the lipocyte phenotype in hepatic connective tissue cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1085, n. 1, p. 29-34, Aug 20 1991.

GUIMARAES, E. L. et al. Relationship between oxidative stress levels and activation state on a hepatic stellate cell line. **Liver Int**, v. 26, n. 4, p. 477-85, May 2006.

HAUTEKEETE, M. L.; GEERTS, A. The hepatic stellate (Ito) cell: its role in human liver disease. **Virchows Arch**, v. 430, n. 3, p. 195-207, Mar 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 524.

MARGIS, R.; BOROJEVIC, R. Retinoid-mediated induction of the fat-storing phenotype in a liver connective tissue cell line (GRX). **Biochim Biophys Acta**, v. 1011, n. 1, p. 1-5, Mar 28 1989.

MARGIS, R. et al. Effects of retinol on proliferation, cell adherence and extracellular matrix synthesis in a liver myofibroblast or lipocyte cell line (GRX). **Int J Exp Pathol**, v. 73, n. 2, p. 125-35, Apr 1992.

MASTRODONATO, M. et al. Altered distribution of caveolin-1 in early liver steatosis. **Eur J Clin Invest**, v. 41, n. 6, p. 642-51, Jun 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Sarvier, 2007.

OGI, M. et al. Distribution and localization of caveolin-1 in sinusoidal cells in rat liver. **Med Electron Microsc**, v. 36, n. 1, p. 33-40, Mar 2003.

PARAT, M. O.; RIGGINS, G. J. Caveolin-1, caveolae, and glioblastoma. **Neuro Oncol**, v. 14, n. 6, p. 679-88, Jun 2012.

SOWA, G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights. **Front Physiol**, v. 2, p. 120, 2012.

TEODORO, A. J. et al. Lycopene isomerisation and storage in an in vitro model of murine hepatic stellate cells. **Eur J Nutr**, v. 48, n. 5, p. 261-8, Aug 2009.

WYNN, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 199-210, Jan 2008.

YOKOMORI, H. et al. Enhanced expression of endothelial nitric oxide synthase and caveolin-1 in human cirrhosis. **Liver**, v. 22, n. 2, p. 150-8, Apr 2002.