

SILVANA GAIBA DE FRANÇA

**ADIPÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS E MOBILIZAÇÃO DE
CÁLCIO INDUZIDA PELA ANGIOTENSINA II E INSULINA**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

SÃO PAULO

2005

SILVANA GAIBA DE FRANÇA

**ADIPÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS E MOBILIZAÇÃO DE
CÁLCIO INDUZIDA PELA ANGIOTENSINA II E INSULINA**

Orientadora: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

Co-orientadores: Prof. Dr. Alfredo Gagnani Filho

Profa. Dra. Lucimar Pereira de França

Profa. Dra. Christiane Steponavicius Sobral

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

SÃO PAULO

2005

França, Silvana Gaiba de

Adipocitos Humanos Cultivados e Mobilização de Cálcio Induzida pela Angiotensina II e Insulina. / Silvana Gaiba de França --São Paulo, 2005.

xiv, 112f

Tese (mestrado) Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica

Título em inglês: Human Adipocytes Cultured and Calcium Mobilization Induced by Angiotensin II and Insulin.

1. Adipócitos
2. Angiotensina II
3. Insulina
4. Ca^{2+} intracelular
5. Microscopia confocal

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – EPM

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
PLÁSTICA**

COORDENADOR: Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira

Dedico especialmente aos meus pais, Bruno Gaiba (in memorian) e Rosária Calado Gaiba (in memorian), a minha eterna gratidão por todo o amor e força.

A toda minha família, por todo amor, carinho, incentivo, ferramentas essenciais para minha formação como ser humano.

Ao meu marido e amigo, Jerônimo, por mais este incentivo, pela paciência, companheirismo e total dedicação.

Aos meus filhos, Virgínia e Yuri, que souberam compreender os momentos de ausência durante esta fase de dedicação ao Curso, pelo amor, apoio constante e incentivo diário.

À Maria de Carvalho França e Anunciada Farias de Souza (in memorian), minhas mães carinhosas, que não me deixaram esquecer em nenhum momento o aprender e ensinar, tão importante para minha formação.

Oração silenciosa

Senhor,
no silêncio desta prece,
venho pedir-te a paz, a sabedoria e a força.
Quero sempre olhar o mundo com os olhos
cheios de amor. Quero ser paciente,
compreensiva e prudente. Quero ver além das
aparências, teus filhos, como tu mesmo os vê.
E assim Senhor, ver somente o bem em cada
um deles. Guarde a minha língua de todas as
maldades, só de bênçãos encham minha alma.
Que eu seja tão boa e alegre, que todos
aqueles que se aproximarem de mim sintam
a tua presença.
Reveste-me Senhor de tua beleza.
E que no decurso deste dia eu te revele a todos.
Assim seja.

À Profa. Dra. Lydia Masako Ferreira, Professora Titular da Disciplina de Cirurgia Plástica, Coordenadora do Curso de Pós-graduação em Cirurgia Plástica e Coordenadora do Laboratório de Cultura de Células da Pele.

Em primeiro lugar, quero agradecer a minha orientadora, pelo auxílio, estímulo, confiança, e sua sábia orientação e ajuda na elaboração desta tese, exemplo de pesquisadora e amor à Universidade.

Não posso também deixar de lhe agradecer a oportunidade que me deu no Laboratório de Cultura de Células da Pele da Disciplina de Cirurgia Plástica, onde muito aprendi, essencial para a realização desse trabalho.

Agradeço ainda,

A oportunidade de realizar esse trabalho na Disciplina de Cirurgia Plástica da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.

À Profa. Dra. Lucimar Pereira de França, Professora Visitante do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM.

Agradeço a Deus pela irmã carinhosa que me concedeu, amiga fiel e sincera.

Existem pessoas admiráveis em toda a sua plenitude, a quem obrigado é pouco. Pessoas exemplares na dignidade, no caráter e na amizade.

Sua firmeza, incentivo, dedicação, orientação, segurança, domínio e participação efetiva em todas as etapas desse trabalho, serviram-me de estímulo constante e certamente, servirão de exemplo por muito tempo.

Ao Prof. Dr. Alfredo Gagnani Filho, Professor Afiliado da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, Professor Orientador do Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, Vice-Coordenador do Laboratório de Cultura de Células da Pele.

Agradeço,

Pela oportunidade de desenvolver esse trabalho no Laboratório de Cultura de Células da Pele da UNIFESP-EPM.

Agradeço não só pela confiança, dedicação, interesse demonstrado na realização deste trabalho, correção desta tese, orientação e ensinamentos valiosos, mas por me ajudar a construir uma fase de minha vida profissional.

A Profa. Dra. Christiane Steponavicius Sobral, Professora Colaboradora da Disciplina de Cirurgia Plástica e pesquisadora do Laboratório de Cultura de Células da Pele da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM.

Agradeço pela colaboração, amizade, apoio e dedicação demonstrada em todos os momentos.

Agradecimentos

Esta tese de mestrado não teria sido possível sem a ajuda e apoio de algumas pessoas, das quais muitas vezes me tive de privar e de não lhes dar a atenção merecida.

Neste momento tenho a oportunidade de lhes fazer um pequeno agradecimento por escrito, demonstrando assim um pouco do sentimento de gratidão que nutro por elas.

A Profa. Dra. Alice Teixeira Ferreira, Professora Livre-Docente do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM, pela chance de realizar esse trabalho junto ao Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM. Agradeço ainda a confiança, dedicação e total colaboração nesse trabalho.

A Profa. Dra. Soraya S. Smaili, Professora Adjunto do Departamento de Farmacologia da UNIFESP-EPM, pela colaboração, confiança, ensino e oportunidade de utilizar o Microscópio de Fluorescência de Alta Resolução do Departamento de Farmacologia da UNIFESP-EPM.

À Andrea Aparecida Fátima Souza Moraes, pós-graduanda do Departamento de Biofísica da UNIFESP-EPM, pela amizade, carinho, apoio e auxílio

na utilização do Citômetro de Fluxo e nas imunomarcações.

A Josefa Maria Casemiro (in memorian), pelos ensinamentos primordiais no cultivo de células, incentivo e dedicação.

À Profa. Dra. Anelisa Bittencourt Campaner, Professora Colaboradora da Disciplina de Cirurgia Plástica e pesquisadora do Laboratório de Cultura de Células da Pele, pela amizade, apoio e incentivo constante.

Aos amigos do laboratório de Cultura de Células da Pele, Carolina Paiva, Fabiana Bocci Giannoccaro, Gustavo Feriani, Michelle Zampieri Ipólito, pela amizade, apoio e incentivo constante.

Às secretárias da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM, Marta Rejane Reis da Silva, Sandra da Silva e Silvana S. Oliveira, pela atenção, apoio e amizade.

À Dra. Andrea Fernandes de Oliveira, preceptora dos residentes da Disciplina de Cirurgia Plástica, pela amizade, carinho, incentivo e apoio.

Aos Médicos Residentes da Disciplina de Cirurgia Plástica pelo apoio, incentivo e colaboração na coleta dos fragmentos de pele utilizados nesse trabalho.

A todos os professores do Centro Universitário São Camilo e da Universidade Federal de São Paulo, pelos constantes ensinamentos e pelo exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa, em especial àqueles que fazem o Programa de Pós-graduação da Cirurgia Plástica da UNIFESP.

À FAPESP – Fundação de Amparo e Pesquisa de São Paulo pelo projeto multiusuário, que forneceu a oportunidade de utilização do Microscópio de Fluorescência Confocal e Citômetro de Fluxo, essenciais para realização desse trabalho.

À CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior pela concessão da bolsa de estudos, como apoio financeiro.

A todos os pacientes, que souberam compreender a necessidade da pesquisa.

Muito obrigada!

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Concentração de cálcio intracelular
ACh	Acetilcolina
AGT	Angiotensinogênio
AI	Angiotensina I
AI	Angiotensina II
AT ₁	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT ₂	Receptor de angiotensina II tipo 2
BSA	Albumina sérica bovina
Ca ²⁺	Íon cálcio
CO ₂	Dióxido de carbono
DAG	Diacilglicerol
DAPI	(4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride
DMEM	Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
ECA	Enzima conversora de angiotensina
Fura-2/AM	Indicador de Ca ²⁺ intracelular-acetoxi-metil éster
HBSS	Solução salina balanceada Hank's
HCl	Ácido clorídrico
HEPES	Ácido de (N-l-2-hidroxietil)piperazina-2-etanosulfônico
Mg ₂₊	Íon magnésio
Na ⁺	Íon sódio
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PKC	Proteína cinase C
R _{máximo}	Razão de intensidade máxima nos comprimentos de onda 340 e 380 nm
R _{mínimo}	Razão de intensidade mínima nos comprimentos de onda 340 e 380 nm
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona

RESUMO

Introdução: O tecido adiposo armazena energia e secreta várias moléculas endócrino/parácrina como a angiotensina II (All) e expressa receptores como de insulina e de All (AT₁ e AT₂). Esses hormônios estão envolvidos em várias patologias tais como a obesidade, hipertensão, diabetes e aterosclerose. **Objetivos:** Caracterização morfológica da cultura primária de adipócitos humanos e da resposta ao estímulo dos hormônios All e insulina. **Métodos:** Para caracterização morfológica fez-se a coloração com Oil red O, gotículas de lipídios, MitoTracker red, mitocôndrias e ERTracker, retículo endoplasmático. Determinaram-se também as fases do ciclo celular, tamanho e complexidade das populações das células cultivadas e dispersas através da citometria de fluxo. O cultivo das células foi realizado de acordo com Hauner et al. (1989). Para as medidas do Ca²⁺ intracelular foi utilizada a análise por microscopia de fluorescência de alta resolução. As células adiposas foram caracterizadas por imunocitoquímica utilizando-se anticorpos para insulina, AT₁ da All, receptor de insulina e lectina conjugados com um marcador fluorescente. **Resultados:** Por microscopia confocal verificou-se a presença de várias gotículas lipídicas, citoesqueleto, mitocôndrias, retículo endoplasmático e membrana celular preservados, e próprios dos pré adipócitos, Os pré-adipócitos apresentaram receptores e grânulos de insulina e o receptor AT₁. Também se verificou por citometria de fluxo a amostra de células recém-dispersas que pôde ser classificada como pré-adipócito. A avaliação temporal dos níveis de Ca²⁺ nas células de pré-adipócitos humanos estimuladas com a All e insulina induzem respostas transientes no caso da All o aumento imediato das [Ca²⁺]_i seguido da diminuição desta resposta e no caso da insulina apresentou oscilações nas [Ca²⁺]_i na presença deste agonista. **Conclusões:** Determinou-se a caracterização morfológica da cultura primária de adipócitos humanos como pré-adipócitos por:apresentarem morfologia semelhante a fibroblastos e inúmeras gotículas de lipídios; evidenciado a presença dos receptores de angiotensina II (AT1) e insulina (RI) por imunofluorescência. As células presentes na amostra do tecido adiposo apresentaram tamanho e complexidade de pré-adipócitos; Nos pré-adipócitos humanos cultivados verificou-se o aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ que foi transiente para o estímulo com angiotensina II e oscilatório para a insulina.

SUMMARY

Introduction: The adipose tissue stores energy and secretes several endocrine/paracrine molecules as the angiotensin II (All) and expresses receptors as of insulin and of All (AT₁ and AT₂). These hormones are involved in several pathologies such as the obesity, hypertension, diabetes and atherosclerosis. Objectives: Morphologic characterization of the primary culture of human adipocytes and of the answer to the incentive of the All hormones and insulin. **Methods:** For morphologic characterization the coloration with Oil red O, lipids droplets, MitoTracker red, mitochondrias and ERTracker, endoplasmic reticulum was made. It also determined the phases of the cellular cycle, size and the populations complexity of the cultivated cells and disperse through the flow cytometry. The cells cultivation was accomplished in agreement with Hauner et al. (1989). For the Ca²⁺ intracellular measures the analysis by fluorescence microscope of high resolution was used. The adipose cells were characterized by immunocytochemistry using antibodies for insulin, AT₁ of All, insulin receptor and lectina conjugated with a fluorescent marker. **Results:** For confocal microscope was verified the presence of several lipidics droplets, cytoskeleton, mitochondrias, endoplasmic reticulum and cellular membrane preserved, characteristic on preadipocytes. The preadipocytes presented receptors and insulin granules and AT₁ receptor It was also verified by flow cytometry the sample of newly-dispersed cells that could be classified as preadipocyte. The temporary evaluation of the Ca²⁺ levels in the human adipocytes cells which were stimulated with All and insulin showed that All induced transient answers, by the immediate increase of the [Ca²⁺]_i followed by the decrease of this response. The insulin presented oscillations in the [Ca²⁺]_i during the presence of this agonist. **Conclusions:** For confocal microscopy was determined the morphologic characterization of the primary culture of human adipocytes as preadipocytes and evidenced the presence of the receivers of angiotensina II (AT1) and insulin (RI) for imunofluorescência. The present cells in the sample of the fatty fabric presented size and preadipocytes complexity; In the cultivated human preadipocytes the increase of the levels intracelulares of Ca²⁺ was verified that was transient for the incentive with angiotensina II and oscillatory for the insulin.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	xii
Resumo	xiii
Summary	xiv
Sumário	xv
1. Introdução	1
2. Objetivos	7
3. Literatura	9
4. Métodos	22
5. Resultados	41
6. Discussão	64
7. Conclusões	78
8. Referências	80
Normas adotadas	
Fontes consultadas	
Anexos	

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

A necessidade de substituição de tecido adiposo ou preenchimento de áreas de perda de tecido ocorre em diversas situações, como por exemplo assimetrias em face, mama, região glútea, ou em áreas localizadas nas seqüelas traumáticas com perda de tecido nas atrofias e hipotrofias das mais variadas formas, fazendo da bioengenharia tecidual uma opção para criar condições para o reparo e a substituição de tecidos lesados, fornecendo elementos celulares e fatores de proliferação. Isto permitiria o desenvolvimento de tecidos autólogos para restaurações estéticas e de defeitos congênitos (HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004).

O campo da engenharia de tecido esforça-se para integrar a contribuição tecnológica de disciplinas que aparentemente não estão relacionadas, com o objetivo de gerar terapias inovadoras e revolucionárias para o reparo e enxertia de tecidos.

Estratégias de engenharia de tecido baseadas no tratamento com células autólogas têm sido realizadas. Estas novas técnicas co-relacionam pré-adipócitos autólogos, substratos de matriz extracelular, células progenitoras adultas e fatores de crescimento com atividades biológicas locais. Estes fatores combinados devem resultar em uma fabricação *in vitro* de enxerto de tecido adiposo e o subsequente uso clínico.

Novos conhecimentos da terapia celular e engenharia tecidual permitem técnicas para reparo ou preenchimento de tecido em grandes áreas corporais.

A expansão do tecido adiposo *in vivo* ocorre rapidamente após o nascimento. No adulto, a capacidade de surgirem novos adipócitos persiste,

como ocorre nos casos de obesidade severa, confirmados por pesquisadores que obtiveram adipócitos maduros pela diferenciação *in vitro* de células adiposas precursoras, isoladas do tecido adiposo de pacientes (BJORNTORP *et al.*, 1985; DESLEX *et al.*, 1987; DESLEX, NEGREL & AIHAUD, 1987).

Atualmente há um consenso de que os adipócitos são um tipo celular específico que deriva de células mesenquimatosas indiferenciadas, com capacidade de diferenciarem-se em células mesodérmicas como condrócitos, osteoblastos, miócitos e adipócitos (GREGOIRE, SMAS & SUL, 1998). As células adiposas precursoras também são chamadas de pré-adipócitos ou lipoblastos e, segundo POLIARD *et al.* (1995) nos primeiros estágios de diferenciação, essas são indistinguíveis dos fibroblastos, mesmo por microscopia eletrônica.

O tecido adiposo é um tipo especializado de tecido conjuntivo atuando como um grande reservatório de gordura. Esse tecido é encontrado abaixo da pele modelando a superfície corporal sendo um importante isolante térmico do organismo. Possui importante função como reservatório energético corporal, secretando inúmeras moléculas que agem sobre os próprios adipócitos ou outros tecidos do organismo, chamadas de adipocinas (KERSHAW & FLIER, 2004).

Estas adipocinas desempenham um papel importante na resposta imunitária, doenças vasculares e regulação do apetite, em sua grande maioria, estão relacionadas direta ou indiretamente aos processos que contribuem na aterosclerose, hipertensão arterial, resistência insulínica, diabetes tipo II e dislipidemias (GREGOIRE, SMAS & SUL, 1998).

Os componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) como o angiotensinogênio (AGT) e as angiotensinas I (AI) e II (AII) estão elevadas durante a adipogênese. A angiotensina I promove crescimento e

diferenciação em adipócitos por induzir diretamente a lipogênese e indiretamente a estimulação da síntese de prostaglandinas (ENGELI *et al.*, 2003). Os adipócitos maduros produzem All que pode inibir um maior recrutamento de pré-adipócitos.

Os componentes derivados do SRAA como a All no tecido adiposo podem atuar de forma autócrina, parácrina e endócrina e são importantes na patogênese da obesidade, da resistência à insulina e da hipertensão.

A All aumenta a entrada de cálcio na célula através de canais de cálcio tipo L presente na membrana celular. O Ca^{2+} e o diacilglicerol (DAG) ativam a proteína cinase C (PKC) e as cinases cálcio-calmodulina, as quais catalizam a fosforilação de proteínas que regulam, por último, a resposta celular.

A insulina exerce muitas ações biológicas, as quais inclui regulação de glicose sangüínea, síntese de lipídios e proteínas e a transcrição gênica (ROSEN, 1987). Com a falta deste hormônio, observa-se um quadro de hiperglicemia, situação que induz uma série de alterações patológicas em células vasculares e neuronais em pacientes diabéticos e modelos de animais, sendo que existem múltiplas teorias propostas para explicar a patogênese das várias complicações causadas pelo aumento da glicemia (KOYA & KING, 1998).

A insulina é o principal hormônio que controla o metabolismo intermediário. Seu efeito global consiste em conservar os combustíveis energéticos: lipídios e aminoácidos, pois facilita a captação, a utilização e o armazenamento celular da glicose após as refeições.

Aumentos na massa de tecido adiposo elevam os riscos de muitas complicações clínicas incluindo diabetes, hipertensão, doenças cardíacas, aterosclerose e algumas formas de câncer. Então, é imperativo que

entendamos os mecanismos pelos quais o tecido adiposo se expande. A amplificação de células adiposas durante o desenvolvimento da obesidade pode ser um fator que ative a proliferação de novas células adiposas. Sendo assim, são necessários estudos *in vitro* e *in vivo* para entender esse complexo, inter-relacionando mecanismos fisiológicos e fisiopatológicos pelos quais o crescimento deste importante órgão é regulado (HAUSMAN *et al.*, 2001).

Para colaborar com esse entendimento, nesse trabalho utilizou-se a microscopia confocal, citometria de fluxo e microscopia de fluorescência de alta resolução como ferramentas para estudo *in vitro* das células adiposas humanas.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

1. Caracterização morfológica dos adipócitos humanos em cultura primária.

2. Caracterização da resposta dos adipócitos humanos em cultura primária ao estímulo dos hormônios angiotensina II ou insulina.

3. Literatura

3. LITERATURA

Neste capítulo os artigos de literatura referentes ao assunto pesquisado serão apresentados divididos por temas, e cada sub-tema será ordenado cronologicamente.

CULTURA DE ADIPÓCITOS

PETTERSSON *et al.* (1985) isolaram células precursoras de adipócitos a partir de estroma vascular de omento e de tecido adiposo subcutâneo de humanos adultos obesos e não obesos e compararam a taxa de replicação destas células em cultura e o número de células com capacidade de expressar o fenótipo de adipócitos. Verificaram que não há diferença na taxa de replicação de células das amostras de doadores obesos e não obesos, nem quando comparados com células precursoras de outros locais diferentes. Avaliaram o crescimento celular em meio de cultura enriquecido, onde aproximadamente 6.5% da população celular original exibiram a morfologia de adipócitos. Assim estes resultados sugerem que as células encontradas no estroma vascular do tecido adiposo têm a habilidade para diferenciar-se em adipócitos sendo que o ambiente e fatores locais, muito mais do que os fatores genéticos, podem ser responsáveis pela hiperplasia em humanos obesos.

DESLEX *et al.* (1987) demonstraram que as células do estroma vascular do tecido adiposo humano adulto podem sofrer conversão gordurosa que consiste na síntese de gotículas de lipídio quando cultivadas

em meio contendo insulina, transferrina e triiodotironina. Dez a 20% das células mudaram sua morfologia para adipócitos e acumularam gotículas de lipídio no período de 10 a 15 dias. As células se diferenciaram e formaram “cluster” – agrupamento de células com a característica original do tecido adiposo observados por imunofluorescência pela identificação da lipoproteína lipase (situado na região de Golgi) e por meio da imunohistoquímica identificando-se o glicerol-3-fosfato (GPDH). Os fibroblasto de prepúcio não exibiram nenhum destes fenótipos. O crescimento celular em meio de cultura apropriado, livre de soro, permitiu a diferenciação de adipócitos diplóides precursores por apresentarem fatores envolvidos na estimulação ou inibição do processo de diferenciação.

DESLEX, NEGREL & AILHAUD (1987) mostraram que células do estroma vascular de ratos obesos de 4 semanas de idade quando cultivados em meio contendo insulina ou fator de crescimento insulina-like, IGF-I, triiodotironina e transferrina sofreram conversão em células gordurosas. Cerca de 90% das células acumularam gotículas de lipídio e isso foi proporcional a redução na suplementação do soro no meio de cultura. A conversão foi avaliada pelo desenvolvimento de lipoproteína lipase e atividade da (GPDH), incorporação de glicose marcada com ^{14}C pelas células. Resultados semelhantes obtidos de diferentes regiões de rato com células do estroma vascular de tecido adiposo. Este resultado sugeriu que em meio apropriado livre de soro ocorre diferenciação celular de precursores de adipócitos diplóides e abre a possibilidade da caracterização de ativadores ou inibidores do processo de conversão adiposa.

HAUNER *et al.* (1989) cultivaram células do estroma vascular obtidas do tecido adiposo subcutâneo humano de adulto que foram cultivados em meio de cultura livre de soro na presença de 0,2 nM de triiodotironina, 0,5 μM de insulina. Após 18 dias mais de 25% das células foram capazes de

diferenciar-se. As células foram avaliadas por acúmulo de lipídios, expressão de lipoproteína lipase (LPL) e pela atividade da GPDH. A adição do cortisol resultou num potente processo de diferenciação do tecido adiposo com característica concentração-dependente. O cortisol pode ser substituído pela dexametasona ou pela aldosterona, mas não por hormônios esteróides sexuais. A proporção de células diferenciadas era dependente da idade e do doador. Quando isoladas de adultos jovens, até 70% dessas células do estroma vascular expressaram o fenótipo de adipócito, quando comparada a 5-10% das células que foram isoladas dos pacientes mais velhos. Uma relação inversa foi observada entre a idade dos 27 doadores com peso normal e alta expressão de GPDH, após a manutenção das células por 18 dias em meio de cultura suplementado com insulina, triiodotironina e cortisol. Esses autores concluíram que o tecido adiposo humano adulto ainda contém células precursoras de adipócitos que são capazes de sofrer diferenciação *in vitro*. Este provável sistema de cultivo pode oferecer a oportunidade de caracterizar outros fatores adipogênicos ou anti-adipogênicos envolvidos no controle do crescimento do tecido adiposo.

POLIARD *et al* (1995) mostraram que a linhagem celular C1 derivada de teratocarcinoma se comportava como uma célula progenitora de tripla potencialidade mesodermal que poderia diferenciar-se em osteoblasto, condroblastos ou adipoblasto sendo estritamente dependente da organização espacial das células e da natureza da indução. Na ausência de contato entre as células antes da adição de indutores, as células C1 mantinham um fenótipo de indiferenciação estável. Quando entram em contato, antes da indução de diferenciação, apresentam genes característicos dos três destinos. Na presença de fatores específicos, como beta glicerol fosfato, ascorbato, dexametasona essas células poderiam diferenciar-se nesses tipos celulares. Isso demonstrou que essa capacidade validou a utilização desse clone C1 como um modelo *in vitro*

para estudo desses fatores moleculares que podem ter uma ação sinérgica pela ação conjunta de fatores de estimulação como a dexametasona e insulina que foram capazes de converter as C1 em adipócitos funcionais.

GREGOIRE (2001) Relatou avanços da biologia do tecido adiposo que têm demonstrado que o tecido adiposo branco (TAB) possui um papel central na regulação do equilíbrio energético e atua como um órgão secretório/endócrino que media numerosos processos fisiológicos e patológicos. Desequilíbrio do TAB pode causar obesidade ou lipoatrofia, doenças cardiovasculares e diabetes. Alterações no TAB resultam em mudanças nos números ou tamanhos de adipócitos. As mudanças do número de adipócitos são alcançadas por uma interação complexa entre proliferação e diferenciação de pré-adipócitos. Diferenciação de adipócitos ou a adipogênese, é um processo altamente controlado que foi estudado extensivamente durante os últimos 25 anos.

WECHSELBERGER *et al.* (2002) os autores transplantaram pré-adipócitos, células de urotélio e epitélio traqueal cultivados *in vitro* colocados adequadamente sobre uma superfície de cápsula pré-fabricada usando a cola de fibrina como veículo de transporte para a reconstrução tecidual. Na primeira fase em modelo animais, coletaram os diferentes tecidos e as células foram cultivadas, e um bloco de silicone que foi implantado subcutaneamente, ou dentro da envoltura anterior do reto introduzindo-se a cápsula para sua formação. Depois de 6 a 10 dias, quando as culturas primárias estavam confluentes, os animais foram reanestesiados e cortadas as bolsas da cápsula recentemente formadas, e as suspensões de células de urotélio (n 40), células de epitélio traqueal (n 32), e pré-adipócitos (n 40) foram implantados sobre a superfície da cápsula em dois grupos, o primeiro utilizando meio de cultura como um veículo de transporte e o segundo a cola de fibrina. Foi realizada histologia das amostras e em todos os animais nos quais os autores usaram cola de

fibrina como um veículo, puderam demonstrar uma reimplantação próspera de todos os tipos celulares. Concluíram que a indução de cápsula em combinação com a cola de fibrina pode ser um modelo próspero para transplante *in vivo*.

JANKE *et al.* (2002) examinaram o papel de All para a diferenciação de pré-adipócitos humanos em cultura primária. Os pré-adipócitos isolados do tecido adiposo humano foram estimulados para diferenciação. A influência do SRAA em diferenciação de adipócitos foi investigada adicionando angiotensinogênio (AGT), All ou antagonistas do receptor de All no meio para diferenciação. Verificaram também a influência de adipócitos em adipogênese por meio de experiências em co-cultura. A expressão dos genes do SRAA, AGT, ECA e receptor AT₁ aumentaram durante a adipogênese. A estimulação do receptor AT₁ através da All reduziu conversão da gordura, considerando que o bloqueio deste receptor notadamente aumentou a adipogênese. Os adipócitos podem inibir a diferenciação de pré-adipócito na co-cultura, e este efeito foi abolido pelo bloqueio do receptor AT₁. Este achado leva para um papel funcional do SRAA na diferenciação do tecido adiposo humano, porque a secreção de AGT e geração de All são características da adipogênese. Os autores postularam um mecanismo parácrino de retroalimentação negativo que inibe o recrutamento adicional de pré-adipócitos em adipócitos maduros.

HARTE *et al.* (2003) Utilizaram os adipócitos isolados do subcutâneo que foram tratados com insulina (1–1000 nM) por 48 h. Como parte dos estudos, foi desenvolvido um anticorpo anti AGT e validado por imunohistoquímica. Doses crescentes de insulina elevaram a expressão da proteína de AGT de uma maneira dose-dependente. Os autores concluíram que as doses crescentes de insulina estimularam a produção de AGT. Neste estudo a análise dessa proteína sugere que a hiperinsulinemia possa ser um fator importante para a relação hipertensão e obesidade.

O`CONNOR, *et al.* (2003) estimularam a fração do estroma vascular do tecido adiposo humano para adipogênese *in vitro* numa matriz de substrato extracelular diferente de tecido adiposo coletado de pacientes do sexo feminino de 25 a 45 anos de idade submetidos a uma cirurgia eletiva. Depois de 24 dias, menos de 5% de células estroma-vasculares tinha sido convertida em adipócitos com substrato de fibronectina, 13% a 28% com colágeno I e $59\% \pm 7\%$ com Matrigel. O volume de lipídio ultrapassou $4,5 \times 10^3 \mu\text{m}^3/\text{célula}$ para o Matrigel com 30% abaixo para os outros substratos. A proliferação das células era evidente para o Matrigel e para a fibronectina, as células apresentaram um espalhamento maior com uma área projetada que excede $3 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{célula}$. Estes resultados são pertinentes ao desígnio de um implante gorduroso, enquanto promovem sua viabilidade na composição de um substituto.

CASSIS *et al.* (2004) buscaram determinar se a produção local de All influenciava a liberação de leptina de adipócitos e concentrações de leptina circulantes. Os adipócitos de ratos tratados por três dias com captopril, demonstraram redução de All, liberação de leptina e diminuição das concentrações de leptina circulante. Adipócitos incubados com All resultaram em um aumento da expressão do RNAm da leptina e liberação da mesma. Determinaram o efeito elevado da All sistêmico e leptina em ratos com injeções de All ou solução salina por 1, 2, ou 7 dias tendo reduzido a concentração de leptina circulante com a duração da exposição de All. Indicaram que a produção local de All aumenta leptina liberada pelos adipócitos; porém, com elevações em All sistêmica, ativada pelos efeitos da All local produzida.

ANGIOTENSINA

MIASIRO *et al.* (1983) relataram que muitas respostas a All em registro isométrico com preparações isoladas de íleo de coelho albino são rapidamente atenuadas (dessensibilizadas) após a resposta inicial para o peptídeo. A dessensibilização ou a perda da resposta fisiológica é um processo regulatório exibido por muitas células quando expostas a diferentes agonistas por tempo prolongado ou por administrações sucessivas e, esse fenômeno pode representar um importante mecanismo regulatório em muitos tecidos.

LEFKOWITZ, STADEL & CARON (1983) apresentou dois mecanismos bioquímicos propostos para explicar o processo de dessensibilização. Um mecanismo que envolve um rápido desacoplamento do receptor das proteínas ligantes da proteína G, mediado pela fosforilação do receptor por quinases específicas, o qual é descrito para o caso de dessensibilização induzida por receptores β -adrenérgicos. O segundo mecanismo envolve o seqüestro ou a internalização que transporta o receptor da superfície celular, tornando-o inacessível para o ligante extracelular.

ANDERSON & PEACH (1994) relataram que o mecanismo bioquímico para explicar a dessensibilização para os receptores da All não está bem esclarecido. Assim, a dessensibilização na formação de inositol trifosfato mediada pela All em músculos lisos tem sido atribuída a seqüestro e a internalização do receptor responsável pela dessensibilização induzida pela All.

JONES, STANDRIDGE e MOUSTAID (1997) caracterizaram o receptor AT₁ em adipócitos da linhagem 3T3-L1 e testaram a hipótese que

a All tem ação direta no metabolismo de adipócitos usando ambos modelos, 3T3-L1 e adipócitos humanos. Mostraram que a All tem efeitos semelhantes em células adiposas humanas e na linhagem 3T3-L1 mantidas em cultura primária. Finalmente, demonstraram que a All aumenta a taxa de transcrição do FAS e do gene ob em 3T3-L1 e células adiposas humanas. Estes resultados indicaram que All pode estar envolvida no controle da adiposidade pela regulação da síntese de lipídio e do armazenamento em adipócitos.

KIM *et al.* (2002) Mostraram que a All aumenta a síntese de ácido gorduroso e triglicerídios armazenados. Os triglicerídios armazenados estão correlacionados com a concentração de leptina circulante. Propuseram que a All pudesse aumentar a diferenciação de adipócitos e a produção de prostaglandinas (PGs). O propósito deste estudo foi determinar se All aumenta a secreção de leptina por um mecanismo PG-dependente. Doses fisiológicas de All aumentaram secreção de leptina significativamente na linhagem 3T3-L1 e em adipócitos humanos. Concluíram que embora a All estimule a secreção de leptina e PG em adipócitos, a regulação dessa secreção de leptina, pela All em adipócitos não é mediado por um mecanismo PG-dependente.

INSULINA

GONZALES-YANES & SÁNCHEZ-MARGALET (2000) demonstraram que a pancreastatina (PST), um peptídeo derivado da cromogranina-A, tem efeitos de contraregulação da insulina em hepatócitos e adipócitos, sugerindo um possível papel na resistência à insulina. O mecanismo de ação da PST sobre a glicose e o metabolismo de lipídio é típica de um

hormônio que mobiliza cálcio e induz a ativação de um receptor acoplado a proteína $G_{q/11}$ que ativa a via da fosfolipase C β (PLC- β). Em adipócitos de rato, a PST inibe o transporte de glicose mediada pela insulina, utilização de glicose, e síntese de lipídio, e tem um efeito lipolítico. Entretanto estimula o nível basal da síntese protéica que é estimulada pela insulina. Estudaram recentemente o sistema do efeito do receptor da PST em membranas de adipócitos. Para investigar os mecanismos do efeito da PST sob a ação de insulina, estudam a via de sinalização cruzada da PST com a sinalização da insulina em adipócitos de rato. Esses autores acreditam que a PST inibe a translocação do GLUT4 para a membrana que é estimulada pela insulina, isso explicaria a inibição do transporte de glicose. O receptor de insulina ativa a fosforilação da tirosina, substrato do receptor de insulina (IRS)-1, e p60-70 que também impede a associação e atividade da p85 – fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K). O mecanismo desta inibição envolve a ativação da “clássica” isoforma da proteína cinase C e a fosforilação da serina do receptor de insulina e do IRS-1. A PST ativa a proteína ativadora de mitose (MAPK) modula a sinalização e aumenta o efeito da insulina. Esta via da PST pode ser considerada como ativadora da síntese protéica. Esses autores concluíram que a PST parece inibir a estimulação da insulina via PI3K em adipócitos, considerando a ativação da via da MAPK. Estes resultados sugeriram uma via cruzada da PST sobre a sinalização da insulina que pode ser explicada pelo efeito da PST sobre o metabolismo da glicose e da síntese protéica.

CRANDALL *et al.* (2000) investigaram o efeito da insulina e do fator de crescimento (IGF-1), insulina-like, sobre o inibidor-1 do ativador de plasminogenio (PAI-1) liberado de cultura primária de pré-adipócitos e adipócitos humanos. Inicialmente foi medido experimentalmente o nível basal de PAI-1 produzido (ng/ml) indicando uma variabilidade entre culturas individuais. Usando uma nova técnica para quantificação em adipócitos, determinaram o PAI-1 liberado pelas células, indicando uma significante

redução com a diferenciação. Uma grande faixa de concentração de insulina e de IGF-1 não afetou a liberação do PAI-1. Esses dados foram confirmados pela técnica de RT-PCR do RNAm do PAI-1 após tratamento com insulina e IGF-1. Estas culturas expressaram gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase estimulada pela insulina (GAPDH) e síntese de leptina após diferenciação de adipócitos. Este foi o primeiro trabalho que autores descreveram a secreção do PAI-1 por culturas primárias de pré-adipócitos e adipócitos humanos, indicando que a liberação de PAI-1 independente da insulina e do IGF-1 o que indica a existência de outros fatores responsáveis pela elevação de PAI-1 plasmática observada no processo de resistência à insulina.

DIETZE et al. (2002) para análise das vias cruzadas de sinalização de fatores, produzidos por adipócitos que desenvolvem um papel fundamental na indução da resistência à insulina em músculo esquelético, foi estabelecido um sistema de co-cultura de adipócitos humanos e células musculares esqueléticas. Células musculares provenientes de três doadores foram co-cultivadas com células de tecido adiposo de vários doadores, a sinalização da insulina foi subseqüentemente analisada em miócitos. A fosforilação da tirosina induzida pela insulina de substratos do receptor de insulina (IRS)-1 foi completamente bloqueada, sem alterar a expressão de IRS-1. A troglitazona aumentou a ação da insulina sobre a fosforilação do IRS-1 na presença ou na ausência da co-cultura. A insulina regulou a ativação da cinase Akt em miócitos que foi reduzida após a co-cultura, onde a ação da insulina foi restaurada com a troglitazona. A adição do fator de necrose tumoral (TNF)- α (2,5 nmol/l) para miócitos por 48 h reduziu a expressão de IRS-1 e inibiu IRS-1 e a fosforilação da Akt comparada com o efeito da co-cultura. Doses baixas de TNF- α foi ineficiente. Após a co-cultura, TNF- α no meio de cultura foi detectado no limite de 0.3 pmol/l. Um nível muito baixo de resistina foi detectado no sobrenadante dos miócitos, mas não nos adipócitos. Esses autores

concluíram que a liberação de fatores de células adiposas induzem uma resistência à insulina em células musculares esqueléticas humanas, enquanto que o TNF- α e a resistina aparentemente não estão envolvidos neste processo.

INDICADOR FLUORESCENTE

GRYNKIEWICZ, POENIE & TSIEN (1985) mostraram uma nova família de indicadores altamente fluorescentes que foram sintetizados para estudos bioquímicos e para o papel fisiológico de Ca^{2+} citosólico livre. Estas propriedades, particularmente a sensibilidade ao íon, cujo comprimento de onda é específico para a forma ligada ao Ca^{2+} . Estes indicadores fluorescentes foram escolhidos para muitas aplicações intracelulares, especialmente em células únicas, células aderentes que se estendem em camadas ou pedaços de tecidos.

POENIE *et al.* (1986) utilizando um novo indicador de Ca^{2+} fluorescente fura-2 determinaram a concentração do íon de cálcio livre em células PtK1. Nenhuma diferença estatística significativa foi encontrada nos níveis basais de cálcio citoplasmático ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) em células em interfase e mitose. Entretanto, as células em mitose apresentaram uma rápida elevação do ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) de 130nM para 500 ou 800nM no intervalo de 20s na transição da metáfase-anáfase. Os níveis transientes de cálcio ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) na região central da célula no início da anáfase sugerem que cálcio pode ter um papel sinalizador no processo de divisão celular.

WILLIAMS & FAY (1990) apresentaram uma técnica que incluía o uso de métodos potenciométricos, para o preciso controle e determinação dos

níveis de Ca^{2+} em soluções, e está associada com o método que equilibra soluções internas e externas com ionóforos, como a ionomicina. O produto dessa técnica tem sido desenvolvido como um processo simples que utiliza fura-2 como um indicador das concentrações de cálcio ionizadas que apresenta uma faixa fisiológica pCa 7,5-5,5, em soluções. As vantagens desse procedimento são: (i) rápida resolução ou performance; (ii) independente da concentração total de EGTA na solução (substância captadora de cálcio dentro de cada solução experimental); (iii) independente da pureza de EGTA; e (iv) não é afetado pelo grande número de cátions presente dentro das soluções.

GOLOVINA & BLAUSTEIN (1997) verificaram a organização do Ca^{2+} nos estoques do retículo endoplasmático e sarcoplasmático liso de astrócitos e miócitos. A dinâmica do armazenamento e liberação de cálcio foi estudada usando imagens de microscopia de fluorescência de alta resolução. Descreveram a heterogeneidade dos estoques de cálcio em células estimuladas com agonistas fisiológicos. Estes resultados sugerem que o cálcio estocado no retículo endoplasmático está organizado espacialmente em distintos compartimentos com funcionalidade de discretas unidades (pool). O ácido ciclopiazônico (inibidor da bomba de cálcio ATPase da membrana do retículo endoplasmático) e a cafeína ou a rianodina recrutam cálcio de compartimentos espacialmente separados. Esses resultados sugerem que as células podem gerar espacialmente e temporalmente distintas sinalizações de cálcio para o controle individual dos processos cálcio-dependentes.

4. Métodos

4. MÉTODOS

4.1 CULTURA PRIMÁRIA DE ADIPÓCITOS HUMANOS

Foram utilizadas amostras de tecido adiposo abdominal subcutâneo de cinco mulheres, com média de idade de 35 anos, obtidas durante cirurgias eletivas de abdominoplastia realizadas no Hospital São Paulo pelo Setor de Abdômen, coordenado pelo Prof. Dr. Fábio Nahas, da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP-EPM. O tecido obtido seria desprezado após o procedimento cirúrgico, e não necessitaria de exame anatomopatológico para elucidação de qualquer patologia associada, e somente foi enviado quando a paciente foi entrevistada antes de tal procedimento e obtido consentimento escrito (Anexo 01).

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM sob nº 072/05. (Anexo 02)

Para obtenção da cultura primária de adipócitos humanos a amostra de 5 cm³ de tecido retirado da cirurgia foi transferido para um frasco de cultura estéril de 100 ml contendo 50 ml de solução salina balanceada Hank's (HBSS) obtido da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA, com 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e levado imediatamente ao laboratório de Cultura de Células da Pele da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP - EPM.

No fluxo laminar, o tecido adiposo foi transferido para uma placa de Petri de 100 mm² de diâmetro e cortado em pequenos fragmentos de aproximadamente 0,5 mm² com auxílio de uma tesoura de iris. Em seguida,

os fragmentos foram transferidos para um frasco de vidro de 100 ml estéril (**Figura 1A**) e acrescentado colagenase tipo II (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA), 1 mg/ml em HBSS contendo na proporção 4 volumes de colagenase para 1 volume do tecido obtido (**figura 1B**), submetidos à agitação por 30 minutos com barra magnética a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂.

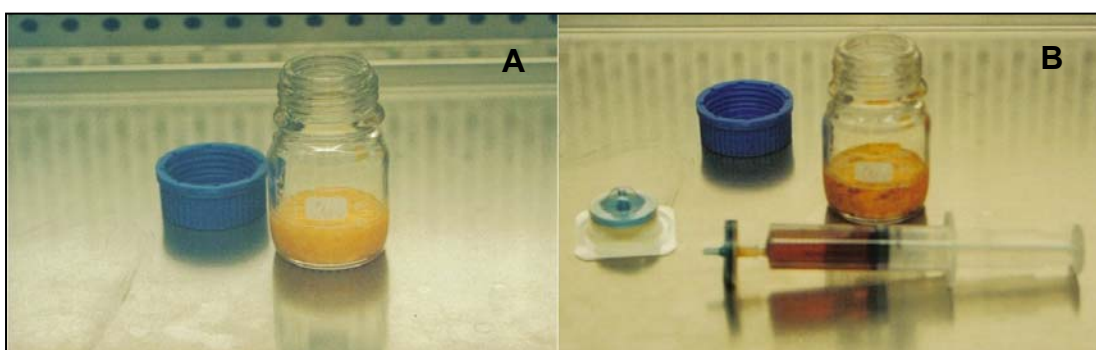


Figura 1. Imagens fotográficas dos fragmentos do tecido adiposo (A) e a solução de digestão enzimática contendo 1mg/ml de colagenase (B) dentro da seringa para ser adicionada ao frasco contendo esses fragmentos.

A solução de tecido gorduroso obtida (**Figura 2A**) foi filtrada em malha de nylon de 250 μ m. O filtrado obtido foi colocado em tubos cônicos estéreis de 15 ml (**Figura 2B**) e centrifugado por 10 minutos a 300 g em temperatura ambiente. A gordura superficial do sobrenadante foi aspirada com auxílio de uma pipeta sorológica de 10 ml e transferida para um tubo cônico de 15 ml. Desprezou-se a fase intermediária e o precipitado (**figura 2A**) também foi transferido para outro tubo cônico de 15 ml, juntou-se essas duas fases e foram ressuspensos em 20 ml de meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) obtido da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA, suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina. A seguir o volume foi dividido

em duas garrafas de 75 cm² as quais foram mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO₂.

Após 24 horas do isolamento o meio foi aspirado, a garrafa de cultivo foi lavada com solução tampão fisiológica (PBS) obtido da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, EUA, e acrescentado 10 ml de DMEM/Ham's F-12 (1:1), suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Para a manutenção das células foi renovado o meio de cultura a cada 2 dias.

As células cultivadas da primeira a terceira passagem foram utilizadas nos experimentos.

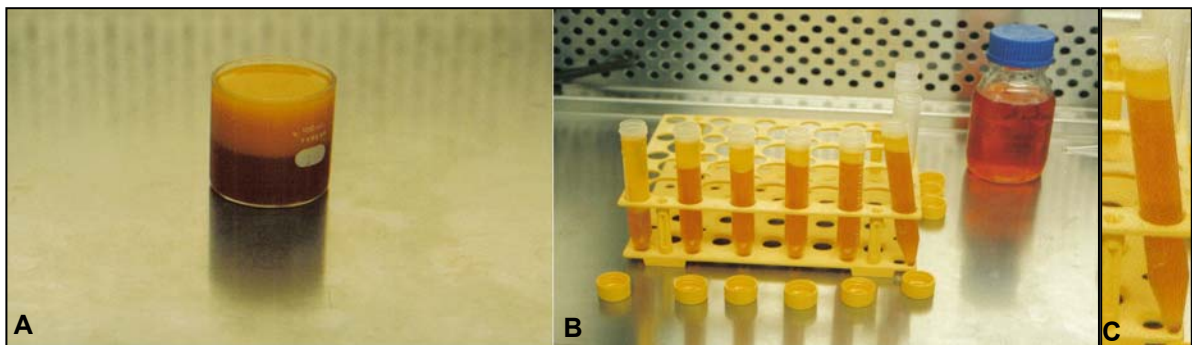


Figura 2. Imagens fotográficas mostrando as amostras de tecido adiposo após digestão pela colagenase e filtração (A). Essa solução foi fracionada em tubos cônicos de 15 ml (B) que foram submetidos a centrifugação de 300 g por 10 min. As amostras apresentaram duas fases: a gordura superficial no sobrenadante e o precipitado formado (C).

4.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DA CULTURA PRIMÁRIA DE ADIPÓCITOS HUMANOS

Para caracterização morfofuncional da cultura primária de adipócitos humanos utilizou-se a microscopia confocal e citometria de fluxo.

4.2.1 CITOQUÍMICA E IMUNOCITOQUÍMICA POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL

Para os ensaios de detecções citoquímicas e imunocitoquímicas, 10^3 células cultivados do tecido adiposo nas passagens P1 até P3 foram semeadas sobre lamínulas circulares de 12 mm^2 , cada lamínula foi acondicionada em um poço de placa de 24 poços (**Figura 3**) mantidas em incubadora úmida a 37°C e 5% de CO_2 até atingirem a subconfluência, que se deu após 48 horas.

Após 48 horas o meio foi aspirado e os poços lavados com PBS e as células foram fixadas com formol 0,4% em PBS e mantidas a 4°C até o momento do experimento.



Figura 3. Imagem fotográfica de uma placa de 24 poços onde foram colocadas as lamínulas circulares de 12 mm^2 , a seguir foram semeadas as células e mantidas em estufa CO_2 por 48 horas.

A marcação das células com os marcadores e corantes fluorescentes foram feitas de acordo com o método descrito por BKAILY et al (1996) com adaptações, cujos dados dos fluoróforos utilizados constam na **Tabela 1** do Anexo 03

As lamínulas contendo as células foram observadas no microscópio de fluorescência confocal da Carl Zeiss LSM 510 (**Figura 4**), objetiva 40X ou 100X com abertura numérica 1,4 a óleo. Sendo possível a análise com excitação envolvendo quatro lasers simultaneamente, foram eles: laser de Argônio (488 nm), Hélio/Neônio-1 (543 nm), Hélio/Neônio-2 (633 nm) e o Titânio/safira (750 nm). Foram também utilizados os respectivos filtros de interferência para os fluoróforos utilizados, a fim de se obter os comprimentos de onda de emissão e as imagens na profundidade do plano focal, que foram obtidas combinando as fatias ópticas projetadas dos eixos x-y.

Fez-se a varredura linear das células a cada 3 segundos de acordo com a velocidade do scanner, ainda dependendo do número de fatias. A visualização e obtenção das imagens foram feitas por meio do microscópio confocal acoplado a um computador cujo programa de aquisição e análise de imagens permite a criação de imagens em 3D.



Figura 4. Imagem fotográfica do equipamento de Microscópio Confocal Carl Zeiss LSM 510 e as fontes de laser titânio-safira (canto inferior esquerdo) e Helio-Neônio1 e 2 e fonte de Argônio atrás do microscópio. O sistema é integrado ao computador para coleta de imagens tomográficas das amostras.

4.2.1.1 IDENTIFICAÇÃO DE MITOCÔNDRIAS

As mitocôndrias das células foram identificadas utilizando-se um marcador seletivo, o Mitotracker red (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), a partir da solução estoque de 1 mM em dimetil sulfóxido (DMSO) obtido da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA, posteriormente diluída em solução Tyrode-BSA (5 mM HEPES obtida da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA, 13 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,9 mM CaCl₂, 5,6 mM glicose), com pH 7,4 e suplementado com 0,01% albumina

sérica bovina (BSA) obtida da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA (**Tabela 2 do Anexo 04**) para a concentração final de 10 nM.

Inicialmente foram aspirados o formol e lavado três vezes com PBS, uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina e duas vezes em PBS. A marcação foi realizada utilizando-se 1 μ l de Mitotracker red na presença de 1 μ l do ácido plurônico, Pluronic F-127 (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), em temperatura ambiente e protegida da luz, durante 1 minuto, lavou-se três vezes com 1 ml de PBS para a retirada do excesso do marcador. Após a marcação das células, as mitocôndrias foram visualizadas efetuando-se a varredura da amostra de células pelo laser de Argônio (488 nm).

4.2.1.2 IDENTIFICAÇÃO DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE)

O retículo endoplasmático (RE) das células adiposas em cultura primária foi identificado utilizando-se um marcador seletivo, o ER Tracker (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Fez-se a solução estoque de 100 nM em DMSO que posteriormente foi diluída em solução Tyrode-BSA, na concentração final de 10 nM para o ER Tracker.

Inicialmente foram aspirados o formol e lavado três vezes com PBS, uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina e duas vezes em PBS. A marcação foi realizada utilizando-se 1 μ l de ER Tracker na presença de 1 μ l do Pluronic F-127, em temperatura ambiente e protegida da luz, durante 1 minuto, lavou-se três vezes com 1 ml de PBS para a retirada do excesso do marcador. Após a marcação das células, o RE foi visualizado efetuando-se a varredura da amostra pelo laser de argônio (488 nm).

4.2.1.3 IMUNOCITOQUÍMICA

Inicialmente foram aspirados o formol e lavado três vezes com PBS, uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina e duas vezes em PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo primário, na diluição descrita abaixo, em PBS contendo 1% de BSA por 45 minutos. Ao final da incubação, as células foram lavadas por duas vezes em PBS, 1 vez em PBS com 1% BSA e novamente em PBS por mais duas vezes. A seguir, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado ao Alexa Flúor 488 e 594, diluídos 1:50 (25 µg/ml) em PBS. Após 30 minutos de incubação, as células foram lavadas cinco vezes em PBS e montadas sobre lâminas de vidro. As células fixadas e marcadas foram observadas no microscópio confocal.

Anticorpos: Lectina (Molecular Probe W11261), monoclonal obtido de coelho e com secundário conjugado com Alexa Flúor 488, foi utilizado numa diluição de 1:250; receptor AT₁, monoclonal obtido de coelho e com secundário conjugado com Alexa Flúor 594, foi utilizado numa diluição de 1:100; receptor de insulina (Sta. Cruz SC 711), policlonal obtido de coelho e com secundário conjugado com Alexa Flúor 594, foi utilizado numa diluição de 1:100; grânulos de insulina (Sta. Cruz, SC 9168), policlonal obtido de coelho e com secundário conjugado com Alexa Flúor 488, foi utilizado numa diluição de 1:100.

4.2.2 CITOMETRIA DE FLUXO

Na análise por citometria de fluxo foram identificadas e quantificadas as células recém dispersas do tecido adiposo e as células cultivadas.

4.2.2.1 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS ADIPOSAS E VIABILIDADE CELULAR PELO IODETO DE PROPÍDEO

Na análise por citometria de fluxo foram quantificadas as células recém dispersas do tecido adiposo e as células cultivadas permeáveis ao iodeto de propídeo (PI). Foi também realizada a avaliação da viabilidade celular do tecido adiposo humano presente na amostra de células recém dispersas e cultivadas.

Para marcar as células em apoptose foi utilizada a marcação com iodeto de propídeo (PI), AMANN *et al.*, 1999, que como o brometo de etídeo (BRE) se intercala entre as bases do DNA e tem a capacidade de fluorescer quando excitado pela luz UV.

As células recém dispersas do tecido adiposo foram coletadas em 1 ml de PBS e em seguida foram centrifugadas a 300 g e ressuspensas em 100µl de PBS marcadas com 5 µg/ml de PI, utilizando-se em cada amostra 10^6 células. As células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, protegidas da luz e então foram lavadas 3 vezes com 1 ml de PBS e imediatamente analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson – BD, SAN JOSE, CA EUA) (**figura 5**).



Figura 5: Citômetro de fluxo utilizado para análise das células cultivadas e recém-dispersas do tecido adiposo.

4.2.2.2 SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS TIPOS CELULARES DA DISPERSÃO DO TECIDO ADIPOSEO.

A separação dos tipos celulares utilizando ficoll-hypaque foi feita utilizando uma amostra de células obtidas da dispersão do tecido adiposo de 5 pacientes. Esta amostra continha 50% de cada um das fases, superior e inferior do sobrenadante, onde os tipos celulares foram separados por gradiente de centrifugação seguindo a metodologia descrita por BOYUM, 1968. Esta consistiu em colocar iguais volumes (3ml) de soluções de diferentes densidades (Hypaque 1119 e 1077) juntamente com a suspensão de células (3ml) contendo a ordem de 10^7 células / ml e centrifugar o conteúdo de células em cada anél a 300 g por 30min. Este procedimento padrão para separação de células sanguíneas agrupa as células de dimensões e pesos semelhantes em anéis facilmente diferenciáveis onde o anel superior será formado pelas células mononucleadas, o intermediário por granulócitos e no inferior encontram-se os eritrócitos. Após a separação das células foi utilizado a citometria de fluxo para identificar as populações de pré-adipócitos e adipócitos presentes nos anéis das amostras de células do tecido adiposo humano.

Determinou-se a região de acordo com o tamanho (FSC – Forward Side Scatter) e complexidade (SSC – Side Scatter). Inicialmente foi eliminado a população de eritrócitos por ficoll-hepaque, antes de iniciar as leituras pelo citômetro de fluxo. Restou assim, uma população de células mononucleadas. Para a eliminação das populações de células mononucleadas eram necessários marcadores específicos para ser obtida uma população pura de adipócitos e pré-adipócitos. Por isso, inicialmente foi caracterizado as populações de interesse determinando uma região de acordo com tamanho e complexidade de cada população celular utilizando o marcador fluorescente de gotículas de lipídios, o Oil red O.

4.2.2.3 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E DAS FASES DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A fração de células em cada fase do ciclo celular foi determinada pela quantificação de DNA pelo PI, que é um agente que se intercala de maneira estequiométrica, isto é, proporcional ao número de bases do DNA seguindo as disposições espaciais de acordo com a forma molecular da dupla hélice do ácido nucléico. Os ensaios foram realizados de acordo com a técnica revista por NICOLETTI et al (1991). As células foram centrifugadas a 200 g por 15 min em tubos cônicos de 15 ml, o botão de células foi ressuspensão em 2 ml de etanol a 4°C. As células foram lavadas 2 vezes com 1ml de PBS a 4°C e ressuspensas em 500µl de PBS gelado a 4 °C. Para eliminar a dupla hélice de RNA que está presente na amostra foi adicionado RNase em uma concentração de 0,5 mg/ml a 4°C por 50 minutos. A seguir, colocou-se 1 ml de solução contendo PI por 15 min a 4°C.

A análise foi realizada em citômetro de fluxo e foram analisados 10.000 eventos por amostra, cada evento correspondeu a uma célula que no histograma de análise bivariada passou pelo feixe de laser em fila indiana e foi detectada. O conteúdo de DNA foi avaliado no detector FL2A analisado em escala gráfica linear. A população celular a ser analisada foi selecionada em histograma bivariado de área de FL2A versus largura do sinal de FL2, para eliminarem-se os agregados celulares. A análise da porcentagem de células nas diferentes fases do ciclo celular, G₀/G₁, S e G₂/M foi realizada utilizando o software Cell Quest versão 3.4 (BD).

A intensidade da marcação na escala linear do PI no canal FL2A refere-se à quantidade de DNA das células, desta forma as células em G₀/G₁ (2n) apresentam menor intensidade de fluorescência por apresentarem menor quantidade de DNA em comparação com as células na fase G₂/Mitose (4n). As células em apoptose apresentam uma

quantidade menor de 2n localizando-se à esquerda da fase G_0/G_1 , região $subG_0/G_1$, (**figura 6**).

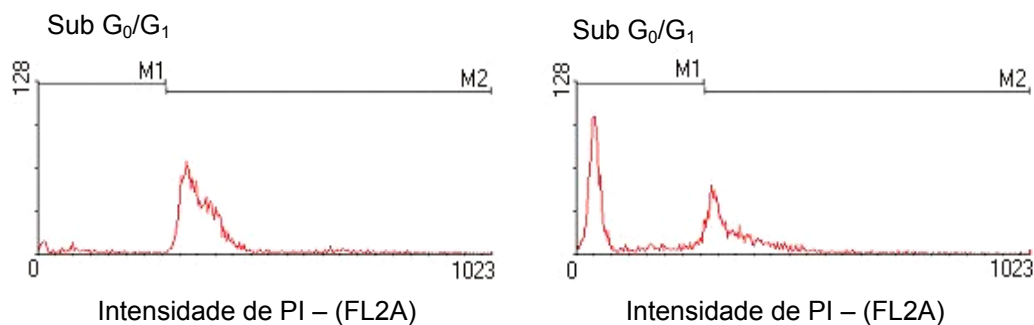


Figura 6: Histograma do conteúdo de DNA é lido no canal FL2A marcados com PI. As células que apresentam baixo conteúdo de DNA ($subG_0/G_1$) são as células em apoptose localizando-se na região **M1**, as células nas outras fases do ciclo celular se encontram na região **M2**.

4.3 MARCAÇÃO POR MEIO DE FLUOROCROMOS PARA MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ALTA RESOLUÇÃO

As células da cultura primária do tecido adiposo foram cultivadas em meio para adipócitos e mantidas em incubadora úmida a 37°C , contendo 5% de CO_2 . As células foram semeadas em lamínulas circulares de 25 mm^2 pré-tratadas com matrigel (Becton e Dickinson), complexo de proteínas de adesão, principalmente colágeno e laminina. As células foram então incubadas por 48 horas e lavadas três vezes com 2 ml de solução Tyrode-BSA.

4.3.1 MEDIDAS DOS NÍVEIS DE CÁLCIO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE ALTA RESOLUÇÃO

As lamínulas circulares de 25 mm² contendo as células em estado de confluência (100%) foram pré-tratadas com matrigel e então cultivadas dentro de placas de Petri de 35 mm² com 2 ml de DMEM/Ham's F12 (1:1) e mantidas em incubadora úmida a 37° C, contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Para cada lamínula contendo as células, foi acrescentado 1 μM do indicador de Ca²⁺ intracelular – acetoxi-metil ester (Fura-2/AM) obtido da Molecular Probes, Eugene, OR, EUA. O tempo total de incubação foi de 10 minutos, cuja incorporação do indicador fluorescente deu-se em temperatura ambiente, a fim de evitar-se a extrusão deste pelos transportadores aniônicos da membrana celular e a entrada deste em compartimentos subcelulares, organelas. O indicador foi preparado em DMSO conforme orientação do fabricante e acondicionado em frasco de vidro âmbar a -4°C. O detergente ácido plurônico (Pluronic F127), solubilizado a 10% DMSO, foi adicionado no momento do experimento em volume igual ao do indicador.

O indicador Fura-2/AM ao ser incorporado pelas células sofre ação de esterases citoplasmáticas e dessa forma, complexa-se aos íons Ca²⁺ onde o seu espectro de excitação desloca-se de 380 nm (indicador livre) para 340 nm (indicador ligado ao Ca²⁺) o que denota um aumento na intensidade de fluorescência em 340 nm, correspondendo ao aumento das concentrações intracelulares de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i). As leituras foram realizadas em dois comprimentos de ondas de excitação, 340 e 380 nm, por um programa que alterna o monocromador entre frações de milissegundos, permitindo a leitura contínua da fluorescência. A emissão da fluorescência foi medida no comprimento de onda de 505 nm, descontando-se a autofluorescência das células e a fluorescência de fundo. A leitura inicial

nos dois comprimentos de onda de excitação (340/380 nm) equivaleu ao valor do cálcio intracelular basal. Após estabilização da leitura com a obtenção dos níveis basais de Ca^{2+} foram administrados os agonistas ou reagentes, conforme o protocolo experimental de dessensibilização.

4.3.2 DETERMINAÇÃO DO $R_{\text{MÁXIMO}}$ E $R_{\text{MÍNIMO}}$ PARA O FURA-2/AM

Os resultados dos experimentos foram fornecidos pelo método da razão de leitura em 340 e 380 nm ou pela $[\text{Ca}^{2+}]_i$ utilizando-se a fórmula $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times [(R - R_{\text{mínimo}}) / (R_{\text{máximo}} - R) \times \beta$ (GRYENKIEWICZ *et al.*, 1985) onde K_d é a constante de dissociação do Fura-2/AM e vale 224 nM a 37°C, R é a razão de fluorescência obtida em 340 e 380 nm, β é a razão entre a fluorescência do Fura-2/AM livre e a da forma ligada ao cálcio, obtida com a curva de calibração “*in situ*” (WILLIAM & FAY, 1990). Para isso, utilizamos a cultura de células permeabilizadas com digitonina e expostas ao MnCl_2 .

A digitonina permeabilizou a membrana plasmática das células, poupando a das organelas que não possui colesterol em suas bicamadas lipídicas e, portanto, expondo o Fura-2/AM citosólico às concentrações do Ca^{2+} extracelulares, obtendo-se assim um aumento da intensidade da fluorescência, que indica a saturação do indicador com o Ca^{2+} representando o valor máximo da razão 340/380 (razão máxima de fluorescência (R_{Max}) de cada experimento.

O Mn^{2+} promoveu a queda rápida da intensidade da fluorescência uma vez que este competiu e deslocou o Ca^{2+} do Fura-2/AM e apagou a fluorescência do indicador atingindo os valores da autofluorescência da

célula. Como o Mn^{2+} possui a propriedade de complexar-se somente com a forma totalmente desesterificada do fluoróforo e não com as formas parcialmente esterificadas, que também fluorescem, essa estratégia assegura que os sinais observados foram provenientes do complexo fluoróforo-íon Ca^{2+} . Portanto, as variações de razão 340/380 nm corresponderam às variações da concentração intracelular do complexo Fura-2- Ca^{2+}

Os valores obtidos foram expressos com a razão de fluorescência em 340 e 380 nm ou pela $[Ca^{2+}]_i$ utilizando a fórmula desenvolvida por GRYENKIEWICZ *et al.* (1985): $[Ca^{2+}]_i = Kd \times [(R - R_{min}) / (R_{max} - R)] \times \beta$, onde β é o fator de calibração do aparelho entre o Fura-2 livre e o ligado ao Ca^{2+} , obtido a partir da curva de calibração *in situ*, o Kd é a constante de dissociação *in vitro* do complexo Fura-2 - Ca^{2+} com valor de 224 nM a 37° C; R é a razão de fluorescência emitida em 505 nm, proveniente das amostras excitadas em 340 e 380 nm; R_{Max} e R_{Min} representam respectivamente, a razão da intensidade de fluorescência do Fura-2/AM no comprimento de onda de excitação de 340/380 nm na presença de quantidades máximas de Ca^{2+} (saturação dada pela digitonina) e na presença de Ca^{2+} zero (WILLIAMS & FAY, 1990).

Sabe-se que os valores de $[Ca^{2+}]_i$ estimados pela fórmula de GRYNKIEWICZ, POENIE & TSIEN. (1985) e POENIE *et al.* (1986), apresentam uma incidência de erros devido: (1) ao valor da constante de dissociação que é obtida numa condição *in vitro*, e a viscosidade nesta situação difere muito daquela das condições celulares (POENIE *et al.* 1986); (2) a uma desesterificação incompleta do Fura-2/AM, que nesta forma é insensível ao Ca^{2+} ; (3) ao vazamento do Fura-2/AM pela membrana celular, por transportadores aniônicos ou por pontos de lesão da membrana (DI VIRGILIO *et al.*, 1988); (4) e à geometria das células (POENIE *et al.*, 1986).

Como o indicador de fluorescência existe apenas nas formas, livre ou complexado ao Ca^{2+} , o sinal a partir deste par de comprimentos de onda de excitação (340/380 nm) se infere a $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (COBBOLD & RINK, 1987) de tal forma que a determinação da razão 340/380 nm (método ratiométrico) evita o erro anteriormente descrito no item 4 e alguns artefatos.

Os resultados foram apresentados pelas razões obtidas diretamente das leituras no decorrer dos experimentos, utilizando-se assim o método ratiométrico

4.3.3 INDUÇÃO DE DESSENSIBILIZAÇÃO EM ADIPÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS

As células adiposas cultivadas na passagem 1 a 3 foram semeadas (5×10^4 células) em lâminas circulares de 25 mm^2 , pré-tratadas com matrigel, e permaneceram banhadas em meio DMEM/Ham's F-12 (1:1), suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina em incubadora de CO_2 a 37°C por 2 dias. Para o protocolo experimental, a amostra de células foi lavada três vezes com 1 ml da solução Tyrode-BSA e foram mantidas nesta solução. Assim, foram marcadas com o indicador fluorescente Fura-2/AM por 10 min como descrito anteriormente. Para a indução da dessensibilização, as células foram estimuladas com uma dose de AII (10 nM) ou insulina (10 nM) por tempo prolongado (5 minutos) sendo assim, observadas ao microscópio de fluorescência de alta resolução (NIKON Eclipse TE 300) (**figura 7**) acoplado à câmera CCD (MicroMax 512BFT, Roper Sci, Princeton Instruments, EUA). As imagens foram obtidas a cada 3s, o que permitiu a observação do fenômeno estudado em tempo real. A avaliação dos níveis intracelulares de

Ca^{2+} frente ao estímulo dado pelos hormônios, seguiu a descrição do método citado anteriormente.

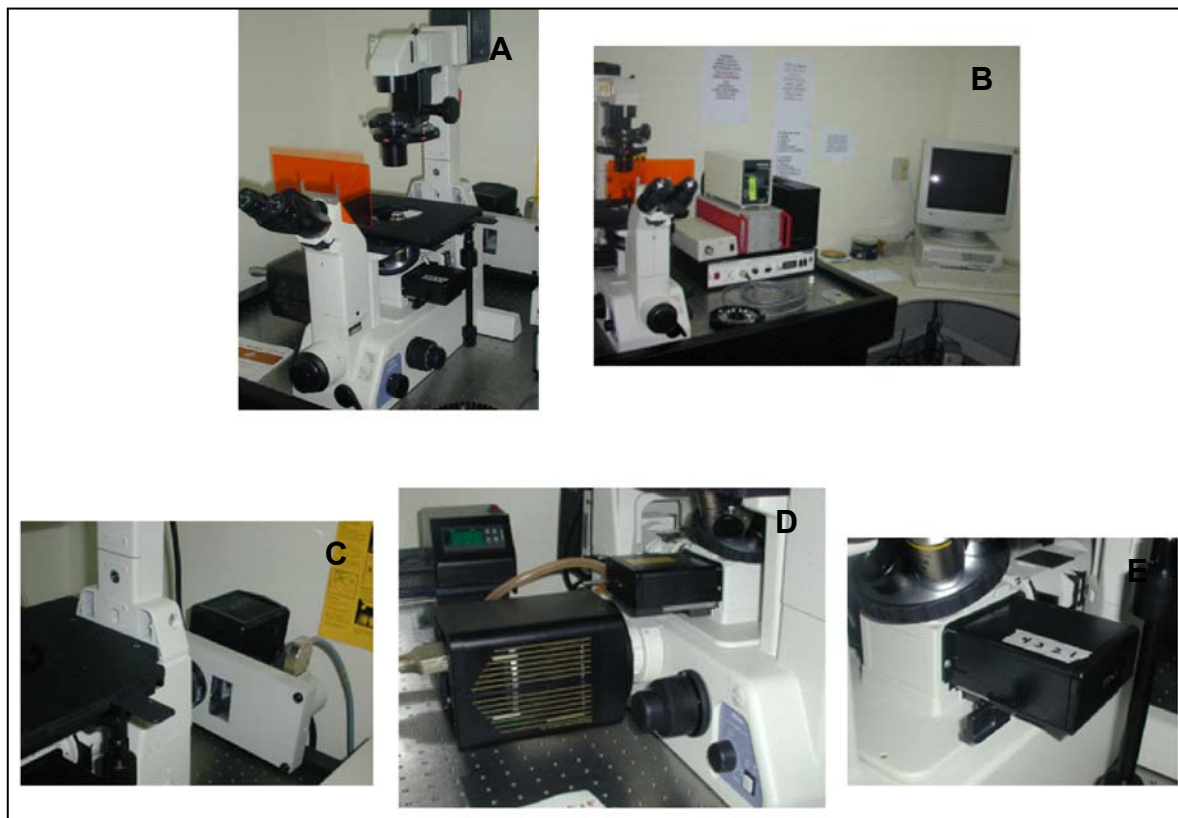


Figura 7. Imagem fotográfica do Microscópio de Fluorescência de Alta Resolução acoplado à câmara CCD (A) Microscópio invertido, (B) Laboratório de microscopia do equipamento aonde vimos o microscópio completo (computador à direita), (C) Fonte de laser, (D) Câmara CCD e (E) Filtro de lasers

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na citometria de fluxo utilizaram-se amostras de três pacientes e os experimentos foram realizados em triplicata e a análise do histograma foi

realizada quantificando a porcentagem das regiões M1 e M2 utilizando o programa Cell Quest (versão 3.4 BD). Uma vez delimitada uma região de análise, o programa calcula a média dos eventos da escala linear mediante a fórmula:

$$\text{Media} = \frac{\sum X_i}{n}$$

onde X_i é o valor linear dos eventos e n é o número de eventos usados nos cálculos.

Para a microscopia de fluorescência de alta resolução utilizaram-se amostras de cinco pacientes, células cultivadas da primeira a terceira passagens e os experimentos foram realizados em quadruplicata. A análise estatística dos resultados foi determinada para comparações entre grupos usando-se o teste T pareado de Student ou o Teste de ANOVA, para múltiplas comparações. A significância estatística foi dada para $p < 0,05$. As medidas de fluorescência foram realizadas por computador usando-se o programa de aquisição e análise de imagens Spectralyzer, pois estes dados são variáveis e não são distribuídos uniformemente. Os valores da razão da intensidade de fluorescência para o Fura-2/AM, ligado ou livre do íon Ca^{2+} (340/380 nm) foram normalizados, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\Delta \text{ Fluorescência (\%)} = \frac{(\text{R } 340/380 - \text{R } 340/380 \text{ basal})}{(\text{R } 340/380 \text{ basal})} \times 100$$

$$(\text{R } 340/380 \text{ basal})$$

5. Resultados

5. RESULTADOS

A caracterização das células primárias de adipócitos humanos foi inicialmente feita com a utilização de microscopia de luz na qual podemos observar na **Figura 8** a micrografia das células adiposas na primeira passagem, antes de atingir o estado de confluência do frasco de cultura de 75 cm².

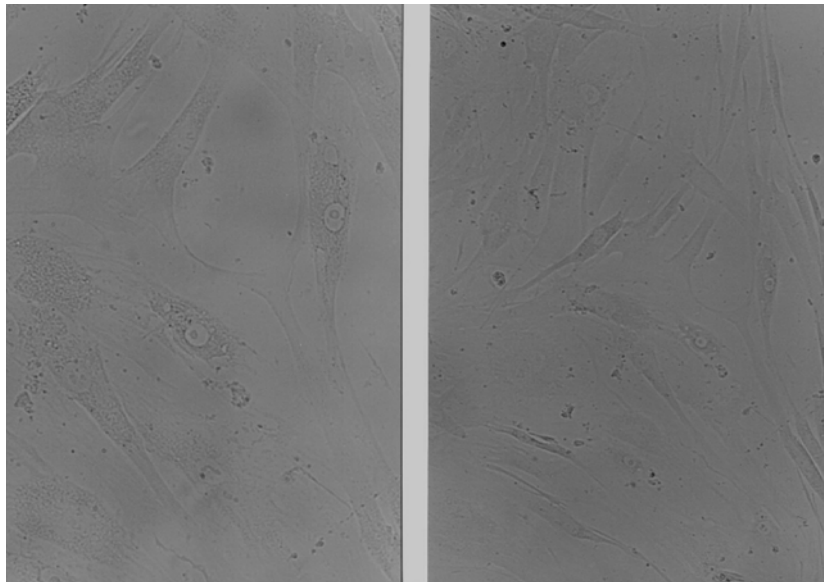


Figura 8. Fenótipo das células adiposas sob microscopia de luz utilizando objetiva de 40X (esquerda) 20X (direita) do microscópio NIKKON TE300, aumento de 400X e 200X com 10⁵ células em frasco de cultura de 75 cm². As células apresentadas em estão em estado de subconfluência com característica morfológica preservada.

Para a caracterização fenotípica das células adiposas, fez-se o ensaio de citoquímica. As células foram incubadas separadamente com os corantes fluorescentes cujas imagens estão ilustradas na **Figura 9 (A, B, C e D)**. As lamínulas contendo as células foram observadas no microscópio de fluorescência confocal Carl Zeiss (LSM 510) e fez-se a tomografia óptica para a aquisição das imagens e reconstrução em 3D. Observa-se em vermelho, a concentração de gotículas de lipídios, principalmente na região perinuclear, caracterizando a célula como pré-adipócito. Observa-se também a distribuição dos filamentos de actina (verde) o que mostra a ausência de bolhas (blebbing) e característica do citoesqueleto preservada.

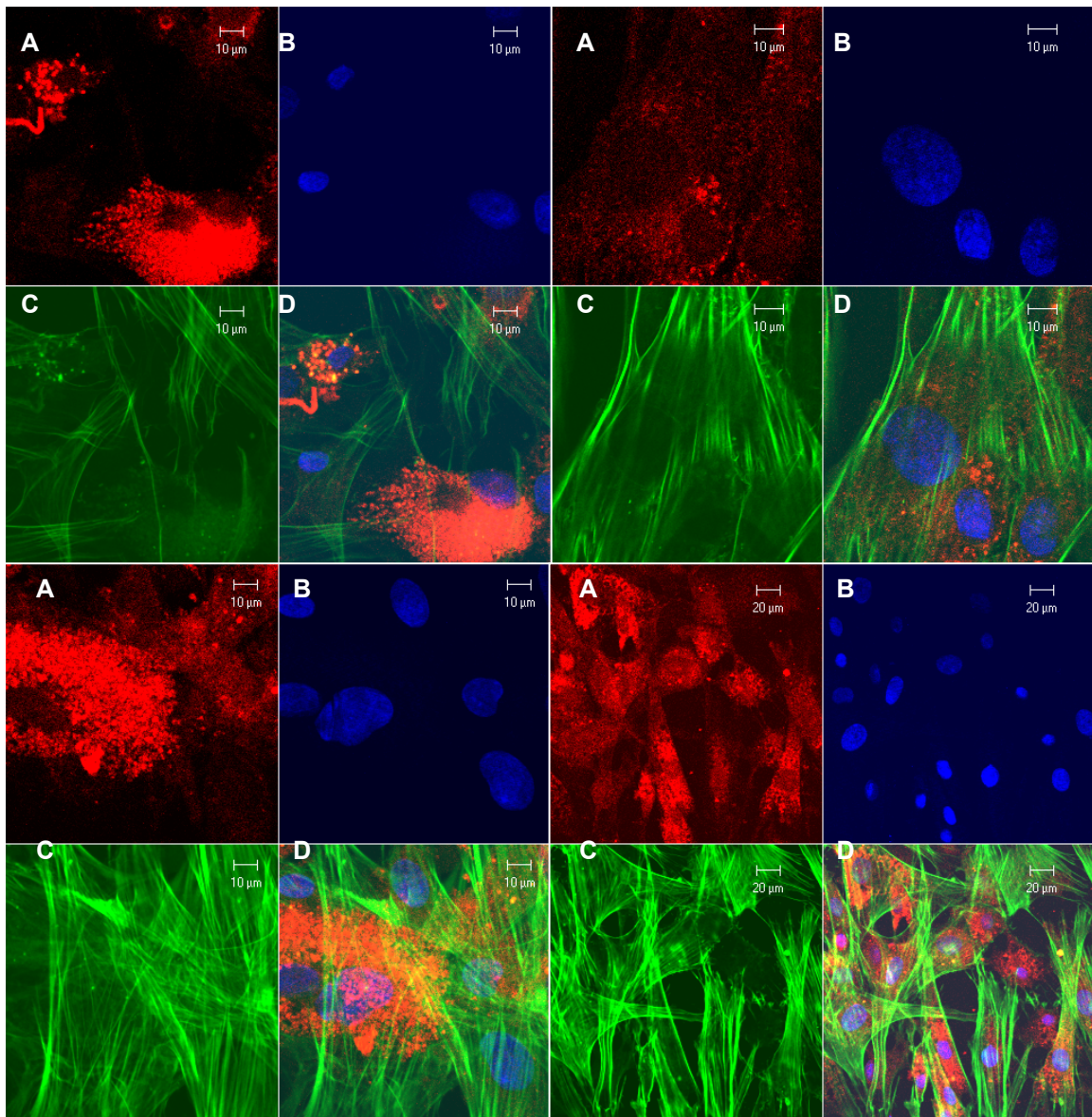


Figura 9. Galeria de imagens das células primárias adiposas identificadas por citoquímica.

A - gotículas lipídicas estão coradas com oil red (vermelho)

B - Núcleo celular corado com DAPI (azul) .

C - Imunomarcagem para proteína do citoesqueleto por coloração da actina F com faloidina conjugado com Alexa flúor 488 (verde). Nota-se a preservação dos filamentos de actina.

D - Sobreposição das imagens A, B e C. Mostrando a co-localização das organelas.

5.1 LOCALIZAÇÃO E ANÁLISE QUALITATIVA DAS MITOCÔNDRIAS EM PRÉ-ADIPÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS

As mitocôndrias das células adiposas foram identificadas com o marcador seletivo Mitotracker red. Após a marcação as células foram visualizadas efetuando-se a varredura da amostra de células pelo laser de argônio (488 nm). Os resultados foram expressos nas imagens obtidas nas **Figuras 10**, com as quatro imagens para cada ensaio (**A, B, C, D**). Também se observa o núcleo celular corado em azul e filamentos de actina em vermelho.

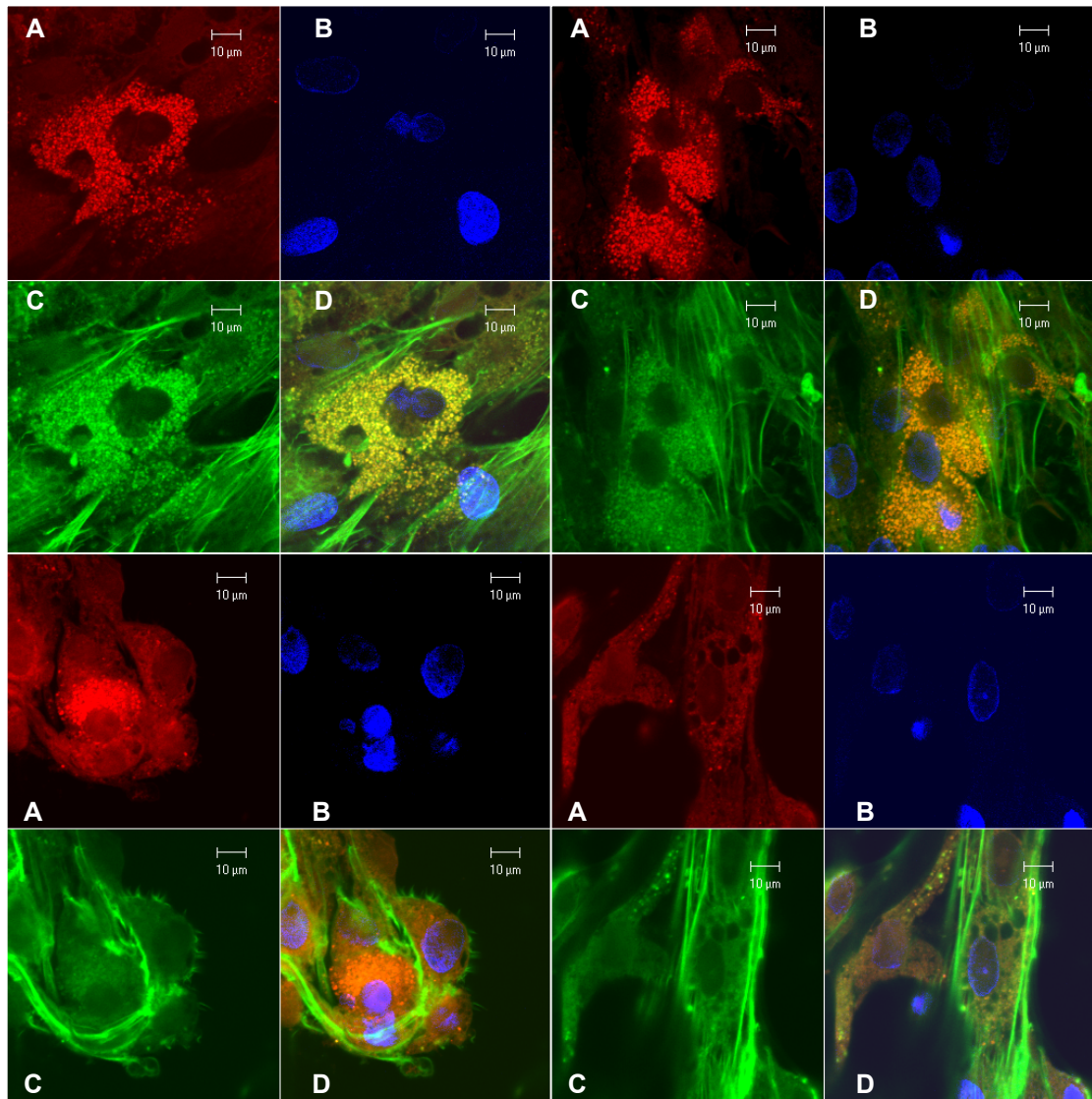


Figura 10. Imagem de microscopia confocal das células cultivadas do tecido adiposo humano.

A - As mitocôndrias coradas MitoTracker red (vermelho)

B - Núcleo celular corado com DAPI (azul) .

C - Imunomarcacão para proteína do citoesqueleto por coloração da actina F com faloidina conjugado com Alexa flúor 488 (verde). Nota-se a preservação dos filamentos de actina.

D - Sobreposição das imagens A, B e C. Mostrando a co-localização das organelas.

5.2 LOCALIZAÇÃO DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO EM PRÉ-ADIPÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS

O retículo endoplasmático das células adiposas foi identificado com o marcador seletivo ER Tracker da Molecular Probe. Após a marcação as células foram visualizadas efetuando-se a varredura da amostra de células pelo laser de titânio-safira (375 nm). Os resultados foram expressos nas imagens obtidas na **Figura 11**

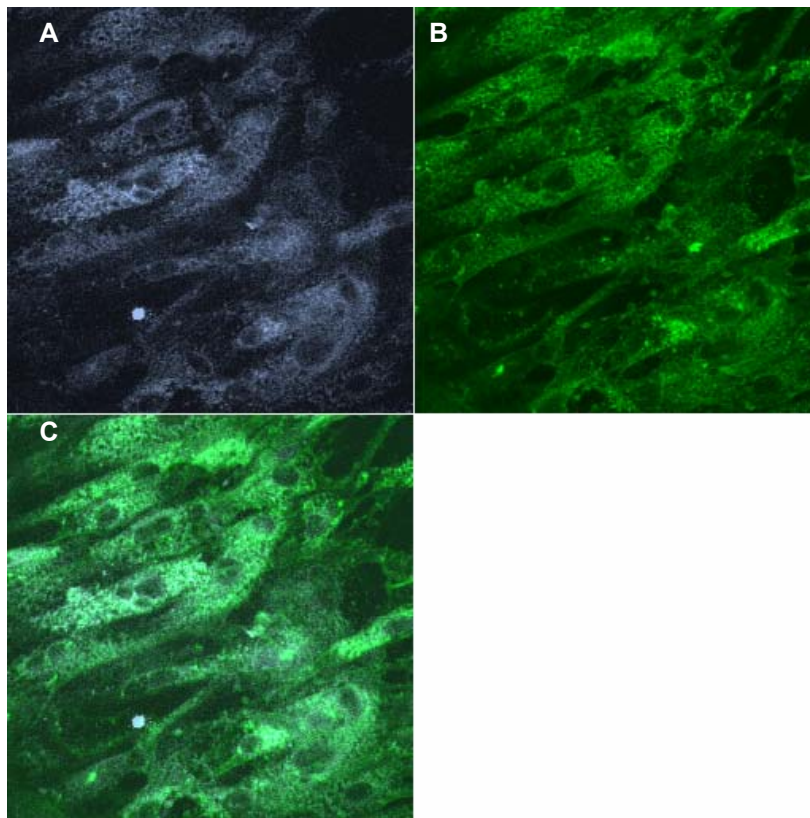


Figura 11. Imagem de microscopia confocal das células cultivadas do tecido adiposo humano. A - O retículo endoplasmático corado ER Tracker (azul). Mostrando a localização e dimensão do retículo endoplasmático. B - Imunomarcação para fosfolípido lectina (verde). C - Sobreposição das imagens A, B. O núcleo celular pode ser observado em preto (ausente de marcadores).

5.3 IDENTIFICAÇÃO DE RECEPTOR AT₁ EM PRÉ-ADIPÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS

A identificação do receptor foi realizada utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-receptor de AT₁ produzido em coelho e revelado com o secundário. Os resultados foram expressos nas imagens obtidas nas Figuras 12 e 13.

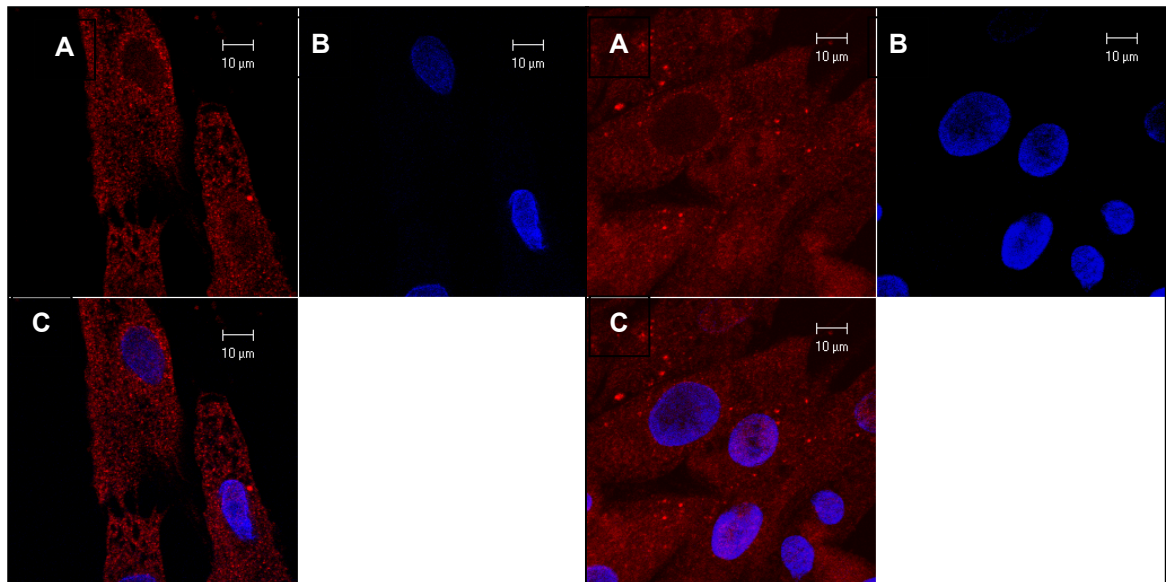


Figura 12 – Marcação do receptor AT₁ das células adiposas em cultura primária. As células foram marcadas com os respectivos anticorpos fluorescentes e a imagem obtida por microscopia confocal.

A - Marcação do receptor AT₁ da superfície celular pelo anticorpo anti-AT₁ de coelho e revelado com secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho).

B - Identificação do núcleo, corado com DAPI em azul.

C - Sobreposição das imagens A e B. Núcleo (azul) e os receptores AT₁ (vermelho).

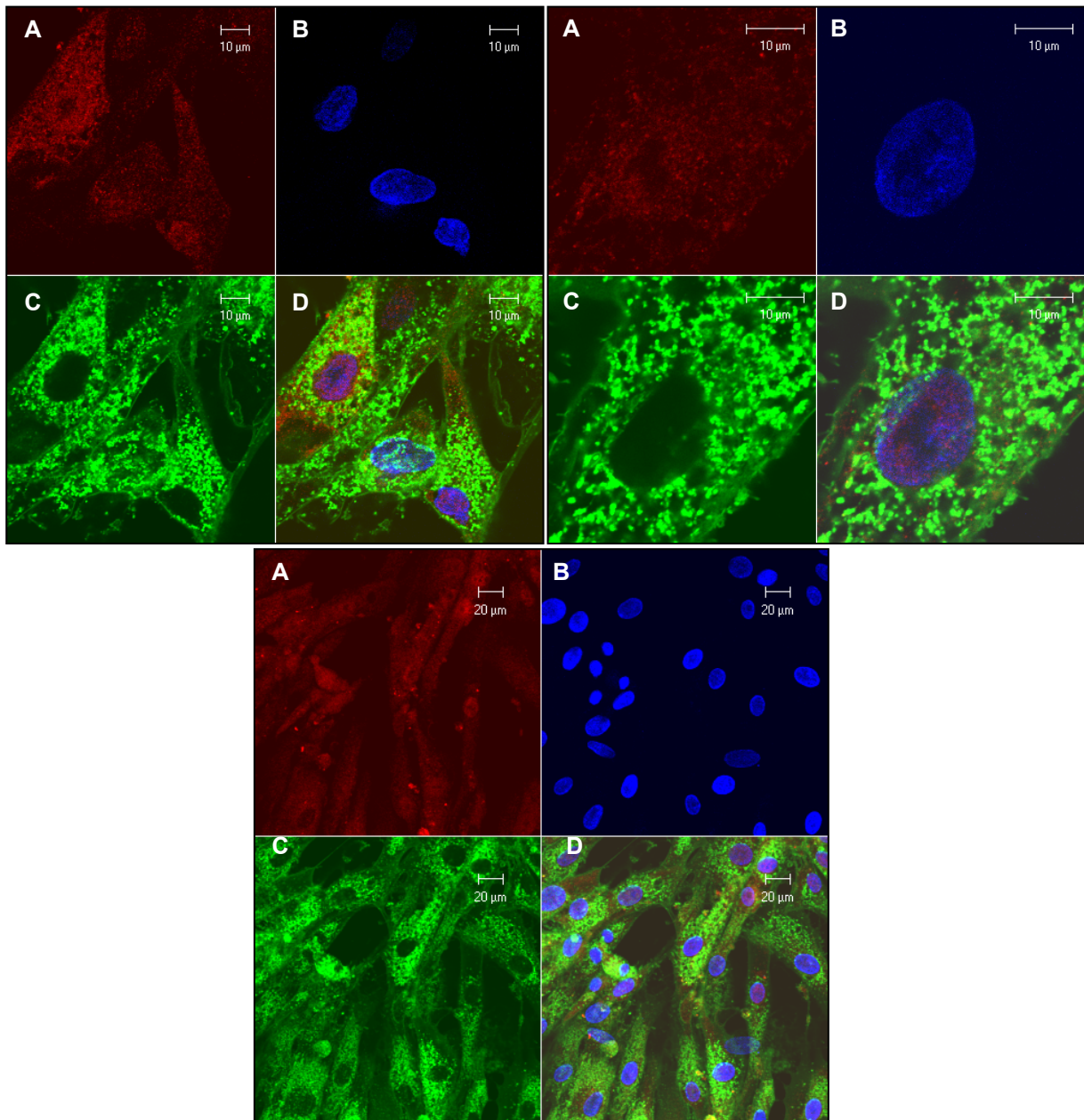


Figura 13- Marcação do receptor AT_1 das células adiposas em cultura primária .A imagem foi obtida por microscopia confocal.

A- Marcação do receptor AT_1 da superfície celular pelo o anticorpo monoclonal anti- AT_1 de coelho e revelado com secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho)..

B- Coloração do núcleo, corado com DAPI em azul.

C- Imunomarcção para lipídio lectina de superfície celular, utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-lectina de coelho e revelado com o secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (verde).

D- Sobreposição das imagens A.B e C. Os receptores AT_1 (vermelho), núcleo (azul) e membrana (lectina) em verde.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DO RECEPTOR DE INSULINA E GRÂNULOS DE INSULINA EM PRÉ-ADIPÓCITOS HUMANOS CULTIVADOS

A identificação do receptor de insulina foi realizada utilizando-se o anticorpo primário anti-receptor de insulina produzido em coelho e revelado com o secundário. A **Figura 14** mostra a presença do receptor de insulina e o núcleo das células adiposas corado em azul.

A presença de grânulos de insulina foi identificada utilizando-se o anticorpo primário anti-insulina produzido em coelho e revelado com o secundário. A **Figura 15** mostra a presença dos grânulos de insulina e o núcleo das células adiposas corado em azul. Após a marcação as células foram visualizadas efetuando-se a varredura da amostra de células pelo laser de HeNe-1 (543 nm).

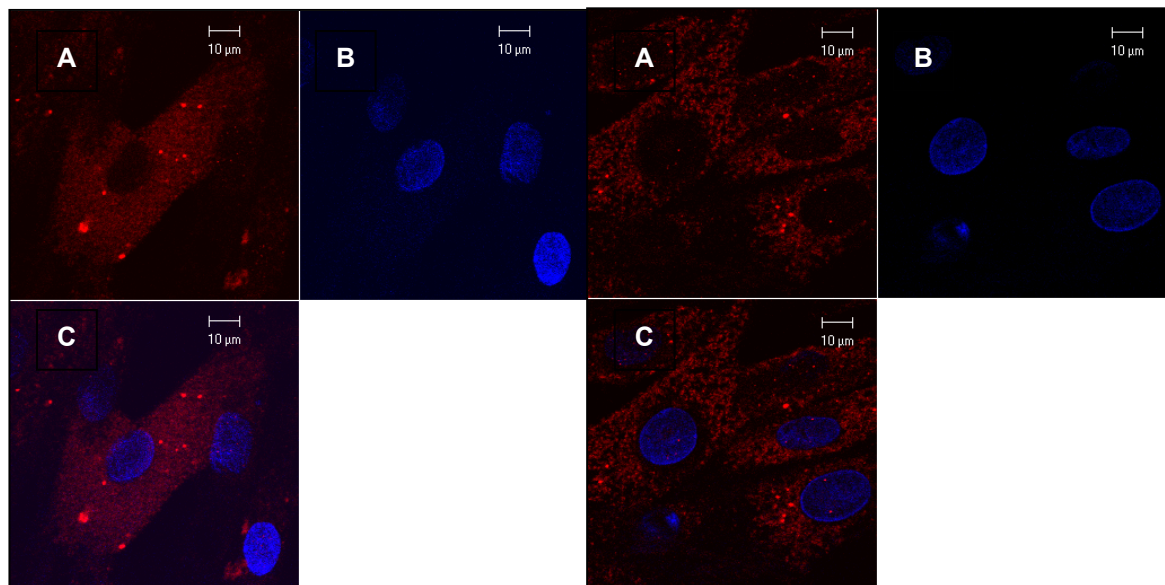


Figura 14 – Marcação do receptor de insulina das células adiposas em cultura primária. As células foram marcadas com os respectivos anticorpos fluorescentes e a imagem obtida por microscopia confocal.

A – Identificação do receptor de insulina da superfície celular pelo anticorpo anti-insulina produzido em coelho e revelado com secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho).

B - Identificação do núcleo, corado com DAPI em azul.

C - Sobreposição das imagens A e B. Núcleo (azul) e os receptores de insulina (vermelho).

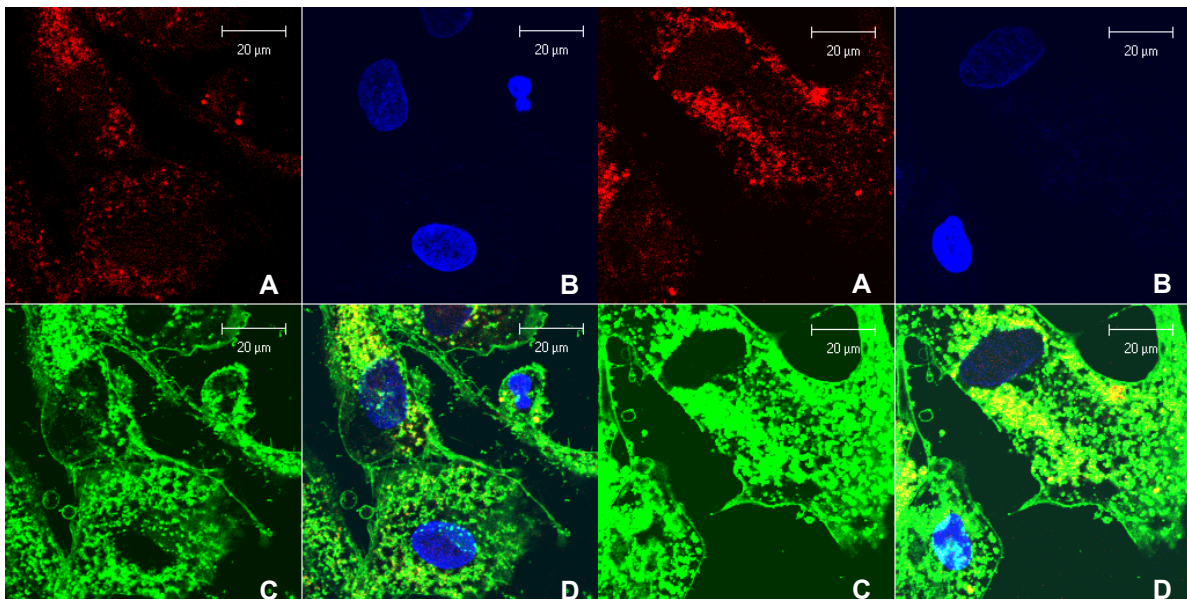


Figura15. Marcação da insulina das células adiposas em cultura primária .A imagem foi obtida por microscopia confocal

A- Marcação da insulina pelo o anticorpo policlonal anti-insulina de coelho e revelado com secundário conjugado com Alexa Fluor 594 (vermelho)..Observa-se a distribuição dos grânulos de insulina.

B- Coloração do núcleo, corado com DAPI em azul.

C- Imunomarcção para lipídio lectina de superfície celular, utilizando-se o anticorpo anti-lectina de coelho e revelado com secundário conjugado com Alexa Fluor 488 (verde).

D- Sobreposição das imagens A.B e C. Os grânulos de insulina (vermelho), núcleo (azul) e membrana (lectina) em verde.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS ADIPOSAS E VIABILIDADE CELULAR PELO IODETO DE PROPÍDEO

Para identificar as populações de pré-adipócitos e adipócitos presentes na amostra de células do tecido adiposo humano determinou-se a região de acordo com o tamanho (FSC – Forward Side Scatter) e a complexidade (SSC – Side Scatter). Antes de iniciar a leituras pelo citometro de fluxo, foi eliminado a população de eritrócitos por fycoll - hepaque, restando assim apenas a população de células mononucleadas.

Para cultura de tecido adiposo humano de 05 pacientes em triplicata foi quantificado o número de células presentes nas três regiões observados no contour plot (**Figura 16**).

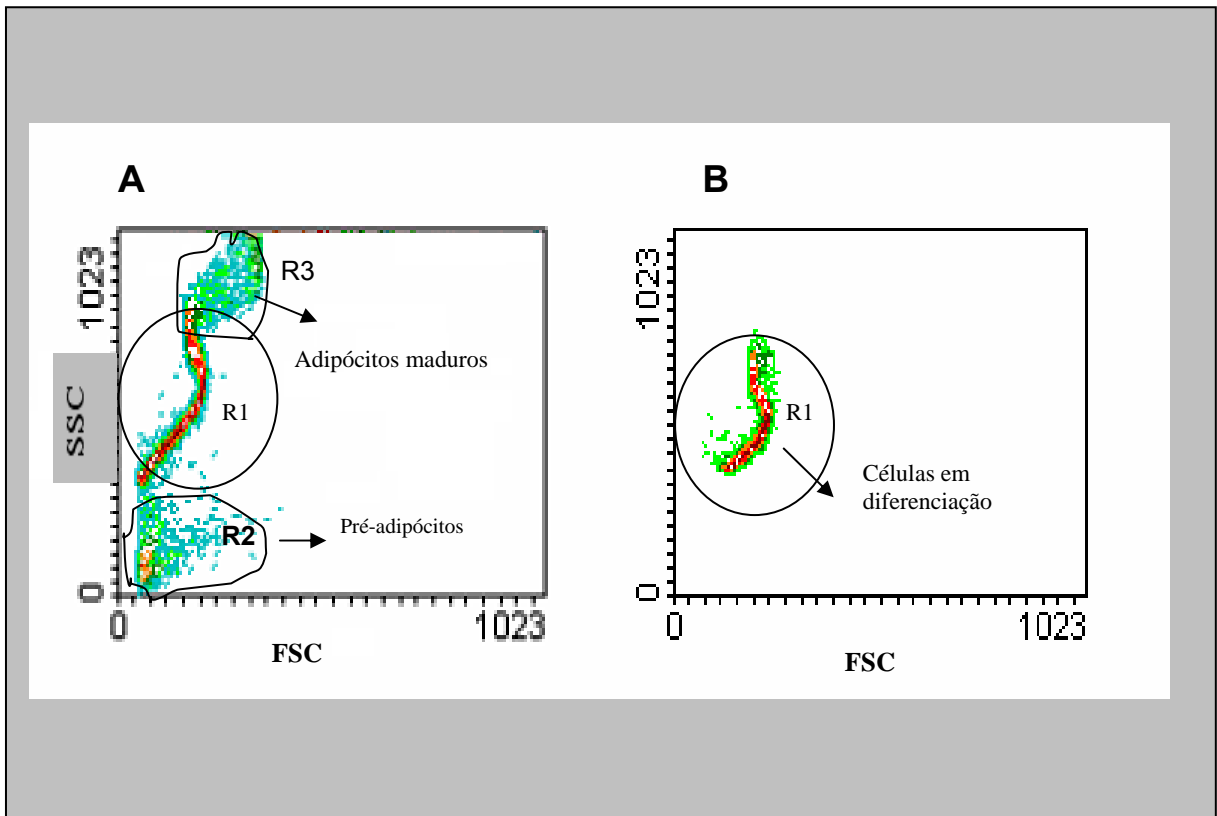


Figura 16: A) Contour Plot (FSC X SSC) característico de células humanas, delimitando a região dos adipócitos maduros (R3), células em diferenciação (R1) e pré-adipócitos (R2). B) Caracterização da região R1, observando a diferenciação celular.

Neste histograma (**Figura 17**) observamos que de 100% das células avaliadas (10.000) temos praticamente 20% das células tanto na região dos adipócitos maduros (R3) como na região das células em diferenciação (R1). A quantidade de células de pré-adipócitos da região R2 é significativamente diferente das outras regiões com cerca de 60% do total de células.

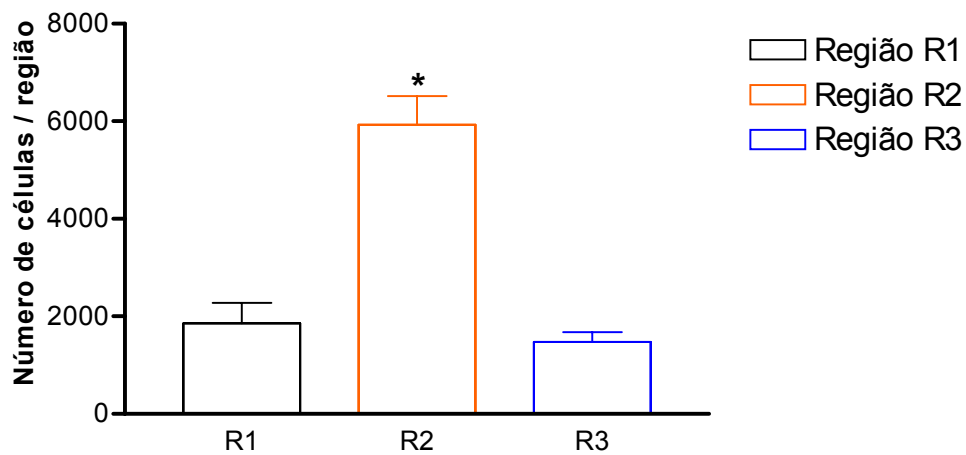


Figura 17. Número de células presentes nas três regiões do contour plot (Figura 16, FSC X SSC) em 10.000 eventos. Células em diferenciadas (R1) e pré-adipócitos (R2) e adipócitos maduros (R3). (*) - Significância estatística dada por $p < 0,05$, teste ANOVA, $N = 05$. Os dados representam valores médios \pm S.E.M. de eventos independentes.

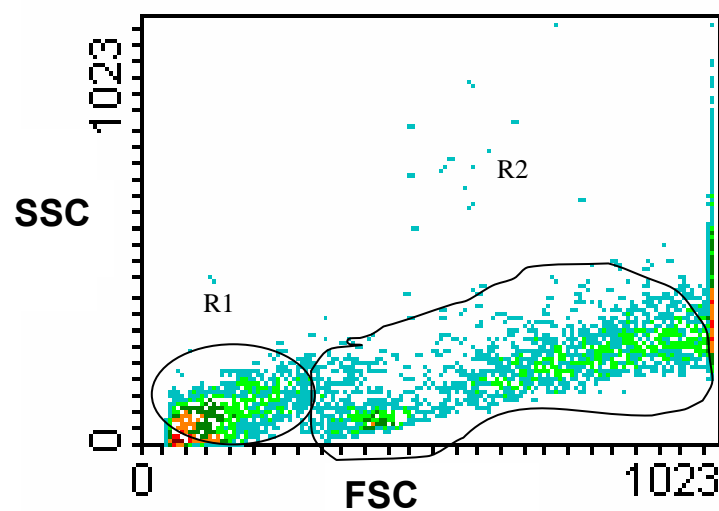


Figura 18: Contour plot (FSC X SSC) característico de células humanas. (R1) distribuição dos pré-adipócitos e (R2) adipócitos e células sanguíneas.

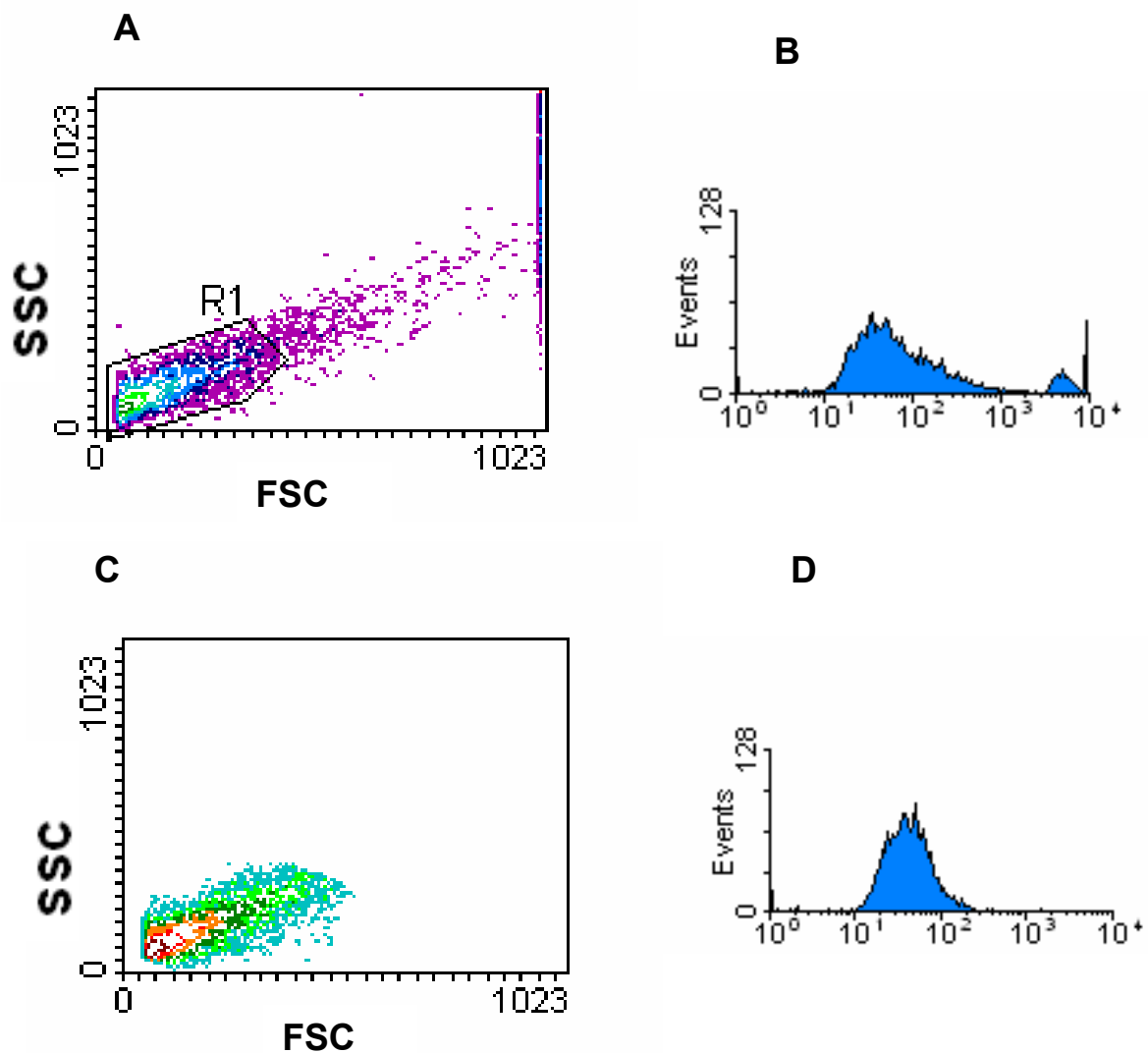


Figura 19: Contour Plot (FSC X SSC) característico de células humanas, utilizando o Ficol – Hypaque. A) Região dos pré-adipócitos (R1) e possíveis células mononucleadas. B) Histograma representativo das células marcadas com oil-red da região dos pré-adipócitos. C) Contour plot do gate R1 delimitando a região dos pré-adipócitos e D) Histograma representativo da região dos pré-adipócitos corados oil-red.

Nas condições de cultivo, até a terceira passagem, ficam somente os pré-adipócitos como observado na **Figura 20**, que não se diferenciaram pela ausência dos fatores estimulantes no meio conforme descrito na literatura por outros autores (DESLEX, NEGREL & AILHAUD, 1987; HAUNER *et al.*,1989). Pode-se observar que na região dos pré-adipócitos temos 80% das células cultivadas (**Figura 20A, B e C**). O histograma bivariado, **Figura 20D**, representa as fases do ciclo celular obtido a partir da região R1 (pré-adipócitos) identificada na **Figura 20B e C**.

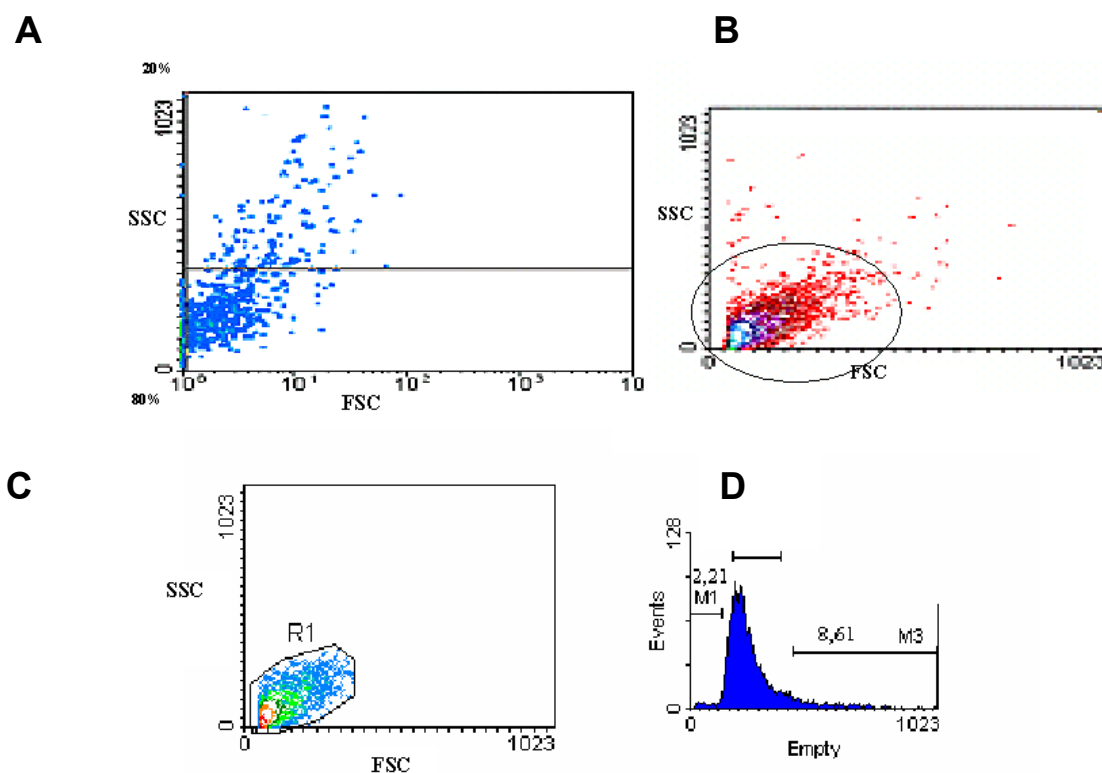


Figura 20. Avaliação do número de células em apoptose e mitose da suspensão de cultura de células na segunda passagem através do ciclo celular. (A, B e C) Contour Plot (FSC X SSC) representativos da distribuição das populações de células pré-adipócitos e adipócitos maduros: Na figura D o histograma mostra a análise para a região dos pré-adipócitos, onde M1 significa a região das células em apoptose, a M2 significa a região das células em G₀/G₁ e M3 significa a região das células em S e G₂/M. A detecção das células em apoptose foi determinada utilizando-se o programa Cell Quest.

5.6 EFEITO DA AII SOBRE OS NÍVEIS INTRACELULARES DE Ca^{2+} POR MEIO DO INDICADOR FURA-2/AM

Para estudar o perfil das variações do Ca^{2+} citosólico pela estimulação com a AII e insulina, as células foram incubadas com o Fura-2/AM, conforme descrito anteriormente e o perfil obtido é demonstrado nas Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28.

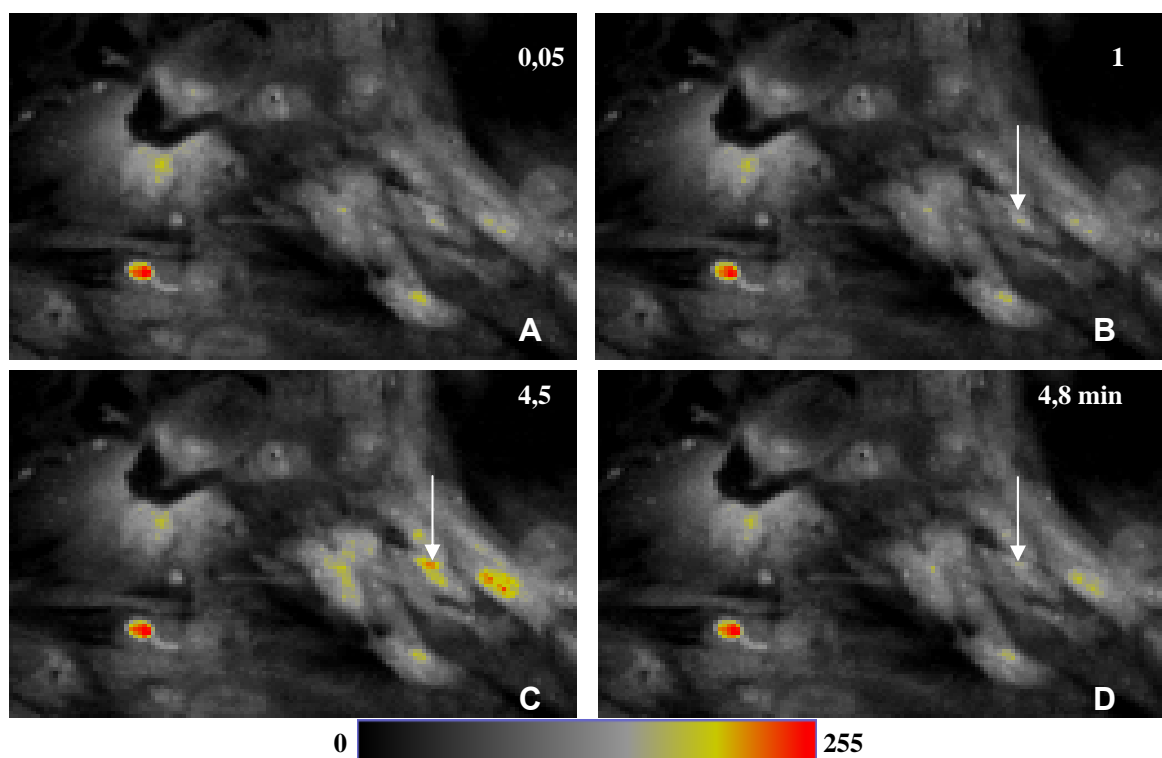


Figura 21. (A) Micrografias de alta resolução das células dos pré-adipócitos humanos cultivadas mostrando o efeito temporal da AII na célula indicada. As células foram marcadas com Fura-2/AM por 10 min. (B) Aumento do Ca^{2+} citosólico foi observado após a adição de AII. (C) A fluorescência máxima foi obtida por meio da digitonina ($125 \mu\text{M}$). (D) A fluorescência mínima obtida por meio da adição de MnCl_2 (2 mM). As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas em solução de Tyrode-BSA ($0,1\%$) a 37°C durante a visualização e a aquisição de imagens. A barra de cores (0-255) representa a intensidade de fluorescência do indicador.

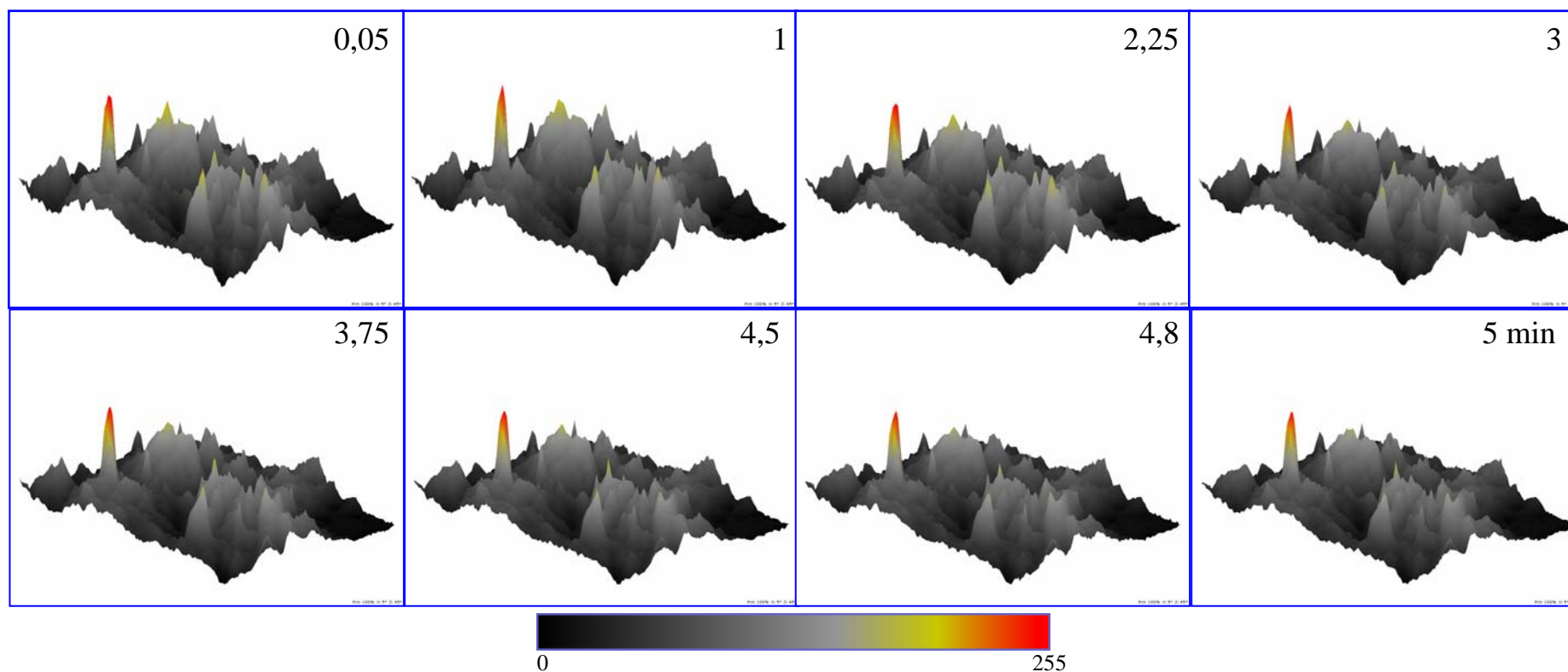


Figura 22. Gráfico em 3D do efeito temporal da All em pré-adipócitos humanos cultivados. As células foram marcadas com Fura-2/AM por 10 minutos (10 nM). (1,0 min) Aumento do Ca^{2+} citosólico foi observado após a adição de All. (4,5 min) A fluorescência máxima obtida por meio da digitonina (125 μM). (4,8 min) A fluorescência mínima obtida por meio da adição de MnCl_2 (2 mM). As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas em solução de Tyrode-BSA (0,1%) a 37°C durante a visualização e a aquisição de imagens. A barra de cores (0-255) representa a intensidade de fluorescência do indicador.

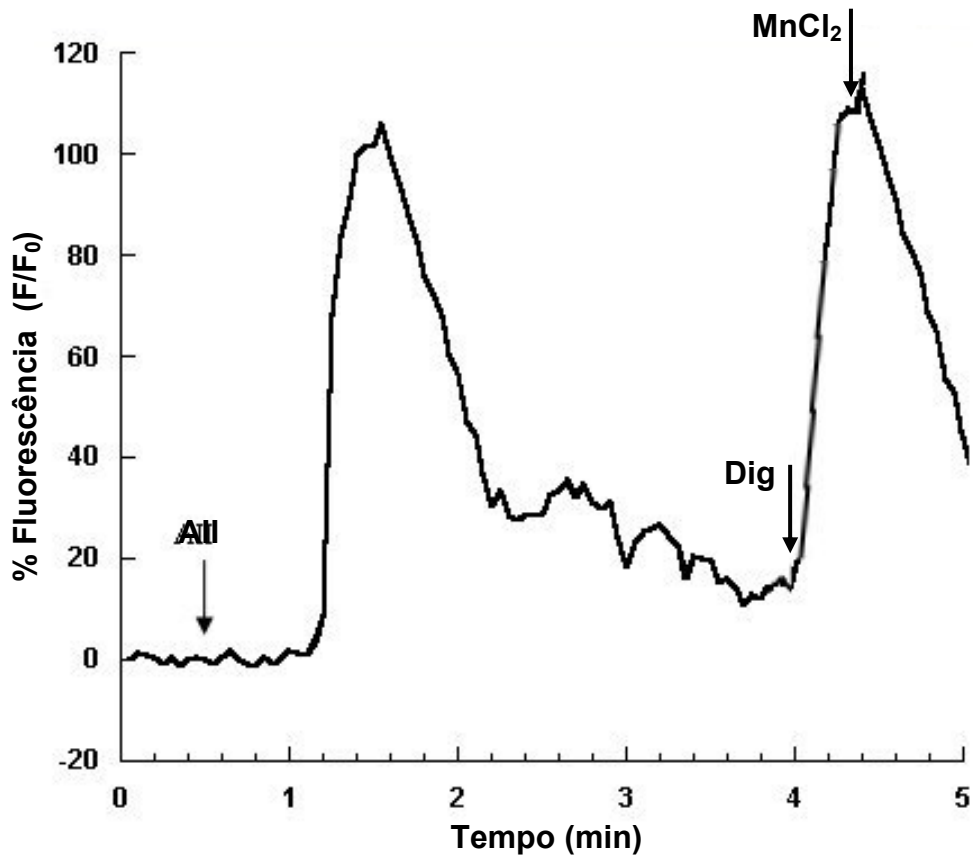


Figura 23. Efeito temporal de 10 nM AII em pré-adipócitos humanos cultivados (5 min), marcadas com Fura-2/AM para visualização de Ca^{2+} intracelular. Perfil de resposta das células quando ao Ca^{2+} intracelular por administração de AII. Fez-se a obtenção de fluorescência máxima e mínima por meio da digitonina (125 μM) e MnCl_2 (2 nM), respectivamente. As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas com Tyrode-BSA (0,1%) a 37°C durante a visualização e a aquisição de imagens.

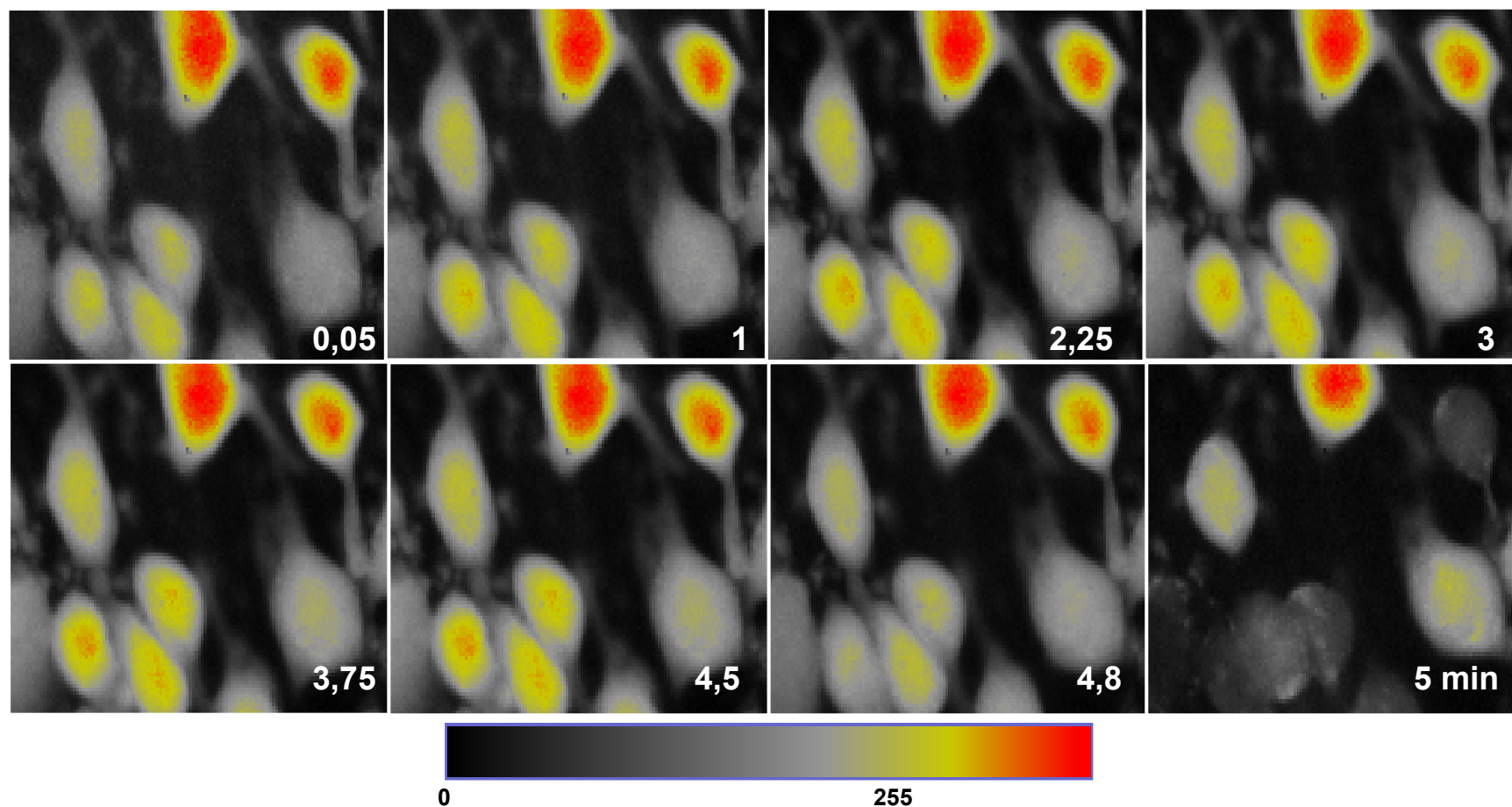


Figura 24. Micrografias de alta resolução dos pré-adipócitos humanos cultivados mostrando o efeito temporal da AII na célula indicada. As células foram marcadas com Fura-2/AM por 10 min. (1,0 min) Aumento do Ca^{2+} citosólico foi observado após a adição de AII. (4,5 min) A fluorescência máxima obtida por meio da digitonina ($125 \mu\text{M}$). (4,8 min) A fluorescência mínima obtida por meio da adição de MnCl_2 (2 mM). As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas em solução de Tyrode-BSA ($0,1\%$) a 37°C durante a visualização e a aquisição de imagens. A barra de cores (0-255) representa a intensidade de fluorescência do indicador.

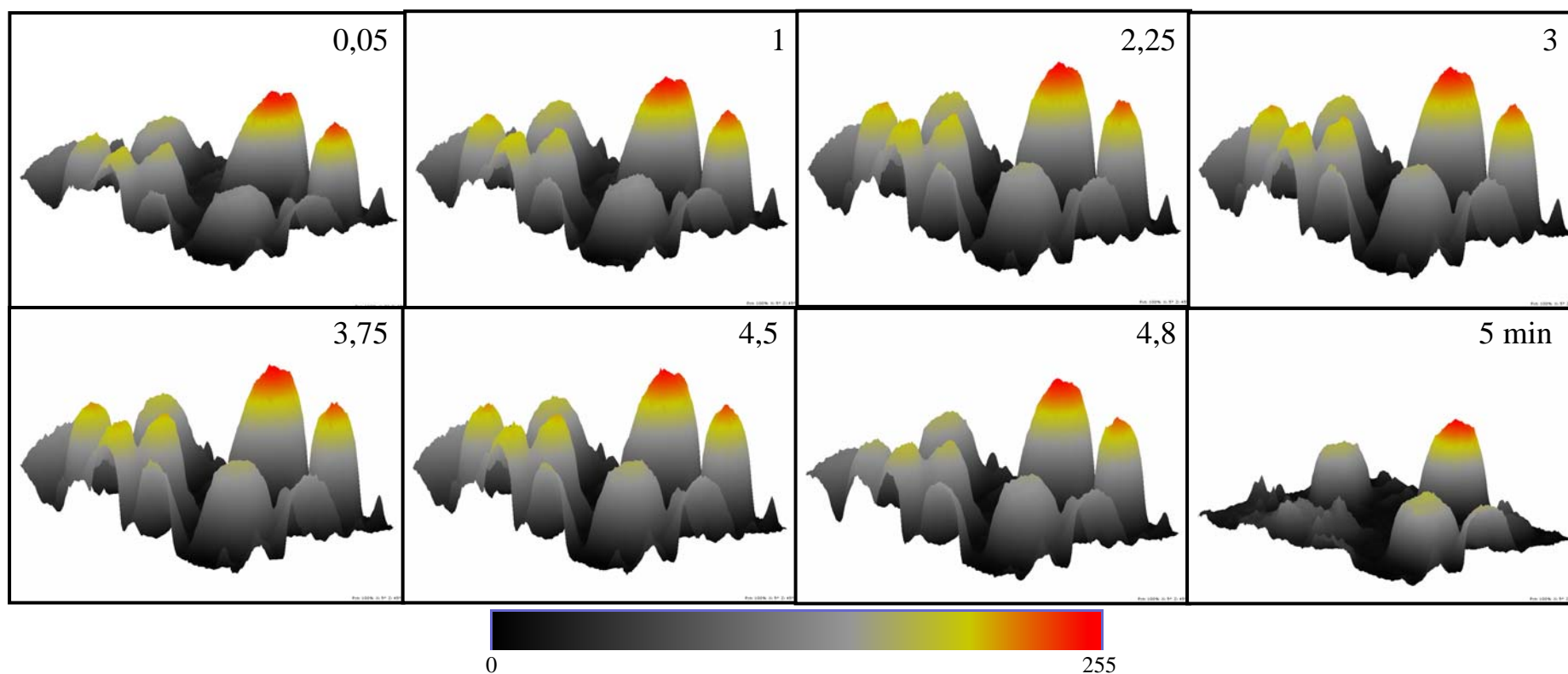


Figura 25. Gráfico em 3D do efeito temporal da All dos pré-adipócitos humanos cultivados. As células foram marcadas com Fura-2/AM por 10 minutos (10 nM). (1,0 min) Aumento do Ca^{2+} citosólico foi observado após a adição de All. (4,5 min) A fluorescência máxima obtida por meio da digitonina (125 μM). (4,8 min) A fluorescência mínima obtida por meio da adição de MnCl_2 (2 mM). As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas em solução de Tyrode-BSA (0,1%) a 37°C durante a visualização e a aquisição de imagens. A barra de cores (0-255) representa a intensidade de fluorescência do indicador.

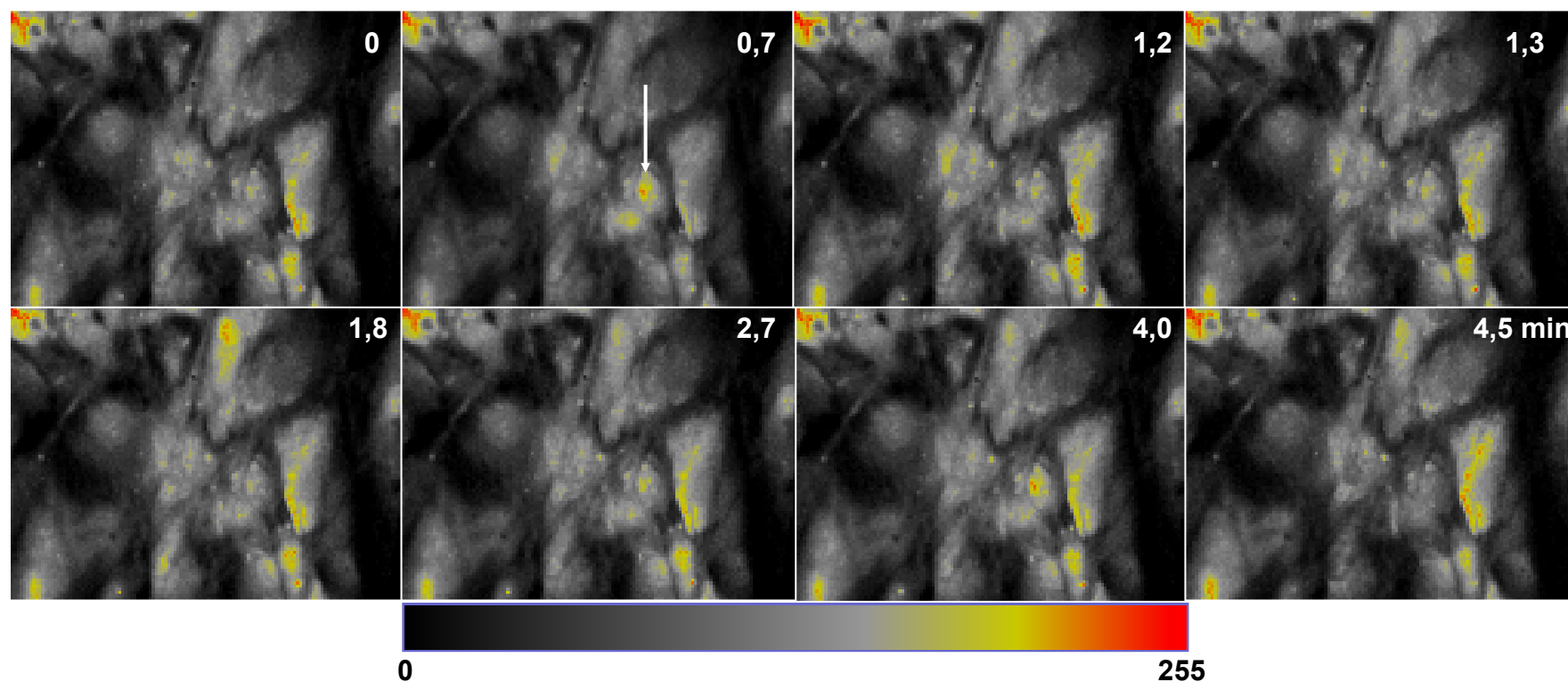


Figura 26 Micrografias de alta resolução dos pré-adipócitos humanos cultivados mostrando o efeito temporal da insulina na célula indicada. As células foram marcadas com Fura-2/AM por 10 min. (0,7 min) Aumento do Ca^{2+} citosólico foi observado após a adição de insulina. (4,0 min) A fluorescência máxima obtida por meio da digitonina ($125 \mu\text{M}$). (4,5 min) A fluorescência mínima obtida por meio da adição de MnCl_2 (2 mM). As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas em solução de Tyrode-BSA ($0,1\%$) a 37°C durante a visualização e a aquisição de imagens. A barra de cores (0-255) representa a intensidade de fluorescência do indicador.

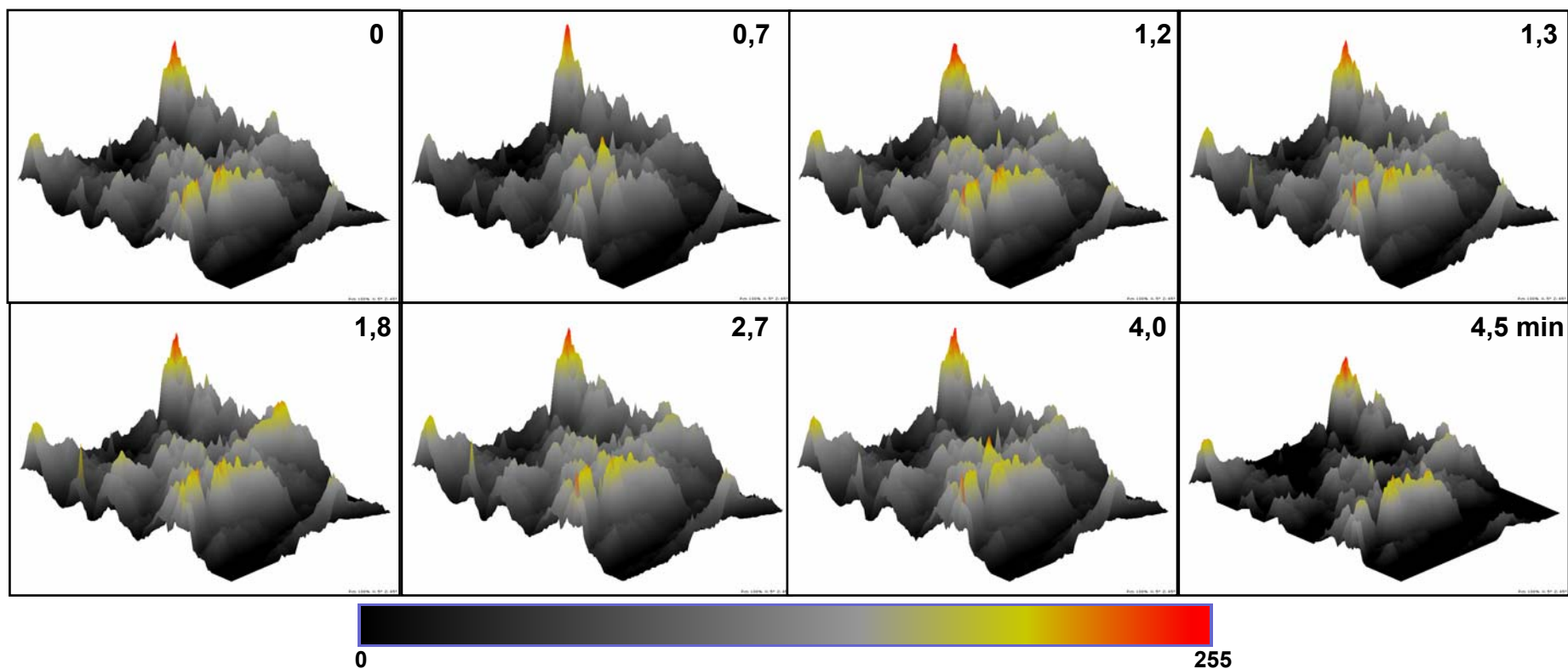


Figura 27. Gráfico em 3D do efeito temporal da insulina dos pré-adipócitos humanos cultivados. As células foram marcadas com Fura-2/AM por 10 minutos (10 nM). (0,7 min) Aumento do Ca^{2+} citosólico foi observado após a adição de insulina. (4,0 min) A fluorescência máxima obtida por meio da digitonina (125 μM). (4,5 min) A fluorescência mínima obtida por meio da adição de MnCl_2 (2 mM). As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas em solução de Tyrode-BSA (0,1%) a 37°C durante a visualização e a aquisição de imagens. A barra de cores (0-255) representa a intensidade de fluorescência do indicador.

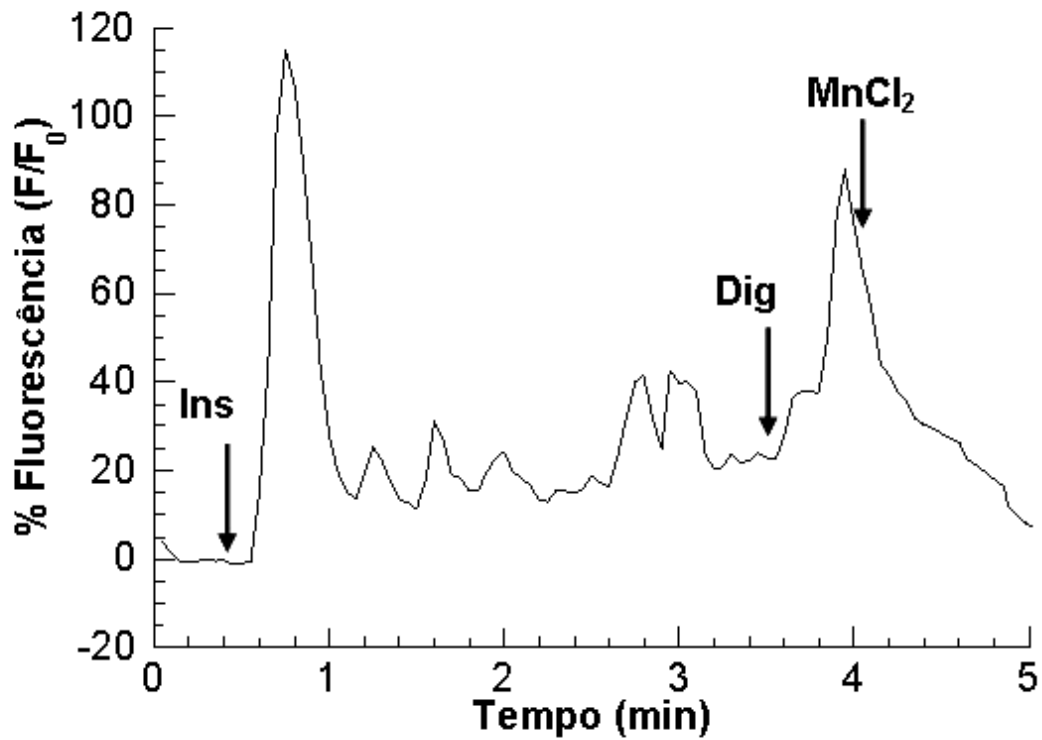


Figura 28. Efeito temporal de 10 nM insulina dos pré-adipócitos humanos cultivados (5 min), marcadas com Fura-2/AM para visualização de Ca^{2+} intracelular. Perfil de resposta das células quando ao Ca^{2+} intracelular por administração da insulina. Fez-se a obtenção de fluorescência máxima e mínima por meio da digitonina (125 μM) e MnCl_2 (2 nM), respectivamente. As lâminas circulares contendo as células foram montadas em câmaras circulares e mantidas banhadas com Tyrode-BSA (0,1%) a 37°C durante a visualização e a aquisição das imagens.

6. Discussão

6. DISCUSSÃO

O tecido adiposo é um tipo especializado de tecido conjuntivo atuando como um grande reservatório de gordura. Esse tecido é encontrado abaixo da pele modelando a superfície corporal, é um importante isolante térmico do organismo, atua como um amortecedor de choques mecânicos em certas regiões do corpo, preenchendo os espaços entre outros tecidos e mantendo certos órgãos em suas posições normais. No entanto, há evidências de que o tecido adiposo secreta fatores que desempenham papel importante na resposta imunitária, doenças vasculares e regulação do apetite (BLOOM & FAWCETT, 1994; GREGOIRE, SMAS & SUL, 1998).

O tecido adiposo expande-se rapidamente após o nascimento. No adulto, a capacidade de surgirem novos adipócitos persiste como ocorre nos casos de obesidade severa. Essa possibilidade foi verificada por vários pesquisadores, que obtiveram adipócitos maduros pela diferenciação *in vitro* de células adiposas precursoras, isoladas de tecido adiposo de rato e humano (BJORNTORP *et al.*, 1985; DESLEX *et al.*, 1987; DESLEX, NEGREL & AIHAUD, 1987).

Atualmente, há um consenso de que os adipócitos são um tipo celular específico que deriva de células mesenquimatosas indiferenciadas, com capacidade de diferenciarem-se em células mesodérmicas como condrócitos, osteoblastos, miócitos e adipócitos (GREGOIRE, SMAS & SUL, 1998).

No presente estudo, as células do tecido adiposo foram expandidas *in vitro* na presença de meio nutritivo suplementado somente com soro fetal bovino sem a adição de soro fetal humano ou indutores adipogênicos, os

quais determinariam a proliferação celular e a diferenciação celular. No entanto, a ausência desses fatores não impossibilitou a obtenção e a expansão de células adiposas cultivadas pouco diferenciadas, os pré-adipócitos. Assim, essas células têm um grande potencial para a engenharia tecidual visto que guardam as propriedades de proliferação e diferenciação celular fundamentais para a reparação tecidual ou enxertia de tecidos.

A utilização das células tronco embrionárias para fins terapêuticos como o reparo tecidual, precisa transpor a barreira ética quanto a obtenção e o armazenamento destas. Sendo assim, a obtenção de células adiposas humanas cultivadas permitiria a utilização destas em engenharia tecidual. Estas células podem ser obtidas do próprio paciente, proveniente do abundante tecido adiposo, visto que o implante autólogo evita a rejeição tecidual.

A cultura de tecidos começou a ser utilizada no início do século XIX como um método para o estudo do comportamento de células animais, livres das variações sistêmicas comuns tanto na homeostase quanto durante a situação experimental (FRESHNEY, 1995). Como o próprio nome sugere, a técnica foi primeiramente elaborada usando fragmentos de tecidos não desagregados, e o crescimento ficou restrito à migração de células a partir do mesmo. Os estudos com tecido humano foram crescentes após a demonstração que tumores humanos poderiam dar origem a linhagens celulares contínuas, como exemplo as células HeLa (GEY *et al.*, 1952), que se tornaram modelo para o desenvolvimento *in vitro* de experimentos até então impossíveis (FRESHNEY, 1995).

Em cultura, o meio físico-químico (pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂) pode ser controlado precisamente e as condições fisiológicas podem ser mantidas relativamente constantes. A única restrição é que a maioria das linhagens celulares necessita de

suplementação do meio de cultura com soro ou outros constituintes pouco definidos (FRESHNEY;1995).

Com o desenvolvimento da técnica de cultura de células, foram incorporados uma infinidade de possibilidades experimentais e conhecimentos às ciências biológicas no tangente à pesquisa médica

As células do tecido adiposo humano servem como um excelente modelo para estudar uma variedade de processos metabólicos em um sistema *in vitro*. Essas células normais são derivadas de tecido adiposo de omento ou subcutâneo sob condições específicas de cultivo. Elas diferenciarão sem replicação em células semelhantes a adipócitos maduros ou replicarão tornando-se confluentes e crescerão em subcultivos. A observação inicial de uma fração do estroma vascular do tecido adiposo omental humano contém células semelhantes a fibroblastos que eram os possíveis precursores de adipócitos, foi descrito por POZNANSKI, WAHEED & VAN (1973).

Este trabalho aponta-nos para a possibilidade de obtenção de tecido adiposo humano por meio de lipossucção, cujas células seriam expandidas *in vitro*, sem a utilização de agentes agressores, com a proposta de serem reimplantadas no paciente/doador, onde o ambiente fisiológico adequado, promoveria o reparo tecidual ou a enxertia quando estas se fizerem necessárias.

As mais conhecidas das células originárias do tecido adiposo são os adipócitos e o aumento da massa dos depósitos gordurosos durante o desenvolvimento é devido ao aumento do número e do tamanho das células adiposas. Esse aumento do número dos adipócitos é dependente da diferenciação dos adipócitos precursores ou pré-adipócitos. Estes estão presentes no próprio tecido e podem ser isolados a partir da retirada de

tecido adiposo de muitas espécies, cuja diferenciação pode ser conduzida *in vitro* (Figura 8).

A dissociação das células do tecido adiposo foi realizada por meio de digestão enzimática pela colagenase. As células separaram-se em fases devido à diferença de densidade entre os adipócitos e os outros tipos celulares (Figura 2A e B). Os adipócitos, contendo gotículas de lipídios (Figura 9), possuem densidade menor que a solução enzimática e migram para a superfície ao contrário dos outros tipos celulares que formam um precipitado com pré-adipócitos, células endoteliais, macrófagos e fibroblastos. Esta última fração de células é de estroma vascular com células que apresentam aspecto de fibroblastos e dentre elas, os pré-adipócitos, que acumulam progressivamente lipídios e adquirem as características de adipócitos maduros. A geração de novos adipócitos depende do equilíbrio energético do organismo. No homem, na obesidade severa, observa-se uma hipertrofia determinada pelo aumento do número de adipócitos (CASTEILLA *et al.*, 2004).

Neste estudo fez-se o cultivo dos adipócitos humanos até a terceira passagem. Nesta fase de subcultivo as células apresentaram características morfológicas semelhantes a fibroblastos sendo a avaliação morfológica realizada por microscopia óptica.

O aspecto morfológico dessas células assemelhou-se a fibroblastos e identificou-se a presença de inúmeras gotas lipídicas no citoplasma devido a conversão gordurosa dessas células como descrito por DESLEX *et al.* (1987). As gotículas foram visualizadas por meio do corante Oil red sob microscopia confocal, dando evidências iniciais que a maioria dessas células estão pouco diferenciadas, os pré-adipócitos humanos (Figura 9), como descrito por HAUNER *et al.* (1989). Embora, as células adiposas cultivadas não se diferenciaram, por ausência de fatores de diferenciação, elas formaram “clusters”, um agrupamento característico de células como

observado no tecido originário (Figura 10), onde observou-se os núcleos das células e o entrelaçamento de filamentos de actina entre as células contíguas concordando com DESLEX *et al.* (1987).

Atualmente não existe nenhum marcador antigênico específico para os pré-adipócitos, fato que impossibilitou a identificação dessas células por meio de anticorpos específicos. A definição exata do pré-adipócito é funcional, sendo uma célula capaz de diferenciar-se em adipócito (DESLEX, NEGREL & AILHAUD, 1987). Como no presente estudo a indução da diferenciação celular não era uma meta a ser alcançada, buscaram-se alternativas metodológicas que permitisse a caracterização das células adiposas cultivadas de acordo com os aspectos morfológicos e farmacológicos.

Quando inicia-se a diferenciação, o número de vesículas de superfície lisa aumenta, enquanto que a quantidade de retículo endoplasmático rugoso diminui. As pequenas inclusões lipídicas começam a aparecer em um dos pólos citoplasmáticos, assim como vesículas de pinocitose e uma fina lâmina glicoprotéica externa.

Seguindo o desenvolvimento, as células assumem forma oval, sendo a principal característica nesta fase a extensa concentração de vesículas de superfície lisa e pequenas gotículas lipídicas, geralmente em torno do núcleo. Na periferia das gotículas lipídicas surgem partículas de glicogênio, assim como tornam-se mais aparentes a lâmina basal e vesículas de pinocitose. Em contato íntimo com as células estão fibrilas colágenas, sendo estas designadas de lipoblastos de estágio intermediário (BLOOM, FAWCETT, 1994; HOSS, REITH & ROMRELL, 1993; JEOR, 1993)

No último estágio de diferenciação, as células aumentam de tamanho e tornam-se mais esféricas. Ocupando a porção central do citoplasma, estão grandes vacúolos lipídicos formados pela coalescência de gotículas

menores. É grande o número de vesículas de superfície lisa de vários tamanhos, enquanto que o retículo endoplasmático rugoso torna-se menos proeminente e o Golgi diminui.

Dessa forma, foi de interesse fazer a caracterização fenotípica das células adiposas cultivadas pela identificação e morfologia de organelas e componentes celulares como o núcleo, as mitocôndrias, o retículo endoplasmático e citoesqueleto.

Para caracterizar os componentes celulares do citoesqueleto e a presença dos receptores de insulina e All e insulina intracelular fez-se a citoquímica e a imunofluorescência como observado nas Figura 10 (mitocôndrias e citoesqueleto), Figura 11 (retículo endoplasmático) e a presença dos receptores de insulina (Figura 14) e All (Figura 12 e 13), insulina intracelular (Figura 15).

Foi observada a presença de várias gotículas de lipídios dispersas no citoplasma, bem como, numerosas mitocôndrias (Figura 10), retículo endoplasmático proeminente (Figura 11) com citoesqueleto preservado. As células apresentaram morfologia alongada semelhante a fibroblastos.

Estes resultados permitiram evidenciar uma cultura de pré-adipócitos e a citometria de fluxo foi uma ferramenta para avaliação quantitativa que permitiu a análise das populações celulares pelo tamanho celular e complexidade do DNA das células recém dispersas do tecido adiposo e àquelas cultivadas.

Para identificar as populações de pré-adipócitos e adipócitos presentes na amostra de células do tecido adiposo humano determinou-se à região de acordo com o tamanho (FSC) e complexidade (SSC). Inicialmente foi eliminado a população de eritrócitos por fycoll-hepaque, antes de iniciar as leituras pelo citômetro de fluxo. Restou-se assim, uma

população de células mononucleadas. Para a eliminação das populações de células mononucleadas eram necessários marcadores específicos para ser obtida uma população pura de adipócitos e pré-adipócitos. Por isso, inicialmente foi caracterizado as populações de interesse determinando uma região de acordo com tamanho e complexidade de cada população celular utilizando o marcador fluorescente de gotículas de lipídios o Oil red O, baseado na configuração descrita por CRANDALL *et al.*, 1999., como observado na Figura 19. No estudo as células recém-dispersas do tecido adiposo, que não foram submetidas ao cultivo, apresentaram-se três distintas populações celulares: pré adipócitos, células diferenciadas e adipócitos maduros de acordo com os parâmetros dados por tamanho (FSC) e complexidade (SSC). A viabilidade celular destas células foi superior a 90% utilizando-se o marcador iodeto de propídeo por citometria de fluxo.

A amostra de células recém-dispersas do tecido adiposo humano, foi proveniente de 05 pacientes. Os experimentos de cada linhagem foram repetidos três vezes. A análise quantitativa (Figura 17) da amostra de células presentes nas três regiões definidas no “contour plot” (Figura 16) mostra que em 100% das células analisadas (10.000 eventos) aproximadamente 20% tanto das células na região que corresponde aos adipócitos maduros (R3) como também de células diferenciadas da região R1. Em contraste, a quantidade de pré-adipócitos (R2) são significativamente diferentes das outras regiões com cerca de 60% do total de células avaliadas.

A separação dos tipos celulares, por fycoll-hepaque, feita utilizando uma amostra de células obtidas da dispersão do tecido adiposo de 5 pacientes foi obtida a partir de 50% de cada um das fases, superior e inferior do sobrenadante, onde os tipos celulares foram separados por

gradiente de centrifugação seguindo a metodologia descrita por BOYUM, 1968.

Foram formados dois anéis de células provenientes do tecido adiposo. No anel intermediário estavam os pré-adipócitos, adipócitos e células sangüíneas presentes na amostra e o anel inferior foi desprezado pois apresentava células eritróides. Como mostra no gráfico de dispersão obtido na análise por citometria de fluxo podemos observar na Figuras 18 e 19, Contour plot (FSC X SSC) característico de células humanas. A distribuição dos pré-adipócitos, adipócitos e células sangüíneas, pela região que indica o tamanho e complexidade deste tipo celular.

Os resultados morfológicos preliminares demonstraram a importância e a necessidade de marcadores específicos para identificação e isolamento dos pré-adipócitos para que não haja outras populações celulares que possam interferir na análise. Nas condições de cultivo até a terceira passagem ficaram somente os pré-adipócitos (Figura 20), que não se diferenciaram pela ausência dos fatores estimulantes no meio, conforme descrito por DESLEX, NEGREL & AILHAUD (1987), HAUNER *et al.* (1989). As células cultivadas do tecido adiposo após a terceira passagem envelheceram e morreram por necrose ou apoptose.

DESLEX, NEGREL & AILHAUD (1987) mostraram que células do estroma vascular de ratos obesos de quatro semanas de idade quando cultivados em meio contendo insulina ou fator de crescimento semelhante a insulina, IGF-I, triiodotironina e transferrina sofreram conversão para célula adiposa. Cerca de 90% das células acumularam gotículas de lipídio e isso foi proporcional à redução da suplementação do soro no meio de cultura. A conversão foi avaliada pelo desenvolvimento de lipoproteína lipase e atividade da GPDH, incorporação de glicose marcada com ^{14}C . Resultados semelhantes com células do estroma vascular de tecido adiposo foram obtidos de diferentes regiões de rato. Este resultado sugere que em meio

apropriado livre de soro ocorre diferenciação celular de precursores de adipócitos diplóide e abre a possibilidade da caracterização de ativadores ou inibidores do processo de conversão adiposa.

Neste estudo, mostrou-se a presença do receptor da All e insulina, AT₁ (Figura 12 e 13) e IR (Figura 14), respectivamente. O receptor AT₁ nos pré-adipócitos cultivados apresentou-se expresso na membrana celular (Figura 13 A) confirmado pela co-localização com a lectina (Figura 13 D)

O excesso de peso parece contribuir para o aumento da pressão arterial, em grande proporção de pacientes com hipertensão essencial e pode também ser o responsável do aumento da pressão arterial que ocorre com o envelhecimento nos países industrializados (OIGMAN, 2000).

Em geral, a obesidade está associada à hiperinsulinemia de jejum como também a uma resposta insulínica exagerada à sobrecarga de glicose. Esta situação caracteriza-se como uma síndrome complexa denominada resistência à insulina (OIGMAN, 2000).

Modelos patogênicos têm sido propostos para explicar a associação entre a adiposidade e o sistema renina angiotensina. Este parece estar relacionado ao acúmulo de gordura no tecido adiposo, bem como ao seu envolvimento no processo inflamatório e aterogênico.

Em adição à via clássica do sistema de All, o SRA tem sido identificado em vários órgãos implicando, assim, que vários tecidos possam apresentar a capacidade de sintetizar All independente do sistema circulante.

O angiotensinogênio está intensamente expresso no tecido adiposo humano com outros marcadores de função do adipócito. A produção local de All pode participar no controle local do crescimento do tecido e no seu

desenvolvimento. Sua elevada concentração em indivíduos obesos pode ser mais um elo entre a obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares (HERMSDORFF & MONTEIRO, 2004).

No presente estudo foi de interesse investigar o efeito da All e insulina em pré-adipócitos humanos cultivados. Assim, fez-se a análise do efeito prolongado da All e insulina nos pré-adipócitos cultivados por medidas dos níveis intracelulares de cálcio e imagens obtidas por microscopia de fluorescência de alta resolução, que permitiu a verificação dos fenômenos e obtenção das imagens em tempo real. A administração exógena desses hormônios nas células permitiu mimetizar as condições fisiológicas onde a All, sendo sintetizada no tecido adiposo promove de maneira autócrina a diferenciação celular, a adipogênese entre outras respostas autócrinas e/ou parácrinas.

O tratamento prolongado com insulina em pré-adipócitos cultivados promoveu oscilações nos níveis intracelulares de cálcio durante o tempo estudado (Figura 28) ou seja, cinco minutos, e esse efeito oscilatório (Figura 26 e 27) nos níveis intracelulares de Ca^{2+} pode ser importante para a captação de glicose induzida pela insulina, que requer aumento nos níveis intracelulares de cálcio para a apresentação à membrana plasmática dos transportadores de glicose, os GLUT-4. Além disso, espera-se da insulina no tecido adiposo e em especial nos pré-adipócitos a diferenciação, proliferação e a atividade secretória entre outras (NAGAMATSU *et al.*, 2001; NAKAMICHI *et al.*, 2002).

A análise das imagens obtidas e dos níveis intracelulares de Ca^{2+} marcados com o indicador fluorescente, mostrou que a estimulação do receptor AT_1 (Figura 21 e 22) e do receptor de insulina (IR) (Figura 26 e 27), ambos presentes nos pré-adipócitos humanos cultivados (Figura 12, 13, 14 e 15), podem responder a esses hormônios e promover aumento nos níveis de cálcio intracelular. A exposição das células adiposas cultivadas a

esses peptídios por tempo prolongado promoveu o aumento da $[Ca^{2+}]_i$, seguido de diminuição da resposta celular que se aproximou dos níveis basais de Ca^{2+} . Observou-se então o fenômeno de dessensibilização à AII caracterizado pela perda ou diminuição da resposta celular ao estímulo prolongado. Este é um mecanismo regulatório presente em muitos tecidos que permite a proteção tecidual de estímulos prolongados, como o muscular liso (SHIMUTA *et al.* 1990).

Esta é a primeira evidência de dessensibilização a AII (Figura 23) em células do tecido adiposo, em especial nos pré-adipócitos humanos cultivados. Ainda, verificou-se a propagação da sinalização celular induzida pela AII (Figuras 21 e 24) e insulina (Figura 26) por meio de ondas de cálcio propagadas em sincronismo para as células adjacentes (Figuras 25 e 27). Esse fenômeno pode ser atribuído ao papel das junções intercelulares (gap junctions) que estão presentes na maioria das células e tecidos. As células acopladas por junções comunicantes podem transferir moléculas, os segundos mensageiros como o Ca^{2+} ou IP_3 proveniente da célula estimulada para as células adiposas. As células acopladas podem influenciar a amplitude e duração da resposta ao estímulo levando as cascatas de eventos celulares, como a proliferação celular. Assim o estímulo pode ter sido propagado pela difusão entre células adjacentes de Ca^{2+} ou de IP_3 por meio das junções comunicantes do tipo gap. Esse fato permitiu as células cultivadas do tecido adiposo o acoplamento elétrico, fenômeno importante para a propagação da resposta local e sincronismo no tecido adiposo, cujos resultados (Figuras 24 e 26).) mostra a propagação do Ca^{2+} entre células adjacentes o que denota a presença de junções comunicantes do tipo gap (SCHILLER *et al.*, 2001)

6.1 PERSPECTIVAS

A correção de defeitos de tecido mole por enxerto de gordura autólogo é um procedimento de rotina em cirurgia plástica. Sua eficiência e segurança têm sido muito discutidas e muitas técnicas de lipoinjeção têm sido desenvolvidas. Entretanto, muitas vezes o procedimento precisa ser repetido devido à reabsorção do transplante. As razões são que muitas das células transplantadas já estão diferenciadas, e que não há suporte nutricional para a camada de células próprias quando estas são transplantadas em fragmentos. Pelo cultivo de adipócitos autólogos pode-se ter somente células não diferenciadas, então os pré-adipócitos podem ser transplantados e o procedimento pode ser feito de maneira que otimize o suporte nutricional das células. HUSS & KRATZ (2002) compararam a técnica de cultura de células com dois modelos clínicos de processamento de material de liposucção e mostraram que os pré-adipócitos sobrevivem e apresentam maior potencial proliferativo em cultura de células.

A utilização atual do tecido adiposo e as recentes evoluções da técnica de COLEMAN, vem progressivamente permitir que o enxerto de tecidos ceda lugar ao enxerto de células o que permite uma reconstrução tecidual próxima do ideal da área lesada.

O enxerto de fragmentos autólogos de tecido adiposo é muito eficiente. O domínio das condições de cultura das células do tecido adiposo e da diferenciação destas em adipócitos permite considerar a multiplicação *in vitro* das células progenitoras e a sobrevivência delas por vários dias. Esta possibilidade de expansão abre então a esperança de que a partir de pequenas retiradas, seja possível desenvolver o material suficiente para o enxerto. Caso contrário, a congelação das células do tecido adiposo,

prática de rotina dentro dos laboratórios de pesquisa, torna possível pôr este tipo de procedimento em destaque para o uso clínico futuro.

A criação de banco de células congeladas abre então possibilidades de utilização das células do tecido adiposo para o enxerto do tipo heterólogo. Evidentemente, este tipo de aplicação requer uma rígida avaliação, mas fará parte do arsenal cirúrgico. Apesar da existência de tais bancos de células, isto não é parte da realidade clínica atual.

O tecido adiposo revela características notáveis que vai da capacidade energética, pluripotência, função endócrina/secretora e imunológica. A pesquisa com tecido adiposo é portadora de esperanças em terapia celular. Esta aponta para esclarecer as capacidades e os mecanismos de desenvolvimento do tecido adiposo. Estes conhecimentos devem abrir novas perspectivas para sua utilização terapêutica e o controle de seu desenvolvimento.

Graças aos dados científicos quanto as suas potencialidades e devido a grande quantidade de tecido adiposo no adulto, esta deixa de ser um investimento de risco e passa a ser portadora de título de nobreza.

7. Conclusões

7. CONCLUSÕES

Determinou-se a caracterização morfológica da cultura primária de adipócitos humanos como pré-adipócitos por: apresentarem morfologia semelhante a fibroblastos e inúmeras gotículas de lipídios, evidenciado a presença dos receptores de angiotensina II (AT₁) e insulina (RI) por imunofluorescência. As células presentes na amostra do tecido adiposo apresentaram tamanho e complexidade de pré-adipócitos.

Nos pré-adipócitos humanos cultivados verificou-se o aumento dos níveis intracelulares de Ca²⁺ que foi transiente para o estímulo com angiotensina II e oscilatório para a insulina.

8. Referências

8. REFERÊNCIAS

Amann S, Reinke C, Valet G, Moser U, Leuenberger H. Flow-cytometric investigation of cellular metabolism during oxidative stress and the effect of tocopherol. *Int J Vitam Nutr Res.* 1999; 69(5): 356-61

Anderson KM, Peach MJ. Receptor binding and internalization of a unique biologically active angiotensin II-coloidal gold conjugate. Morphological analysis of angiotensin II processing in isolated vascular strips. *J Vasc Res.* 1994; 31: 10-7.

Bjorntorp P, Paust IM, Miller WH Jr, Karlsson M, Swpniewska G, Dahlgren K. Dietary and species influence on potential of plasma to stimulate differentiation and lipid accumulation in cultured adipocyte precursors. *J Lipid Res.* 1985; 26(12): 1444-54

Bkaily G, Gros-Louis N, Naik R, Jaalouk D, Pothier P. Implication of the nucleus in excitation contraction coupling of heart cells. *Mol cell Biochem.* 1996; 154: 113-21.

Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1968; 97: 7.

Cassis LA, English VL, Bharadwaj K, Boustany CM. Differential effects of local versus systemic angiotensin II in the regulation of leptin release from adipocytes. *Endocrinology.* 2004; 145(1): 169-74.

Casteilla L, Charrière G, Laharrague P, Cousin B, Planat-Benard V, Péricaud L, Chavoïn JP. Tissus adipeux, chirurgie plastique et reconstricte lê retour aux sources. *Ann Chir Plast Esthet.* 2004, 49:409-18.

Cobbold PH, Rink TJ. Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J.* 1987 Dec 1; 248(2): 313-28.

Crandall DI, Armellino DC, Busler DE, Mchendry-Rinde B, Kral JG. Angiotensin II Receptors in Human Preadipocytes: Role in Cell Cycle Regulation. *Endocrinology.* 1999; 140(1): 154-8.

Crandall DL, Groeling TM, Busler DE, Antrilli TM. Release of PAI-1 by human preadipocytes and adipocytes independent of insulin and IGF-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279: 984-8.

Deslex S, Negrel R, Ailhaud G. Development of a chemically defined serum-free medium for differentiation of rat adipose precursor cells. *Exp Cell Res.* 1987 Jan; 168(1): 15-30.

Deslex S, Negrel R, Vannier C, Etienne J, Ailhaud G. Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes.* 1987; 11(1): 19-27.

Di Virgilio F, Steinberg TH, Swanson JA, Silvestein SC. Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. *J Immunol.* 1988; 140: 915-20.

Dietze D, Koenen M, Böhrig K, Horikoshi H, Hauner H, Eckel J. Impairment of insulin signaling in human skeletal muscle cells by co-culture with human adipocytes. *Diabetes.* 2002; 51: 2369-76.

Engeli S, Schlinhg P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiéra F, Sharma AM. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *Int J Biochem Cell Biol.* 2003; 35: 807-25.

Gey G, Coffman WD, Kubicek MT. Tissue culture studies of the proliferate capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* 1952, 12:364-5.

Golovina VA, Blaustein MP. Spatially and functionally distinct Ca^{2+} stores in sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. *Science.* 1997 Mar 14; 275(5306): 1643-8.

González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. Pancreastatin modulates insulin signaling in rat adipocytes. *Diabetes.* 2000; 49: 1288-94.

Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation. *Physiol Rev.* 1998; 78(3): 783-809.

Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine Cell. *Exp Biol Med.* 2001; 226(11): 997-1002.

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985 Mar 25; 260(6): 3440-50.

Harte AL, McTernan, PG, McTernan CL, Crocker J, Starcynski J, Barnett AH, Matyka K, Kumar S. Insulin increases angiotensinogen expression in human abdominal subcutaneous adipocytes. *Diabetes Obes Metab.* 2003; 5::462-7.

Hauer H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, Pfeiffer F. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *J Clin Invest.* 1989; 84: 1663-70.

Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev.* 2001; 2: 239-54.

Hermsdorff HHM, Monteiro JBR. Gordura visceral, subcutânea ou intramuscular: onde está o problema? Arq Bras Endocrinol Metab. 2004; 48(6): 803-11.

Huss FR, Kratz G. Adipose tissue processed for lipoinjection shows increased cellular survival *in vitro* when tissue engineering principles are applied. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 2002; 35(3): 166-71.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Luft FC, Sharma AM. Mature adipocytes inhibit *in vitro* differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. Diabetes. 2002; 51: 1699-1707.

Jeor ST. The role of weight management in the health of women. J Am Diet Assoc. 1993; 98: 1007-12.

Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. J Clin Endocrinol Metab. 2004; 89: 2548-56.

Kim S, Whelan J, Claycombe K, Reath DB, Moustaid-Moussa N. Angiotensin II increases leptin secretion by 3T3-L1 and human adipocytes via a prostaglandin-independent mechanism. J Nutr. 2002; 132: 1135-40.

Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. Diabetes. 1998, 47: 859-66.

Lefkowitz RJ, Stadel JM, Caron MG. Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. Annu Rev Biochem. 1983; 52: 159-86.

Miasiro N, Oshiro ME, Paiva TB, Paiva AC. Role of the two N-terminal residues of angiotensin II in the production of tachyphylaxis. Eur J Pharmacol. 1983 Mar 4; 87(4): 397-406.

Nagamatsu S, Nakamichi Y, Ohara-Imaizumi M, Ozawa S, Katahira H, Watanabe T, Ishida H. Adenovirus-mediated preproinsulin gene transfer into adipose tissues ameliorates hyperglycemia in obese diabetic KKA^y mice. *FEBS Letters*. 2001, 509:106-10.

Nakamichi Y, Ohara-Imaizumi M, Ishida H, Nagamatsu S. An insulin-related peptide expressed in 3T3L1 adipocytes is localized in GLUT4 vesicles and secreted in response to exogenous insulin, which augments the insulin-stimulated glucose uptake. *J Cell Sci*. 2002; 116, 73-9.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991; 139(2): 271-9.

O'Connor KC, Song H, Rosenzweig N, Jansen DA. Extracellular matrix substrata after adipocyte yield and lipogenesis in primary cultures of stromal-vascular cells from human adipose. *Biotechnol Lett*. 2003; 25: 1967-72.

Oigman W. O papel do sistema renina-angiotensina-aldosterona no desenvolvimento da hipertensão arterial associada à obesidade. *Rev Bras Hipertens*. 2000; 2:142-8.

Pettersson P, Van R, Karlsson M, Bjorntorp P. Adipocyte precursor cells in obese and nonobese humans. *Metabolism*. 1985 Sep; 34(9): 808-12.

Poenie M, Alderton J, Steinhardt R, Tsien R. Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science*. 1986 Aug 22; 233(4766): 886-9.

Poliard A, Nifuji A, Lamblin D, Plee E, Forest C, Kellermann O. Controlled conversion of an immortalized mesodermal progenitor cell towards osteogenic, chondrogenic, or adipogenic pathways. *J Cell Biol.* 1995 Sep; 130(6): 1461-72.

Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest.* 1973; 29(5): 570-6

Rosen OM. After insulin binds. *Science.* 1987; 237(4821): 1452-8.

Schiller PC, D'Ippolito G, Brambilla R, Roos BA, Howard GA. Inhibition of gap-junctional communication induces the trans-differentiation of osteoblasts to an adipocytic phenotype *in vitro*. *J Biol Chem.* 2001; 276:14133-8.

Shimuta SI, Kanashiro CA, Oshiro MEM, Paiva TB, Paiva ACM. Angiotensin II desensitization and Ca^{2+} and Na^{+} fluxes in cultured intestinal smooth muscle cells. *J. Pharmacol Exper Therap.* 1990,253: 1215-21.

Wechselberger G, Russel RC, Neumeister MW, Schoeller T, Piza-Katzer H, Rainer C. Successful transplantation of three tissue engineered cell types using capsule induction technique and fibrin glue as a delivery vehicle. *Plast Reconstr Surg.* 2002; 110: 123-9.

Williams DA, Fay FS. Intracellular calibration of the fluorescent calcium indicator Fura-2. *Cell Calcium.* 1990 Feb-Mar; 11(2-3): 75-83.

Normas Adotadas

NORMAS ADOTADAS

ICMJE – International Committee of Medical Journals Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journal. [Http://www.icmje.org](http://www.icmje.org)

Consulta ao DeCS – Descritores em Ciências da Saúde. www.bireme.br – terminologia em saúde.

Orientação normativa para elaboração e apresentação de teses. Programa de Pós-graduação em Cirurgia Plástica Reparadora da UNIFESP-EPM

Fontes Consultadas

FONTES CONSULTADAS

Freshney RL. Culture of Animal Cell: a manual of basic technique. 3nd ed. New York: Willy-Liss;1995.

Jones GE. Human Cell Culture Protocols. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1996.

Bloom W, Fawcett DW. A textbook of histology. Capítulo 6, 12^a ed. Chapman & Hall, New York, 1994.

Hoss MH, Reith J, Ronrell LJ. Histologia: texto e atlas 2^a ed. Panamericana, São Paulo, 1993.

Anexos

ANEXO 01

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

1. Título do projeto: “Tecido adiposo: isolamento, cultivo e caracterização de adipócitos humanos”.
2. Informações sobre o objetivo: Essa pesquisa na qual você participará como voluntário, tem como objetivo estabelecer o isolamento e cultivo de adipócitos humanos e analisar os eventos da caracterização e sinalização celular para futuramente usarmos estas informações em diversas restaurações estéticas e de defeitos congênitos.
3. Descrição dos procedimentos: Após sua cirurgia eletiva, quando normalmente os tecidos redundantes retirados durante o procedimento serão desprezados, como gordura e pele, serão enviados para o laboratório de cultura de células onde faremos as células crescerem dentro de recipientes apropriados.
4. Relação dos procedimentos: A gordura e pele que são desprezadas em cirurgias eletivas como mamoplastia, abdominoplastia e lipoaspiração, serão encaminhadas ao Laboratório de Cultura de Células.
5. Descrição dos desconfortos e riscos esperados: Nenhum transtorno será causado, pois o material utilizado seria desprezado, nenhum procedimento a mais será acrescentado à sua cirurgia.
6. Benefício para o paciente: Não há benefício direto ao participante.
7. Procedimentos alternativos: Não existem procedimentos alternativos, pois não serão realizados procedimentos aos já necessários ao procedimento eletivo.
8. Garantia de acesso: Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a aluna Silvana Gaiba de França que pode ser encontrada no seguinte endereço: Rua Napoleão de Barros, 715, 4º andar, Telefone: (11) 5576.4118. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Botucatu, 572 – 1º andar – cj 14, 5571.1062, FAX 5539.7162 – E-mail: cepunifesp@epm.br.
- 9 – É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição;
- 10 – Direito de confidencialidade – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 11 – Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.
- 13 – Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.
- 14 – Eu, como pesquisador, comprometo a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo " Tecido adiposo: isolamento, cultivo e caracterização de adipócitos humanos".

Eu discuti com a aluna Silvana Gaiba de França sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

ANEXO 02



Universidade Federal de São Paulo
Escola Paulista de Medicina

Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital São Paulo

São Paulo, 4 de março de 2005.
CEP 0072/05

Ilmo(a). Sr(a).

Pesquisador(a) SILVANA GAIBA DE FRANÇA

Co-Investigadores: Lydiá Masako Ferreira, Alfredo Gragnani Filho, Soraia Smali, Alice Teixeira Ferreira, Lucimar Pereira de França, Jerônimo Pereira de França.

Disciplina/Departamento: Cirurgia Plástica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo

Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: "**Tecido adiposo: isolamento, cultivo e caracterização de adipócitos humanos**".

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Cultura de células.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Sem risco, desconforto mínimo.

OBJETIVOS: Isolar, cultivar e caracterizar os adipócitos humanos.

RESUMO: Adipócitos humanos serão caracterizados por citometria e microscopia de fluorescência confocal, por meio de marcadores específicos de estrutura celular. Haverá construção de curva de crescimento na presença e na ausência dos hormônios: angiotensina II e insulina. Caracterização das células e das organelas, mitocôndrias e retículo endoplasmático nas diferentes fases de cultivo por sondas fluorescentes. O tecido adiposo para cultura primária será obtido de cirurgia realizada no HSP.

FUNDAMENTOS E RACIONAL: Estudo com cultura de células, para o estudo de sinalização celular na diferenciação de adipócitos humanos. Está fundamentado, podendo trazer importantes informações.

MATERIAL E MÉTODO: Será realizado em colaboração com pesquisadores com experiência na metodologia para estudo da sinalização celular.

TCLE: Será obtido TCLE do paciente mesmo sendo o material utilizado, normalmente descartado ..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo - R\$ 7800,00.

CRONOGRAMA: 12 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Mestrado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **27/02/06** e **22/02/07**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

ANEXO 03

Tabela 1 – Dados de indicadores e sondas fluorescentes utilizados nos ensaios de microscopia

Indicador/sonda fluorescente	Aplicação	EX max (nm)	EM max (nm)	Laser de Ar/Kr, He/Ne e titânio/safira em nm
DAPI	Indicador de ácido nucléico	374	430-640	UV ou filtro (“UV longpass”)
ER tracker	Sonda para RE/RS	374	430-640	UV ou filtro (“UV longpass”)
FITC	(Fluoresceína) utilizada em sondas fluorescentes	494	520	488
Fura-2/AM	Indicador de Ca ²⁺ citosólico	340/380	505	UV ou filtro (“UV longpass”)
Mitotracker red	Sonda para mitocôndrias	579	599	543
Oil red O	Corante para gotículas lipídicas citoplasmáticas		599	UV ou filtro (“UV longpass”)
PI	Corante para ácidos nucléicos		599	UV ou filtro (“UV longpass”)

ANEXO 04

Tabela 2 – Composição da solução Tyrode

Reagentes	Concentração (mM)
NaCl	137,00
KCl	2,70
CaCl ₂ .2H ₂ O	1,36
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,50
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	0,36
NaHCO ₃	11,90
Glicose	5,50