



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA CRUZ

**Papel dos Corpúsculos Lipídicos Na Proliferação e
Transformação Celular**

Orientadores: Prof. Dr. João P. B. Viola
Prof^a. Dr^a. Patricia T. Bozza

**RIO DE JANEIRO
MARÇO 2014**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA CRUZ

**Papel dos Corpúsculos Lipídicos Na Proliferação e
Transformação Celular**

Tese de doutorado apresentada ao
Instituto Nacional de Câncer José de
Alencar Gomes da Silva como parte
dos requisitos para obtenção do grau
de Doutor em Oncologia

Orientadores: Prof. Dr. João P. B. Viola
Prof^a. Dr^a. Patricia T. Bozza

**RIO DE JANEIRO
MARÇO 2014**

C957p Cruz, André Luiz de Souza.

Papel dos corpúsculos lipídicos na proliferação e transformação celular./ André Luiz de Souza Cruz. – Rio de Janeiro: INCA, 2014.

Xvii.;152f.; il.

Tese (Doutorado Oncologia) – Pós-Graduação em Oncologia- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2014.

Orientadores: João P. B. Viola.

Patricia T. Bozza.

1. Corpúsculos Lipídicos. 2. Ciclo Celular. 3. Transformação Celular. I. Viola, João P. B.(Orient.). II. Bozza, Patricia T. (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD

571.9457



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

ANDRÉ LUIZ DE SOUZA CRUZ:

**Papel dos Corpúsculos Lipídicos Na Proliferação e Transformação
Celular**

Orientadores: Prof. Dr. João P. B. Viola
Prof^a. Dr^a. Patricia T. Bozza

Aprovada em: 26/03/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Marcelo Alex de Carvalho – Presidente
Prof. Dr. Franklin David Rumjanek
Prof^a. Dr^a. Rossana Correa Netto de Melo
Prof. Dr. Mário Alberto Cardoso da Silva Neto
Prof. Dr. José Andrés Morgado Díaz – Suplente I
Prof^a. Dr^a. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
MARÇO 2014**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Papel dos Corpúsculos Lipídicos Na Proliferação e Transformação Celular

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

André Luiz de Souza Cruz

Corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas envolvidas no metabolismo de lipídeos, no tráfego de membrana e na sinalização intracelular. A lipogênese está associada com um mau prognóstico em diversas doenças neoplásicas, sugerindo um papel dessas organelas no desenvolvimento do câncer. Foi mostrado anteriormente que corpúsculos lipídicos são elementos centrais na síntese de prostaglandina E₂ e na proliferação celular em linhagens celulares de câncer de cólon, e podem estar implicados na patologia desta neoplasia. Baseado nesses dados, avaliamos a regulação dos corpúsculos lipídicos na progressão do ciclo celular e na transformação celular. Células NIH3T3 foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e progressão pelo ciclo celular foi avaliada após suplementação com soro por incorporação de BrdU e por análise de qRT-PCR ou western blot de genes e proteínas do ciclo celular. Foi observado que, após suplementação, células NIH3T3 progridem para fase S em 24 horas, seguindo para as fases G₂ e M após 36-48 horas. Além disso, análise de expressão de ciclinas confirmou que células sincronizadas progridem uniformemente pelo ciclo celular após suplementação com soro. Usando este modelo, avaliamos a regulação de corpúsculos lipídicos durante o ciclo celular. Quantificação e análise de localização subcelular mostraram que células em arresto na fase G₁ apresentam menor quantidade e localização perinuclear de corpúsculos lipídicos, enquanto que um maior número e localização dispersa dessas organelas foram observados durante a fase S. Os mesmos resultados foram observados em células IEC-6. Além disso, estes dados foram confirmados em NIH3T3 através de microscopia de fluorescência com marcação simultânea de corpúsculos lipídicos e BrdU incorporado, ou através de sincronização específica na fase S por timidina. A linhagem transformada NIH3T3-H-rasV12 foi também submetida à confluência e privação de soro para análise de corpúsculos lipídicos, onde foi possível observar um aumento no número e localização dispersa de corpúsculos lipídicos, além do acúmulo da proteína estrutural ADRP, quando comparadas com a linhagem selvagem NIH3T3. Por outro lado, células NIH3T3 com superexpressão de ADRP humana não apresentaram características de transformação in vitro, como observado em ensaios de proliferação e morte celular, formação de focos, ou ensaio de crescimento independente de ancoragem. Juntos, esses resultados mostram que corpúsculos lipídicos são regulados durante a progressão do ciclo celular e que em células transformadas esta regulação está alterada, embora tenha sido visto que a superexpressão de ADRP não é capaz de induzir transformação celular em nosso modelo. Não obstante, esses dados dão evidências de que um mecanismo coordenado regula a progressão de ciclo celular e biogênese de corpúsculos lipídicos, que pode estar desregulado durante o desenvolvimento neoplásico.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Papel dos Corpúsculos Lipídicos Na Proliferação e Transformação Celular

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

André Luiz de Souza Cruz

Lipid bodies (or lipid droplets) are organelles involved in lipid turnover, membrane traffic and signaling. Lipogenesis has been associated with poor prognosis in several neoplastic diseases, suggesting a role for these organelles in cancer development. We have previously reported that lipid bodies are involved in prostaglandin E₂ synthesis and cell proliferation in colon cancer cells, and may have implications to colon adenocarcinoma pathogenesis. Based on this, we evaluated the role of lipid bodies in cell cycle regulation and during cellular transformation. NIH3T3 cells were synchronized through confluence and serum starvation, and progression through cell cycle was assayed before or after 12, 24, 36 or 48 hours of serum supplementation by BrdU incorporation, and by qRT-PCR and western blot analysis of cell cycle genes and proteins. We observed that, upon serum supplementation, NIH3T3 cells reached S phase after 24 hours and G₂/M phase after 36-48 hours, confirming that synchronized NIH3T3 progressed uniformly through cell cycle after stimulus. Using the same model, we evaluated the regulation of lipid bodies during cell cycle progression by fluorescence microscopy and flux cytometry. We observed that cells arrested on G₁ phase showed a lower number and perinuclear localization of lipid bodies, whereas an increased number of lipid bodies with a dispersed distribution through the cytoplasm were observed during S phase. The same results were seen in IEC-6 cells. These data were also confirmed in NIH3T3 cells by microscopy analysis after simultaneous staining of lipid bodies and incorporated BrdU, and with thymidine synchronization to assess regulation of lipid bodies in S cell cycle phase. The transformed cell lineage NIH3T3-H-*ras*V12 was also submitted to confluence and serum starvation for lipid bodies' analysis, showing increased number and dispersed localization of lipid bodies, along with increased ADRP protein accumulation, when compared with NIH3T3 cells. In the other hand, NIH3T3 cells overexpressing human ADRP did not display transformed phenotype *in vitro*, as observed in cell death and proliferation, *foci* formation, and anchorage-independent growth assays. Taken together, these results suggest that lipid bodies are highly regulated during cell cycle, and that this regulation is altered in transformed cells, although ADRP overexpression was not able to induce cell transformation in our model. Nevertheless, these data provide evidence for a coordinate mechanism that regulates cell cycle progression and lipid body biogenesis, which might be deregulated during cancer development.

Este trabalho foi realizado no Programa de Biologia Celular da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva, sob orientação do Dr. João Viola, e contou com apoio financeiro da FAPERJ, CNPq, CAPES, INCA/FIOCRUZ e INCT-Câncer.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que de alguma forma foram importantes para o desenvolvimento deste trabalho.

Faço um agradecimento especial para meu orientador João Viola, por me mostrar de forma eficiente o que é necessário para amadurecer na pesquisa e na vida acadêmica. Raramente isso foi feito de forma direta, mas sim a custo de muito trabalho e dedicação, e certamente por isso que as lições são bem aprendidas. Devo-lhe muito por minhas conquistas profissionais, e sei que ainda posso aprender ainda mais com seu talento e experiência.

Outro agradecimento especial deve ser feito à Dr^a. Patrícia Bozza, pelo grande auxílio para o desenvolvimento deste trabalho, pela sensibilidade e perspicácia durante nossas discussões, e pela confiança e encorajamento depositados em mim.

Agradeço à minha esposa Paloma, a pessoa que me torna cada dia um homem melhor. Obrigado por sempre estar do meu lado nos momentos alegres e por me incentivar e me mostrar o melhor caminho nos momentos difíceis. Foi quase insuportável viver distante fisicamente de você durante um ano, mas mesmo depois dessa jornada continuamos a crescer e a vencer juntos cada etapa de nossas vidas. Saiba que minha admiração por você cresce a cada dia.

Agradeço aos meus pais, por toda a orientação que me deram durante a vida, e por me ajudarem a enfrentar os obstáculos e transformações que a vida impõe.

Gostaria de agradecer aos companheiros do laboratório, tanto os de agora quanto os que já partiram, pela grande ajuda durante todas as discussões profissionais, além de fazer do ambiente de trabalho um local muito agradável para trabalhar ou jogar conversa fora: Amanda, Bianca, Bruno, Cristiane, Douglas, Vanessa, Giu, Karina, Matheus, Steffi, Pedro, Renata, Vilênia, Leo, Luiza, Erika (membro honorário), Emilia, Miriam, Marina, Luciano, Patricia e Taylane. Um agradecimento especial à Giu e Pat pelo auxílio durante os experimentos de Real Time; ao Pedro e ao Bruno pelas transduções; e ao Leo pelos experimentos com BrdU. Sem essa ajuda eu estaria na bancada quebrando a cabeça até agora!

Um agradecimento especial também à Nina e ao Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto, meus colaboradores neste trabalho. Nina, as fotos ficaram perfeitas!

Agradeço também à Nara e ao Raphael, do laboratório da Dr^a. Patricia Bozza, pela

grande ajuda nos protocolos, nos meus experimentos, e na obtenção dos reagentes tão necessários para este trabalho.

Agradeço também às pessoas que tornam todo o nosso trabalho possível: Alexssandra e Wellington; e aproveito para estender o agradecimento às inúmeras funcionárias da CNS que mantiveram impecável o ambiente de trabalho durante esse período

Gostaria de agradecer também à equipe da Secretaria de Pós Graduação por sempre serem solícitos às minhas necessidades, principalmente sabendo da quantidade de encargos que vocês precisam resolver.

Agradeço também a todos do INCA que me auxiliaram durante este trabalho, em especial ao pessoal do Programa de Genética pelo excelente microscópio, e um agradecimento especial a todos do Laboratório de Hematologia Molecular pelas conversas doidas e pelo citômetro de fluxo (Frava!).

Gostaria de agradecer ao apoio recebido dos alunos durante o período em que fui representante discente. Esta foi uma experiência fantástica, e bem recompensadora. Fico feliz ter poder ter sido útil aos companheiros da PGO.

Claro, não tenho palavras para agradecer aos alunos membros da comissão organizadora do IV Curso de Verão do INCA. Val, Priscila e Gabriel, sem vocês não sei o que teria sido do evento! Uma infinidade de tarefas em um prazo curtíssimo, e mesmo assim conseguimos dar nó em pingo d'água! Gostaria também de agradecer ao Dr. Marcelo Soares, coordenador docente do Curso de Verão, pelo seu comprometimento e orientação mesmo durante um momento pessoal delicado. Meus sinceros agradecimentos a todos vocês.

Aos meus amigos da faculdade, um muitíssimo obrigado. Maurício e Roberta, meus compadres, além da Anna, da Nathália e da Livia. Mesmo nos encontrando tão pouco, saibam que sempre serão meus amigos e que podem contar comigo quando quiser!

Agradeço também a todos os amigos e amigas que de alguma forma fizeram com que o árduo trabalho de laboratório fosse amenizado com uma incrível convivência: tanto da parte da Paloma (Pri, Lary, Karina Kroll, Vanessa, Anneliese) quanto da minha (Alessandro (R10), Rafael (Tatau), Dalmaso, Bina).

Por fim, um agradecimento às instituições de fomento: CNPq, CAPES, FAPERJ, INCA/FIOCRUZ e INCT-Cancer.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	- Ácido Araquidônico
ABDH5	- AB-hydrolase Containing 5
ACAT	- Acil-CoA Colesterol Aciltransferase
ADP	- Difosfato de Adenosina
ADRP	- Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos
AIP4	- Proteína de Interação com Atrofina-1 tipo 4
AML12	- alpha mouse liver 12
AP-1	- Proteína Ativadora-1
APC/C	- Complexo Promotor de Anáfase/Ciclossomo
ApoB	- Apolipoproteína B-100
ARDS	- Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
ARF	- Fator de Ribosilação de ADP
ATGL	- Lipase de Triglicerídeos do Tecido Adiposo
BAL	- Lavado Broncoaveolar
bFGF	- Fator de Crescimento de Fibroblastos básico
BODIPY	- boro-dipirrometano
BrdU	- 5-bromo-2'-deoxiuridina
BSA	- Albumina de Soro Bovino
BSC1	- Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip
CCR ₃	- Receptor de Quimiocinas C-C tipo 3
CDK	- Cinase Dependente de Ciclinas
CGI-58	- Comparative Gene Identification-58
CHO	- Ovário de Hamster Chinês
CKI	- Inibidor de CDK
CLA	- Ácido Linoléico Conjugado
COS	- CV-1 em Origem, carregando SV40
COX	- Ciclooxygenase
cPLA ₂ -α	- Fosfolipase A2 Alfa Citosólica
DAPI	- 4',6-diamidino-2-fenilindol
DDK	- Cinase Dependente de Dbf4
DEPC	- Dietilpirocarbonato
DGAT	- Acil-CoA Diacilglicerol Aciltransferase
DMEM	- Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DO	- Densidade Óptica
DP	- Desvio Padrão
EDTA	- Ácido Triacético Diamino Etileno
EGFP	- Proteína Verde Fluorescente Aumentada
EGFR	- Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
ERK	- Cinase Regulada por Sinalização Extracelular
FAM	- Carboxifluoresceína
FITC	- Isotiocianato de Fluoresceína
FSP27	- Proteína Específica de Gordura 27
GAPDH	- Glicealdeído 3-Fosfato Desidrogenase
G-CSF	- Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos
GDP	- Difosfato de Guanidina
GLUT4	- Transportador de Glicose tipo 4
GTP	- Trifosfato de Guanidina
HBS	- Tampão Salino de Hanks

HCV	- Vírus da Hepatite C
HDAC	- Histona Deacetilase
HeLa	- Henrietta Lacks
HEPES	- Ácido Etanosulfônico Hidroxietil Piperazina
HepG2	- Carcinoma Hepatocelular Humano, G2
HER-2	- EGFR-2 humana
HIV	- Vírus da Imunodeficiência Humana
HIF	- Fator Induzido por Hipóxia
HPRT	- Hipoxantina-Guanina Fosforibosiltransferase
HSL	- Lipase Hormônio-Sensitiva
IgG	- Imunoglobulina G
IL	- Interleucina
IP	- Iodeto de Propídio
JNK	- Cinase c-Jun N-terminal
LDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade
LO	- Lipooxigenase
LPS	- Lipopolissacarídeo
LSDP5	- Lipid Storage Droplet Protein 5
LTB ₄	- Leucotrieno B ₄
LTC ₄	- Leucotrieno B ₄
MAP	- Proteínas Ativadas por Mitógenos
MCM	- Minichromosome Maintenance
MDM	- Mouse Double Minute
MIF	- Média de Intensidade de Fluorescência
MLDP	- Proteína de Corpúsculos Lipídicos do Miocárdio
MLTC-1	- Linhagem Celular de Tumor de Leydig Murino-1
mTOR	- Alvo da Rapamicina em Mamíferos
NADH	- Dinucleotídeo de Adenina Nicotinamida
Nek	- Proteína semelhante à NIMA
NIMA	- Nunca em Mitose A
NP-40	- Nonidet P-40
NS5A	- Proteína não-estrutural 5A
ORC	- Complexo de Reconhecimento da Origem
oxLDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade Oxidada
OXPAT	- Proteína PAT Enriquecida em Tecidos Oxidados
PAF	- Fator Ativador de Plaquetas
PAGE	- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
PAT	- Perilipina, ADRP, TIP-47
PBS	- Tampão Fosfato Salino
PCNA	- Antígeno Nuclear de Células em Proliferação
PCR	- Complexo Pré-Replicativo
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PDGFR	- Receptores do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PGD ₂	- Prostaglandina D ₂
PGE ₂	- Prostaglandina E ₂
PI3K	- Fosfatidilinositol-3-Cinase
PKA	- Proteína Cinase A
PKB	- Proteína Cinase B
PKC	- Proteína Cinase C
PLC	- Fosfolipase C
Plk	- Proteínas-Cinase Semelhantes a <i>polo</i>

PP17	- Proteína de Placenta 17
PPAR	- Receptor Ativado por Proliferador de Peroxissomos
PPRE	- Elemento Responsivo a PPAR
PTEN	- Fosfatase e Homólogo de Tensina
RANTES	- Regulada por Ativação Expressa e Secretada por Células T Normais
Rb	- Proteína Retinoblastoma
SDS	- Duodecil Sulfato de Sódio
SFB	- Soro Fetal Bovino
SNAP	- Proteínas Solúveis de Associação ao NSF
SNARE	- Receptor de Proteínas Solúveis de Associação ao NSF
SWI/SNF	- Switch/Sucrose non-fermentable
TAG	- Triacilglicerol
TAMRA	- Carboxitetrametilrodamina
TBS	- Tampão Tris Salino
TBS-T	- Tampão Tris Salino - Tween 20
TEMED	- Tetra Metil Etileno Diamina
TGF- β	- Fator Transformador de Crescimento-beta
TIP47	- Proteína de Interação de Cauda de 47 kDa
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral-alfa

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Representação esquemática do ciclo celular em mamíferos.....	2
FIGURA 1.2. Biogênese e estrutura de corpúsculos lipídicos.....	18
FIGURA 1.3. Representação esquemática das proteínas da família PAT.....	23
FIGURA 4.1. Modelo de sincronização de células NIH3T3 por confluência e privação de soro.....	54
FIGURA 4.2. Células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro são capazes de restabelecer proliferação após suplementação com soro.....	55
FIGURA 4.3. Células NIH3T3 sincronizadas progridem uniformemente pelo ciclo celular após suplementação com soro.....	56
FIGURA 4.4. Localização celular de corpúsculos lipídicos varia conforme progressão do ciclo celular em células NIH3T3.....	59
FIGURA 4.5. Quantidade de corpúsculos lipídicos varia durante a progressão do ciclo celular em células NIH3T3.....	60
FIGURA 4.6. Dispersão de corpúsculos lipídicos é dinâmica durante a fase S do ciclo celular em células NIH3T3.....	61
FIGURA 4.7. Timidina causa arresto na fase S do ciclo celular em células NIH3T3.....	62
FIGURA 4.8. Células NIH3T3 em arresto na fase S do ciclo celular apresentam maior número e localização dispersa de corpúsculos lipídicos.....	63
FIGURA 4.9. Células IEC-6 sincronizadas progridem uniformemente pelo ciclo celular após suplementação com soro.....	66
FIGURA 4.10. Localização celular de corpúsculos lipídicos varia conforme progressão do ciclo celular em células IEC-6.....	67
FIGURA 4.11. Quantidade de corpúsculos lipídicos varia durante a progressão do ciclo celular em células IEC-6.....	68
FIGURA 4.12. Células NIH3T3 transformadas com a oncoproteína H-rasV12 apresentam desregulação do ciclo celular.....	71
FIGURA 4.13. Células NIH3T3-H-rasV12 apresentam localização dispersa e maior número de corpúsculos lipídicos.....	72
FIGURA 4.14. Células NIH3T3-H-rasV12 apresentam maior acúmulo da proteína estrutural ADRP.	73
FIGURA 4.15. Células NIH3T3 transduzidas com retrovírus para superexpressão do gene humano de ADRP apresentam maior acúmulo da proteína ADRP.....	75

FIGURA 4.16. Células NIH3T3 superexpressando ADRP apresentam maior quantidade e localização dispersa de corpúsculos lipídicos.....	76
FIGURA 4.17. Células NIH3T3 não apresentam alteração na proliferação após superexpressão de ADRP.....	78
FIGURA 4.18. Células NIH3T3 não apresentam alteração na progressão do ciclo celular após superexpressão de ADRP.....	79
FIGURA 4.19. Células NIH3T3 não apresentam alteração na morte celular em privação de soro após superexpressão de ADRP.....	80
FIGURA 4.20. Células NIH3T3 não apresentam fenótipo de transformação <i>in vitro</i> após superexpressão de ADRP.....	81

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O ciclo celular	1
1.1.1. <u>Regulação das fases G₁ e S do ciclo celular</u>	3
1.1.2. <u>Regulação da fase G₂ e Mitose</u>	7
1.1.3. <u>Ciclo celular e câncer</u>	11
1.2. Corpúsculos lipídicos	14
1.2.1. <u>Estrutura e morfologia de corpúsculos lipídicos</u>	14
1.2.2. <u>Biogênese de corpúsculos lipídicos</u>	16
1.2.3. <u>Família de proteínas PAT</u>	22
1.2.4. <u>Funções de corpúsculos lipídicos</u>	29
1.2.5. <u>Papel de corpúsculos lipídicos na fisiopatologia de doenças</u>	34
1.2.5.1. <i>Regulação de corpúsculos lipídicos no câncer</i>	36
2. OBJETIVOS	38
2.1. Geral	38
2.2. Específicos	38
3. MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1. Cultura de células	39
3.2. Construção dos plasmídeos	39
3.3. Produção de retrovírus recombinantes e infecção de células NIH3T3	39
3.4. Sincronização do ciclo celular	40
3.5. Análises de ciclo celular e conteúdo de DNA sub-G₀ por iodeto de propídio	41
3.6. Análise de ciclo celular por incorporação de BrdU	41
3.7. Análise de proliferação celular por incorporação de [³H]timidina	42
3.8. Análise de proliferação celular por ensaio de cristal violeta	42
3.9. Western blot	42
3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA	43

3.11. PCR em tempo real	44
3.12. Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos por Oil Red O	45
3.13. Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos por Bodipy®	45
3.14. Localização subcelular de corpúsculos lipídicos por microscopia de fluorescência	46
3.15. Ensaio de formação de focos em cultura	48
3.16. Ensaio de crescimento em meio semissólido.....	48
3.17. Reagentes e soluções	49
3.17.1. <u>Cultura de células</u>	49
3.17.2. <u>Transfecção e Transdução Retroviral</u>	49
3.17.3. <u>Endonucleases de restrição e polimerases</u>	49
3.17.4. <u>Análise de ciclo celular e Sub-G₀</u>	49
3.17.5. <u>Western blot</u>	49
3.17.6. <u>Anticorpos</u>	50
3.17.7. <u>Outros reagentes</u>	51
4. RESULTADOS	52
4.1. Análise da progressão do ciclo celular em células NIH3T3 sincronizadas	52
4.2. Análise da regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular.....	57
4.3. Regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular em células IEC-6.....	64
4.4. Regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular em células transformadas	69
4.5. Efeito da superexpressão de ADRP na regulação de corpúsculos lipídicos	74
4.6. Efeito da superexpressão de ADRP na proliferação celular e transformação celular <i>in vitro</i>.....	77
5. DISCUSSÃO	82

6. CONCLUSÕES.....	94
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95
8. ANEXOS.....	135
8.1. Capítulos de livro publicados.....	135
<u>8.1.1. VIOLA, J.P., CRUZ, A.L.S., WERNECK, M.B.F., BOZZA, P.T. Formation and Function of Lipid Droplets in Inflammation and Cancer. Em: R. Resende; H. Ulrich. Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research. 1ed.: Springer Netherlands, 2013, p.139-165.</u>	<u>135</u>

1. INTRODUÇÃO

1.1. O ciclo celular

Em 1858, o patologista alemão Rudolf Virchow propôs que todas as células vivas originaram-se de uma célula pré-existente (“*Omnis cellula ex cellula*”). Todos os organismos vivos, das bactérias unicelulares aos mamíferos multicelulares, são produtos de eventos de crescimento e divisão celular. Esse processo ocorre por meio de uma sequência ordenada de eventos, que duplicam os componentes celulares e os dividem em duas novas células distintas, e é conhecido como ciclo celular (NOBURY E NURSE, 1992; NURSE, 2000). Os detalhes do ciclo celular podem variar de um organismo para outro, ou mesmo em diferentes períodos de crescimento em um mesmo indivíduo. Por exemplo, células dividem mais rápido durante o início do desenvolvimento embrionário de *Xenopus laevis* (MURRAY e KIRSCHNER, 1989).

O ciclo celular básico é dividido em quatro fases: a fase de síntese, ou fase S; duas fases de intervalo (“*gaps*”) denominadas fases G_1 e G_2 ; e a mitose, também chamada de fase M (NOBURY E NURSE, 1992) (Figura 1.1). Dois eventos cruciais são executados durante o ciclo celular: durante a fase S, ocorre a duplicação de conteúdo genético da célula, e durante a fase M ocorre a repartição de todos os componentes celulares entre duas células filhas idênticas. As outras duas fases do ciclo celular, G_1 e G_2 , representam períodos de preparação que asseguram a progressão correta pelas fases S e M, respectivamente. Para garantir a correta progressão pelo ciclo celular, células desenvolveram diversos pontos de checagem ou *checkpoints*, que as previnem de entrar em uma nova fase até completarem com sucesso a fase anterior (HARTWELL E WEINERT, 1989). A perda dos pontos de checagem pode resultar em morte celular, infidelidade na distribuição do conteúdo genético na divisão, ou maior susceptibilidade a danos ao DNA (HARTWELL E WEINERT, 1989). Além disso, a progressão do ciclo celular está diretamente relacionada ao crescimento celular, e a coordenação entre biossíntese e divisão celular garante que tecidos e órgãos em desenvolvimento alcancem seu tamanho e densidade celular ideal (NEUFELD E EDGAR, 1998).

A entrada no ciclo celular é dependente de estímulos mitogênicos extracelulares, que impulsionam a célula a sair do estágio de quiescência, também conhecido como fase G_0 (SHERR, 1996). A partir de um determinado ponto durante a fase G_1 , células passam a ser capazes de progredir pelo ciclo celular independente

da presença de sinais estimulatórios. Esta transição é denominada ponto de restrição, após a qual células entram de forma irreversível na progressão do ciclo celular (PARDEE, 1974). Atualmente o ponto de restrição é comumente usado para subdividir a fase G₁ em G₁ inicial e G₁ tardio (PLANAS-SILVA E WEINBERG, 1997) (Figura 1.1), e seus mecanismos moleculares ainda não foram bem definidos.

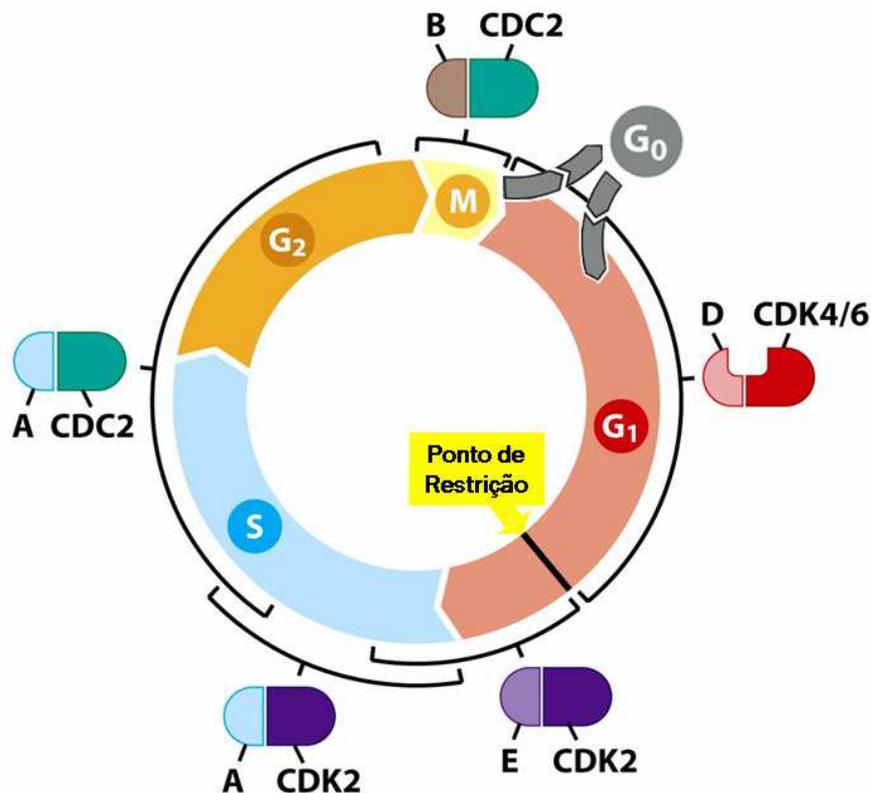


Figura 1.1. Representação esquemática do ciclo celular em mamíferos. O ciclo celular é dividido em quatro fases – G₁, S, G₂ e M. Estão representados os períodos de atividade dos complexos ciclina-Cdks durante a progressão do ciclo, além da entrada ou saída de células no estado de quiescência (G₀) e o ponto de restrição que ocorre durante a progressão da fase G₁. Adaptado de WEINBERG, 2007.

Algumas das moléculas que controlam os diversos eventos do ciclo celular foram extensivamente caracterizadas. Cinasas dependentes de ciclinas (CDKs), um grupo de serina/treonina cinases heterodiméricas, são proteínas centrais desse processo (MORGAN, 1997; MALUMBRES E BARBACID, 2005) (Figura 1.1). O membro original da família CDK (hoje denominado CDK1) foi identificado em varreduras genéticas nas leveduras *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* com defeitos na divisão celular (RUSSELL E NURSE, 1986b). Essa proteína, denominada Cdc2 em *S. pombe* e Cdc28 em *S. cerevisiae*, é essencial para a progressão do ciclo celular nesses organismos e, posteriormente, genes homólogos foram encontrados em células humanas (DRAETTA *et al.*, 1987; LEE E NURSE, 1987). Outros membros da família CDK foram clonados e caracterizados nos anos seguintes (MALUMBRES E BARBACID, 2005).

Estudos independentes em invertebrados marinhos identificaram proteínas cujo acúmulo e degradação oscilavam durante a progressão do ciclo celular (ROSENTHAL *et al.*, 1980). Em função dessa característica, essas proteínas foram denominadas ciclinas (EVANS *et al.*, 1983). Ciclinas foram posteriormente clonadas de moluscos e ouriços-do-mar, e foi mostrado que essas proteínas eram capazes de promover meiose em oócitos de *Xenopus laevis* (HUNT, 1989). A ligação bioquímica entre CDKs e ciclinas foi inicialmente descrita em 1990, quando foi reportada a associação de CDK1 com as ciclinas A e B em oócitos de moluscos, de *X. laevis*, e em estrelas do mar (NURSE, 1990). Análises do genoma humano identificaram diversos genes que codificam proteínas relacionadas com ciclinas, por compartilhar uma região conservada de 150 aminoácidos denominada “*cyclin box*”. Este domínio é composto por cinco regiões com alto conteúdo de α -hélices, e responsável pela ligação e ativação com seus principais parceiros, incluindo CDKs (NOBLE *et al.*, 1997). Embora todas essas proteínas sejam consideradas genericamente ciclinas, para a maioria delas ainda não foi caracterizado se são realmente sintetizadas e degradadas ciclicamente.

1.1.1. Regulação das fases G₁ e S do ciclo celular

Durante a década de 90 a análise bioquímica de proteínas CDK, bem como de seus reguladores e substratos, foi fundamental para o entendimento da regulação do ciclo celular em mamíferos. O ciclo celular pode se iniciar após uma divisão celular anterior, com a entrada das células-filhas em um novo processo de ciclo. Alternativamente, estas células podem sair do ciclo celular cessando a proliferação e entrando no estado de quiescência (Figura 1.1). As células que mantêm a proliferação avançam para a fase G₁ do novo ciclo. As ciclinas D (D1, D2 e D3) são as primeiras ciclinas sintetizadas durante o ciclo celular, induzidas a partir de um estímulo mitogênico (SHERR, 1994). Ciclinas D têm seus níveis controlados pela presença de fatores de crescimento, sugerindo que estas proteínas são responsáveis pela comunicação funcional entre os estímulos extracelulares e a maquinaria do ciclo celular (SHERR, 1993, 1995). Apesar de apresentarem defeitos no desenvolvimento nos olhos e nas glândulas mamárias, camundongos deficientes especificamente para ciclina D1 são viáveis e suas células mantêm capacidade de proliferação, indicando que esta molécula não é estritamente necessária para progressão pela fase G₁ na maioria dos casos (FANTI *et al.*, 1995; SICINSKI *et al.*, 1995). Ciclinas D1, D2 e D3 apresentam grande percentual de similaridade em suas

sequências (XIONG *et al.*, 1992), e portanto podem ter funções redundantes (SHERR, 1994, 1995). Ciclinas D se ligam e ativam tanto CDK4 e CDK6 (MORGAN, 1997). Essas duas proteínas cinases são relacionadas entre si e não apresentaram diferenças funcionais, apenas padrões distintos de ativação (MEYERSON E HARLOW, 1994; JINNO *et al.*, 1999). A geração de camundongos deficientes para CDK4 mostrou que esta cinase parece ser dispensável para a progressão do ciclo na maioria das células, exceto para alguns tipos específicos como, por exemplo, células β pancreáticas (RANE *et al.*, 1999; TSUTSUI *et al.*, 1999).

Os substratos primários de CDK4/6 na progressão da fase G_1 são os membros da família de proteínas retinoblastoma, respectivamente Rb, p107 e p130 (ADAMS, 2001). Essas proteínas funcionam como sítios de ancoragem para diversas outras proteínas que necessitam ser minuciosamente reguladas durante o ciclo celular (MORRIS E DYSON, 2001). Por exemplo, proteínas Rb se ligam a fatores de transcrição da família E2F e bloqueiam sua habilidade de ativar a transcrição gênica (FLEMINGTON *et al.*, 1993; HELIN *et al.*, 1993). Além disso, a ligação entre Rb e E2F forma um complexo repressor que se liga a promotores e reprime ativamente sua transcrição (BREMNER *et al.*, 1995; SELLERS *et al.*, 1995; WEINTRAUB *et al.*, 1995). Foi mostrado que a ativação de E2F é fundamental para a progressão de células pelo ciclo celular (JOHNSON *et al.*, 1993), mostrando portanto que Rb causa arresto do ciclo celular na fase G_1 por inibir a atividade transcricional de E2F (ZHU *et al.*, 1993; QIN *et al.*, 1995). Proteínas Rb também são capazes de recrutar enzimas remodeladoras de cromatina, como histonas deacetilases (HDACs) (BREHM *et al.*, 1998) e complexos SWI/SNF (DUNAIEF *et al.*, 1994; SINGH *et al.*, 1995).

A atividade de proteínas Rb é modulada por fosforilação sequencial pelos complexos CDK4/6-ciclina D e, posteriormente, também pelo complexo CDK2-ciclina E (LUNDBERG E WEINBERG, 1998; HARBOUR *et al.*, 1999; EZHEVSKY *et al.*, 2001). Ezhevsky e colaboradores mostraram que Rb encontra-se completamente desfosforilada e inativa em G_0 , e seu estado ativo (inibitório) seria causado por hipofosforilação inicial por CDK4/6 durante o início da fase G_1 (EZHEVSKY *et al.*, 1997, 2001). Subseqüente hiperfosforilação por CDKs levaria então à inibição de Rb e progressão do ciclo celular. Proteínas Rb hiperfosforiladas liberam moléculas que estavam anteriormente associadas à sua forma hipofosforilada (BUCHKOVICH *et al.*, 1989; KATO *et al.*, 1993), sendo este um processo altamente regulado e complexo (revisado em HARBOUR E DEAN, 2000). Inativação de Rb leva à

transcrição de genes requeridos para progressão à fase S, incluindo os genes de ciclina E e ciclina A (OHTANI *et al.*, 1995; SCHULZE *et al.*, 1995; GENG *et al.*, 1996) e genes necessários para a síntese de DNA (DYSON, 1998; NEVINS, 1998).

A ligação de ciclina E com CDK2 causa ativação deste complexo (HARBOUR *et al.*, 1999), o que mantém o estado hiperfosforilado de Rb atuando em sítios-alvos distintos aos do complexo CDK4/6-ciclina D (KITAGAWA *et al.*, 1996). De fato, a inativação de proteínas Rb durante a fase G₁ ocorre de forma sequencial e dependente destes dois complexos ciclina-CDK (LUNDBERG E WEINBERG, 1998). Curiosamente, a inserção do gene de ciclina E no *locus* da ciclina D1 previne a manifestação de alguns fenótipos observados nos camundongos deficientes para ciclina D1, sugerindo que ciclina E é o principal alvo abaixo da ciclina D1 (GENG *et al.*, 1999). De fato, um dos primeiros eventos de fosforilação de Rb é causado por CDK4/6-ciclina D, que permite a expressão de ciclina E ao desfazer a ligação entre Rb e complexos HDAC (HARBOUR *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2000). Após esse evento, a expressão de ciclina E é suficiente para superar o arresto de G₁ controlado por Rb (LUKAS *et al.*, 1997; ALEVIZOPOULOS *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2000). Esses dados mostram que a ativação de CDK2-ciclina E muda o programa do ciclo celular, reduzindo a dependência de mitógenos para sua continuidade.

As funções de CDK2 são contrabalanceadas pela atividade dos inibidores de CDK (CKIs) da família Cip/Kip, que incluem p21^{Cip1} (EL-DEIRY *et al.*, 1993; HARPER *et al.*, 1993; XIONG *et al.*, 1993), p27^{Kip1} (POLYAK *et al.*, 1994a, 1994b; TOYOSHIMA E HUNTER, 1994), e p57^{Kip2} (LEE *et al.*, 1995; MATSUOKA *et al.*, 1995). Os níveis de p27^{Kip1} são altos em células quiescentes; no entanto, com o início do ciclo celular estes inibidores são inativados por interação com complexos CDK4/6-ciclina D (POLYAK *et al.*, 1994b; TOYOSHIMA E HUNTER, 1994). Apesar desta ligação com uma CKI, o complexo CDK4/6-ciclina D mantém sua atividade catalítica (SOOS *et al.*, 1996; BLAIN *et al.*, 1997; LABAER *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1999). Inclusive, a ligação de proteínas Cip/Kip é necessária para a formação de complexos ciclina D-CDKs ativos (LABAER *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1999). Por outro lado, fibroblastos embrionários de camundongos deficientes para genes *Kip1* e *Cip1* mostram um aumento na atividade de CDK2-ciclina E (CHENG *et al.*, 1999). Esses dados indicam que o sequestro de proteínas da família Cip/Kip por complexos CDK4/6-ciclina D facilita o acúmulo e ativação de CDK2-ciclina E (SHERR E ROBERTS, 1999). Posteriormente, o complexo CDK2-ciclina E antagoniza a função de seu próprio inibidor ao fosforilar p27^{Kip1} e direcioná-lo à via de degradação por

proteassomo (PAGANO *et al.*, 1995; SHEAFF *et al.*, 1997; VLACH *et al.*, 1997; MONTAGNOLI *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 1999). A inativação desse sistema por CDK2-ciclina E também resulta na redução da necessidade por mitógenos e, junto com a hiperfosforilação de Rb, culmina no comprometimento irreversível da célula para entrar na fase S do ciclo celular (SHERR E ROBERTS, 1999). É importante lembrar que a inativação inicial de Rb e das proteínas Cip/Kip ocorre somente a partir da ativação da atividade de ciclina D e suas CDKs, mas o surgimento do complexo CDK2-ciclina E permite que o ciclo progrida independente da ciclina anterior, como foi mostrado a partir da superexpressão ectópica de ciclina E (LENG *et al.*, 1997; LUKAS *et al.*, 1997).

A família de proteínas INK4, outro grupo de proteínas inibidoras de CDKs, tem como alvo especificamente as cinases dependentes de ciclinas D (RUAS E PETERS, 1998). Quatro diferentes proteínas INK4 foram identificadas: p16^{INK4a} (SERRANO *et al.*, 1993), p15^{INK4b} (HANNON E BEACH, 1994), p18^{INK4c} (GUAN *et al.*, 1994; HIRAI *et al.*, 1995) e p19^{INK4d} (HIRAI *et al.*, 1995; CHAN *et al.*, 1995). Proteínas INK4 inativam CDK4/6 formando complexos INK4/CDK, liberando dessa forma proteínas Cip/Kip e, portanto, inibindo indiretamente a atividade de CDK2-ciclina E e assegurando o arresto de ciclo celular (SHERR E ROBERTS, 1999). Este efeito é, entretanto, dependente da presença da proteína Rb funcional (GUAN *et al.*, 1994; KOH *et al.*, 1995; LUKAS *et al.*, 1995; MEDEMA *et al.*, 1995), implicando que, com a inibição de cinases dependentes de ciclinas D, a proteína Rb se mantém fosforilada e inibindo a transcrição de genes relacionados à fase S. Foi mostrado que a via do fator transformador de crescimento beta (TGF- β) contribui para o arresto de ciclo celular na fase G₁ pela indução da expressão de p15^{INK4b} (HANNON E BEACH, 1994; REYNISDÓTTIR *et al.*, 1995; REYNISDÓTTIR e MASSAGUÉ, 1997). p16^{INK4a} acumula conforme células envelhecem, sendo induzido possivelmente durante o estabelecimento da senescência celular (ALCORTA *et al.*, 1996; HARA *et al.*, 1996; PALMERO *et al.*, 1997; SERRANO *et al.*, 1997; ZINDY *et al.*, 1997a). Já p18^{INK4c} e p19^{INK4d} são expressas durante o desenvolvimento fetal e podem ter papéis na diferenciação celular terminal (MORSE *et al.*, 1997; ZINDY *et al.*, 1997a, 1997b. PHELPS *et al.*, 1998).

A expressão de ciclina A é inicialmente regulada por E2F (SCHULZE *et al.*, 1995) e ocorre durante a fase G₁ tardia. Esta ciclina também se liga com CDK2, e este complexo é requerido para progressão pela fase S (GIRARD *et al.*, 1991; WALKER E MALLER, 1991). De fato, ciclinas E são fosforiladas após entrada na

fase S pela sua própria CDK, o que causa sua degradação (CLURMAN *et al.*, 1996; WON E REED, 1996). Paralelamente, CDK2-ciclina A se liga a E2F e fosforila seu parceiro transcricional DP-1, impedindo a ligação de E2F ao DNA e levando à diminuição de sua atividade transcricional (KREK *et al.*, 1994; DYNLACHT *et al.*, 1994; KREK *et al.*, 1995).

Durante a progressão para fase S e ativação de CDK2, ocorre o recrutamento de DNA helicases, primases e polimerases para estruturas denominadas complexos pré-replicativos (PRC) (KELLY E BROWN, 2000; PRASANTH *et al.*, 2000). Parte deste complexo é inicialmente carregado nas origens de replicação dos cromossomos durante o fim da mitose, a partir da ligação das proteínas ORC (complexo de reconhecimento da origem) (BELL E STILLMAN, 1992; STILLMAN, 2005). Na fase G₁ as proteínas Cdc6/18 e Cdt1 se ligam a ORC e recrutam o complexo de proteínas MCM (proteínas de manutenção dos cromossomos) (COCKER *et al.*, 1995; BELL E DUTTA, 2002; DAVEY *et al.*, 2002). O complexo MCM tem especial importância ao funcionar como DNA helicase (TYE, 1999; FORSBURG, 2004; LEI, 2005) e licenciar esta região do DNA para o início a replicação (BLOW E HODGSON, 2002). O disparo da replicação do DNA somente ocorre na fase S em função da atividade tanto de CDK quanto da proteína cinase DDK (cinase dependente de Dbf4) (SCLAFANI, 2000; MASAI e ARAI, 2002), que direcionam o recrutamento e ativação de fatores de replicação adicionais e DNA polimerases, que juntos compõem o replissoma (BELL E DUTTA, 2002; SCLAFANI e HOLZEN, 2007). Por fim, a montagem de outras PRCs é bloqueada nas fases S, G₂ e M em função da atividade de diversas CDKs, principalmente por fosforilações que causam a degradação e re-localização de componentes do complexo (NGUYEN *et al.*, 2001; TAKEDA E DUTTA, 2005). Além disso, a mitose não poderá progredir até a replicação de DNA ocorrer por completo (HARTWELL E WEINERT, 1989). Juntos esses eventos asseguram que a fita de DNA será replicada somente uma vez por ciclo celular.

1.1.2. Regulação da fase G₂ e Mitose

A fase G₂ é caracterizada pela atuação dinâmica de diversas proteínas-cinases reguladoras, sendo a principal delas a proteína CDK1 (DURKACZ *et al.*, 1986; DRAETTA E BEACH, 1988; FISHER E NURSE, 1996). Esta enzima desempenha importantes papéis que contribuem para a coordenação correta da mitose, a última fase do ciclo celular. Por exemplo, CDK1 promove a fosforilação de

proteínas motoras envolvidas na separação dos centrossomos, requerido para a formação do fuso mitótico bipolar (BLANGY *et al.*, 1995); CDK1 também fosforila a proteína lamina, induzindo a desestruturação do envelope nuclear (PETER *et al.*, 1990); por fim, esta enzima também fosforila a proteína condensina, o que contribui para a condensação do cromossomo (KIMURA *et al.*, 1998). Deficiência em CDK1 resulta em letalidade embrionária nas primeiras divisões celulares (SANTAMARIA *et al.*, 2007).

A atividade de CDK1 é regulada pela ligação com ciclinas A e B (DRAETTA *et al.*, 1989). Inicialmente ativada por ciclina A, o complexo CDK1-ciclina A decai durante a fase G₂ com a sua sucessiva a degradação (DEN ELZEN E PINES, 2001; GELEY *et al.*, 2001). Por outro lado, o acúmulo de ciclina B é dirigido por CDK2-ciclina A durante as fases S e G₂ (DYNLACHT *et al.*, 1994; ZIEBOLD *et al.*, 1997; SAVILLE E WATSON, 1998; CHAE *et al.*, 2004; MAJOR *et al.*, 2004; LAOUKILI *et al.*, 2008). Em função desses processos, o complexo CDK1-ciclina B passa a ser preponderante durante a mitose (LINDQVIST *et al.*, 2009). Além disso, a atividade de CDK1-ciclina B é regulada pelo balanço entre as cinases Wee1 e Myt1, e a fosfatase Cdc25. Wee1 e Myt1 são capazes de fosforilar CDK1-ciclina B nos resíduos de aminoácidos T14 e Y15, inibindo sua atividade (HEALD *et al.*, 1993; LIU *et al.*, 1997; O'FARRELL, 2001). Já Cdc25 é capaz de desfosforilar os mesmos resíduos T14 e Y15 de CDK1 (RUSSELL E NURSE, 1986a; GOULD E NURSE, 1989; O'FARRELL, 2001), revertendo a regulação de Wee1 e Myt1. Com a ativação de CDK1-ciclina B forma-se um mecanismo de retroalimentação positivo, pois o complexo é capaz de fosforilar tanto as proteínas Wee1 e Myt1 para inativá-las (BOOHER *et al.*, 1997; NAKAJIMA *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2004) quanto proteínas Cdc25 para ativá-las (HOFFMANN *et al.*, 1993; BALDIN *et al.*, 2002; MAILAND *et al.*, 2002; BOUTROS *et al.*, 2006). Há a participação das proteínas 14-3-3 nesse processo, que se ligam em Wee1 e em Cdc25 após fosforilação para ativá-las ou inativá-las, respectivamente (LEE *et al.*, 2001).

Diversas proteínas cinases além de CDK1 também têm uma participação importante na regulação da mitose. Proteínas-cinase semelhantes a *polo* (Plks) compõem um família de quatro proteínas relacionadas com o produto do gene *polo* em *Drosophila* (NIGG, 1998). Dessas proteínas, somente Plk1 tem um papel evidenciado durante a mitose, enquanto que outras proteínas da família apresentam papéis fora do ciclo celular (KAUSELMANN *et al.*, 1999). Outras proteínas importantes para a mitose são as proteínas semelhantes a NIMA (Neks), proteínas-

cinase relacionadas ao produto do gene NIMA (nunca em mitose A) em *Aspergillus nidulans* (OSMANI E YE, 1996). O genoma de mamíferos contém ao menos sete genes *NEKs*, denominadas *NEK1-7* (KANDLI *et al.*, 2000), sendo a proteína Nek2 a mais conhecida da família (FRY *et al.*, 1998). Por fim, aurora cinases foram identificadas inicialmente em *S. cerevisiae* e em *Drosophila* (CHAN e BOTSTEIN, 1993; GLOVER *et al.*, 1995), sendo presentes três genes aurora em células de mamíferos, denominados *AURKA*, *AURKB* e *AURKC* (aurora cinase A, B e C, respectivamente) (NIGG, 2001). Durante a mitose, essas cinases descritas têm papel importante na separação e maturação do centrômero (Plk1, Nek2 e aurora A), no ponto de checagem do fuso mitótico (Plk1, aurora B) e na citocinese (Plk1, Nek2, aurora B) (SALAÜN *et al.*, 2008).

A mitose compreende diversos eventos que precisam ser concluídos em um curto período de tempo (revisado em NIGG, 2001 e SALAÜN *et al.*, 2008). Para iniciar a mitose, células inicialmente precisam ter replicado seu DNA e possuir duas cópias íntegras do seu genoma, além de terem duplicado também seu centrômero, o centro de organização de microtúbulos (BETTENCOURT-DIAS e GLOVER, 2007). A partir deste ponto células saem do período chamado de interfase e entram em mitose, progredindo através de cinco fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase; por fim, ocorre a separação das duas células-filhas a partir do processo de citocinese.

Durante a prófase, a cromatina inicia sua condensação em cromossomos, enquanto que os centrômeros passam por um processo de maturação no qual ocorre o recrutamento de proteínas envolvidas na nucleação do microtúbulo mitótico (BETTENCOURT-DIAS e GLOVER, 2007). Além disso, durante a prófase ocorre a separação dos centrômeros e sua migração para os pólos opostos do núcleo (NIGG, 2001; BETTENCOURT-DIAS e GLOVER, 2007). Por fim, nesta primeira fase da mitose ocorre o início da desestruturação do envelope nuclear (GÜTTINGER *et al.*, 2009). A prometáfase é caracterizada pela conclusão da dissolução da membrana nuclear, e pela nucleação de microtúbulos à procura de cromossomos, formando uma estrutura radial denominada áster (WALCZAK *et al.*, 2010). A ligação de microtúbulos aos cromossomos ocorre pelo cinetócoro, uma estrutura protéica especializada associada com os centrômeros dos cromossomos mitóticos (PRZEWLOKA e GLOVER, 2009).

Durante a metáfase, os cromossomos atingem seu estado máximo de condensação. Nesta fase é possível observar a formação do fuso mitótico

(WITTMANN *et al.*, 2001; WALCZAK *et al.*, 2010). Para isso ocorrer, cada par de cromossomos deve apresentar seus dois cinetócoros ligados a microtúbulos nucleados a partir de centrossomos opostos, de forma que as cromátides-irmãs se separem e sigam em direções opostas no fim da mitose. Durante esse processo, a formação do fuso é controlada pela instabilidade dinâmica dos microtúbulos (WALCZAK *et al.*, 2010). Ao fim da metáfase ocorre o ponto de checagem do fuso mitótico, que avalia se o fuso está sob tensão e com todos os cromossomos ligados e alinhados na placa metafásica (PRZEWLOKA e GLOVER, 2009). As células permanecerão retidas na metáfase até essas condições serem atingidas. Na anáfase há a degradação das coesinas, proteínas que mantêm as cromátides-irmãs unidas (NASMYTH e HAERING, 2009), e cada cromátide-irmã é puxada em direção ao centrossomo correspondente. Na telófase, há a reestruturação do envelope nuclear ao redor de cada grupo de cromossomos das células-filha (GÜTTINGER *et al.*, 2009).

A citocinese, cuja preparação ocorre em paralelo com as outras fases da mitose, conclui o processo de divisão celular. Ela é dividida em quatro etapas: iniciação, contração, inserção da membrana e finalização (BARR E GRUNEBERG, 2007). Durante a anáfase ocorre a formação do anel contrátil sob a membrana plasmática, um agrupamento dinâmico de filamentos de actina, miosina II e outras proteínas estruturais e regulatórias necessárias para a fase de contração (EGGERT *et al.*, 2006). Durante a contração, o anel corta a células em duas pela atividade dos filamentos de actina e miosina. Há ainda a formação de uma nova membrana abaixo do anel contrátil por tráfego e fusão de vesículas (BARR e GRUNEBERG, 2007), que auxilia na separação física das células (STEIGEMANN e GERLICH, 2009), dando conclusão ao ciclo celular com a geração de duas novas células.

Ao fim da mitose, a atividade de todas as CDKs é inibida pela ativação do complexo promotor de anáfase/ciclossomo (APC/C), uma proteína E3 ligase responsável por marcar ciclinas para degradação (PETERS, 2006). Ciclina B é a última a ser degradada, processo que ocorre durante a metáfase, após o ponto de checagem do fuso mitótico (ACQUAVIVA e PINES, 2006; VAN LEUKEN *et al.*, 2008). Este mecanismo de degradação de ciclinas B é mantido até o início da fase S, onde APC/C é inibida por CDK2-ciclina A e pela proteína Emi1 (LUKAS *et al.*, 1999; HSU *et al.*, 2002), assegurando que esta ciclina somente acumule durante a fase G₂ e parte da mitose.

1.1.3. Ciclo celular e câncer

Desde o início da década de 1990, muitos estudos ilustraram a relevância da desregulação do ciclo celular no câncer. Células malignas têm em comum a aquisição de algumas características essenciais, resultantes de alterações na fisiologia celular, que juntas ditam o desenvolvimento e crescimento tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2000, 2011). Duas dessas características são a auto-suficiência de sinais proliferativos e a insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento celular, que juntas contribuem para o descontrole do ciclo celular (MALUMBRES e BARBACID, 2001; MASSAGUE, 2004). Além disso, muitas células adquirem instabilidade cromossômica, um defeito responsável por mudanças numéricas nos cromossomos, e que está diretamente ligado ao ciclo celular. (KASTAN e BARTEK, 2004; KOPS *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos mostram a importância das vias de sinalização ativadas por fatores extracelulares que estimulam a expressão de ciclinas e a proliferação. Proteínas envolvidas nessa sinalização incluem receptores de membrana, como receptores tirosina-kinases e receptores acoplados à proteína G, ou proteínas transdutoras de sinal, como Ras e fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K). Superexpressão ou mutações que causam ativação constitutiva nessas proteínas são comuns em câncer (MASSAGUÉ, 2004). Exemplos em receptores tirosina-kinases incluem mutações no receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) em carcinomas de pulmão, cabeça e pescoço, cólon, e glioblastomas; superexpressão de HER-2 (EGFR-2 humana) em câncer de mama; e mutações nos receptores do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e receptores Kit em sarcomas gastrointestinais (SAWYERS, 2003; GSCHWIND *et al.*, 2004). Por sua vez, é observado também um papel dos receptores de prostaglandina associados à proteína G EP2 e EP4 em câncer de cólon (DORSAM e GUTKIND, 2007). Mutações ativadoras de Ras são encontradas em vários tipos de carcinoma (DOWNWARD, 2003; COLEMAN *et al.*, 2004), assim como mutações e ampliações de PI3K e da proteína-quinase Akt (ou proteína-quinase B, PKB) (VIVANCO e SAWYERS, 2002). Alguns supressores de tumor são reguladores negativos de vias de sinalização mitogênicas, e por sua vez são comumente inativados em células tumorais. Por exemplo, a perda da fosfatase de lipídios PTEN, cuja atividade antagoniza com a de PI3K, é vista em diversas malignidades (VIVANCO e SAWYERS, 2002).

Diversos componentes do ciclo celular que orquestram a transição G₁/S estão envolvidos na carcinogênese (SHERR, 1996). Ciclina D1 está superexpressa

em diversos tumores como resultado da amplificação ou translocação de seu locus localizado no cromossomo 11q13 (MOTOKURA *et al.*, 1991; HUNTER e PINES, 1994; HALL e PETERS, 1996; SHERR, 1996). Foi demonstrado uma mutação de CDK4 em melanoma que impede a ligação com proteínas INK4 (WOLFEL *et al.*, 1995), sendo este efeito foi posteriormente identificado para CDK6 (EASTON *et al.*, 1998). Os genes de CDK4 e CDK6 também apresentam amplificação em diversas malignidades, como sarcoma, glioma, linfoma, melanoma, e cânceres de mama (MALUMBRES e BARBACID, 2009). Tanto CDK2 quanto CDK1 apresentaram superexpressão em alguns tipos de adenoma de cólon (YAMAMOTO *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 1999). A tumorigênese também pode ser influenciada por diferentes CKIs como, por exemplo, o gene $p16^{INK4a}$, que está alterado em vários tumores e pode ser inativado por deleção, mutações pontuais ou hipermetilação (KAMB, 1998). Os genes de $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$, que se encontram próximos no cromossomo 9, são simultaneamente perdidos em alguns casos (HARPER e ELLEDGE, 1996). Já $p27^{Kip1}$ apresenta baixa expressão em alguns tumores humanos (TSIHLIAS *et al.*, 1999). A perda de função de Rb está associada com progressão irrestrita do ciclo celular. Esta proteína encontra-se frequentemente mutada em retinoblastomas e em câncer de pulmão (KNUDSON, 1971; HALL e PETERS, 1996), e perda de sua função foi associada à leucemia linfoblástica aguda (LLA) (TSAI *et al.*, 1996). Ultimamente, um papel importante dos fatores E2F tem surgido em cânceres, com amplificações descritas em diversas malignidades (CHEN *et al.*, 2009). Em resumo, aproximadamente 90% dos cânceres humanos apresentam anormalidades em algum componente da via de Rb (HALL e PETERS, 1996).

O genoma de células eucariotas está sob constante ataque de agentes ambientais, como radiação ultravioleta, radiação ionizante, e químicos genotóxicos, e de agentes endógenos como espécies reativas de oxigênio. Esses agentes causam modificações como quebras simples ou duplas na fita de DNA, ligações entre bases, erros de pareamento, inserções ou deleções, que se não corrigidas podem causar o acúmulo de mutações em diversos genes, incluindo os responsáveis pelo controle ou progressão do ciclo celular (FRIEDBERG, 2001; NIIDA e NAKANISHI, 2006). O dano ao DNA induzido em células em proliferação resulta na ativação do ponto de checagem para análise de integralidade do DNA, levando à parada do ciclo celular e o recrutamento da maquinaria de reparo, e evitando dessa forma que a informação genética incorreta seja transmitida para as células-filha (revisado em NIIDA e NAKANISHI, 2006; HOUTGRAAF *et al.*, 2006).

Um dos principais componentes envolvidos no ponto de checagem e no reparo de erros no DNA é o fator de transcrição p53 (SENGUPTA e HARRIS, 2002; MEEK, 2009). p53 é conhecido por ser capaz de induzir supressão de tumores (VOGELSTEIN *et al.*, 2000; LOWE *et al.*, 2004; VOUSDEN e LANE, 2007), e considera-se atualmente que as funções desta proteína são perdidas na maioria dos tumores humanos, tanto por mutações esporádicas no gene *TP53* (LEVINE *et al.*, 1991; HOLLSTEIN *et al.*, 1991; HAINAUT e HOLLSTEIN, 2000), ou por alterações em genes dos reguladores cruciais de p53, como ARF e proteínas MDM (KAMIJO *et al.*, 1998; SHERR, 2001; ONEL e CORDON-CARDO, 2004; DANOVI *et al.*, 2004). Evidências sugerem que p53 não influencia a taxa de iniciação ou mutações de tumores, mas previne a progressão maligna das células tumorais (KEMP *et al.*, 1993; SANDS *et al.*, 1995; CHEN *et al.*, 2005). De fato, restauração da expressão de p53 é capaz de promover regressão e eliminação de tumores *in vivo* (VENTURA *et al.*, 2007; XUE *et al.*, 2007).

No início do século XX, o zoologista alemão Theodor Boveri propôs que uma constituição anormal de cromossomos pode dar origem ao câncer. Atualmente é bem conhecido que um número aberrante de cromossomos na célula, denominado aneuploidia, é uma característica genética comum em vários tumores humanos (WEAVER e CLEVELAND, 2006). A aneuploidia é causada por erros na distribuição de cromossomos durante a mitose (HOLLAND e CLEVELAND, 2009). O ponto de checagem de fuso mitótico é um mecanismo de segurança que, como foi dito anteriormente, inibe a entrada de células em mitose na anáfase até que todos os cromossomos tenham se ligado de forma correta aos microtúbulos do fuso (WITTMANN *et al.*, 2001; WALCZAK *et al.*, 2010). Já foram descritas mutações e alterações na expressão de diversos componentes do ponto de checagem do fuso em câncer de pulmão, ovário, mama, colo-retal, e em alguns tipos de leucemias (WEAVER e CLEVELAND, 2006). Aneuploidia pode preceder a transformação maligna, como é observado em lesões pré-cancerosas no cérvix (RIED *et al.*, 1999; DUENSING e MUNGER; 2004), em cabeça e pescoço (AI *et al.*, 2001), no cólon (RIED *et al.*, 1999; CARDOSO *et al.*, 2006), no esôfago (DOAK *et al.*, 2004) e na medula óssea (AMIÉL *et al.*, 2005). Além disso, foi mostrado que um número anormal de cromossomos é capaz de alterar a transcrição global da célula (UPENDER *et al.*, 2004), o que pode levar a um aumento na expressão de genes que promovem proliferação e diminuição na expressão de genes de controle do ciclo celular.

1.2. Corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos são inclusões intracelulares citoplasmáticas de compartimentalização e estocagem de lipídios. São organelas heterogêneas com respeito ao tamanho e composição, e referidas por diferentes termos na literatura como “*lipid droplets*”, “*lipid bodies*”, “*lipid globules*” ou “*adiposomes*” (MURPHY, 2001; MARTIN e PARTON, 2006). Corpúsculos lipídicos são descritos como uma das duas maiores formas de composição lipídica em sistemas biológicos, a outra sendo as bicamadas lipídicas que formam a matriz de todas as membranas celulares (MURPHY, 2001).

Corpúsculos lipídicos eram associados principalmente a tecidos que exercem um papel no acúmulo ou transporte de lipídios em animais e plantas, como no tecido adiposo e no fígado em mamíferos, ou em frutas e sementes de plantas (MURPHY, 2001). Já em microorganismos como leveduras e em diversos procariotos, a indução do acúmulo de corpúsculos lipídicos era observada em resposta a um estresse ambiental, como limitação de nitrogênio ou estresse osmótico (MURPHY, 2001; WÄLTERMANN e STEINBÜCHEL, 2005). Em síntese, corpúsculos lipídicos eram descritos como sítios de estocagem, e metabolicamente inativos em termos de funções celulares. Contudo, a partir do advento de novas técnicas de análise, corpúsculos lipídicos foram encontrados em praticamente todos os tipos celulares (MURPHY, 2001; MARTIN e PARTON, 2006), e atualmente são considerados organelas dinâmicas e funcionalmente ativas. Sugere-se o envolvimento de corpúsculos lipídicos nas mais variadas funções como no metabolismo e tráfego de lipídios, na sinalização celular e na produção de mediadores inflamatórios (MARTIN e PARTON, 2006; BOZZA *et al.*, 2009; BOZZA e VIOLA, 2010).

1.2.1. Estrutura e morfologia de corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos são compostos por uma monocamada de fosfolípidios anfipáticos, glicolipídios e esteróides que circundam um núcleo hidrofóbico composto por lipídios neutros, como triacilgliceróis (TAGs), diacilgliceróis, ésteres de colesterol, ésteres de retinil e colesterol livre (ZWEYTICK *et al.*, 2000; MURPHY, 2001; TAUCHI-SATO *et al.*, 2002; MARTIN e PARTON, 2005), além de proteínas variadas associadas. A quantidade e proporção de lipídios neutros presentes no núcleo dessas organelas são variáveis e dependem do tipo celular. Além disso, análise da composição de ácidos graxos dos fosfolípidios de corpúsculos lipídicos revelou que

os fosfolipídios presentes na superfície de corpúsculos lipídicos são estruturalmente diferentes dos fosfolipídios presentes nas membranas do retículo endoplasmático rugoso, ou dos microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002). Fosfatidilcolina é o principal fosfolipídio encontrado na monocamada que circunda corpúsculos lipídicos, seguido por fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, e espécies éter-ligadas com colina ou etanolamina como grupo polar (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002; BARTZ *et al.*, 2007). Moléculas de lisofosfatidilcolina com ácidos graxos insaturados e moléculas de fosfatidilcolina contendo duas cadeias de acila monoinsaturadas são encontradas unicamente e em abundância na superfície de corpúsculos lipídicos (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002).

Corpúsculos lipídicos podem ser visualizados através de microscopia óptica ou eletrônica. É possível identificar estas organelas em microscopia óptica utilizando fixação apropriada com paraformaldeído (DIDONATO e BRASAEMLE, 2003) e marcação com tetróxido de ósmio (WELLER *et al.*, 1991; BOZZA *et al.*, 1996b), com sondas fluorescentes hidrofóbicas como Nile red (GREENSPAN *et al.*, 1985), ou com lipídeos conjugados a sondas fluorescentes, como Bodipy[®] (DIDONATO e BRASAEMLE, 2003). No nível ultraestrutural, corpúsculos lipídicos se apresentam como estruturas esféricas constituídas de um núcleo com material de densidade eletrônica variada, circundado por uma linha eletrodensa medindo cerca de 2-2,5 nm de espessura (DVORAK, 1991; TAUCHI-SATO *et al.*, 2002). Isso demonstra que corpúsculos lipídicos são delimitados por uma monocamada de fosfolipídeos. Uma particularidade destas organelas é sua osmiofilia, que varia refletindo sua constituição lipídica entre diferentes tipos celulares, e que pode ser alterada a partir de estímulos distintos (MELO *et al.*, 2003; FABRINO *et al.*, 2004; MELO *et al.*, 2006; D'AVILA *et al.*, 2006). Essas organelas podem ainda apresentar variações em seu tamanho, desde organelas recém-formadas medindo 50 nm de diâmetro até corpúsculos lipídicos de 200 µm diâmetro encontrados em adipócitos maduros (MURPHY e VANCE, 1999; MURPHY, 2001), e seu número ou dimensões podem variar com ativação celular dependente de condições como inflamação, infecções ou neoplasias (WELLER *et al.*, 1989; PACHECO *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2003; D'AVILA *et al.*, 2006; MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008; ACCIOLY *et al.*, 2008). Corpúsculos lipídicos podem ser encontrados não só no citosol (MURPHY, 2001), como também podem ser secretados como lipoproteínas (OLOFSSON *et al.*, 1999; HUSSAIN, 2000) ou como glóbulos lipídicos por células epiteliais mamárias (KEENAN, 2001).

Supõe-se que as diversas funções descritas para corpúsculos lipídicos estão relacionadas à sua composição protéica, que compreende enzimas de metabolismo e transporte de ácidos graxos, enzimas formadoras de mediadores inflamatórios (BOZZA *et al.*, 2007), citocinas, proteínas da família Rab (LIU *et al.*, 2004) e proteínas cinases (YU *et al.*, 1998; YU *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2002), além de proteínas estruturais envolvidas na biogênese e mobilização dessas organelas (BRASAEMLE, 2007; BICKEL *et al.*, 2009) e estruturas ribossomais e proteínas associadas ao RNA (DVORAK *et al.*, 2003; WAN *et al.*, 2007).

É possível observar a associação de corpúsculos lipídicos com outras organelas e estruturas citoplasmáticas. As associações mais bem documentadas são com as cisternas do retículo endoplasmático, que frequentemente são vistas envolvendo corpúsculos lipídicos (BOZZA *et al.*, 1997; MARTIN e PARTON, 2005; OZEKI *et al.*, 2005). Foi observada a interação entre corpúsculos lipídicos e mitocôndrias em monócitos (WAN *et al.*, 2007) e em células epiteliais de intestino (ACCIOLY *et al.*, 2008). Além disso, foi vista a associação de corpúsculos lipídicos com peroxissomos em células da linhagem COS-7 (SCHRADER, 2001), enquanto que Binns e colaboradores mostraram que esta interação em leveduras promove o acoplamento da lipólise nessas organelas com a β -oxidação de ácidos graxos em peroxissomos (BINNS *et al.*, 2006). Corpúsculos lipídicos também estão associados à membrana perinuclear em leucócitos (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001a) e células epiteliais de cólon (ACCIOLY *et al.*, 2008). Além disso, corpúsculos lipídicos podem interagir com o citoesqueleto, tanto com filamentos intermediários como vimentina (FRANKE *et al.*, 1987) quanto com microtúbulos (POL *et al.*, 2004; BOSTRÖM *et al.*, 2005). Por fim, pode ocorrer relocação de corpúsculos lipídicos em leucócitos fagocíticos em resposta a infecções, onde é possível observar interação dessas organelas com fagossomos (MELO *et al.*, 2003; VAN MANEN *et al.*, 2005; MELO *et al.*, 2006; D'AVILA *et al.*, 2006).

1.2.2. Biogênese de corpúsculos lipídicos

Embora se conheça bastante sobre morfologia e composição de corpúsculos lipídicos, o mecanismo de formação destas organelas ainda não foi totalmente esclarecido. Por outro lado, alguns modelos hipotéticos foram propostos para explicar a biogênese de corpúsculos lipídicos, e todos partilham a concepção de que essas organelas são originadas e estão intimamente relacionadas com o retículo endoplasmático (MARTIN e PARTON, 2006; BOZZA *et al.*, 2009). Estes modelos se

baseiam na transferência de lipídios e proteínas do retículo endoplasmático para corpúsculos lipídicos em formação, e algumas linhas de evidência suportam esta ideia. Como foi descrito anteriormente, sua associação mais bem documentada são as com cisternas do retículo endoplasmático. Além disso, proteínas residentes em retículo endoplasmático foram encontradas em preparados de corpúsculos lipídicos (BRASAEMLE *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; UMLAUF *et al.*, 2004). Já Pol e colaboradores utilizaram uma versão mutada e fluorescente da proteína caveolina (cav3^{DGV}-YFP) para avaliar a formação de corpúsculos lipídicos em tempo real. Em células mantidas em privação de soro, onde não houve presença detectável dessas organelas, a proteína cav3^{DGV}-YFP acumulou-se exclusivamente no retículo endoplasmático. Com a adição de ácido oléico, foi observada a rápida formação de novos corpúsculos lipídicos contendo a proteína cav3^{DGV}-YFP incorporada (POL *et al.*, 2004). Outro estudo conduzido por Gubern e colaboradores mostrou que a enzima fosfolipase A2 α citosólica (cPLA2- α) é fundamental para biogênese de corpúsculos lipídicos, e que sua inibição causou o aparecimento de estruturas tubulovesiculares relacionadas com o retículo endoplasmático liso (GUBERN *et al.*, 2008).

Três modelos principais foram propostos para explicar a formação de corpúsculos lipídicos (Figura 1.2). Um dos primeiros modelos sugere que corpúsculos lipídicos derivam de um “brotamento” da membrana do retículo endoplasmático, o que explicaria sua organização em um núcleo de lipídios neutros rodeados por uma monocamada de fosfolipídios (MURPHY *et al.*, 2001, TAUCHI-SATO *et al.*, 2002; MARTIN e PARTON, 2006) (Figura 1.2.A). Lipídios neutros seriam sintetizados pelas enzimas acil-Coa colesterol aciltransferase (ACAT) e acil-CoA diacilglicerol aciltransferase (DGAT), ambas presentes no retículo endoplasmático em duas isoformas: ACAT1 e ACAT2, e DGAT1 e DGAT2, respectivamente a partir de colesterol livres e ácidos graxos (CHANG *et al.*, 2006; TURKISH e STURLEY, 2007). O depósito desses lipídios recém-sintetizados seria feito entre as duas camadas da membrana do retículo. Após atingir uma concentração crítica esse acumulado de lipídios brotaria em direção a citoplasma, levando consigo uma parte do folheto citoplasmático da membrana do retículo, que se organizaria como uma monocamada de fosfolipídios delimitando o corpúsculo lipídico recém-formado.

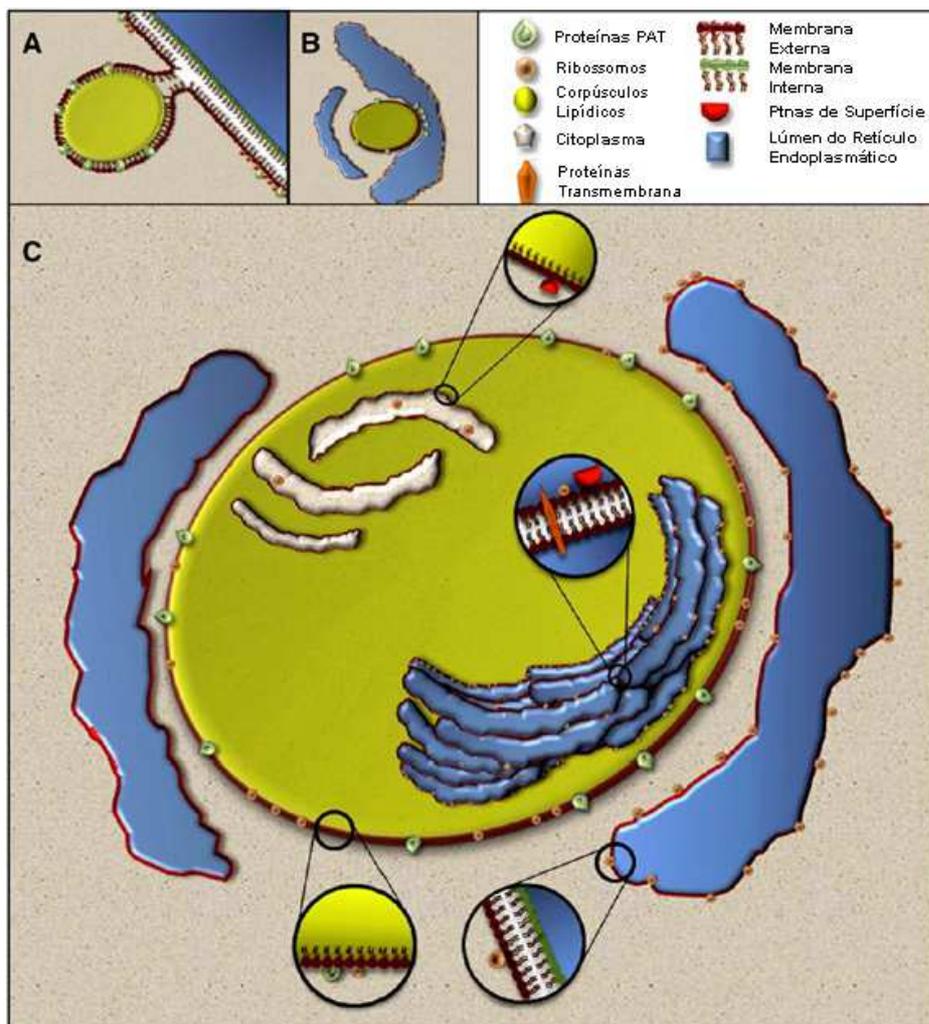


Figura 1.2. Biogênese e estrutura de corpúsculos lipídicos. Três modelos de biogênese de corpúsculos lipídicos estão mostrados: (A) formação de massa de lipídios neutros, sintetizada por enzimas e depositada entre as duas camadas da membrana do retículo endoplasmático, seguido pelo brotamento da estrutura lipídica para o citoplasma; (B) formação de corpúsculos lipídicos em domínios do retículo endoplasmático em forma de cálice e ricos em proteínas PAT, uma família de proteínas estruturais e corpúsculos lipídicos; (C) formação de corpúsculos lipídicos por incorporação de domínios membranosos do retículo endoplasmático, contendo proteínas de superfície, proteínas transmembrana e ribossomos em seu interior (no detalhe). Adaptado de BOZZA et al., 2009.

Um modelo alternativo de biogênese foi baseado em resultados obtidos por microscopia de criofratura, no qual estruturas membranares consistentes com a membrana do retículo endoplasmático foram observadas em contato próximo com estruturas identificadas como corpúsculos lipídicos (Figura 1.2.B). Robenek e colaboradores postulam que a biogênese dessas organelas ocorre próximo ao retículo, em regiões compartimentalizadas em formato de cálice, onde haveria o transporte e depósito de lipídios mediado por proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos (ROBENEK *et al.*, 2006). Paralelamente, Wan e colaboradores mostraram por microscopia eletrônica a presença de domínios de membrana e ribossomos incorporados ao núcleo lipídico dessas organelas (WAN *et al.*, 2007) (Figura 1.2.C).

Estes autores sugerem um modelo de biogêneses que implica na incorporação de estruturas de membranas lamelares derivados do retículo endoplasmático no interior de corpúsculos lipídicos (WAN *et al.*, 2007; BOZZA *et al.*, 2009). De acordo com este modelo, corpúsculos lipídicos poderiam incorporar e acomodar proteínas transmembrana não somente na periferia dessas organelas, mas também em seu interior, como são comumente detectadas (DVORAK *et al.*, 1993; BOZZA *et al.*, 1997; BOZZA *et al.*, 1998).

Corpúsculos lipídicos recém-formados podem aumentar de tamanho devido à acreção de ésteres de lipídios por diversos mecanismos, que podem incluir o depósito de lipídios em um acoplamento contínuo de corpúsculos lipídicos ao retículo endoplasmático, síntese *de novo* por enzimas presentes em corpúsculos lipídicos já formados, ou por fusão de corpúsculos lipídicos (FUJIMOTO *et al.*, 2008; OHSAKI *et al.*, 2008, KHOR *et al.*, 2013). Até recentemente, supunha-se que a síntese e depósito de ésteres de lipídios em corpúsculos lipídicos ocorriam somente durante a interação entre essas organelas e o retículo endoplasmático. No entanto, um estudo recente descreveu a translocação de isoenzimas envolvidas nas etapas da síntese de triacilgliceróis do retículo endoplasmático para um subgrupo de corpúsculos lipídicos nascentes, onde permanecem associados de forma estável (WILFLING *et al.*, 2013). Essas enzimas eram capazes de catalizar a síntese de triacilgliceróis em corpúsculos lipídicos, levando a um aumento no diâmetro dessas organelas (WILFLING *et al.*, 2013).

A fusão mutual de corpúsculos lipídicos é outro mecanismo proposto para crescimento dessas organelas, como demonstrado através de imagens sequenciais “*time lapse*” (BOSTRÖM *et al.*, 2005). A presença de proteínas do complexo SNARE (receptor de SNAP) em corpúsculos lipídicos sugere que esta fusão possa ocorrer de forma similar à fusão de vesículas (BOSTRÖM *et al.*, 2007). No entanto, o resultado desta fusão pode ser diferente devido às diferenças estruturais entre corpúsculos lipídicos e vesículas aquosas; enquanto o volume aquoso das vesículas é capaz de se ajustar de acordo com a disponibilidade de fosfolipídios da membrana, o volume total de lipídios resultante da fusão não se altera, causando uma diferença na proporção entre a superfície e o volume do corpúsculo lipídico fusionado e, portanto, um excesso de membrana (FUJIMOTO *et al.*, 2008). Murphy e colaboradores confirmaram estas suposições através de análise quantitativa em tempo real, utilizando fusógenos químicos para induzir fusão de corpúsculos lipídicos em adipócitos e fibroblastos (MURPHY *et al.*, 2010). O excesso de

fosfolipídios e possíveis proteínas associadas podem ser descartados, utilizados em outros processos celulares ou, alternativamente, incorporados ao núcleo de corpúsculos lipídicos, sendo esta outra hipótese que justifica a presença de estruturas membranares e as inúmeras proteínas observadas no interior dessas organelas por diferentes técnicas (BOZZA *et al.*, 1997, 1998; ROBENEK *et al.*, 2004, 2005; WAN *et al.*, 2007).

A biogênese de corpúsculos lipídicos é um processo induzido, altamente regulado, e depende de estímulos específicos em cada tipo celular. Na presença de proteínas como interleucinas e quimiocinas, leucócitos rapidamente formam corpúsculos lipídicos mesmo na ausência de lipídios exógenos (BOZZA *et al.*, 1998; BARTEMES *et al.*, 1999; BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b, 2002b, PACHECO *et al.*, 2007). Em neutrófilos, corpúsculos lipídicos são induzidos *in vitro* após estímulo com fator ativador de plaquetas (PAF), ativadores da proteína cinase C (PKC) ou ácidos graxos *cis*-insaturados como ácido oléico ou ácido araquidônico (WELLER *et al.*, 1989, 1991b; BOZZA *et al.*, 1996a, 1996b). Aumento na biogênese de corpúsculos lipídicos em neutrófilos e macrófagos também foi observado após indução de inflamação por lipopolissacarídeos (LPS) ou lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), mas não por LDL nativa (PACHECO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2002). Recentemente foi descrito em macrófagos a formação de novos corpúsculos lipídicos após estímulo por leptina, mostrando um papel fundamental das proteínas fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) e mTOR na biogênese dessas organelas (MAYA-MONTEIRO *et al.*, 2008).

Tentativas de caracterização das cascatas intracelulares de sinalização relacionadas à biogênese de corpúsculos lipídicos revelaram que, dependendo do estímulo, vias distintas podem acionar a formação de novas organelas. Em leucócitos, por exemplo, PAF atua em seu receptor acoplado à proteína G e induz formação de corpúsculos lipídicos via PKC e ativação da fosfolipase C (PLC) (BOZZA *et al.*, 1996a, 1997, 1998). Em contraste, a ativação de outros receptores acoplados à proteína G, como os receptores de IL-8, C5a e leucotrieno B₄ (LTB₄) não induzem biogênese. Além disso, quimiocinas atuando via receptores CCR3 como RANTES e eotaxina podem iniciar este processo em eosinófilos e basófilos, mas não em neutrófilos (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b; VIEIRA-DE-ABREU *et al.*, 2005). Biogênese de corpúsculos lipídicos mediada por receptores CCR3 é mediada por ativação de proteínas mitogênicas como MAP cinases, PI3K e tirosina-cinases, e não por PKC ou PLC como ocorre com ativação por PAF (BANDEIRA-MELO *et al.*,

2001b). Ainda ilustrando esta especificidade de estímulo e sinalização, prostaglandina D₂ (PGD₂) é capaz de induzir diretamente a biogênese de corpúsculos lipídicos em eosinófilos, mas não em macrófagos, apesar de ambas as células expressarem receptores funcionais de PGD₂ (MESQUITA-SANTOS *et al.*, 2006).

A biogênese de corpúsculos lipídicos é um processo dinâmico, onde é possível observar a formação de novas organelas até uma hora após o estímulo. Portanto, questionou-se a necessidade de síntese protéica neste processo. Pré-tratamento de leucócitos com inibidores da síntese protéica causou a inibição parcial da formação de novos corpúsculos lipídicos induzidos por PAF (BOZZA *et al.*, 1997) mostrando que, dependendo do estímulo, a síntese de novas proteínas e a ativação de alguns genes precoces é necessária para este processo ocorrer (BOZZA *et al.*, 1996a, 1996b, 1997; BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b; PACHECO *et al.*, 2002). Em relação à expressão gênica, foi mostrado o papel desempenhado pelos receptores ativados por proliferador de peroxissomos (PPARs), fatores de transcrição membros da família de genes de receptores nucleares, durante a diferenciação de macrófagos (NAGY *et al.*, 1998; TONTONNOZ *et al.*, 1998). Ligantes específicos para PPAR γ potencializam a formação de novos corpúsculos lipídicos induzidos por oxLDL, por agonistas semelhantes a PAF, e pelo fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), sugerindo um papel importante para PPAR nesse processo (DE ASSIS *et al.*, 2003; INAZAWA *et al.*, 2003).

Além de leucócitos, as diferentes vias de sinalização envolvidas na biogênese de corpúsculos lipídicos foram avaliadas em outros tipos celulares. Em células epiteliais, foi observada a biogênese de corpúsculos lipídicos após tratamento com ácidos graxos insaturados, envolvendo atividade de PI3K e p38 cinase (MOREIRA *et al.*, 2009). Foi demonstrada a importância de fosfolipase D1 e de ERK2 na formação de corpúsculos lipídicos tanto em fibroblastos quanto em sistema livre de células (ANDERSSON *et al.*, 2006). Outro estudo mostrou um papel crucial da proteína P311 na indução de corpúsculos lipídicos por ácido retinóico em fibroblastos pulmonares (LEUNG *et al.*, 2008). Já Gubern e colaboradores mostraram que a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por soro depende de fosforilação da enzima cPLA2- α no resíduo Ser⁵⁰⁵ em diversos tipos celulares, sugerindo um papel central desta enzima neste processo (GUBERN *et al.*, 2008). Mais recentemente, o mesmo grupo mostrou que as proteínas JNK e ceramida-cinase são responsáveis pela fosforilação de cPLA2- α requerida para a síntese de

corpúsculos lipídicos (GUBERN *et al.*, 2009). As proteínas Prp19p e FSP27 (proteína específica de gordura 27) foram identificadas como constituintes de corpúsculos lipídicos e necessárias para sua biogênese em adipócitos de camundongos (CHO *et al.*, 2007; PURI *et al.*, 2007; NISHINO *et al.*, 2008). Um homólogo de seipina, proteína envolvida na Lipodistrofia Congênita de Berardinelli-Seip (BSCL), também é importante na biogênese e manutenção de corpúsculos lipídicos em leveduras (SZYMANSKI *et al.*, 2007; FEI *et al.*, 2008). Já em células endoteliais foi observada a formação de corpúsculos lipídicos durante hipóxia, mediada por PKC e sinalização dependente de tirosinas cinases (SCARFO *et al.*, 2000).

1.2.3. Família de proteínas PAT

Corpúsculos lipídicos contêm inúmeras proteínas funcionalmente diversas. Dentre elas, um grupo de proteínas tem um papel fundamental na sua formação, manutenção, modificação e involução. Juntas compõem a família PAT de proteínas estruturais, nomeada a partir dos seus três membros mais conhecidos: Perilipina, ADRP (Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócitos, também chamada de perilipina 2, adipofilina ou ADFP) e TIP47 (Proteína de Interação de Cauda de 47 kDa, também chamada de perilipina 3 ou PP17). Também fazem parte da família as proteínas S3-12 (perilipina 4) e OXPAT, esta última também chamada de perilipina 5, Proteína de Corpúsculos Lipídicos do Miocárdio (MLDP) ou *Lipid Storage Droplet Protein 5* (LSDP5) (LONDOS *et al.*, 2005; BRASAEMLE, 2007; BICKEL *et al.*, 2009, KIMMEL *et al.*, 2010) (Figura 1.3). Os membros da família PAT diferem entre si em tamanho, tecidos expressos, afinidade por corpúsculos lipídicos, estabilidade e regulação transcricional (BICKEL *et al.*, 2009). Estas diferenças implicam que cada proteína PAT possui funções celulares distintas, mas todas regulam a interface entre corpúsculos lipídicos e o ambiente celular.

Os membros perilipina, ADRP e TIP47 são evolutivamente conservados, apresentando proteínas homólogas com funções semelhantes em *Drosophila* e *Dictyostelium* (MIURA *et al.*, 2002). ADRP e TIP47 apresentam a maior conservação de seqüência de aminoácidos, com 47% de identidade. Com exceção da proteína S3-12, esta grande similaridade de seqüência é compartilhada entre os membros da família principalmente em sua porção N-terminal, denominada domínio PAT (BRASAEMLE *et al.* 2007) (Figura 1.3). No entanto, esta seqüência não é imprescindível para a localização em corpúsculos lipídicos, pois construções da

proteína ADRP com ausência ou do domínio PAT ou da sua região C-terminal foram localizadas nessas organelas (MCMANAMAN *et al.*, 2003). Além disso, já foi mostrado que há redundância nas seqüências que especificam o direcionamento de proteínas PAT para corpúsculos lipídicos (MCMANAMAN *et al.*, 2003; NAKAMURA e FUJIMOTO, 2003; TARGETT-ADAMS *et al.*, 2003). Repetições 11-mer, que são encontradas em sinucleínas e apolipoproteínas e tem a predisposição a constituir hélices anfipáticas (BUSSEL e ELIEZER, 2003), assim como acilação, podem estar diretamente envolvidas na ancoragem de proteínas PAT em corpúsculos lipídicos (HEID *et al.*, 1996; HICKENBOTTOM *et al.*, 2004; BULAKINA *et al.*, 2009).

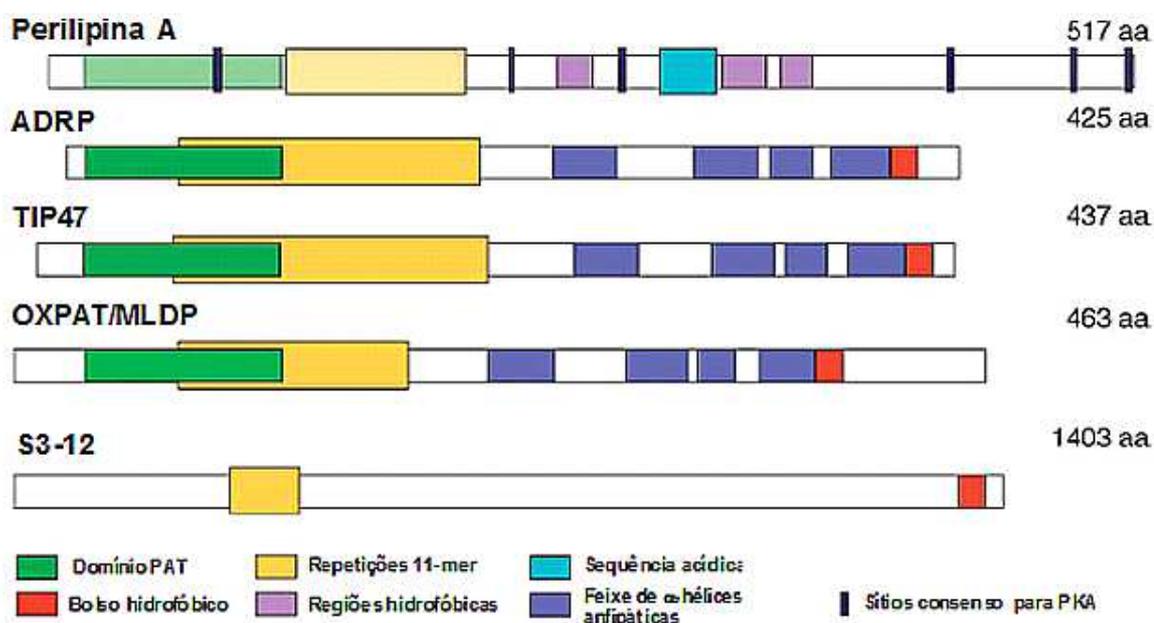


Figura 1.3. Representação esquemática das proteínas da família PAT. Estão representas as características estruturais das proteínas Perilipina A, ADRP, TIP47, OXPAT/MLDP e S3-12 e seus respectivos tamanhos em aminoácidos. A região N-terminal das proteínas PAT, excetuando S3-12, apresenta uma região de 100 aminoácidos bem conservada chamada domínio PAT (verde). Sobreposta a essa região existem seqüências de aminoácidos com repetições 11-mer, supostas a formar hélices anfipáticas (amarelo) (BUSSEL E ELIEZER, 2003). ADRP, TIP47 e OXPAT/MLDP apresentam ainda domínios compostos por feixe de α -hélices anfipáticas (azul escuro) (Hickenbotton *et al.*, 2004). Excetuando perilipina A, proteínas PAT apresentam e, sua porção C-terminal uma região conservada de 14 aminoácidos, que formam um bolso hidrofóbico na proteína TIP47 (vermelho) (HICKENBOTTON *et al.*, 2004). Em contraste, perilipina A apresenta regiões hidrofobias exclusivas (lilás) e um domínio ácido (azul claro), além de ser a única proteína PAT a apresentar sítios consenso de fosforilação por PKA (barras pretas). Figura adaptada de BRASAEMLE, 2007.

Perilipina foi a primeira proteína específica de corpúsculos lipídicos encontrada em células de mamíferos (GREENBERG *et al.*, 1991). São conhecidas três de suas isoformas (A, B e C), geradas por splicing alternativo (BICKEL *et al.*, 2009). Perilipinas funcionam controlando o acesso de lipases ao interior de corpúsculos lipídicos em células em repouso, reduzindo assim a taxa de hidrólise de

triacilgliceróis (SOUZA *et al.*, 1998; BRASAELME *et al.*, 2000; SOUZA *et al.* 2002; TANSEY *et al.*, 2003). Em contraste, a ativação da lipólise mediada por estímulos β -adrenérgicos causa fosforilação de perilipina mediada pela proteína quinase A (PKA), tornando-a um sítio de ancoragem para a lipase hormônio-sensitiva (HSL) (SZTALRYD *et al.*, 2003). Dados obtidos de camundongos deficientes para perilipina são consistentes com este modelo, mostrando redução de massa de gordura, resistência à obesidade, aumento de lipólise basal e diminuição de lipólise estimulada (MARTINEZ-BOTAS *et al.*, 2000; TANSEY *et al.*, 2001).

Foi também relatada a associação de perilipina com outra proteína presente em corpúsculos lipídicos, CGI-58/ABHD5 (*Comparative Gene Identification-58/AB-hydrolase Containing 5*) (YAMAGUCHI *cols.*, 2004), co-ativadora de outra lipase denominada ATGL (Lipase de Triglicerídeos do Tecido Adiposo, também chamada de desnutrina ou fosfolipase A2 ζ) (LASS *et al.*, 2006). Em células em repouso, perilipina seqüestra CGI-58/ABHD5, prevenindo a ativação da hidrólise de triacilglicerol (SUBRAMANIAN *et al.*, 2004; YAMAGUCHI *et al.*, 2007). Após estímulo, a fosforilação de perilipina A por PKA libera CGI-58/ABDH5 para o citoplasma, facilitando a interação proteína-proteína entre CGI-58/ABDH5 e ATGL (SUBRAMANIAN *et al.*, 2004; YAMAGUCHI *et al.*, 2007, GRANNEMAN *et al.*, 2007, 2009).

Dentre as proteínas da família PAT, ADRP é uma das proteínas mais estudadas. A expressão da proteína ADRP é ubíqua, e sua associação com corpúsculos lipídicos foi vista em todos os tipos celulares examinados, sendo considerada uma proteína marcadora específica dessas organelas. ADRP foi inicialmente descrita como um transcrito de RNA induzido durante a diferenciação de adipócitos em cultura, gerando uma proteína de aproximadamente de 50 kDa (JIANG *et al.*, 1992a, 1992b). Posteriormente, uma avaliação por imunocitoquímica revelou que ADRP localiza-se em corpúsculos lipídicos de células da linhagem de adipócitos 3T3-L1, em células de Leydig MA-10, em fibroblastos da linhagem CHO, e em hepatomas humanos da linhagem HepG2 (BRASAEMLE *et al.*, 1997). Análise de diversas linhagens celulares por imunofluorescência também revelou expressão de ADRP em células de diferentes tecidos e espécies (HEID *et al.*, 1998).

Embora a função biológica de ADRP não tenha sido totalmente esclarecida, várias evidências apontam para um papel desta proteína na captação de ácidos graxos, na ligação de ácidos graxos e colesterol, na estocagem de lipídios neutros e na secreção de glóbulos lipídicos do leite (BRASAEMLE *et al.*, 1997; HEID *et al.*,

1998; GAO e SERRERO, 1999; TARGETT-ADAMS *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2011). Além disso, a superexpressão de ADRP foi associada com aumento do número de corpúsculos lipídicos e com aumento do conteúdo de triacilglicerol celular (IMAMURA *et al.*, 2002; NAKAMURA e FUGIMOTO, 2003; LARIGAUDERIE *et al.*, 2004; EDVARDSSON *et al.*, 2006, LISTENBERGER *et al.*, 2007). Foi demonstrado inclusive o aumento na expressão de ADRP em células após incubação com ácidos graxos ou em doenças associadas com acúmulo de gordura celular (WANG *et al.*, 1999; GAO *et al.*, 2000; SETH *et al.*, 2003; TARGETT-ADAMS *et al.*, 2005; FUJII *et al.*, 2009), assim como a partir da ativação do receptor tipo Toll 4 por LPS em macrófagos (FEINGOLD *et al.*, 2010). A expressão gênica de ADRP é regulada por receptores da subfamília de receptores nucleares PPAR, incluindo PPAR α em hepatócitos (EDVARDSSON *et al.*, 2006) e PPAR β/δ em queratinócitos (SCHMUTH *et al.*, 2004). Um elemento responsivo a PPAR (PPRE) foi identificado nos promotores do gene para ADRP humana (TARGETT-ADAMS *et al.*, 2005) e murina (CHAWLA *et al.*, 2003, FAN *et al.*, 2009). Ligantes para receptores PPAR, incluindo ácidos graxos de cadeia longa (GAO *et al.*, 2000, DE WILDE *et al.*, 2010) e agonistas de PPAR (VOSPER *et al.*, 2001; BUECHLER *et al.*, 2001; BILDIRICI *et al.*, 2003; SCHADINGER *et al.*, 2005; DE WILDE *et al.*, 2010) induzem expressão de RNA mensageiro de ADRP, embora esses efeitos variem de acordo com o tipo celular. Também foi descrita a regulação gênica de ADRP mediada por PU.1 e AP-1 em macrófagos estimulados por PMA (WEI *et al.*, 2005) ou ácido oleico (FAN *et al.*, 2009), e por HIF-1 em células da linhagem HepG2 e em células de carcinoma de mama MCF-7 (SAARIKOSKI *et al.*, 2002).

A proteína ADRP pode ser modificada pós-tradução por fosforilação, acilação ou ubiquitinação. Usando espectroscopia de massa, Bartz e colaboradores identificaram um fosfopeptídeo na proteína ADRP humana (serina 291) no fosfoproteoma de corpúsculos lipídicos isolados de células HeLa após tratamento com ácido oléico (BARTZ *et al.*, 2007). Esta serina é conservada na proteína ADRP de murinos, mas sua significância funcional ou a cinase responsável por sua fosforilação ainda não foi descoberta. Análise de ADRP derivada de membranas dos glóbulos lipídicos do leite sugere a acilação desta proteína (HEID *et al.*, 1996), podendo ter um papel na ancoragem destas proteínas em corpúsculos lipídicos. A ubiquitinação de ADRP, por sua vez, está relacionada com direcionamento para degradação pelo proteassomo (XU *et al.*, 2005; MASUDA *et al.*, 2005; HOOPER *et al.*, 2010). Uma construção truncada da proteína ADRP (com remoção dos

aminoácidos 1 a 89) foi resistente à degradação proteossomal em cultura deficiente em lipídios, sugerindo que a região N-terminal da proteína cumpra um papel nesse processo (ORLICKY *et al.*, 2008). Hooper e colaboradores mostraram recentemente o papel da proteína *Spartin* promovendo a poliubiquitinação de ADRP a partir da ativação e recrutamento da proteína E3 ubiquitina ligase AIP4 diretamente para corpúsculos lipídicos (HOOVER *et al.*, 2010). Paralelamente, proteínas ADRP que não estão ligadas a corpúsculos lipídicos também podem ser marcadas para degradação (XU *et al.*, 2005), e sua associação com estas organelas pode ser regulada por complexos protéicos. Nakamura e colaboradores identificaram a interação de ADRP com o fator de ribosilação do ADP (ARF1), e mostraram que expressão de um dominante negativo de ARF1, que mimetiza seu estado quando ligado a GDP, resultou na dissociação de ADRP de corpúsculos lipídicos (NAKAMURA *et al.*, 2004).

Dependendo do estímulo ou do tipo celular, é possível observar uma regulação diferenciada da localização de ADRP em corpúsculos lipídicos. Por exemplo, células de Leydig MA-10 apresentam co-localização das proteínas ADRP e perilipina (BRASAEMLE *et al.*, 1997), enquanto que uma transição na composição de proteínas de corpúsculos lipídicos foi demonstrada durante a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, no qual ADRP é sequencialmente substituída por perilipina (BRASAEMLE *et al.*, 1997). A transição de proteínas ADRP e perilipina também foi observada durante a lipólise estimulada por hormônios em adipócitos, no qual corpúsculos lipídicos previamente revestidos por perilipina regridem, sendo possível visualizar em seu lugar organelas menores contendo ADRP (GROSS *et al.*, 2006). Sugere-se nesse caso que ADRP possa substituir perilipina para manter a estrutura e morfologia de corpúsculos lipídicos reduzidos ou recém-sintetizados. Um mecanismo semelhante foi descrito durante lipólise mediada por incubação com ácido linoléico conjugado (CLA), onde também foi observada a regressão de corpúsculos lipídicos com substituição de perilipina por ADRP em adipócitos, com papel fundamental das vias de ERK e mTOR (CHUNG *et al.*, 2005).

A geração de camundongos deficientes para ADRP revelou a significância desta proteína para o metabolismo lipídico em hepatócitos. Chang e colaboradores descreveram a construção de um camundongo deficiente para a proteína completa de ADRP e não observaram alterações na diferenciação de adipócitos e na formação do tecido adiposo (CHANG *et al.*, 2006). Os animais também apresentaram níveis normais de glicose, insulina e lipídios no plasma (CHANG *et al.*,

2006). No entanto, a deficiência da proteína ADRP completa foi relacionada com redução no conteúdo de TAG em hepatócitos e com atenuação de esteatose causada por dieta rica em gordura, além da diminuição no tamanho e na quantidade de corpúsculos lipídicos notada nessas células (CHANG *et al.*, 2006). Contudo, foi mostrado posteriormente que este camundongo é capaz de produzir uma versão truncada da proteína ADRP em sua porção N-terminal (RUSSEL *et al.*, 2008), o que poderia explicar os efeitos pouco expressivos no metabolismo de lipídios nesses animais quando comparados aos efeitos observados no animal selvagem. Recentemente, um trabalho desenvolveu um novo modelo de camundongo deficiente para ADRP, que desta vez apresentavam a perda completa da síntese protéica (MCMANAMAN *et al.*, 2013). Esses animais apresentavam resistência à obesidade induzida por dieta rica em gordura e aumento de atividade física (MCMANAMAN *et al.*, 2013). Em relação ao tecido adiposo, foi observada uma diminuição no tamanho celular de adipócitos, e uma tendência ao aparecimento de um maior número de adipócitos subcutâneos marrons (MCMANAMAN *et al.*, 2013). Por fim, também foi observada uma diminuição de focos inflamatórios no tecido adiposo, bem como uma redução de esteatose no tecido hepático (MCMANAMAN *et al.*, 2013). Esses dados sugerem que ADRP desempenha um importante papel na homeostasia energética.

A função de outra proteína da família PAT, TIP47, foi avaliada por depleção mediada por RNA de interferência em linhagem de fibroblastos embrionária derivada de camundongos expressando a proteína ADRP truncada (SZTALRYD *et al.*, 2006). Foi observada uma complementação funcional de TIP47 nessas células, já que esta proteína substitui ADRP como a proteína PAT preponderante em corpúsculos lipídicos. A deficiência combinada de ambas as proteínas levou a uma maior síntese de fosfolipídeos em detrimento a TAGs a partir de ácidos graxos exógenos, causando uma pequena redução na formação de corpúsculos lipídicos nessas células (SZTALRYD *et al.*, 2006). Já Bell e colaboradores inibiram a expressão de ADRP e TIP47 em células hepáticas da linhagem AML12, e observaram um aumento no tamanho de corpúsculos lipídicos causado possivelmente por desregulação do controle de fusão dessas organelas (BELL *et al.*, 2008). Este estudo também mostrou que depleção das duas proteínas causou insensibilidade à insulina nessas células, processo que foi revertido com inibição da expressão da lipase ATGL. Ambos os modelos também mostraram um aumento da lipólise após depleção de TIP47 e ADRP. Esses estudos mostram evidências de que a regulação

de proteínas PAT tem influência no metabolismo lipídico. Mais recentemente, foi demonstrado que TIP47 é fundamental para a biogênese de corpúsculos lipídicos em células HeLa (BULANKINA *et al.*, 2009).

Outras funções foram propostas para TIP47 em diferentes contextos. Expressão de proteína do vírus da hepatite C (HCV) em linhagem de hepatoma causou translocação de TIP47 do citosol para corpúsculos lipídicos, culminando em alterações no metabolismo lipídico possivelmente pela falta de disponibilidade de TIP47 no tráfico de endossomos (SATO *et al.*, 2006). Posteriormente, verificou-se que TIP47 atua como regulador positivo da replicação do HCV, ao interagir com a proteína viral NS5A (VOGT *et al.*, 2013; PLOEN *et al.*, 2013). A proteína TIP47 também foi implicada de agir como cofator na montagem de partículas do vírus da imunodeficiência humana (HIV), ao interagir e permitir a co-localização das proteínas virais Gag e Env (LOPEZ-VERGÈS *et al.*, 2006; BAUBY *et al.*, 2010). TIP47 ainda é capaz de atuar em um mecanismo de direcionamento da proteína tirosina-fosfatase Meg2 para vesículas secretórias (SAITO *et al.*, 2007), e como um inibidor da hidrólise de retinil-ésteres por lipases em queratinócitos (GAO e SIMON, 2006). Por fim, TIP47 é capaz de se ligar à mitocôndrias em condições de estresse oxidativo, e inibir morte celular ao proteger a integridade da membrana mitocondrial (HOCSAK *et al.*, 2010).

S3-12 e OXPAT são codificadas por genes *in tandem* no cromossomo humano 19 e no cromossomo murino 17 (WOLINS *et al.*, 2006; DALEN *et al.*, 2007). Apesar de sua proximidade no genoma, as proteínas codificadas por esses genes apresentam funções específicas baseadas em sua distribuição nos tecidos. Em camundongos, S3-12 é expressa principalmente no tecido adiposo branco, e em menor grau nos músculos esqueléticos e cardíaco, relacionando sua função com estocagem de lipídeos (WOLINS *et al.*, 2003, 2005, 2006; DALEN *et al.*, 2007). S3-12 é pouco expressa em tecido adiposo marrom, que é especializado em termogênese adaptativa e apresenta alta capacidade de oxidação de lipídeos. OXPAT, por outro lado, é proeminentemente expresso em tecidos que exibem alta capacidade de oxidação de ácidos graxos, incluindo coração, fígado, tecido adiposo marrom e tecidos musculares esqueléticos menos glicolíticos (WOLINS *et al.*, 2006). A expressão diferencial de S3-12 e OXPAT em tecidos adiposos branco e marrom, respectivamente, sugere que estas proteínas compartimentalizam lipídeos para diferentes vias metabólicas (WOLINS *et al.*, 2006). Proteínas S3-12 endógenas e OXPAT exógenas são estáveis no citosol de células cultivadas em privação de

lipídeos, e translocam para corpúsculos lipídicos após captação de ácidos graxos de cadeia longa (WOLINS *et al.*, 2003, 2005, 2006; DALEN *et al.*, 2007). É possível observar a localização de S3-12 em corpúsculos lipídicos durante lipólise estimulada em adipócitos (BRASAEMLE *et al.*, 2004), embora o mesmo ainda não tenha sido demonstrado para OXPAT. Localização de OXPAT em corpúsculos lipídicos foi mostrada em cardiomiócitos primários e em fígado de camundongo (WOLINS *et al.*, 2006), assim como na linhagem de células esteroideogênicas MLTC-1 (YAMAGUCHI *et al.*, 2006).

1.2.4. Funções de corpúsculos lipídicos

As diversas funções desempenhadas por corpúsculos lipídicos estão diretamente relacionadas à sua composição lipídica e proteica, embora elas ainda não tenham sido completamente esclarecidas. Estudos proteômicos e uma varredura genômica funcional revelaram um grande número de proteínas funcionalmente distintas presentes em corpúsculos lipídicos (ATHENSTAEDT *et al.*, 1999; BRASAEMLE *et al.*, 2004; FUJIMOTO *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; UMLAUF *et al.*, 2004; CERMELLI *et al.*, 2006; BARTZ *et al.* 2007; GUO *et al.*, 2008). Contudo, a natureza diversa dessas proteínas reflete bem as diferenças entre os tipos celulares e os diferentes estados metabólicos das células analisadas, e possivelmente os diferentes papéis que corpúsculos lipídicos desempenhem em cada caso em particular.

A função primária de corpúsculos lipídicos é a estocagem de lipídios neutros e fornecimento de ácidos graxos e colesterol livre (MARTIN e PARTON, 2005). Lipídios estocados nessas organelas podem ser hidrolisados e posteriormente usados para β -oxidação, síntese de membrana, modificação de proteínas e geração de moléculas de sinalização. De fato, foi observada em corpúsculos lipídicos a presença de enzimas chave envolvidas na síntese de ácidos graxos (acetil-coenzima A carboxilase, NADH-citocromo-b5 redutase) e no metabolismo do colesterol (esqualeno epoxidase, 17- β -hidroxiesteróide desidrogenase, lanosterol sintase) (BRASAEMLE *et al.*, 2004; FUJIMOTO *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; UMLAUF *et al.*, 2004). Outros trabalhos mostram a presença de caveolina em corpúsculos lipídicos. Caveolinas são proteínas majoritárias das caveolas, regiões da membrana plasmática de composição lipídica específica com papel na endocitose e na recepção e transmissão de sinalização extracelular (MARTIN e PARTON, 2005). Caveolinas são direcionadas a corpúsculos lipídicos de uma maneira regulada e

transiente em adipócitos, hepatócitos, macrófagos e células da linhagem COS (FUJIMOTO *et al.*, 2001; OSTERMEYER *et al.*, 2001; POL *et al.*, 2001, 2004; UMLAUF *et al.*, 2004; ROBENEK *et al.*, 2005). Caveolinas foram descritas ligando-se a colesterol livre e ácidos graxos (MURATA *et al.*, 1995; TRIGATTI *et al.*, 1999) e regulando o tráfego de colesterol celular (IKONEN e PARTON, 2000; FIELDING e FIELDING, 2001; IKONEN *et al.*, 2004), e a interação dessas proteínas com corpúsculos lipídicos ratifica a implicação dessas organelas no balanço de colesterol (MARTIN e PARTON, 2005). Outros papéis também foram descritos para caveolina na regulação de corpúsculos lipídicos. Foi mostrado que esta proteína é fundamental para a regeneração do fígado, envolvendo diretamente a formação de novos corpúsculos lipídicos (FÉRNANDEZ *et al.*, 2006), e mais recentemente, foi sugerido que esta molécula tenha um papel importante na composição de fosfolipídios e proteínas na membrana destas organelas (BLOUIN *et al.*, 2010). Em outro contexto, células do epitélio pigmentar da retina apresentam corpúsculos lipídicos distintos, denominados retinossomos. Foi demonstrado *in vivo* que essas estruturas são responsáveis pela reciclagem de 11-*cis*-retinal, um derivado do ácido retinóico, sendo esse processo necessário para a produção de rodopsina e manutenção da sensibilidade à luz dos fotorreceptores (IMANISHI *et al.*, 2004).

Corpúsculos lipídicos estão envolvidos na síntese de eicosanóides durante inflamações. É possível verificar correlações entre a biogênese de corpúsculos lipídicos e a geração de eicosanóides derivados de ciclooxygenase (COX) e lipoxigenase (LO), respectivamente prostaglandina E₂ (PGE₂) e leucotrieno B₄ (LTB₄) (BOZZA *et al.*, 1996a, 1996b, 1997; PACHECO *et al.*, 2002, 2007). Corpúsculos lipídicos também foram descritos como sítios ricos em ácido araquidônico (AA) (WELLER e DVORAK, 1985). Como foi descrito anteriormente, foi mostrado também nessas organelas a compartimentalização de enzimas fundamentais na liberação de AA, como cPLA₂, ERK1, ERK2, p38 e p85 (YU *et al.*, 1998), assim como as principais enzimas envolvidas na sua conversão em eicosanóides, como 5-LO, 15-LO e COX (BOZZA *et al.*, 1997, 1998; DVORAK *et al.*, 1992, 1993), ou leucotrienos, como LTC₄ sintase (BOZZA *et al.*, 1998). Por fim, através de ligação cruzada de eicosanóides recém-formados *in situ*, foi possível comprovar que corpúsculos lipídicos são sítios intracelulares de produção de LTC₄, LTB₄, e PGE₂ em leucócitos estimulados (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b, 2002a; VIEIRA-DE-ABREU *et al.*, 2005; D'AVILA *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2007). Esses dados apontam para um importante papel desempenhado por essas organelas no estabelecimento de um

ambiente inflamatório (BOZZA *et al.*, 2009; BOZZA e VIOLA, 2010). Enzimas formadoras de eicosanóides também foram encontradas em células não-mielóides, implicando a importância de corpúsculos lipídicos na produção dessas moléculas também em condições não inflamatórias (DVORAK *et al.*, 1992, 1993, 1994; AREND *et al.*, 2004; ACKERMAN *et al.*, 2005; XIE *et al.*, 2006).

Análises de proteômica identificaram inúmeras proteínas GTPases da família Rab (BRASAELME *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2004; UMLAUF *et al.*, 2004; OZEKI *et al.*, 2005). A localização de uma dessas proteínas, Rab18, foi posteriormente confirmada por imunofluorescência em diferentes tipos celulares (MARTIN *et al.*, 2005; OZEKI *et al.*, 2005). Proteínas Rab são reguladoras críticas do tráfego vesicular e de interações entre organelas (SEABRA *et al.*, 2002), e a presença dessas proteínas em corpúsculos lipídicos sugere interação com outras organelas na célula (LIU e col., 2007). Por exemplo, Ozeki e colaboradores mostraram que Rab18 medeia interações entre corpúsculos lipídicos e o retículo endoplasmático (OZEKI *et al.*, 2005), e foi sugerida a importância desta molécula no metabolismo lipídico mediado por hormônios (PULIDO *et al.*, 2011). A presença de proteínas Rab em corpúsculos lipídicos ainda sugere um papel dessas organelas no tráfego de membranas (LIU *et al.*, 2004; MURPHY *et al.*, 2009).

A presença de diversas proteínas cinases em corpúsculos lipídicos indica que esta organela possa atuar como um domínio citoplasmático implicado na compartimentalização da sinalização intracelular. Foi demonstrada a localização em corpúsculos lipídicos de proteínas MAP cinases, PKC e PI3K, enzimas chave na sinalização intracelular lipídica em diversas respostas celulares (YU *et al.*, 1998, 2000; CHEN *et al.*, 2002). A fosfolipase cPLA₂, enzima que especificamente hidrolisa ácido araquidônico de glicofosfolípidios (CLARK *et al.*, 1990; LESLIE, 1991) é ativada por fosforilação pelas proteínas MAP cinase ERK1, ERK2 e p38 (LIN *et al.*, 1993; SA *et al.*, 1995). Yu e colaboradores mostraram a co-localização dessas cinases com cPLA₂ em corpúsculos lipídicos ricos em araquidonato (YU *et al.*, 1998), sugerindo que a compartimentalização da sinalização garante a rápida ativação de cPLA₂ em resposta a estímulos extracelulares.

Outro grupo de proteínas que podem ser localizadas em corpúsculos lipídicos são citocinas, uma família de glicoproteínas envolvidas em crescimento celular, inflamação, imunidade, diferenciação e reparo. Essas moléculas sinalizatórias são produzidas por diversas células, incluindo leucócitos ativados como macrófagos, neutrófilos, mastócitos basófilos e eosinófilos. Essas células são

capazes de estocar citocinas em diversos compartimentos celulares, como grânulos, vesículas e corpúsculos lipídicos (BANDEIRA-MELO e WELLER, 2005). A primeira citocina encontrada nessas organelas foi o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), localizado em corpúsculos lipídicos de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos infiltrantes de biópsias de pacientes com doença de Crohn (BEIL *et al.*, 1995). TNF- α também foi localizado em corpúsculos lipídicos de leucócitos circulantes de pacientes com quadro clínico de sépsia ou de camundongos após indução de sépsia experimental (PACHECO *et al.*, 2002). Da mesma forma, o fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) foi localizado em corpúsculos lipídicos de mastócitos pulmonares (DVORAK *et al.*, 2001), e os quimioatratantes IL-16 e RANTES foram detectados em corpúsculos lipídicos de eosinófilos (LIM *et al.*, 1996). É possível ainda que corpúsculos lipídicos possam participar de processos de exocitose de citocinas. Foi demonstrado recentemente que proteínas SNARE medeiam a fusão entre corpúsculos lipídicos (BOSTRÖM *et al.*, 2007), e já que essas proteínas são importantes para a fusão de vesículas secretórias e a membrana plasmática (HONG *et al.*, 2005; JAHN e SCHELLER, 2006), é possível que estas organelas também possam participar desse processo. No entanto, a sua participação na exocitose ainda não foi demonstrada.

Outra possível função para corpúsculos lipídicos foi proposta pelo pesquisador Michael Welte, segundo a qual estas organelas atuam como sítios de estocagem de diversas proteínas em diferentes situações, sendo este um mecanismo altamente regulado (WELTE, 2007). Segundo Welte, corpúsculos lipídicos podem servir como refúgio para proteínas, mantendo-as inativas quando não necessárias. Isso é observado em embriões de *Drosophila*, onde grande parte das histonas livres é mantida associada a corpúsculos lipídicos (CERMELLIE *et al.*, 2006). Esse recrutamento é específico, pois ele somente ocorre em ovários e células embrionárias iniciais, e somente envolve as histonas H2A, H2B e H2Av (CERMELLIE *et al.*, 2006). Esse processo pode ser um mecanismo de proteção, já que histonas livres podem interferir com a homeostase celular (GUNJAN e VERREAULT, 2003; GUNJAN *et al.*, 2005). Segundo Welte, associação com corpúsculos lipídicos também pode facilitar a degradação de proteínas (WELTE, 2007). Em hepatócitos, alteração farmacológica no processo de reciclagem de proteínas causou o acúmulo de proteínas apolipoproteína B-100 (ApoB) poliubiquitinadas em corpúsculos lipídicos, em conjunto com outras proteínas ubiquitinadas (OHSAKI *et al.*, 2006), sugerindo que essas proteínas acumuladas em

corpúsculos lipídicos sigam para vias de degradação.

Nos últimos anos alguns trabalhos têm relacionado corpúsculos lipídicos com autofagia (DONG e CZAJA, 2011). Em 2009, Singh e colaboradores mostraram que a autofagia contribui para o metabolismo de lipídios intracelulares mobilizando corpúsculos lipídicos para degradação (SINGH *et al.*, 2009a). No mesmo estudo também foi mostrado que a inibição do mecanismo de autofagia leva a um acúmulo de lipídios intracelulares em hepatócitos (SINGH *et al.*, 2009a). Além disso, uma relação bidirecional parece existir entre corpúsculos lipídicos e autofagia, já que o aumento no conteúdo de lipídios intracelulares também é capaz de diminuir a função de autofagia (YANG *et al.*, 2010). Por outro lado, dados obtidos em adipócitos de camundongos mostram uma função oposta do que a observada em hepatócitos. Nesse outro contexto, a inibição da autofagia impediu a formação de novos corpúsculos lipídicos, o que interrompeu a diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 (SINGH *et al.*, 2009b) e de fibroblastos murinos embrionários (BAERGA *et al.*, 2009) em adipócitos maduros. Em concordância com estes resultados, outro estudo realizado com pacientes apresentando diabetes tipo dois mostrou que adipócitos contendo grandes quantidades de corpúsculos lipídicos apresentavam atenuação da sinalização por insulina e aumento da atividade autofágica (ÖST *et al.*, 2010)

Alguns trabalhos implicam corpúsculos lipídicos também na regulação do ciclo celular. Fernández e colaboradores demonstraram a importância de caveolina-1 na regeneração do fígado ao mostrar que a inibição do acúmulo de corpúsculos lipídicos em células desses animais causou parada de progressão do ciclo celular (FÉRNANDEZ *et al.*, 2006). Este dado sugere que a progressão do ciclo seja regulada metabolicamente por corpúsculos lipídicos. Mais recentemente foi mostrado em leveduras que a lipase Tgl4 (homóloga da lipase ATGL humana), localizada em corpúsculos lipídicos, apresenta fosforilação dependente de Cdc28 (homóloga de CDK1 humana) (KURAT *et al.*, 2009). Este trabalho demonstrou que a ausência de fosforilação mediada por Cdc28 acarreta em perda de lipólise mediada por Tgl4 e, conseqüentemente, a um atraso na progressão do ciclo celular. Além disso, a inibição simultânea da hidrólise de lipídios e a síntese de ácidos graxos impediram completamente a progressão pela fase G₁ do ciclo celular. Estas observações são uma importante contribuição para o esclarecimento do papel do metabolismo de triacilgliceróis na regulação do ciclo celular.

1.2.5. Papel de corpúsculos lipídicos na fisiopatologia de doenças

Durante as duas últimas décadas foi possível observar um acúmulo de informações acerca da biologia de corpúsculos lipídicos e, conseqüentemente, do seu potencial papel na fisiopatologia de doenças. O aumento da lipogênese e defeitos na regulação de lipídios são fenótipos comuns em diversas patologias, e muitos trabalhos tem associado o aumento no número de corpúsculos lipídicos a doenças extremamente difundidas e de grande relevância econômica, como diabetes, aterosclerose, processos inflamatórios e neoplasias. Entretanto, apesar dos indícios de que corpúsculos lipídicos desempenham um importante papel no estabelecimento destas diferentes patologias, os mecanismos envolvidos nesses processos ainda não foram completamente elucidados. Portanto, é de grande interesse entender os mecanismos regulatórios envolvendo corpúsculos lipídicos para a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos.

O acúmulo de corpúsculos lipídicos em hepatócitos e em células musculares foi associado ao desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2 (TASKINEN, 2003). Boström e colaboradores sugerem que a captação de ácidos graxos eleva a quantidade de corpúsculos lipídicos, deslocando a proteína SNAP23 da membrana plasmática para esta organela. Ao permanecer fora da membrana, SNAP23 se desliga do mecanismo de translocação do receptor GLUT4 e captação de glicose mediada por insulina (BOSTRÖM *et al.*, 2007; BOSTRÖN *et al.*, 2010). Esse mecanismo de sequestro de SNAP23 causa insensibilidade à insulina e pode explicar alguns modelos de diabetes (SÖLLNER, 2007; OLOFSSON *et al.*, 2011). Alterações nas proteínas da família PAT também podem ter implicações na diabetes. Foi mostrado que a inibição da proteína ADRP previne a resistência à insulina causada por dieta em camundongos (VARELA *et al.*, 2008). Por outro lado, a redução dos níveis de ADRP também foi capaz de causar a diminuição da produção de insulina por células β -pancreáticas (FALECK *et al.*, 2010).

A desregulação de corpúsculos lipídicos é um fator que contribui para o desenvolvimento de outras doenças específicas. Por exemplo, a síndrome de Chanarin-Dorfman, caracterizada por disfunção da estocagem de lipídios (ANGELINI *et al.*, 1980), é causada por mutações em uma proteína específica de corpúsculos lipídicos, CGI-58/ABHD5 (LEFEVRE *et al.*, 2001; YAMAGUCHI *et al.*, 2009). Mutações nesta proteína resultam em esteatose hepática, ictiose, problemas no desenvolvimento e depósito de lipídios em diversos tipos celulares (IGAL *et al.*, 1997; SREBRNIK *et al.*, 1998; SCHWEIGER *et al.*, 2009). Por sua vez, a lipodistrofia

genética humana é caracterizada pela completa perda de tecido adiposo (ARGAWAL e GARG, 2006), e já foi associada a diversos *loci* incluindo o gene *BSCL2* (MAGRE *et al.*, 2001) e o gene que codifica caveolina-1 (KIM *et al.*, 2008). Como já foi exposto, as proteínas codificadas por estes genes são importantes constituintes de corpúsculos lipídicos. O gene *BSCL2* codifica a proteína seipina, cujo homólogo em leveduras é importante para a biogênese de corpúsculos lipídicos (SZYMANSKI *et al.*, 2007; FEI *et al.*, 2008), enquanto que caveolinas tem um papel crucial no balanço do colesterol celular (MARTIN e PARTON, 2005). Já a regulação da expressão de ADRP e sua compartimentalização em corpúsculos lipídicos foram implicadas na formação de células espumosas em lesões ateroscleróticas (LARIGAUDERIE *et al.*, 2004, 2006; PAUL *et al.*, 2008), sugerindo um papel potencial dessas organelas nesse processo.

Corpúsculos lipídicos também são alvos de patógenos, sendo a formação de novas partículas de vírus da hepatite C (HCV) a mais bem descrita relação dessas organelas com agentes infecciosos. A proteína estrutural do capsídeo viral Core contribui para o acúmulo de lipídios na célula hospedeira, e é detectada na superfície de corpúsculos lipídicos (HOPE e MCLAUHLAN, 2000). Já Miyanari e colaboradores demonstraram o papel dessas organelas na replicação viral ao mostrar que a proteína Core recruta proteínas não estruturais e complexos de replicação para a vizinhança de corpúsculos lipídicos, e que este recrutamento é fundamental para a produção de partículas infecciosas (MIYANARI *et al.*, 2007). A integração da proteína Core desloca ADRP de corpúsculos lipídicos, que em função disso são transportados para a proximidade de sítios de replicação de HCV (BOULANT *et al.*, 2008; TARGETT-ADAMS *et al.*, 2008; LYN *et al.*, 2010). Além disso, foi mostrado que a montagem de partículas virais depende de formação de corpúsculos lipídicos mediada pela enzima diacilglicerol aciltransferase-1 (DCAT-1) (HERKER *et al.*, 2010). Esses resultados indicam que corpúsculos lipídicos são críticos para a produção de HCV, e podem estar relacionados com a patogênese da esteatose hepática observada durante a infecção viral. De fato, revisões recentes mostram que a infecção por HCV está intimamente associada com alterações no metabolismo de lipídios (ALVISI *et al.*, 2011; MORIISHI e MATSUURA, 2012). Por fim, um mecanismo semelhante à replicação do HCV foi observado durante a replicação do vírus da dengue (SAMSA *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2012).

O acúmulo de corpúsculos lipídicos também já foi observado em leucócitos durante diversas condições infecciosas, assim como em processos inflamatórios

tanto clínicos quanto experimentais. Como exemplo, é possível citar leucócitos extraídos de articulações de pacientes com artrite inflamatória ou de lavado broncoalveolar (BAL) de pacientes com síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS), como também leucócitos extraídos do sangue e do peritônio durante sépsia ou em efusões pleurais ou granulomas de infecções bacterianas (RIDLEY e RIDLEY, 1987; TRIGGIANI *et al.*, 1995; BOZZA *et al.*, 1996b; HERNANDEZ-PANDO *et al.*, 1997; CARDONA *et al.*, 2000; PACHECO *et al.*, 2002; D'AVILA *et al.*, 2006; PACHECO *et al.*, 2007). Existem cada vez mais evidências que a biogênese de corpúsculos lipídicos durante o curso de infecções envolve mecanismos bem regulados, e a caracterização do papel dessas organelas nesses processos tem contribuído para o entendimento da relação entre parasita e hospedeiro e na identificação de novos alvos terapêuticos (BOZZA *et al.*, 2007; BOZZA *et al.*, 2009).

1.2.5.1. Regulação de corpúsculos lipídicos no câncer

A lipogênese tem sido associada com alguns carcinomas humanos, bem como determinante de mau prognóstico em câncer de mama, próstata e cólon (KUHAJDA, 2006; SWINNEN *et al.*, 2006). A observação de que algumas células neoplásicas exibem números aumentados de dessas organelas revelou a possibilidade de utilizar a detecção de corpúsculos lipídicos ou a quantificação de proteínas da família PAT como biomarcadores de alguns tipos de câncer. Por exemplo, Straub e colaboradores mostraram que proteínas PAT são frequentemente encontradas em tecidos neoplásicos que apresentam algum grau de esteatose, como no carcinoma hepático, no carcinoma colorretal, e no carcinoma de células renais, porém com níveis diferenciais de expressão (STRAUB *et al.*, 2010). É particularmente interessante a relevância que a proteína ADRP vem adquirindo como possível biomarcador, suportado pela sua expressão diferencial em alguns tipos de câncer. Foi observado o aumento da expressão de ADRP em carcinoma de células renais (RAE *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2005, 2007), no carcinoma hepatocelular (KUROKAWA *et al.*, 2004), em algumas lesões cutâneas malignas ou pré-malignas (OSTLER *et al.*, 2010), em carcinoma de cólon (MATSUBARA *et al.*, 2011), e no carcinoma apócrino de mama (MORITANI *et al.*, 2011).

Apesar da possível ligação da lipogênese com câncer, existem ainda poucas evidências sobre os mecanismos que regulam a biogênese de corpúsculos lipídicos ou a sua significância funcional na tumorigênese. No entanto, observações do nosso grupo publicado por Accioly e colaboradores sugere um possível papel de

corpúsculos lipídicos na patogênese do adenocarcinoma de cólon (ACCIOLY *et al.*, 2008). Foi mostrado que células tumorais de tecidos de adenocarcinoma de cólon humanos apresentam mais corpúsculos lipídicos que células presentes no tecido normal adjacente (ACCIOLY *et al.*, 2008). Além disso, um grande número de corpúsculos lipídicos também foi observado em linhagens tumorais de cólon quando comparada à linhagem epitelial de intestino não transformada IEC-6 (ACCIOLY *et al.*, 2008). Foi notado ainda que o aumento no número de corpúsculos lipídicos era acompanhado de produção *in situ* de prostaglandina E₂, e que a inibição da biogênese dessas organelas causou redução na taxa de proliferação dessas linhagens (ACCIOLY *et al.*, 2008). Por fim, foram observados um aumento no número de corpúsculos lipídicos e maior produção de PGE₂ após transformação da linhagem epitelial IEC-6 com uma versão constitutivamente ativa da oncoproteína H-Ras, enquanto que a inibição da biogênese dessas organelas foi suficiente para reverter o fenótipo hiperproliferativo destas células (ACCIOLY *et al.*, 2008). Esses dados sugerem um papel de corpúsculos lipídicos como produtores centrais de PGE₂ em células tumorais de cólon, o que pode ter implicações para a patologia desta neoplasia (ACCIOLY *et al.*, 2008).

A grande diversidade de proteínas funcionais encontradas em corpúsculos lipídicos, incluindo proteínas estruturais, enzimas de metabolismo de lipídios, e proteínas de sinalização intracelular, sugere uma participação crucial dessas organelas em diversas funções celulares envolvidas na proliferação e diferenciação celular. Um dos possíveis mecanismos a serem investigados é a coordenação do ciclo celular por corpúsculos lipídicos, e de que forma a sua desregulação pode levar ao desenvolvimento de patologias como o câncer. Alguns trabalhos já mostram indícios de um possível papel dessas organelas na progressão do ciclo celular em hepatócitos de camundongo (FÉRNANDEZ *et al.*, 2006) e leveduras (KURAT *et al.*, 2008). Por fim, é interessante determinar se corpúsculos lipídicos podem de fato atuar como um sítio de sinalização intracelular mitogênica e de produção de mediadores inflamatórios, e qual o impacto que essas funções teriam no estabelecimento de um fenótipo tumoral.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o papel de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular e na transformação celular.

2.2. Específicos

1. Avaliar a regulação de corpúsculos lipídicos durante as diferentes fases do ciclo celular;

2. Avaliar a regulação de corpúsculos lipídicos em células transformadas;

3. Avaliar o papel da proteína estrutural de corpúsculos lipídicos ADRP na proliferação e transformação celular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Cultura de células

As células da linhagem NIH3T3 (doadas pela Dr^a. Mari Sogayar, Universidade de São Paulo) ou NIH3T3-H-*ras*V12 (ROBBS *et al.*, 2008) foram cultivadas em meio DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) suplementado tanto com 10% ou 0,2% de soro fetal bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina, 100 mg de estreptomicina, 100.000 unidades de penicilina, solução de aminoácidos não essenciais 1x, 100 mg de piruvato de sódio, solução de vitaminas 1x, solução de aminoácidos essenciais 1x, 10 mM de HEPES pH 7,4, 55 µM de 2-mercaptoetanol e 3,75 g/L de bicarbonato de sódio. As células da linhagem IEC-6 (doadas pelo Dr. Bruno Pires, Universidade Federal do Rio de Janeiro) foram mantidas em meio DMEM suplementado como descrito acima, mais adição de 4 mM de L-glutamina e 0,1 U/ml de insulina humana. As linhagens foram mantidas em estufa à 37°C com 5% de CO₂. Para desaderir as células foi utilizado Tripsina 0,25%/4 mM EDTA. Células NIH3T3-H-*ras*V12 foram mantidas em pressão seletiva com puromicina 7,5 µM em meio de cultura, exceto quando utilizadas em experimentos.

3.2. Construção dos plasmídeos

Os vetores retrovirais pLIRES2-EGFP e pLIRES2-EGFP-ADRP foram usados nos experimentos de transdução retroviral. A construção do plasmídeo pLIRES2-EGFP já foi descrito anteriormente (TEIXEIRA *et al.*, 2005). O cDNA de ADRP humana foi obtido do plasmídeo de expressão pLA4 (TARGET-ADAMS *et al.*, 2003), e subclonando no vetor pLIRES2-EGFP utilizando sítios para as endonucleases de restrição *Xho*I e *Sa*I, gerando por fim o vetor pLIRES2-EGFP-ADRP. Já os vetores pL0 e pLADRP foram gerados, respectivamente, a partir dos plasmídeos pLIRES2-EGFP e pLIRES2-EGFP-ADRP utilizando os sítios para as endonucleases de restrição *Apa*I e *Not*I, seguido por preenchimento utilizando o fragmento da DNA polimerase I *Klenow*. Os plasmídeos utilizados nos experimentos foram amplificados em bactéria e extraídos utilizando o kit MaxSpeed[®] Plasmid Maxi Kit (QIAGEN).

3.3. Produção de retrovírus recombinantes e infecção de células NIH3T3

A linhagem de células empacotadoras ecotrópicas BD EcoPack2 (BD

Biosciences) foi transfectada transientemente com os vetores retrovirais pLIRES2-EGFP, pL0, pLIRES2-EGFP-ADRP ou pLADRP através de precipitação por fosfato de cálcio por 24 horas (incubados 20 µg de DNA para cada placa de 10 cm contendo 4×10^6 células BD EcoPack2 com CaCl_2 2,5M, em solução de HBS 2x durante 30 minutos. Gotejados 500 µl da reação sobre cada placa). Após 24 horas, células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com meio contendo 10% de soro fetal bovino definido (Hyclone). O sobrenadante contendo partículas virais foi coletado 48 horas após transfecção e suplementado com 8 µg/ml de Polybrene[®], e então utilizado imediatamente para infecção por centrifugação (dois ciclos de centrifugação de 45 minutos à 400 g) em 2×10^5 células NIH3T3. Células infectadas foram incubadas por mais 24 horas à 37°C, tripsinizadas, e a eficiência de transdução foi avaliada por expressão de EGFP (proteína fluorescente verde) por citometria de fluxo (FACScalibur - BD Biosciences) para células transduzidas com vetores pLIRES2-EGFP e pLIRES2-EGFP-ADRP. Pela falta do gene repórter, a atividade do gene ADRP codificado pelo vetor pLADRP foi verificado através da produção da proteína ADRP analisada por *western blot*. Para garantir reprodutibilidade, cada experimento foi repetido utilizando células derivadas de infecções virais independentes.

3.4. Sincronização do ciclo celular

Células NIH3T3 ou células NIH3T3-H-rasV12 foram sincronizadas inoculando-se 5×10^5 células em garrafas de cultura de 75 cm² e cultivado-as por 72 horas até atingirem 90% de confluência. Células ainda em confluência foram lavadas duas vezes com PBS e então mantidas em privação de soro, cultivando-as meio DMEM suplementado com 0,2% de SFB por 24 horas. Alternativamente, células NIH3T3 foram primeiramente sincronizadas por confluência e privação de soro como descrito acima, e então inoculadas na densidade de 4×10^5 células por garrafa de 75 cm² após suplementação com meio contendo 10% de SFB em conjunto com 2 mM de timidina (Calbiochem) e analisadas após 24 horas. Células infectadas com partículas retrovirais foram sincronizadas inoculando-se $2,5 \times 10^5$ células em poços de placas de 6 poços, e cultivadas por 48 horas até atingirem 90% de confluência. Posteriormente, o procedimento foi idêntico ao descrito acima para células não transduzidas sincronizadas por confluência e privação de soro. Células IEC-6 foram sincronizadas inoculando-se $1,25 \times 10^6$ células em garrafas de cultura de 75 cm² e cultivado-as por 72 horas até atingirem 90% de confluência. Células ainda em

confluência foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino e então mantidas em privação de soro, cultivando-as meio DMEM sem soro por 24 horas.

3.5. Análises de ciclo celular e conteúdo de DNA sub-G₀ por iodeto de propídio

Células NIH3T3 ou IEC-6 sincronizadas por confluência e privação de soro, ou células NIH3T3 sincronizadas após incubação com timidina, foram soltas da adesão com tripsina, lavadas uma vez com PBS, e marcadas com iodeto de propídio na presença de NP-40. Análise do conteúdo de DNA foi feito coletando 10.000 eventos para análise de ciclo celular e 20.000 eventos para análise de DNA sub-G₀ utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur e o software CellQuest (BD Biosciences). Células NIH3T3 infectadas com os retrovírus contendo os vetores pLIREs2-EGFP ou pLIREs2-EGFP-ADRP foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e 5×10^4 células semeadas em poços de placa de 6 poços, sendo então cultivadas em meio DMEM contendo 0,2% de soro fetal bovino. Nos tempos indicados, a análise do conteúdo de DNA sub-G₀ foi realizado conforme descrito acima.

3.6. Análise de ciclo celular por incorporação de BrdU

Células NIH3T3, NIH3T3-H-*rasV12*, ou IEC-6 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de 4×10^5 células (NIH3T3, NIH3T3-H-*rasV12*) ou 2×10^6 células (IEC-6) em garrafa de 75 cm², sendo mantidas em cultura com meio contendo 10% de soro fetal bovino até adesão (0h) ou até os tempos indicados (12h, 24h, 36h, 48h). Trinta minutos antes da fixação, células foram incubadas com 20 nM de BrdU (5-bromo-2'-deoxiuridina) em meio DMEM com 10% de soro, após o qual foram imediatamente lavadas com PBS, contadas, e fixadas em etanol gelado 100%, sendo então mantidas à -20°C por pelo menos 24 horas. Após esse período, 5×10^5 células foram lavadas em solução de albumina de soro bovino (BSA) 1% em PBS e tratadas com HCl 2N contendo 0,5% de Triton X-100 por 30 minutos para desnaturação do DNA, sendo esta reação posteriormente inativada com tetraborato de sódio (Bórax) 0,1 M. Células foram novamente lavadas com solução de BSA 1%, e incubadas no escuro e em temperatura ambiente por uma hora com o anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado a FITC (isotiocianato de fluoresceína), com diluição de 1:20 em solução de BSA 1% e Tween 20 0,5% em PBS. Após incubação, células foram lavadas com solução de BSA 1% e Tween 20

0,5%, e incubadas a 4°C durante a noite com solução de marcação com iodeto de propídio (0,5 mg/ml de ribonuclease A, 0,02 mg/ml de iodeto de propídio, e Triton X-100 0,1% em PBS). Após marcação, células foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur e o software CellQuest (BD Biosciences). Experimentos com células NIH3T3 infectadas com os retrovírus contendo os vetores pL0 ou pLADRP foram realizados conforme descrito acima para NIH3T3.

3.7. Análise de proliferação celular por incorporação de [³H]timidina

Células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas em triplicata em placas de 96 poços na densidade de 8×10^2 após suplementação com meio contendo 10% ou 0,2% de soro fetal bovino. A proliferação celular foi analisada nos tempos indicados por incorporação de [³H]timidina. O ensaio consistiu em pulsar as células com [³H]timidina (2,5 µCi/ml) por 12 horas. Células foram então coletadas nos tempos indicados com o coletor FilterMate Harvester (Perkin Elmer), e a incorporação de [³H]timidina foi analisada pelo aparelho MicroBeta Trilux (Perkin Elmer).

3.8. Análise de proliferação celular por ensaio de cristal violeta

Células NIH3T3 infectadas com os retrovírus contendo os vetores pLIRE2-EGFP ou pLIRE2-EGFP-ADRP foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e inoculadas em triplicada em placa de 96 poços na densidade de 8×10^2 células, após suplementação com meio contendo 10% ou 0,2% de soro fetal bovino. Nos tempos indicados, células foram fixadas com etanol 100% por 10 minutos, marcadas com cristal violeta 0,05% em 20% de etanol, lavadas com água e incubadas com metanol para leitura no espectrofotômetro SpectraMAX 190 (Molecular Devices) a 595 nm.

3.9. Western blot

Células NIH3T3 ou NIH3T3-H-rasV12 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de 4×10^5 células em garrafa de 75 cm² após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Após os tempos indicados, células foram centrifugadas e lisadas em 20 µl de tampão de ressuspensão (10 Mm EDTA, 40 Mm de Tris-Cl pH 7,5 e 60 Mm pirofosfato de sódio) mais 20 µl de SDS 10%. Os lisados foram aquecidos a 100°C por 20 minutos e

guardados a -80°C . Os extratos de proteína total foram misturados com 10 ml de tampão de amostra e separados em géis de poliacrilamida SDS-PAGE 4%, 10%, ou 12% (30% bis-acrilamida (1:29) e tampão de separação 4x pH 8,8) a 25 mA. Junto com os extratos foi aplicado um padrão de peso molecular (Kaledoscope Prestained Standards - BioRad). Após a corrida, o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (BioAgency) por corrente elétrica (15 volts) durante 45 minutos à temperatura ambiente.

Após transferência, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em TBS 1x por pelo menos duas horas. Depois do bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário policlonal anti-Rb (851) (WELCH E WANG, 1993) com diluição de 1:500, com o anticorpo policlonal anti-ADRP (Fitzgerald) com diluição 1:500, ou com o anticorpo monoclonal anti-pan Ras (F132, Santa Cruz) com diluição 1:2500; ou por 2 horas com o anticorpo policlonal anti-ciclina A (C-19, Santa Cruz) com diluição de 1:1000, com o anticorpo policlonal anti-histona H3 (Cell Signaling) com diluição 1:5000, com o anticorpo monoclonal fosfo-histona H3 (Ser 10) (6G3, Cell Signaling) com diluição 1:500, ou com o anticorpo monoclonal anti-GAPDH (6C5, Santa Cruz) com diluição 1:2000, em TBS 1x com 0,05% de Tween 20 (TBS-T). Após a incubação, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T por 10 minutos e incubadas por 1 hora com anticorpo secundário anti-IgG de coelho, porquinho-da-índia, ou camundongo conjugado a peroxidase (HRP), com diluição de 1:10000 (Histona H3, fosfo-Histona H3, Rb, ADRP) ou 1:20000 (Ciclina A, GAPDH). Após a incubação, as membranas foram lavadas seis vezes com TBS-T por 10 minutos e incubadas com substrato de peroxidase por dois minutos (ECLTM Western Blotting Analysis System - GE Healthcare). A luminescência emitida foi detectada em filmes de quimioluminescência (Kodak BioMax Light Film, Kodak) em diferentes tempos de exposição (de 5 a 40 minutos).

3.10. Extração de RNA e síntese de cDNA

Células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de 4×10^5 células por garrafa de 75 cm^2 após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Após os tempos indicados, foi feita a extração de RNA de 10^6 células utilizando 1 ml do reagente Trizol[®] (Invitrogen). Células foram homogeneizadas em Trizol[®], e centrifugadas à 11000 g por 15 minutos à 4°C após adição de 200 μl de clorofórmio. A fase superior

foi separada e misturada com a mesma medida de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Após nova centrifugação, a fase aquosa foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado com 500 µl de isopropanol. Após incubação por 15 minutos, foi feita uma centrifugação de 12000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com etanol 75%. Após nova centrifugação de 7600 g por 5 minutos, o pellet foi secado e ressuspendido em 20 µl de água contendo 0,1% de DEPC (dietilpirocarbonato - SIGMA), incubando por 15 minutos à 65°C para facilitar a solubilização. A quantidade e qualidade do RNA foram determinadas por eletroforese em gel de agarose e por espectrofotometria utilizando o aparelho NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). A síntese da fita de cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA extraído utilizando a Transcriptase Reversa SuperScript™ III (Invitrogen), conforme indicado pelo fabricante.

3.11. PCR em tempo real

A reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi realizada para avaliar a expressão relativa dos genes das ciclinas D2, E2, A2 e B2. O gene constitutivo hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) foi utilizado como controle endógeno para normalização. Foram utilizadas para estas reações sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e o termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações foram feitas em triplicata para cada gene, utilizando 3,125 ng de cada um dos diferentes cDNAs, 0,5 µl da respectiva sonda e 5 µl de tampão universal PCR Mastermix TaqMan®, em um volume final de 10 µl. O tampão utilizado na reação contém o par de primers para a amplificação do cDNA e um oligonucleotídeo que pareia internamente à região amplificada, marcado com o fluorocromo FAM na sua extremidade 5' e com TAMRA na extremidade 3'. As condições para a reação de PCR foram as seguintes: 95°C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 60°C por 35 segundos e leitura da placa. A análise de quantificação relativa foi feita utilizando a função exponencial $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo o tempo de 0h o tempo de referência. Os números de identificação de cada sonda utilizada são os seguintes: Mm00438071_m1 para ciclina D2, Mn00438077_m1 para ciclina E2, Mm00438064_m1 para ciclina A2, Mn01171453_m1 para ciclina B2, e Mm00446968_m1 para HPRT.

3.12. Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos por Oil Red O

Células NIH3T3 ou IEC-6 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de $1,12 \times 10^4$ células (NIH3T3) ou $5,7 \times 10^4$ (IEC-6) células em lamínulas de 13 mm de diâmetro tratadas com gelatina 2% em PBS após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Células foram mantidas em meio contendo 10% de SFB até adesão (0h), ou até os tempos indicados (12h, 24h, 36h, 48h). A sincronização de células NIH3T3 por timidina em lamínulas foi realizada como descrito anteriormente (ver tópico 3.4). Células foram fixadas com 200 μ l de formalina 3,7% por uma hora, lavadas três vezes com H₂O destilada, e incubadas com propilenoglicol 100% por cinco minutos. Células foram então incubadas com Oil Red O (0,5% em propilenoglicol) por dez minutos, e então incubadas com propilenoglicol 100% por mais cinco minutos. As lamínulas foram posteriormente lavadas três vezes com H₂O destilada, e incubadas com 1 μ M de DAPI por dez minutos antes de serem montadas em lâminas utilizando VECTASHIELD[®] para retenção da fluorescência. Para quantificação de corpúsculos lipídicos em cada tempo analisado, foram fotografadas por microscopia de fluorescência (microscópio OLYMPUS BX60) cinquenta células escolhidas aleatoriamente por cinco campos diferentes, utilizando o mesmo período de exposição pré-estabelecido para cada fotografia. Posteriormente, as fotografias foram convertidas para escala de cinza utilizando o software Adobe[®] Photoshop[®], e corpúsculos lipídicos foram quantificados através do software ImageQuant TL (GE Healthcare) utilizando os parâmetros *Sensitivity* 9500, *Operator size* 51, *Noise* 1, *Background* 1000 para células NIH3T3 e NIH3T3-H-rasV12, e *Sensitivity* 9600, *Operator size* 31, *Noise* 1, *Background* 1000 para células IEC-6. Experimentos com células NIH3T3 infectadas com os retrovírus contendo os vetores pLIREs2-EGFP ou pLIREs2-EGFP-ADRP foram realizados conforme descrito acima para NIH3T3.

3.13. Marcação e quantificação de corpúsculos lipídicos por Bodipy[®]

Células NIH3T3, NIH3T3-H-rasV12, ou IEC-6 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de 4×10^5 células (NIH3T3, NIH3T3-H-rasV12) ou 2×10^6 células (IEC-6) em garrafa de 75 cm², sendo mantidas em cultura com meio contendo 10% de soro fetal bovino. A sincronização de células NIH3T3 por timidina em lamínulas foi realizada como descrito anteriormente (ver tópico 3.4). Nos tempos indicados, 5×10^5 células foram incubadas em 6 μ g/ml de

Bodipy[®] por 10 minutos, e então lavadas em PBS 1x. A média de intensidade de fluorescência da marcação por BODIPY[®] foi aferida utilizando o citômetro de fluxo FACScalibur e o software CellQuest (BD Biosciences).

3.14. Localização subcelular de corpúsculos lipídicos por microscopia de fluorescência

Células NIH3T3, NIH3T3-H-*rasV12*, ou IEC-6 sincronizadas por confluência e privação de soro foram inoculadas na densidade de $1,12 \times 10^4$ células (NIH3T3, NIH3T3-H-*rasV12*) ou $5,7 \times 10^4$ (IEC-6) células em lamínulas de 13 mm de diâmetro tratadas com gelatina 2% em PBS após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. Células foram mantidas em meio contendo 10% de SFB até adesão (0h), ou até os tempos indicados (12h, 24h, 36h, 48h). A sincronização de células NIH3T3 por timidina em lamínulas foi realizada como descrito anteriormente (ver tópico 3.4).

Células NIH3T3 e NIH3T3-H-*rasV12* foram fixadas nos tempos indicados usando 200µL de paraformaldeído 2% em presença de sacarose 4% à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, as células fixadas foram incubadas por 30 minutos em cloreto de amônia 50 nM, permeabilizadas em PBS contendo saponina 0,05%, e bloqueadas em solução contendo saponina 0,05% e gelatina 0,2% em PBS. Após isso, as células foram incubadas sob agitação durante a noite com anticorpo primário monoclonal para α -tubulina, com diluição de 1:80 em solução de bloqueio, e então lavadas com a mesma solução com três banhos de 10 minutos. Foi feita posteriormente a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à rodamina, diluído 1:500 na solução de bloqueio, seguido por mais um processo de lavagem. Células foram então incubadas em Triton X-100 0,2% em PBS por 20 minutos, lavadas com três banhos de PBS por 10 minutos cada, e incubadas em temperatura ambiente com a sonda hidrofóbica fluorescente Bodipy[®] (1/250) em PBS por uma hora. Células foram lavadas com três banho de PBS por 10 minutos cada, incubadas com 1 µM de DAPI, e lavadas mais uma vez com PBS por mais 10 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando n-propil-galato para retenção da fluorescência e observadas por microscopia de fluorescência (OLYMPUS BX60).

Alternativamente, células NIH3T3 suplementadas com soro foram ainda incubadas com 20nM de BrdU em meio DMEM com 10% de soro trinta minutos antes da fixação, após o qual foram imediatamente lavadas com PBS e fixadas nos

tempos indicados utilizando paraformaldeído 2% à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, células foram tratadas com HCl 2N a 37°C por 15 minutos para desnaturação do DNA, lavadas três vezes com PBS, e incubadas com TBS-T 0,02% por 15 minutos. Células foram então bloqueadas por 15 minutos em solução contendo BSA 1% e Tween 20 0,5% em PBS, e incubadas durante a noite com o anticorpo monoclonal anti-BrdU conjugado a FITC com diluição de 1:20 na solução de bloqueio. Células foram lavadas três vezes com TBS-T 0,02% e novamente fixadas em paraformaldeído 2%. Células foram posteriormente tratadas com Triton X-100 0,2% em PBS por 20 minutos, lavadas com três banhos de PBS por 10 minutos cada, e bloqueadas com PBS contendo 5% de soro fetal bovino por 30 minutos. Após isso, lamínulas foram incubadas durante a noite com anticorpo policlonal anti-ADRP (Fitzgerald), em diluição de 1:250 na solução de bloqueio. Após lavagem, foi feita a incubação com anticorpos secundários anti-IgG de porquinho-da-índia conjugados a DyLight[®]550 por uma hora, diluído 1:1000 em PBS. Células foram então lavadas três vezes com PBS, incubadas com 1 µM de DAPI, e lavadas mais uma vez com PBS por mais 10 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando VECTASHIELD[®] para retenção da fluorescência e observadas por microscopia de fluorescência (OLYMPUS BX60).

Células IEC-6 foram fixadas nos tempos indicados usando 200µL de paraformaldeído 2% em presença de sacarose 4% à temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, as células fixadas foram incubadas por 30 minutos em cloreto de amônia 50 nM, permeabilizadas em PBS contendo Triton X-100 0,2%, e bloqueadas em solução contendo BSA 2% e Triton X-100 0,2% em PBS. Após isso, as células foram incubadas sob agitação durante a noite com anticorpo primário monoclonal para α-tubulina, com diluição de 1:100 em solução de bloqueio, e então lavadas com a mesma solução com três banhos de 10 minutos. Foi feita posteriormente a incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à rodamina, diluído 1:200 na solução de bloqueio, seguido por mais um processo de lavagem. Células foram então incubadas em temperatura ambiente com a sonda hidrofóbica fluorescente Bodipy[®] (1/500) em PBS por uma hora. Células foram lavadas com três banho de PBS por 10 minutos cada, incubadas com 1 µM de DAPI, e lavadas mais uma vez com PBS por mais 10 minutos. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando VECTASHIELD[®] para retenção da fluorescência e observadas por microscopia de fluorescência (OLYMPUS BX60).

Para marcação de ADRP em células NIH3T3 e NIH3T3-H-*ras*V12, células

foram sincronizadas e suplementadas conforme descrito acima, e fixadas após adesão. Células foram então marcadas utilizando anticorpos anti-ADRP conforme descrito acima, com incubação de Bodipy[®] (1/250) em concomitância com o anticorpo secundário. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando VECTASHIELD[®] para retenção da fluorescência e observadas por microscopia de fluorescência (OLYMPUS BX60). Por fim, células NIH3T3 infectadas com os retrovírus contendo os vetores pLIRES2-EGFP ou pLIRES2-EGFP-ADRP foram sincronizadas por confluência e privação de soro, inoculadas sobre lamínula coberta por gelatina 2% na densidade de $1,12 \times 10^4$ células, e mantidas em meio contendo 10% de SFB até adesão (0h), ou até os tempos indicados (12h, 24h, 36h, 48h). Células foram então marcadas com Oil Red O e DAPI nos tempos indicados conforme descrito no tópico 3.12. As lamínulas foram montadas em lâminas utilizando VECTASHIELD[®] para retenção da fluorescência e observadas por microscopia de fluorescência (OLYMPUS BX60).

3.15. Ensaio de formação de focos em cultura

Células NIH3T3 infectadas com os retrovírus contendo os vetores pLIRES2-EGFP ou pLIRES2-EGFP-ADRP foram diluídas 1:5 com células NIH3T3 selvagens não infectadas. Essas culturas misturadas foram plaqueadas na densidade final de 5×10^4 células por poço de placa de 6 poços, e o meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Após 12 dias, células foram lavadas em PBS, fixadas em etanol 100%, e marcadas com cristal violeta 0,05% em 20% de etanol para visualização de focos.

3.16. Ensaio de crescimento em meio semissólido

Placas de 6 poços foram cobertas com 1,5 ml de meio de cultura suplementado com 1,2% de agarose para impedir adesão celular. Células NIH3T3 infectadas com os retrovírus contendo os vetores pLIRES2-EGFP ou pLIRES2-EGFP-ADRP foram tripsinizadas, e 5×10^3 células foram ressuspensas em 3 ml de meio de cultura contendo 0,6% de agarose. Após serem plaqueadas, colônias foram deixadas em cultura por vinte dias. Colônias representativas foram visualizadas tanto em microscopia de contraste de fase, quanto por microscopia de fluorescência para detecção de expressão de EGFP (Observer.Z1 - Carl Zeiss), e o número total das colônias foi determinado.

3.17. Reagentes e soluções

3.17.1. Cultura de células

- Meio DMEM (Dulbecco's modified eagle's medium) – SIGMA;
- Soro Fetal Bovino (SFB) – GibcoBRL (Invitrogen);
- Bicarbonato de sódio – SIGMA;
- Piruvato de sódio; aminoácidos essenciais; aminoácidos não essenciais; vitaminas; HEPES; penicilina e estreptomicina; L-glutamina e β -mercaptoetanol.- GibcoBRL (Invitrogen);
- PBS (Tampão Fosfato Salina) – pH 7,2; SIGMA;
- 0,25% Tripsina/ 4mM EDTA – GibcoBRL(Invitrogen).
- Insulina Humana - Novolin[®] R (Novo Nordisk)

3.17.2. Transfecção e Transdução Retroviral

- Cloreto de cálcio diidratado, pureza mínima 99% - SIGMA
- HEPES, pureza mínima 99,5% - SIGMA
- Dextrose - SIGMA
- Cloreto de sódio, pureza mínima 99,5% - SIGMA
- Fosfato de sódio dibásico, pureza mínima 99% - SIGMA
- Cloreto de potássio - Fluka chemie
- Tampão salino de Hanks (HBS) x2 - 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM dextrose, 50 mM HEPES, pH 7,1)
- Polybrene[®] - Fluka Chemie

3.17.3. Endonucleases de restrição e polimerases

- *XhoI*, *SaI*, *ApaI*, *NotI* - New England Biolabs
- Fragmento Largo da DNA Polimerase I (*Klenow*) - New England Biolabs

3.17.4. Análise de ciclo celular e Sub-G₀

- Tampão IP – 3,4 mM de Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de NaCl, NP-40 0,1%, 700 U/L de Rnase A, 0,075 mM de iodeto de propídio.

3.17.5. Western blot

- Tampão de ressuspensão – 40 mM de Tris-HCl pH 7.5, 10 mM de EDTA e 60 mM de pirofosfato de sódio;

- Bis:Acrilamida 30% (29:1) – BioRad;
- Gel de separação 6% - 4,9 ml de bis-acrilamida 30% (29:1), 6 ml do tampão de separação 4x (1,5 M Tris pH 8,8 e 0,4% SDS), 13,1 ml de água destilada, 200 µl de persulfato de sódio 10% e 20 µl de TEMED (SIGMA);
- Gel de empacotamento 4% - 1,35 ml de bis-acrilamida 30% (29:1), 2,5 ml de tampão de empacotamento 4x (0,5M Tris-base pH 6,8 e 0,4% SDS), 5,5 ml de água destilada, 70 µl de persulfato de sódio 10% e 20 µl de TEMED;
- Tampão de amostra 5x (SDS *loading buffer*) - 4,2 g de tris-base, 10 ml de glicerol, 10 ml de azul de bromofenol 0,1%, 15 g de SDS, pH para 6,8 em um volume final de 75 ml. Para cada 3 ml dessa solução adicionou-se 1 ml de β-mercaptoetanol;
- Tampão de corrida 10x (Tris-glicina) – 30,3 g de Tris-base, 36,05 g de glicina, 0,5 L de metanol e 2 L de água destilada para volume final de 2,5 L;
- Tampão de transferência - 7,75 g de Tris-base, 36,05 g de glicina, 0,5 L de metanol e 2 L de água destilada para volume final de 2,5 L;
- TBS 10x – 12 g de Tris-base, 90 g de NaCl, pH 7,4 para volume final de um litro;
- TBS-T – 500 µl de Tween 20 (MP Biomedicals) em um litro de TBS 1x.

3.17.6. Anticorpos

- Anti-ADRP - Fitzgerald;
- Anti-pan Ras (F132) – Santa Cruz Biotechnologies;
- Anti-ciclina A (C-19) – Santa Cruz Biotechnologies;
- Anti-histona H3 – Cell Signaling;
- Anti-fosfo-histona H3 (6G3) (Ser10) – Cell Signaling;
- Anti-α -tubulina – ICN Biochemical;
- Anti-α-tubulina – Cell Signaling;
- Anti-Rb 851 – Anticorpo policlonal cedido pela Dr^a. Jean Wang, School of Medicine, University of California, California, EUA;
- Anti-GAPDH (6C5) – Santa Cruz Biotechnologies;
- Anti-IgG de camundongo conjugado a rodamina – KPL;
- Anti-IgG de coelho conjugado a rodamina – KPL;
- Anti-IgG de porquinho-da-índia conjugado a DyLight[®]55) – Abcam;
- Anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase – GE Healthcare;
- Anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase – GE Healthcare.
- Anti-BrdU conjugado a FITC – Phoenix Flow Systems

3.17.7. Outros reagentes

- Bodipy[®] 493/503 – Molecular Probes (Invitrogen);
- DAPI – Molecular Probes (Invitrogen);
- Formaldeído – ISOFAR;
- NP-40 – Calbiochem;
- N-propil-galato – SIGMA;
- Oil Red O – SIGMA;
- Paraformaldeído – SIGMA;
- Propilenoglicol – SIGMA;
- Puromicina – SIGMA;
- TritonX-100 – Pharmacia Biotech;
- Tween 20 – SIGMA
- Saponina – SIGMA;
- VECTASHIELD[®] Mounting Medium – Vector Laboratories;
- Agarose ultra pura "*Low Melting Point*" – Invitrogen;
- Tetraborato de sodio decaidratado (Bórax) – SIGMA;
- 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) – SIGMA;
- BSA – SIGMA.

4. RESULTADOS

4.1. Análise da progressão do ciclo celular em células NIH3T3 sincronizadas

A sincronização da proliferação de células em cultura é um procedimento amplamente utilizado para estudar os mecanismos que regulam a entrada e progressão de células pelo ciclo celular (SCHORL e SEDIVY, 2007). Com o objetivo de estabelecer a sincronização do ciclo celular, foi utilizada a linhagem celular NIH3T3, derivada de fibroblastos murinos. Essa linhagem foi escolhida por não apresentar fenótipo de transformação, como crescimento na ausência de estímulo ou perda de inibição da proliferação por contato.

Células NIH3T3 foram cultivadas até confluência e mantidas em privação de soro por 24 horas (Fig. 4.1A). Foi possível observar que confluência e privação de soro causaram arresto de ciclo celular, com o acúmulo de células NIH3T3 na fase G_0/G_1 (Fig. 4.1B), e uma baixa proporção de células contendo DNA Sub- G_0 , mostrando que confluência e privação de soro não desencadearam um processo de morte celular (Fig. 4.1B). Para avaliar se células sincronizadas eram capazes de restabelecer proliferação, células em arresto na fase G_0/G_1 foram suplementadas com meio contendo 10% ou 0,2% de soro fetal bovino, e então submetidas a um ensaio de proliferação por incorporação de [3 H]timidina. Células suplementadas com meio contendo 10% de soro foram capazes de retomar proliferação, diferentemente de células mantidas em privação de soro (Fig. 4.2A). Foi possível observar a reentrada de células sincronizadas no ciclo celular por citometria de fluxo durante os períodos de 12, 24, 36 e 48 horas após suplementação com 10% de soro. Foi observado que células encontravam-se majoritariamente na fase G_0/G_1 imediatamente após suplementação com soro (0h) ou 12 horas após suplementação. Após 24 horas foi possível observar a progressão de células pela fase S, e após 36 e 48 horas células progrediram pelas fases G_2 e M, e retornaram para a fase G_1 do ciclo celular (Fig. 4.2B). Análise por *western blot* mostrou hiperfosforilação máxima da proteína pRb e maior acúmulo de ciclina A no período de 24 horas após sincronização, indicando progressão pela fase G_1 e entrada na fase S neste período (Fig. 4.3A). Também foi observada a fosforilação de histonas H3 após 48 horas, sugerindo entrada de células suplementadas na mitose neste período (Fig. 4.3A). Finalmente, os níveis de expressão de mRNA das ciclinas D2, E2, A2 e B2 foram analisados por PCR em tempo real. Foi observado um pico de expressão da ciclina D2 após 12 horas de suplementação, um pico de expressão

das ciclinas E2 e A2 após 24 horas de suplementação, e por fim um pico de expressão de ciclina B2 após 36 e 48 horas de suplementação, indicando que células NIH3T3 sincronizadas são capazes de progredir uniformemente pelo ciclo celular após suplementação com soro (Fig. 4.3B). Juntos estes resultados mostram que a sincronização de células NIH3T3 por confluência e privação de soro proporciona um bom modelo para avaliar a regulação de corpúsculos lipídicos durante as diferentes fases do ciclo celular.

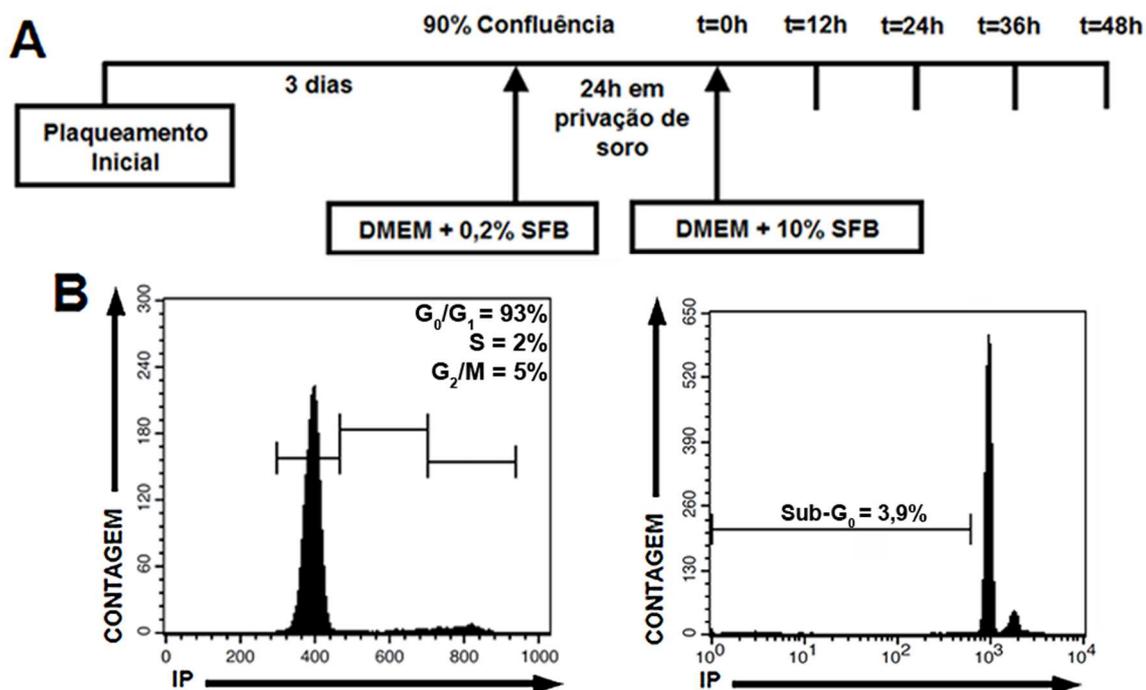


FIGURA 4.1. Modelo de sincronização de células NIH3T3 por confluência e privação de soro. (A) Esquema do modelo experimental de sincronização de células NIH3T3. Células NIH3T3 foram cultivadas até confluência, e então mantidas em privação de soro por 24h. Posteriormente, células foram suplementadas com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e analisadas nos tempos indicados. (B) Análise de citometria de fluxo para ciclo celular e morte celular por fragmentação de DNA indicam estado das células no momento anterior à suplementação com soro. Resultados representativos de pelo menos três experimentos.

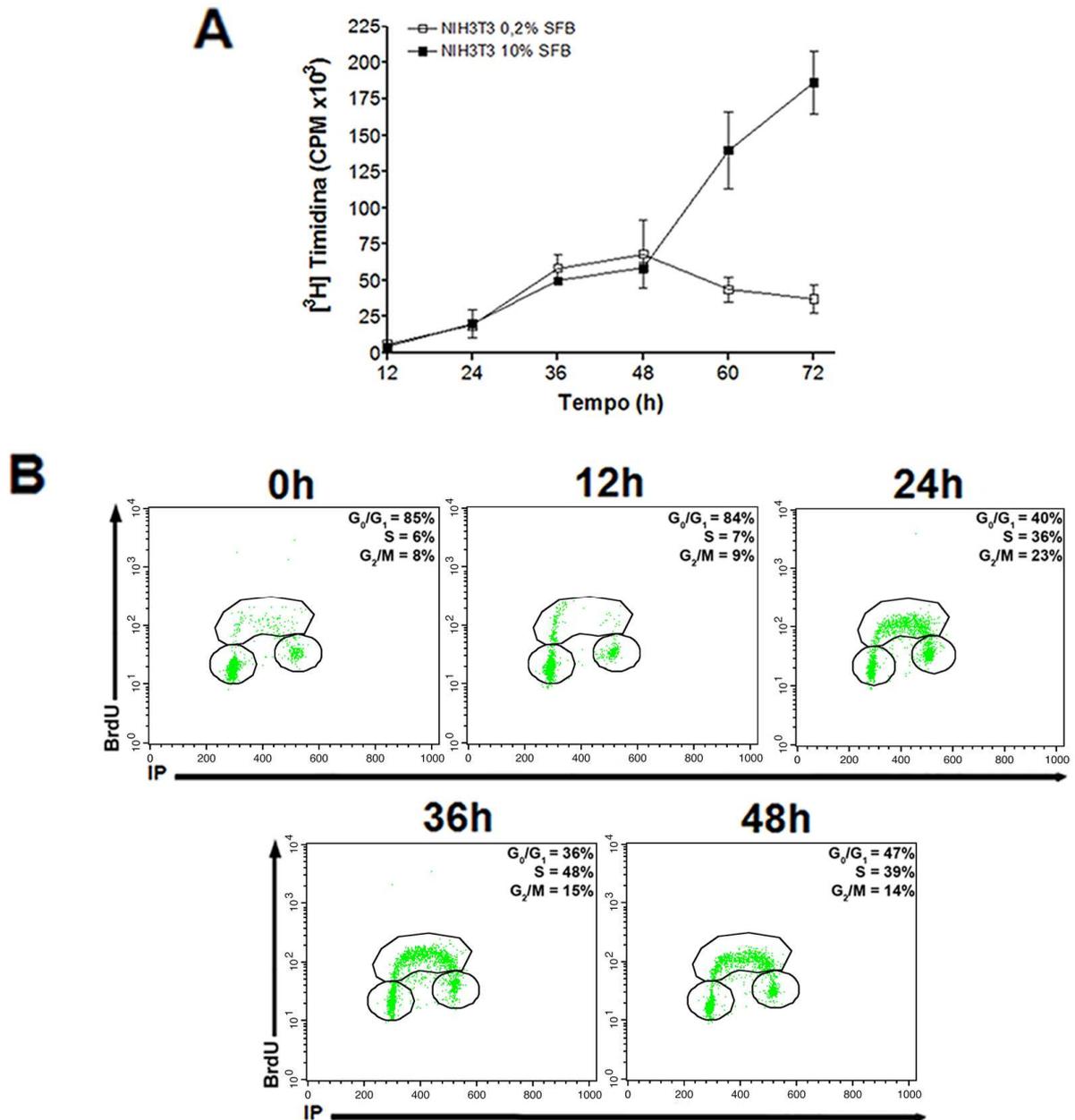


FIGURA 4.2. Células NIH3T3 sincronizadas por confluência e privação de soro são capazes de restabelecer proliferação após suplementação com soro. (A) Células NIH3T3 sincronizadas foram suplementadas com meio contendo 0,2% ou 10% de soro, e a proliferação celular foi avaliada nos tempos indicados por incorporação de [³H] timidina. Barras de desvio padrão indicam variação de um experimento. **(B)** Células NIH3T3 sincronizadas foram suplementadas com meio contendo 10% de soro, e incubadas com 20μM de BrdU trinta minutos antes da fixação nos tempos indicados. Posteriormente, as células foram marcadas utilizando anticorpos anti-BrdU-FITC e iodeto de propídio para análise por citometria de fluxo. A percentagem de células em cada estágio do ciclo celular (G₀/G₁, S e G₂/M) está representada. Todos os resultados são representativos de pelo menos três experimentos.

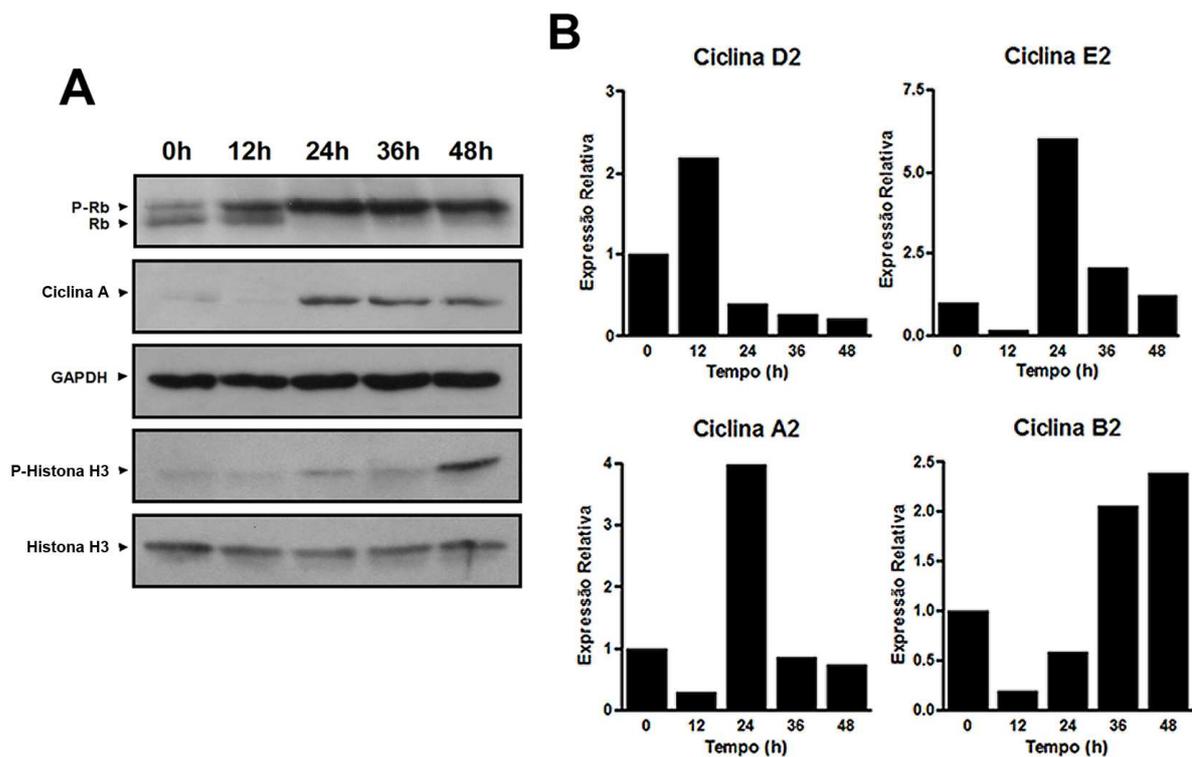


FIGURA 4.3. Células NIH3T3 sincronizadas progridem uniformemente pelo ciclo celular após suplementação com soro. (A) Células NIH3T3 sincronizadas foram suplementadas com meio contendo 10% de soro, os extratos totais de proteínas foram preparados nos tempos indicados, e então separados por SDS-PAGE. *Western blot* foi realizado utilizando anticorpos específicos contra as proteínas descritas, para análise dos níveis de fosforilação de pRb, expressão de ciclina A, e fosforilação de histona H3. **(B)** Células NIH3T3 sincronizadas foram suplementadas com meio contendo 10% de soro. Extratos de RNA foram preparados utilizando Trizol® nos tempos indicados, e a síntese de cDNA foi feita por RT-PCR. cDNAs sintetizados foram usados para avaliar a expressão relativa das ciclinas D2, E2, A2 e B2 por PCR em tempo real, usando sondas TaqMan®. A quantidade de mRNA foi normalizada a partir dos níveis de mRNA de HPRT, e a expressão relativa foi considerada 1 para 0h. Todos os resultados são representativos de pelo menos três experimentos.

4.2. Análise da regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular

Com o objetivo de avaliar a regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular, foi usado o modelo de sincronização por confluência e privação de soro na linhagem NIH3T3, seguido de suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino, para análise de corpúsculos lipídicos nos tempos descritos anteriormente.

Foi realizada inicialmente a análise da localização subcelular de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3 por microscopia de fluorescência, marcando microtúbulos com anticorpos contra α -tubulina para visualização da morfologia celular (vermelho), corpúsculos lipídicos com a sonda lipídica fluorescente Bodipy[®] (verde), e o núcleo das células com o marcador de DNA DAPI (azul). Foi observada a localização perinuclear de corpúsculos lipídicos nos períodos anteriores à suplementação ou após 12 horas de suplementação (referentes à maioria das células na fase G₀/G₁ do ciclo celular), assim como nos períodos de 36 e 48 horas após suplementação (referentes à maioria das células na fase G₂/M do ciclo celular) (Fig. 4.4A). Surpreendentemente, foi observada uma maior quantidade de corpúsculos lipídicos com localização dispersa pelo citoplasma no período de 24 horas após a suplementação, referente à maioria das células progredindo pela fase S do ciclo celular (Fig. 4.4A, 4.4B). A quantificação de corpúsculos lipídicos também revelou um aumento no número de corpúsculos lipídicos durante a fase S do ciclo celular, observado tanto pela quantificação de número e área total por célula feita por microscopia de fluorescência após marcação com a sonda lipofílica Oil Red O (Fig. 4.5A), quanto pela média de fluorescência após marcação com Bodipy[®] e análise por citometria de fluxo (Fig. 4.5B, 4.5C). Esses dados indicam que corpúsculos lipídicos são regulados durante a progressão do ciclo celular, mostrando uma regulação diferencial durante a progressão da fase S.

Alguns experimentos foram realizados a fim de confirmar a regulação diferencial de corpúsculos lipídicos durante a fase S do ciclo celular. Primeiramente, uma análise da localização subcelular de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3 foi realizada por microscopia de fluorescência utilizando em conjunto a marcação de BrdU incorporado. Dessa forma, seria possível analisar a dispersão dessas organelas especificamente em células que estejam progredindo por esta fase do ciclo celular. Enquanto células negativas para marcação de BrdU não apresentaram dispersão de corpúsculos lipídicos (Fig. 4.6), células positivas pra BrdU mostraram

maior dispersão dessas organelas pelo citoplasma (Fig. 4.6), corroborando os dados anteriores mostrando maior dispersão de corpúsculo lipídico durante a fase S do ciclo celular. Além disso, através do padrão de marcação de BrdU por imunofluorescência, é possível determinar o estágio de síntese de DNA no qual determinada célula se encontra (O'KEEFE *et al.*, 1991; WU *et al.*, 2005). Interessantemente, células com marcação homogênea de BrdU no núcleo, indicativo de células no início da síntese de DNA, apresentaram corpúsculos lipídicos ainda perinucleares (Fig. 4.6). Já células apresentando marcação perilaminar ou perinucleolar de BrdU, sugestivo de células no meio da replicação do DNA, mostram corpúsculos com maior dispersão (Fig. 4.6). Por fim, células mostrando marcação pontual de BrdU em regiões heterogêneas, indicativo de células no fim da síntese de DNA, mostram novamente corpúsculos lipídicos perinucleares (Fig. 4.6). Esses dados mostram que essas organelas apresentam mudanças na localização subcelular durante a replicação do DNA, sugerindo que a dispersão de corpúsculos lipídicos é dinâmica durante a progressão pela fase S do ciclo celular.

Ainda para confirmar os dados apontando uma regulação diferencial de corpúsculos lipídicos durante a fase S, células NIH3T3 foram analisadas após arresto de ciclo celular especificamente na fase S por incubação com timidina. Para isso, células sincronizadas por confluência e privação de soro foram mantidas por 24 horas em meio contendo soro e uma alta concentração (2 mM) de timidina (Fig. 4.7A), após o qual foi possível observar um acúmulo de células na fase S do ciclo celular, quando comparadas com células em arresto em G₀/G₁ (Fig. 4.7B). Células em arresto na fase S foram então comparadas com células em arresto na fase G₀/G₁, e a quantidade e localização subcelular de corpúsculos lipídicos foi analisada conforme descrito anteriormente. Foi observado que células em arresto na fase S do ciclo celular apresentavam, em sua maioria, corpúsculos lipídicos dispersos no citoplasma, enquanto que células em arresto na fase G₀/G₁ apresentavam majoritariamente corpúsculos lipídicos perinucleares (Fig. 4.8A). Além disso, células em arresto na fase S apresentavam um maior número e área por célula de corpúsculos lipídicos (Fig. 4.8B), assim como maior intensidade de fluorescência para Bodipy® (Fig. 4.8C, Fig. 4.8D), quando comparadas com células em arresto na fase G₀/G₁. Juntos esses dados corroboram os dados mostrados anteriormente, nos quais corpúsculos lipídicos apresentam-se em maior número e dispersos pelo citoplasma de células NIH3T3 durante a fase S do ciclo celular.

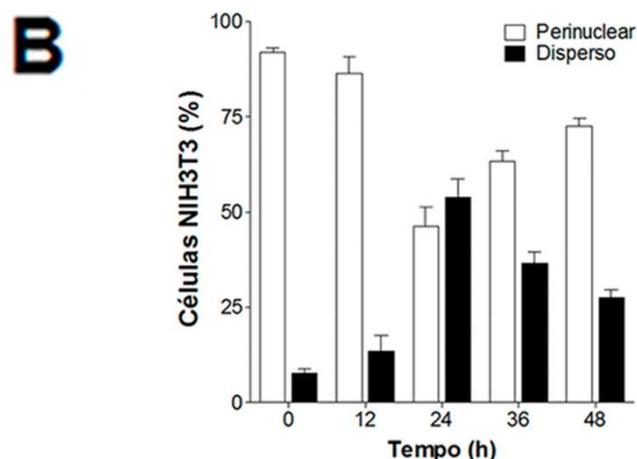
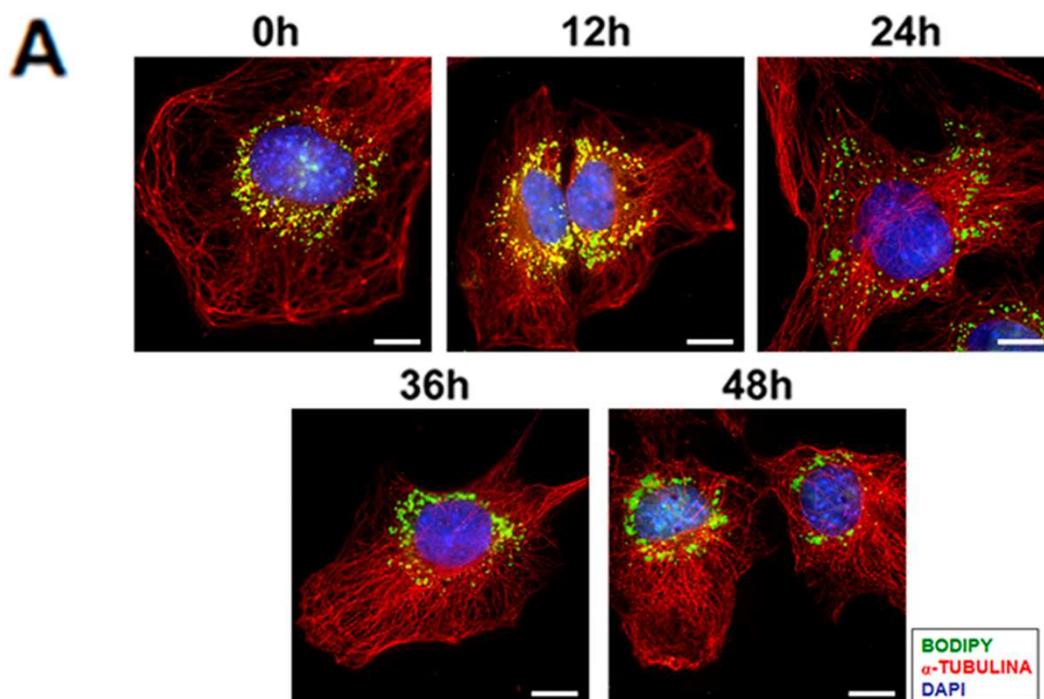


FIGURA 4.4. Localização celular de corpúsculos lipídicos varia conforme progressão do ciclo celular em células NIH3T3. Células NIH3T3 foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e posteriormente suplementadas com meio contendo 10% SFB conforme descrito na Fig. 4.1A. **(A)** Após a suplementação, as células foram fixadas em lamínula nos tempos indicados e tratadas com anticorpos anti- α -tubulina para imunofluorescência (em vermelho), Bodipy® para marcação de corpúsculos lipídicos (em verde) e DAPI para marcação nuclear (em azul). Análise por microscopia de fluorescência mostra a morfologia celular e localização subcelular de corpúsculos lipídicos nos diferentes tempos. Barras de escala representam 10 μ m. **(B)** Gráfico mostrando percentagem de células apresentando corpúsculos lipídicos perinucleares ou dispersos nos diferentes tempos indicados. Todos os resultados são representativos de pelo menos três experimentos.

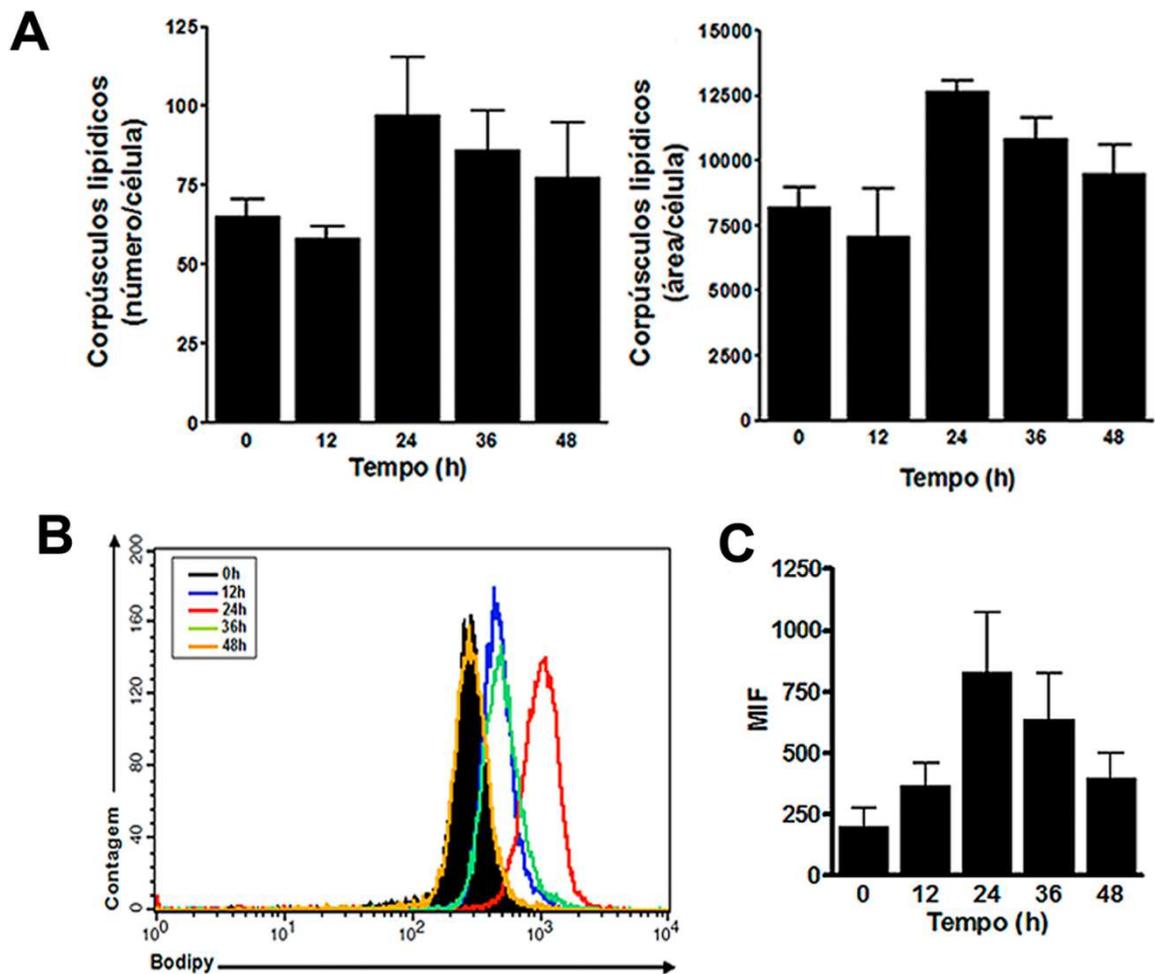


FIGURA 4.5. Quantidade de corpúsculos lipídicos varia durante a progressão do ciclo celular em células NIH3T3. Células NIH3T3 foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e posteriormente suplementadas com meio contendo 10% SFB conforme descrito na Fig. 4.1A. **(A)** Quantificação por marcação com Oil Red O. Células NIH3T3 foram fixadas em lamínula e coradas com Oil Red O nos tempos indicados. O número (gráfico da esquerda) ou área total (gráfico da direita) de corpúsculos lipídicos por célula foram determinados através do software ImageQuant TL (GE Healthcare). Dados mostrados como média \pm DP de três experimentos independentes. **(B)** Quantificação de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo. Células foram tratadas com Bodipy® nos tempos indicados e analisadas por citometria de fluxo. Dados mostrados como sobreposição de intensidades de fluorescência de cada tempo analisado. **(C)** Representação gráfica da média de intensidade de fluorescência de células tratadas com Bodipy® nos tempos indicados. Todos os resultados são representativos de pelo menos três experimentos.

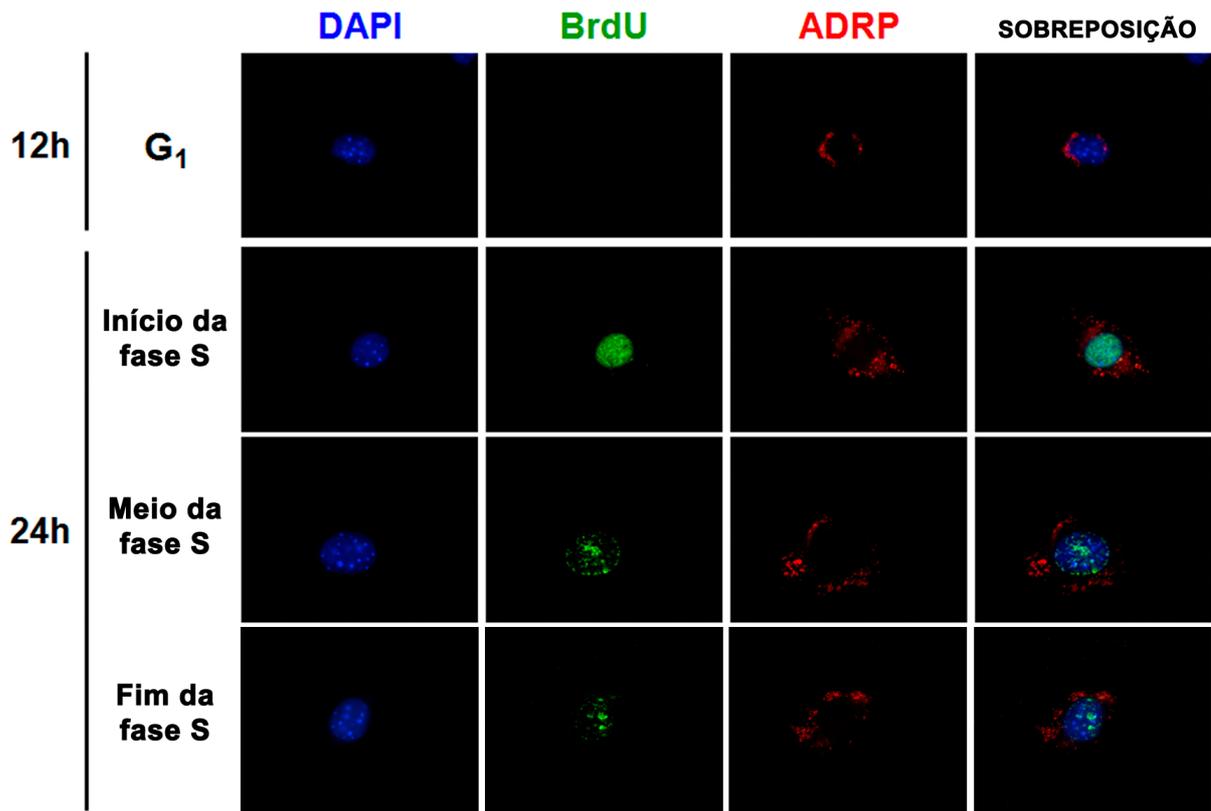


FIGURA 4.6. Dispersão de corpúsculos lipídicos é dinâmica durante a fase S do ciclo celular em células NIH3T3. Células NIH3T3 foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e posteriormente suplementadas com meio contendo 10% SFB conforme descrito na Fig. 4.1A. Células foram então incubadas com 20 μ M de BrdU trinta minutos antes da fixação em lamínulas nos tempos indicados. Posteriormente, as células foram tratadas com os anticorpos anti-BrdU-FITC (em verde), anticorpos anti-ADRP para visualização de corpúsculos lipídicos (em vermelho), e DAPI para marcação nuclear (em azul). Análise por microscopia de fluorescência mostra localização subcelular de corpúsculos lipídicos e marcação nuclear de BrdU nos diferentes tempos indicados. Barras de escala representam 10 μ m. Resultados representativos de três experimentos independentes.

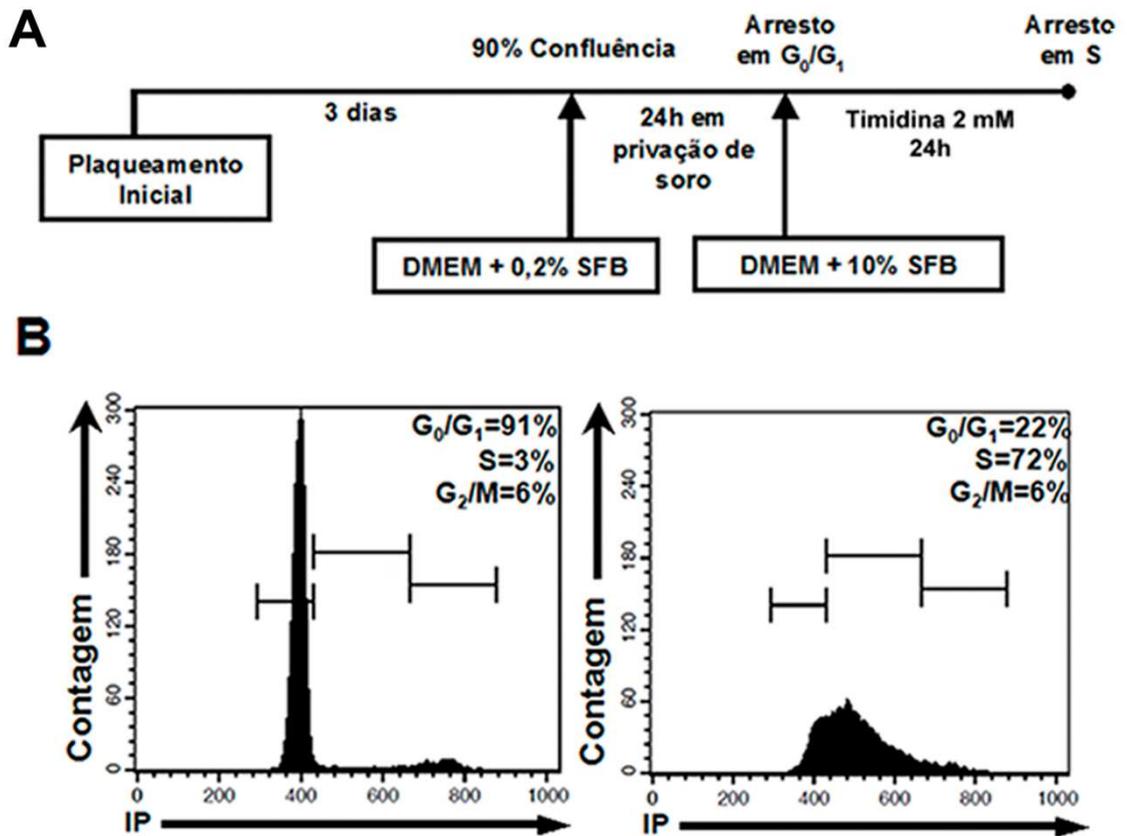


FIGURA 4.7. Timidina causa arresto na fase S do ciclo celular em células NIH3T3. (A) Desenho experimental de arresto de ciclo celular por administração de timidina. Células NIH3T3 foram cultivadas até confluência, e então mantidas em privação de soro por 24h. Posteriormente, células foram cultivadas em meio contendo 10% de SFB e 2 mM de timidina por 24 horas. **(B)** Análise de ciclo celular foi realizada em células NIH3T3 após sincronização por confluência e privação de soro ou após incubação com timidina. Células foram marcadas com iodeto de propídio (IP) e analisadas por citometria de fluxo, e percentagem de células em cada fase do ciclo (G_0/G_1 , S e G_2/M) está indicada. Resultados representativos de pelo menos três experimentos independentes.

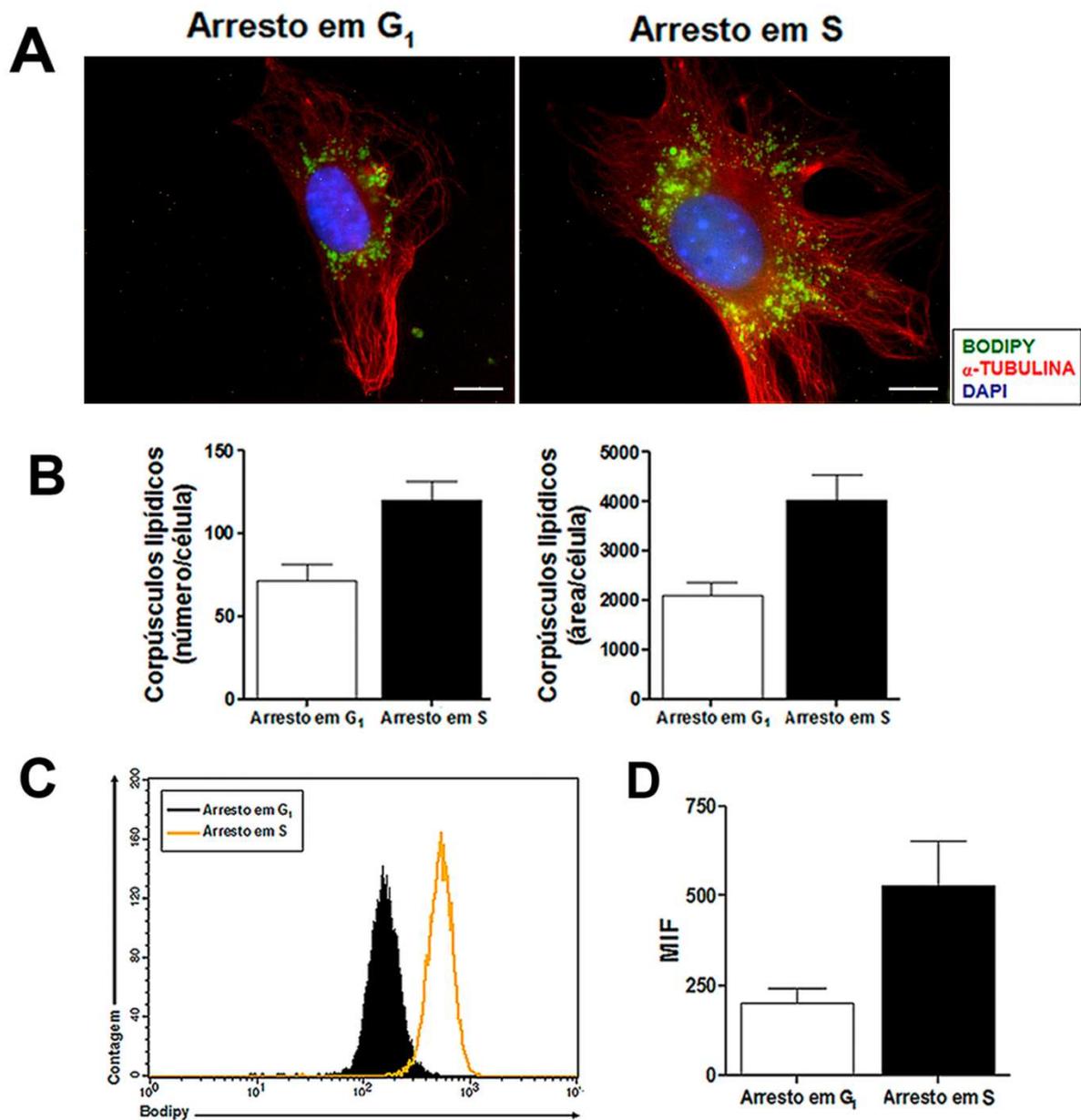


FIGURA 4.8. Células NIH3T3 em arresto na fase S do ciclo celular apresentam maior número e localização dispersa de corpúsculos lipídicos. Células NIH3T3 foram sincronizadas em G₀/G₁ ou S conforme descrito na Fig. 4.10A. **(A)** Localização subcelular de corpúsculos lipídicos. Células foram fixadas em lamínula e tratadas com anticorpos anti- α -tubulina para imunofluorescência (em vermelho), Bodipy® para marcação de corpúsculos lipídicos (em verde) e DAPI para marcação nuclear (em azul). Análise por microscopia de fluorescência mostra a morfologia celular e localização subcelular de corpúsculos lipídicos nos diferentes tratamentos. Barras de escala representam 10 μ m. **(B)** Quantificação por marcação com Oil Red O. Células NIH3T3 em arresto em G₁ ou arresto em S foram fixadas em lamínula e coradas com Oil Red O. O número ou área total de corpúsculos lipídicos por célula foram determinados através do software ImageQuant TL (GE Healthcare). Dados mostrados como média \pm DP de três experimentos independentes. **(C)** Quantificação por citometria de fluxo. Células em arresto em G₁ ou arresto em S foram tratadas com Bodipy® e analisadas por citometria de fluxo. Dados mostrados como sobreposição de intensidades de fluorescência de cada tempo analisado. **(D)** Representação gráfica da média de intensidade de fluorescência de células tratadas com Bodipy®. Dados mostrados como média \pm DP de três experimentos independentes. Todos os resultados mostrados são representativos de pelo menos três experimentos independentes

4.3. Regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular em células IEC-6

Para dar suporte aos dados mostrados em células NIH3T3, de regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular foi avaliada do mesmo modo em células IEC-6, derivadas de células intestinais de rato e que também não apresentam fenótipo de células transformadas (QUARONI *et al.*, 1979). Para isso, o mesmo método de sincronização por confluência e privação de soro utilizado em células NIH3T3 foi realizado em células IEC-6. Desta vez, células IEC-6 foram cultivadas até confluência e mantidas em meio sem soro por 24 horas (Fig.4.9A). Assim como em células NIH3T3, o procedimento de sincronização causou arresto de células IEC-6 na fase G_0/G_1 do ciclo células sem resultar em morte celular significativa (Fig. 4.9B). Além disso, após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino, células IEC-6 também foram capazes de restabelecer proliferação, como observado através de citometria de fluxo após incorporação de BrdU (Fig. 4.9C). Foi observado que células IEC-6 encontravam-se majoritariamente na fase G_0/G_1 do ciclo celular imediatamente após suplementação com soro (0h) ou 12 horas após suplementação, alcançando a fase S do ciclo celular entre 24 e 36 horas, e retornando para a fase G_0/G_1 após 48 horas (Fig. 4.9C). Juntos estes resultados mostram que a sincronização de células IEC-6 por confluência e privação de soro, assim como em células NIH3T3, também pode ser utilizado para avaliar a regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular.

As mesmas análises para avaliar a regulação de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3 foram realizadas em células IEC-6 suplementadas. A localização subcelular de corpúsculos lipídicos foi observada por microscopia de fluorescência, desta vez marcando microtúbulos com anticorpos contra α -tubulina para visualização da morfologia celular (vermelho), corpúsculos lipídicos com a sonda lipídica fluorescente Bodipy[®] (verde), e o núcleo das células com o marcador de DNA DAPI (azul). Assim como em células NH3T3, foi observada a localização perinuclear de corpúsculos lipídicos nos períodos anteriores à suplementação ou após 12 horas de suplementação (referentes à maioria das células na fase G_0/G_1 do ciclo celular), bem como em células após 48 horas de suplementação (Fig. 4.10). Além disso, corpúsculos lipídicos com localização dispersa pelo citoplasma foram observados em células IEC-6 no período após 24 e 36 horas de suplementação, referente à maioria das células progredindo pela fase S do ciclo celular (Fig. 4.10). A quantificação corpúsculos lipídicos em IEC-6 também revelou um aumento no

número de corpúsculos lipídicos a partir da entrada de células IEC-6 na fase S do ciclo celular, observado tanto pela quantificação de número e área total por célula feita por microscopia de fluorescência após marcação com a sonda lipofílica Oil Red O (Fig. 4.11A), quanto pela média de fluorescência após marcação com Bodipy® e análise por citometria de fluxo (Fig. 4.11B, 4.11C). Esses dados vão de acordo com o que foi observado em células NIH3T3, e reforçam a ideia de que corpúsculos lipídicos apresentam uma regulação dinâmica durante a progressão do ciclo celular.

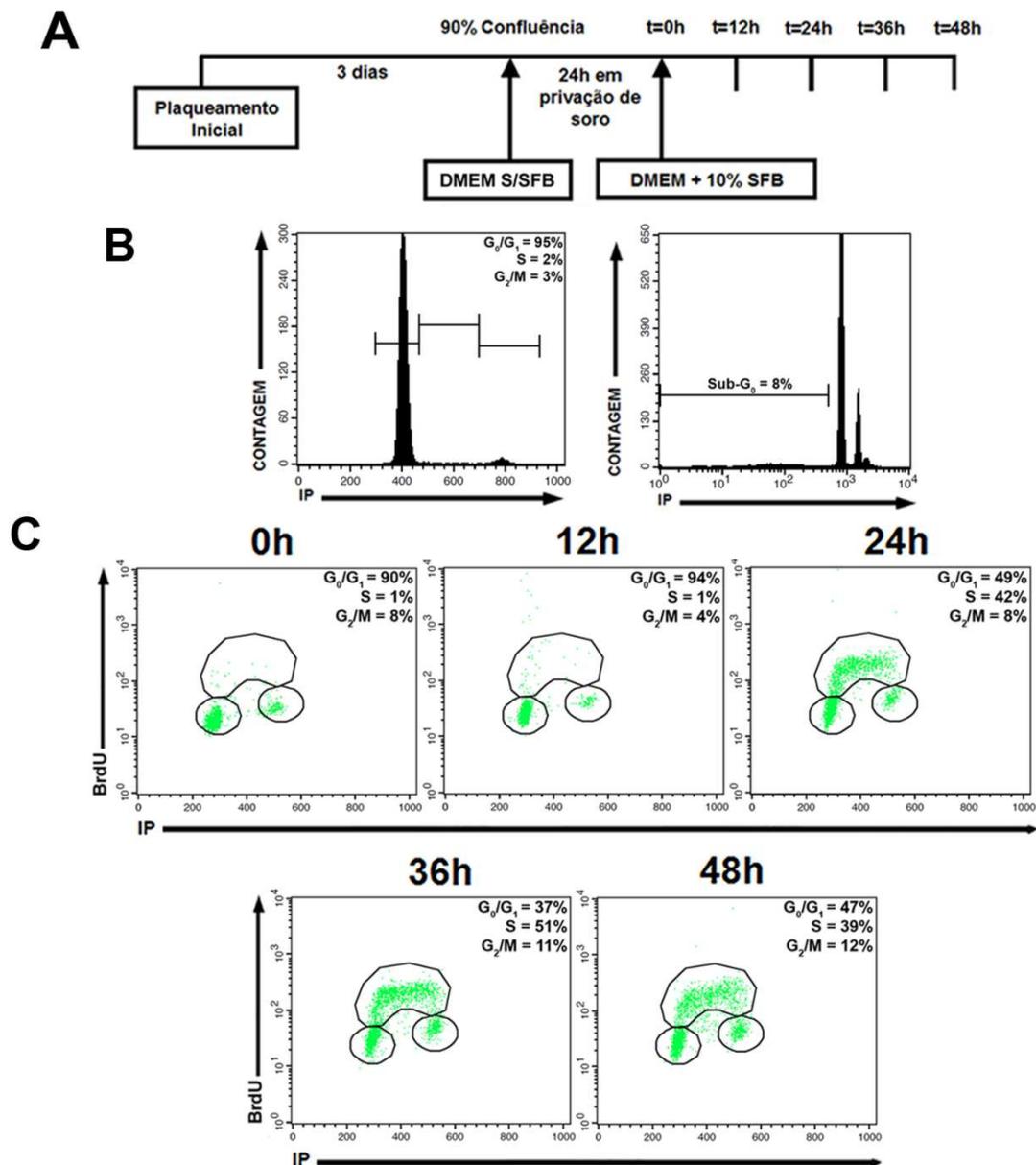


FIGURA 4.9. Células IEC-6 sincronizadas progridem uniformemente pelo ciclo celular após suplementação com soro. (A) Esquema do modelo experimental de sincronização de células IEC-6. Células IEC-6 foram cultivadas até confluência, e então mantidas em meio sem soro por 24h. Posteriormente, células foram suplementadas com meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e analisadas nos tempos indicados. (B) Análise de citometria de fluxo para ciclo celular e morte celular por fragmentação de DNA indicam estado das células no momento anterior à suplementação com soro. (C) Células IEC-6 sincronizadas foram suplementadas com meio contendo 10% de soro, e incubadas com 20 μ M de BrdU trinta minutos antes da fixação nos tempos indicados. Posteriormente, as células foram marcadas utilizando anticorpos anti-BrdU-FITC e iodeto de propídio para análise por citometria de fluxo. A percentagem de células em cada estágio do ciclo celular (G_0/G_1 , S e G_2/M) está representada. Todos os resultados são representativos de pelo menos três experimentos.

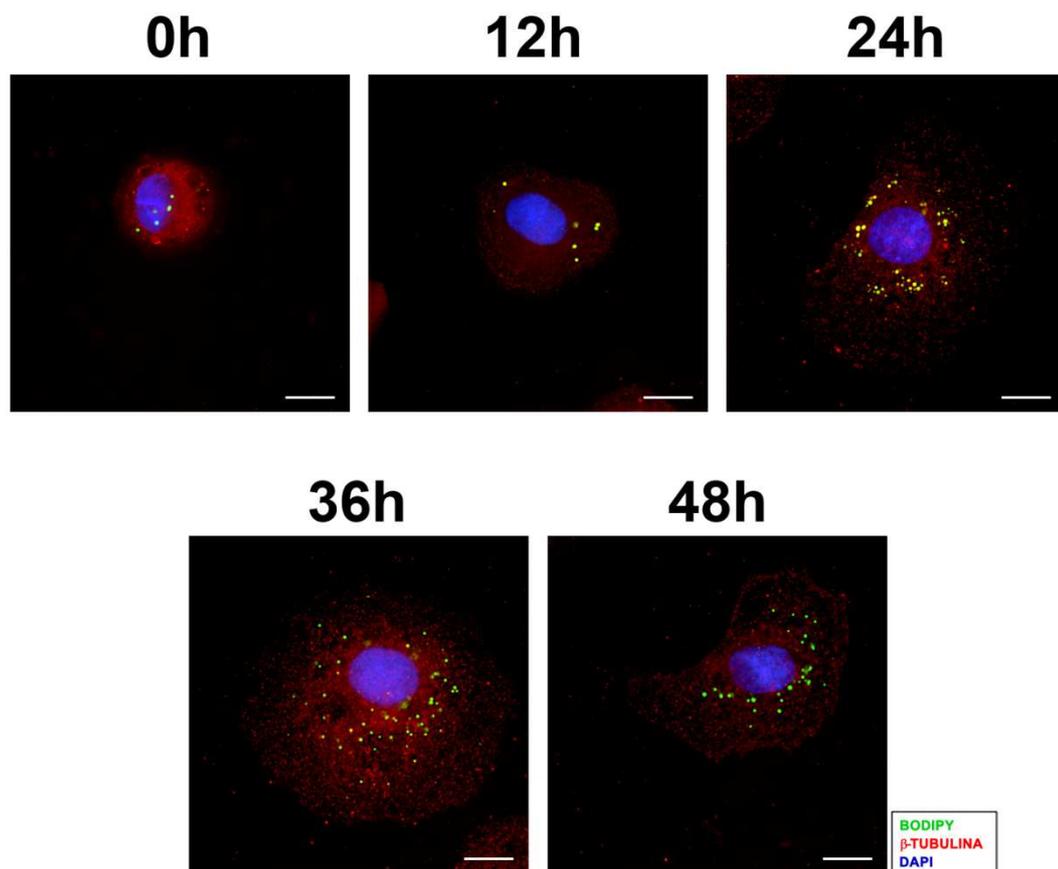


FIGURA 4.10. Localização celular de corpúsculos lipídicos varia conforme progressão do ciclo celular em células IEC-6. Células IEC-6 foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e posteriormente suplementadas com meio contendo 10% SFB conforme descrito na Fig. 4.4A. **(A)** Após a suplementação, as células foram fixadas em laminula nos tempos indicados e tratadas com anticorpos anti- α -tubulina para imunofluorescência (em vermelho), Bodipy® para marcação de corpúsculos lipídicos (em verde) e DAPI para marcação nuclear (em azul). Análise por microscopia de fluorescência mostra a morfologia celular e localização subcelular de corpúsculos lipídicos nos diferentes tempos. Barras de escala representam 10 μ m. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

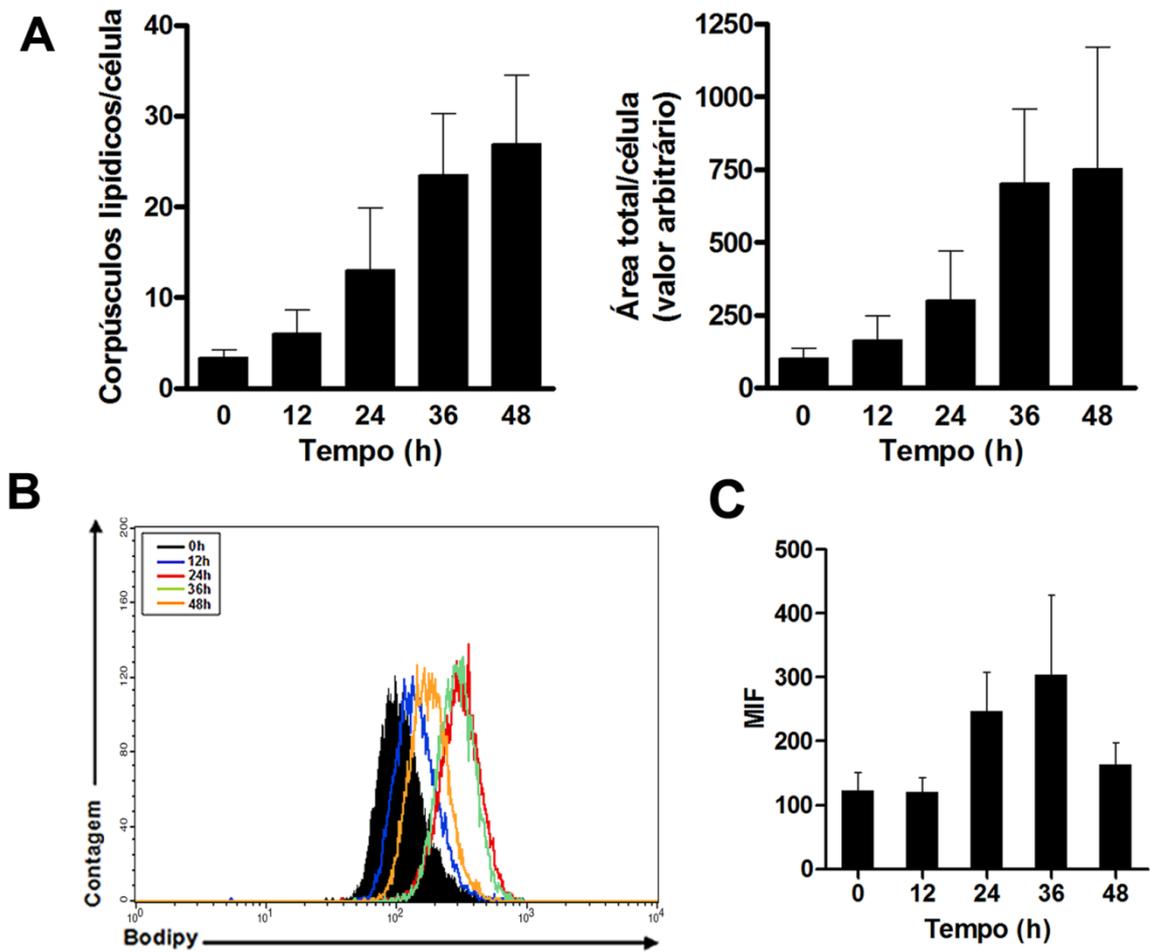


FIGURA 4.11. Quantidade de corpúsculos lipídicos varia durante a progressão do ciclo celular em células IEC-6. Células IEC-6 foram sincronizadas por confluência e privação de soro, e posteriormente suplementadas com meio contendo 10% SFB conforme descrito na Fig. 4.4A. **(A)** Quantificação por marcação com Oil Red O. Células IEC-6 foram fixadas em lamínula e coradas com Oil Red O nos tempos indicados. O número (gráfico da esquerda) ou área total (gráfico da direita) de corpúsculos lipídicos por célula foram determinados através do software ImageQuant TL (GE Healthcare). Dados mostrados como média \pm DP de três experimentos independentes. **(B)** Quantificação de corpúsculos lipídicos por citometria de fluxo. Células IEC-6 foram tratadas com Bodipy® nos tempos indicados e analisadas por citometria de fluxo. Dados mostrados como sobreposição de intensidades de fluorescência de cada tempo analisado. **(C)** Representação gráfica da média de intensidade de fluorescência de células tratadas com Bodipy® nos tempos indicados. Todos os resultados são representativos de pelo menos três experimentos.

4.4. Regulação de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular em células transformadas

Com o objetivo de caracterizar diferenças na regulação de corpúsculos lipídicos em células apresentando defeitos no controle de ciclo celular, células NIH3T3 foram transformadas a partir da expressão da oncoproteína constitutivamente ativa H-*rasV12* (ROBBS *et al.*, 2008). Células NIH3T3-H-*rasV12* apresentam características típicas de células transformadas, como foi mostrado anteriormente (ROBBS *et al.*, 2008). Células NIH3T3 ou NIH3T3-H-*rasV12* foram submetidas ao procedimento de sincronização em G₀/G₁ por confluência e privação de soro (Fig. 4.12A). Análise por marcação com iodeto de propídio mostrou que confluência e privação de soro foram capazes de causar arresto em G₀/G₁ em células NIH3T3, enquanto que o mesmo tratamento não foi capaz de causar o mesmo efeito em células NIH3T3-H-*rasV12* (Fig. 4.12B). Baseados nestes dados, análises de quantificação e localização subcelular de corpúsculos lipídicos foram realizadas em ambas as linhagens após confluência e privação de soro. Pôde-se observar a localização dispersa de corpúsculos lipídicos pelo citoplasma em células NIH3T3-H-*rasV12*, diferentemente de células NIH3T3 selvagens que apresentavam corpúsculos lipídicos com localização perinuclear (Fig. 4.13A). Também foi possível observar por citometria de fluxo uma maior quantidade de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3-H-*rasV12*, quando comparadas com células NIH3T3 selvagens (Fig. 4.13B). Estes dados mostram uma regulação diferencial de corpúsculos lipídicos entre uma linhagem transformada e uma linhagem não transformada.

Já foi descrito que a proteína estrutural de corpúsculos lipídicos ADRP é importante para o acúmulo de lipídios intracelulares, sugerindo um papel na biogênese de corpúsculos lipídicos (IMAMURA *et al.*, 2002; GAO E SERRERO, 1999; BRASAEMLE *et al.*, 1997). Baseado nestes dados, a expressão aumentada de ADRP em células NIH3T3-H-*rasV12* poderia estar supostamente correlacionada com o aumento no número de corpúsculos lipídicos observado nesta linhagem. Portanto, foram realizadas análises de expressão e localização subcelular de ADRP em células NIH3T3 e NIH3T3-H-*rasV12*. Análise por *western blot* mostrou uma maior expressão da proteína ADRP em células NIH3T3-H-*rasV12* quando comparadas com a linhagem NIH3T3 (Fig. 4.14A). Além disso, foi possível observar a localização da marcação de ADRP justaposta a Bodipy[®] por microscopia de fluorescência, sugerindo a localização desta proteína em corpúsculos lipídicos em ambas as linhagens (Fig. 4.14B). Esses dados definem ADRP como um alvo interessante para

a modulação da biogênese de corpúsculos lipídicos nessas linhagens.

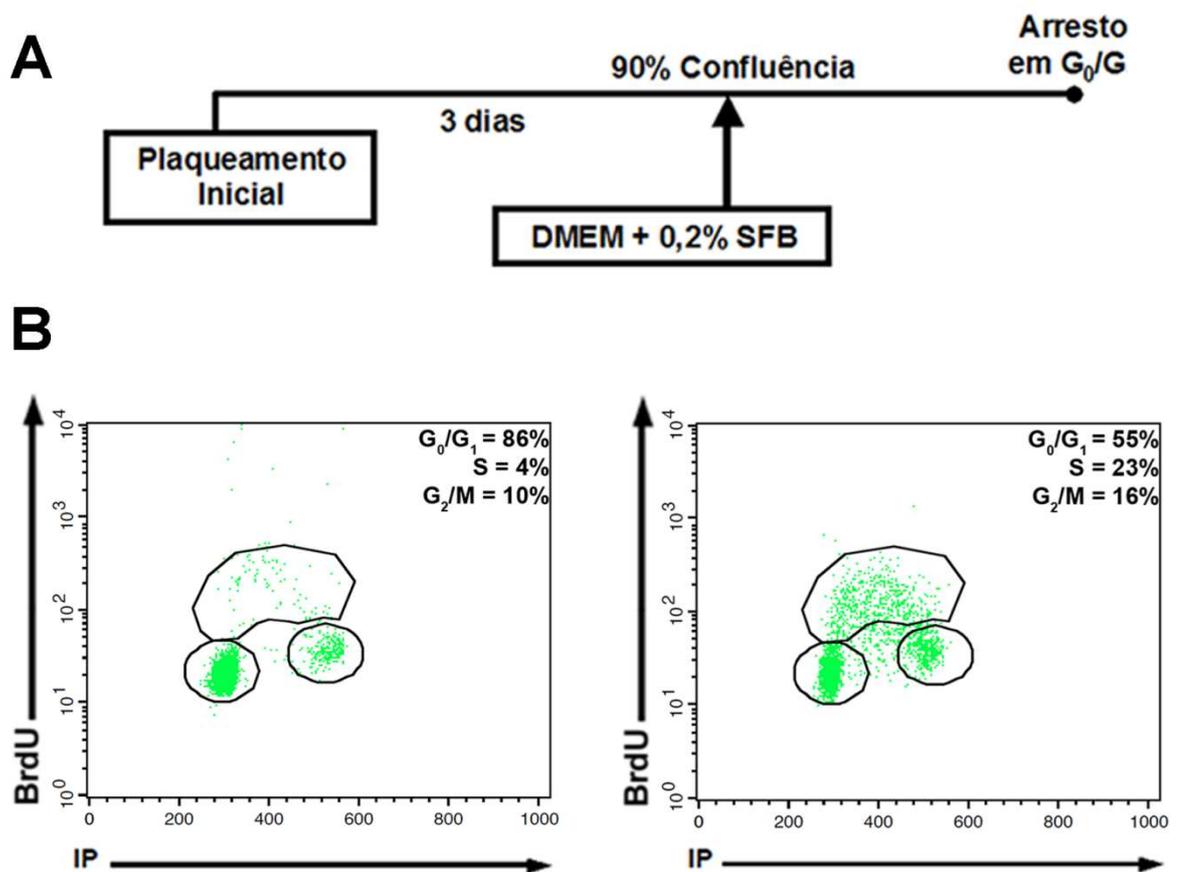


FIGURA 4.12. Células NIH3T3 transformadas com a oncoproteína H-rasV12 apresentam desregulação do ciclo celular. (A) Desenho experimental para sincronização de células por arresto em G₀/G₁. Células NIH3T3 ou NIH3T3-H-rasV12 foram cultivadas até confluência, e então em privação de soro por 24h. **(B)** Análise de ciclo celular foi realizada em ambas as linhagens após confluência e privação de soro. Células foram incubadas com 20μM de BrdU trinta minutos antes da fixação. Posteriormente, as células foram marcadas utilizando anticorpos anti-BrdU-FITC e iodeto de propídio para análise por citometria de fluxo. A percentagem de células em cada estágio do ciclo celular (G₀/G₁, S e G₂/M) está representada. Dados representativos de pelo menos três experimentos independentes.

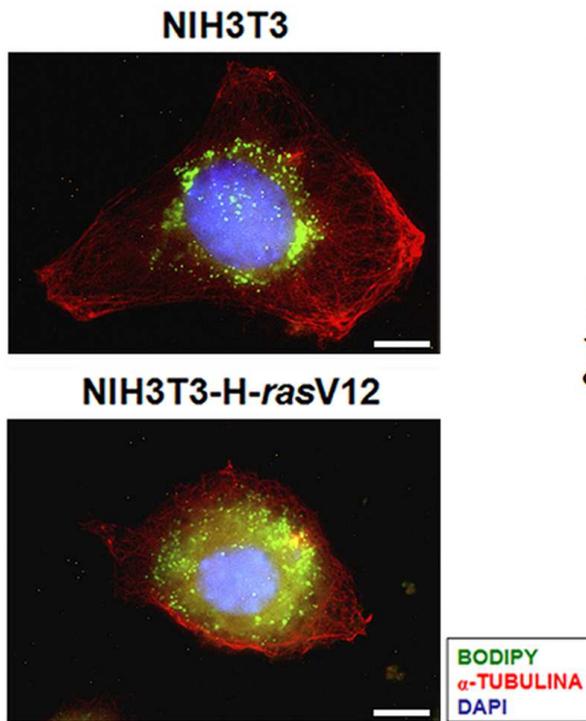
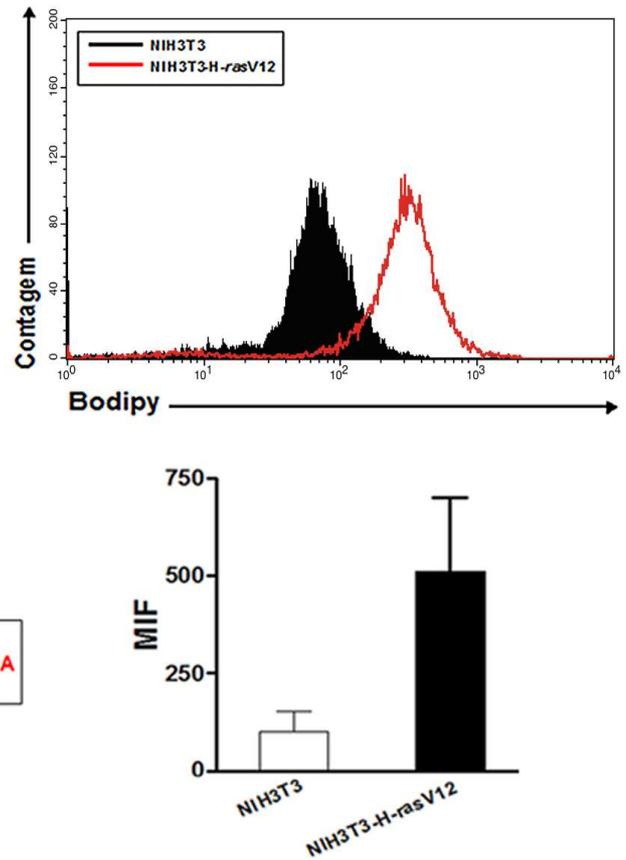
A**B**

FIGURA 4.13. Células NIH3T3-H-rasV12 apresentam localização dispersa e maior número de corpúsculos lipídicos. Células NIH3T3 ou NIH3T3-H-rasV12 foram submetidas ao tratamento de confluência e privação de soro conforme descrito na Fig. 4.12A. **(A)** Localização subcelular de corpúsculos lipídicos. Células foram fixadas em lamínula e tratadas com anticorpos anti- α -tubulina para imunofluorescência (em vermelho), Bodipy® para marcação de corpúsculos lipídicos (em verde) e DAPI para marcação nuclear (em azul). Análise por microscopia de fluorescência mostra a morfologia celular e localização subcelular de corpúsculos lipídicos nas duas linhagens celulares. Barras de escala representam 10 μ m. **(B)** Quantificação por citometria de fluxo. Células NIH3T3 ou NIH3T3-H-rasV12 foram tratadas com Bodipy® e analisadas por citometria de fluxo. Dados mostrados como sobreposição de intensidades de fluorescência ou através de representação gráfica da média de intensidade de fluorescência de células NIH3T3 ou NIH3T3-H-rasV12 tratadas. Dados mostrados como média \pm DP de três experimentos independentes. Todos os resultados mostrados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

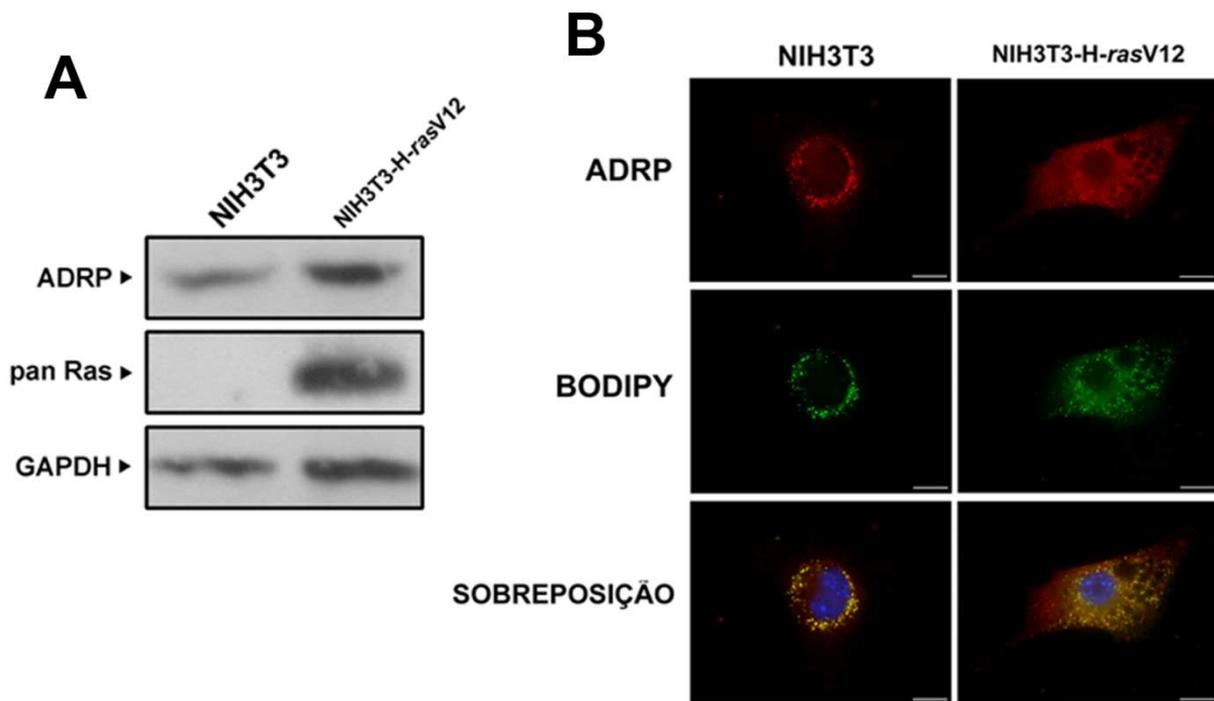


FIGURA 4.14. Células NIH3T3-H-rasV12 apresentam maior acúmulo da proteína estrutural ADRP. Células NIH3T3 ou NIH3T3-H-rasV12 foram submetidas ao tratamento de confluência e privação de soro conforme descrito na Fig. 4.12A. **(A)** Western blot foi realizado utilizando anticorpos específicos contra as proteínas descritas após confluência e privação de soro. **(B)** Localização subcelular de ADRP. Após confluência e privação de soro, células NIH3T3 ou NIH3T3-H-rasV12 foram marcadas para ADRP por imunofluorescência (em vermelho), com a sonda lipídica fluorescente Bodipy® para marcação de corpúsculos lipídicos (em verde) e com DAPI para marcação nuclear (em azul). Barras de escala representam 10 μ m. Todos os resultados mostrados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.5. Efeito da superexpressão de ADRP na regulação de corpúsculos lipídicos

Baseados nos dados mostrados anteriormente em células NIH3T3-H-rasV12, foi realizado a indução da superexpressão de ADRP em células NIH3T3 com o objetivo de avaliar o efeito da proteína ADRP na biogênese de corpúsculos lipídicos. Para isso, células NIH3T3 foram transduzidas com vetores retrovirais contendo o gene de ADRP humana (hADRP) sob controle de expressão pelo promotor de citomegalovirus. Após transdução, células foram submetidas à confluência e privação de soro, e a quantidade e localização subcelular de corpúsculos lipídicos foram avaliadas antes ou após 12, 24, 36 e 48 horas de suplementação com meio contendo 10% de soro (Fig. 4.15A). Foi possível observar a eficiência da transdução retroviral tanto do vetor vazio quanto do vetor contendo o gene de hADRP por citometria de fluxo, avaliando a expressão do gene repórter EGFP (Fig. 4.15B). Por sua vez, a superexpressão do gene de ADRP humana foi confirmada por *western blot*, através do qual foi possível observar a presença da proteína hADRP em células NIH3T3 seis dias após transdução (Fig. 4.15C).

As análises de quantificação e localização subcelular de corpúsculos lipídicos foram realizadas em células transduzidas ou com vetor vazio ou com vetor contendo o gene de hADRP conforme descrito na Fig. 4.5A. Através de quantificação por Oil Red O, foi possível observar uma maior quantidade de corpúsculos lipídicos em células que superexpressam ADRP humana quando comparadas com células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio (Fig. 4.16A). Também foi possível observar a localização dispersa de corpúsculos lipídicos pelo citoplasma em células que superexpressam hADRP na maioria dos tempos analisados (Fig. 4.16B). Em contrapartida, células transduzidas com vetor vazio apresentavam corpúsculos lipídicos com localização dispersa somente 24 horas após suplementação com soro (Fig. 4.16B), o que está de acordo com os resultados obtidos anteriormente em nosso modelo de sincronização (Fig. 4.5A). Esses dados indicam que o aumento da expressão de ADRP é capaz de alterar a regulação de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3.

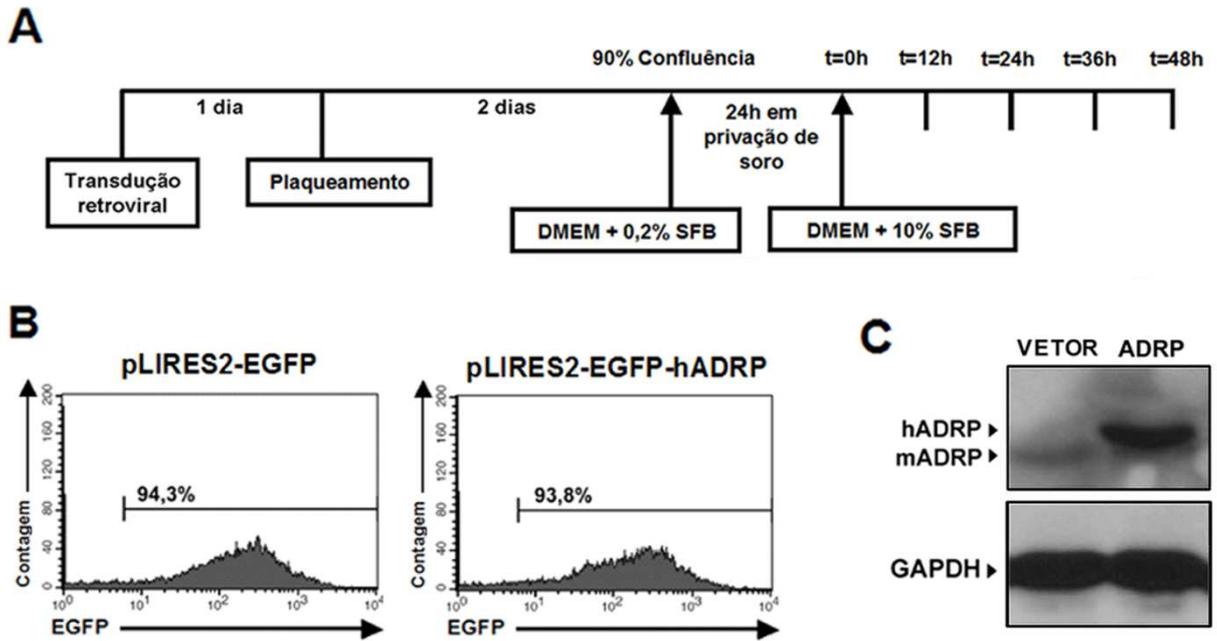


FIGURA 4.15. Células NIH3T3 transduzidas com retrovírus para superexpressão do gene humano de ADRP apresentam maior acúmulo da proteína ADRP. (A) Desenho experimental para transdução retroviral e sincronização de células NIH3T3. Células foram transduzidas com retrovírus contendo vetor vazio (pLIRE2-EGFP) ou vetor para expressão de ADRP humana (pLIRE2-EGFP-hADRP). Após 24 horas, células transduzidas foram lavadas e cultivadas por 48 horas até atingir 90% de confluência, e então cultivadas com meio DMEM contendo 0,2% de soro fetal bovino por mais 24h. Posteriormente, células foram suplementadas com meio contendo 10% de SFB e analisadas nos tempos indicados. **(B)** A eficiência da transdução retroviral foi avaliada após 24 horas a partir da medição de fluorescência do produto da expressão do gene repórter EGFP por citometria de fluxo. **(C)** Análise de expressão da proteína ADRP. Após confluência e privação de soro, os extratos totais de proteína das células transduzidas com retrovírus contendo o vetor vazio ou o vetor de expressão para ADRP foram preparados após 24 horas de suplementação com soro e separados por SDS-PAGE. *Western blot* foi realizado utilizando anticorpos específicos contra ADRP e GAPDH.

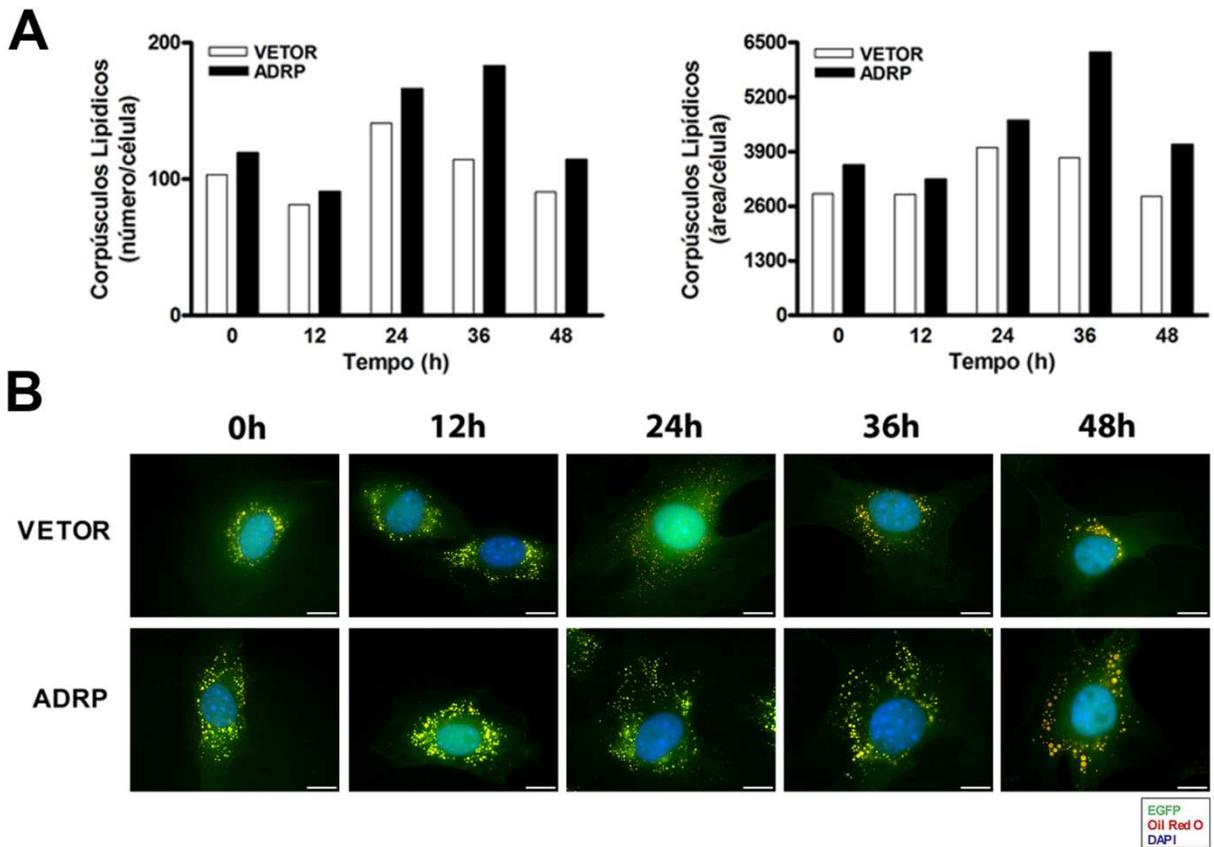


FIGURA 4.16. Células NIH3T3 superexpressando ADRP apresentam maior quantidade e localização dispersa de corpúsculos lipídicos. Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-ADRP, e sincronizadas conforme descrito na Fig. 4.15A. **(A)** Quantificação por marcação com Oil Red O. Células NIH3T3 transduzidas com retrovírus contendo o vetor vazio ou o vetor de expressão para ADRP foram fixadas em lamínula e coradas com Oil Red O nos tempos indicados. O número e área total de corpúsculos lipídicos por célula foram determinados através do software ImageQuant TL (GE Healthcare). **(B)** Localização subcelular de corpúsculos lipídicos. Após suplementação com soro, células NIH3T3 transduzidas com retrovírus contendo o vetor vazio ou o vetor de expressão para ADRP foram fixadas em lamínula nos tempos indicados e tratadas com Oil Red O para visualização de corpúsculos lipídicos (em vermelho), e com DAPI para marcação nuclear (em azul). A morfologia celular foi observada a partir da fluorescência do produto do gene repórter EGFP (em verde). Análise por microscopia de fluorescência mostra a morfologia celular e localização subcelular de corpúsculos lipídicos na células transduzidas com cada vetor retroviral. Barras de escala representam 10 μ m. Todos os dados mostrados são representativos de pelo menos três experimentos independentes.

4.6. Efeito da superexpressão de ADRP na proliferação celular e transformação celular *in vitro*

Baseado nos dados obtidos com a superexpressão de ADRP na regulação de corpúsculos lipídicos, células NIH3T3 foram novamente transduzidas com vetores retrovirais contendo o gene de expressão de hADRP com o objetivo de avaliar o efeito da superexpressão de ADRP na proliferação celular e transformação celular *in vitro* por ensaios de progressão de ciclo celular, morte celular em meio privado de soro, formação de focos em cultura e formação de colônias em meio semi-sólido. Células transduzidas foram novamente submetidas a sincronização por confluência e privação de soro, e posteriormente suplementadas com meio contendo 10% ou 0,2% de soro, conforme descrito na Fig. 4.5A. Análise de proliferação celular por marcação por cristal violeta não mostrou diferenças no acúmulo de células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio ou células superexpressando hADRP quando cultivadas em presença de soro (Fig. 4.17). Além disso, neste mesmo experimento não foi possível observar acúmulo de células NIH3T3 transduzidas com o vetor de superexpressão de hADRP quando cultivadas em privação de soro, sendo o mesmo observado pelo controle transduzido com o vetor vazio (Fig. 4.17). Não foram observadas diferenças na progressão do ciclo celular em presença de soro por marcação por iodeto de propídio (Fig. 4.18), e análise de morte celular por quantificação de DNA Sub-G₀ em privação de soro também não mostrou diferenças entre células superexpressando hADRP e o controle (Fig. 4.19).

Paralelamente, ensaios de transformação celular *in vitro* foram realizados em células NIH3T3 transduzidas para avaliar o potencial carcinogênico de ADRP. Através de ensaio de formação de focos em cultura não foi possível observar focos de células NIH3T3 transduzidas com vetor vazio ou com vetor contendo gene de expressão de hADRP, indicando que em ambas as condições células NIH3T3 mantêm a capacidade de inibir crescimento por contato célula-célula (Fig. 4.20A). Da mesma forma, não foram observadas diferenças na formação de colônias em meio semissólido entre células controle e com superexpressão de hADRP, que apresentaram quantidade e diâmetro semelhantes entre si (Fig. 4.20B). Juntos esses dados indicam que a superexpressão do gene de hADRP não é capaz de promover um fenótipo transformado em células previamente não cancerosas, descartando a hipótese de que este gene possa exercer uma função de oncogene.

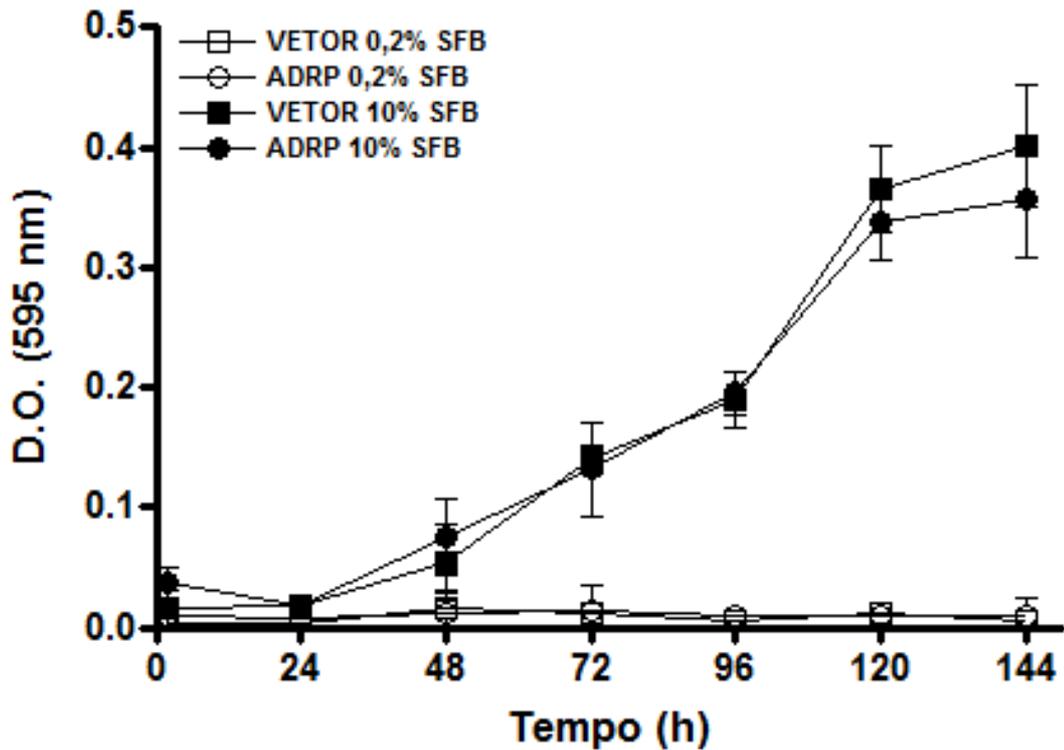


FIGURA 4.17. Células NIH3T3 não apresentam alteração na proliferação após superexpressão de ADRP. Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-ADRP, e sincronizadas conforme descrito na Fig. 4.15A.. Após confluência e privação de soro, células NIH3T3 transduzidas foram suplementadas com meio contendo 10% ou 0,2% de soro e cultivadas em placas de 96 poços. A cinética de proliferação celular foi avaliada por marcação com cristal violeta nos tempos indicados. Dados mostrados como média \pm DP de três experimentos independentes.

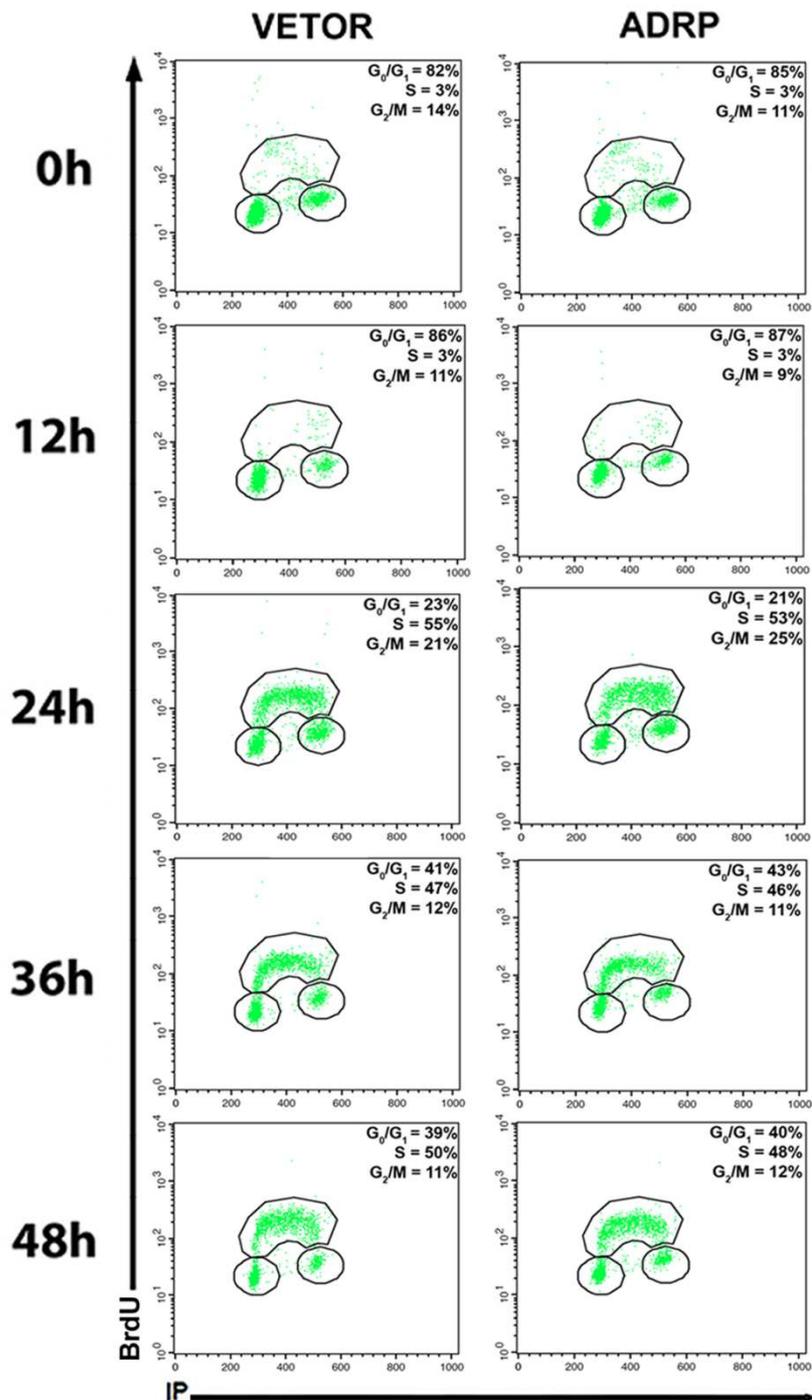


FIGURA 4.18. Células NIH3T3 não apresentam alteração na progressão do ciclo celular após superexpressão de ADRP. Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pL0 ou pLADRP, e sincronizadas conforme descrito na Fig. 4.15A. Após confluência e privação de soro, células NIH3T3 transduzidas foram suplementadas com meio contendo 10 % de soro, e incubadas com 20 μ M de BrdU trinta minutos antes da fixação nos tempos indicados. Posteriormente, as células foram marcadas utilizando anticorpos anti-BrdU-FITC e iodeto de propídio para análise por citometria de fluxo. A percentagem de células em cada estágio do ciclo celular (G₀/G₁, S e G₂/M) está representada. Dados representativos de pelo menos três experimentos.

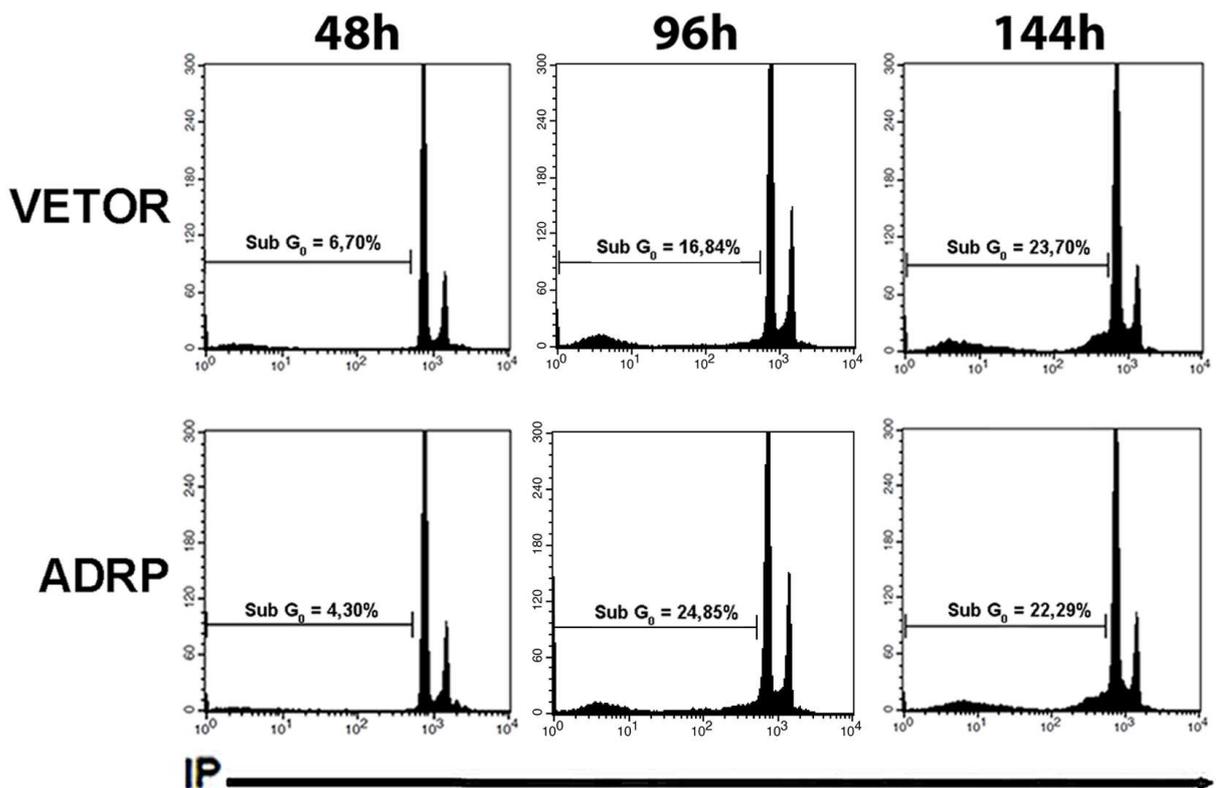


FIGURA 4.19. Células NIH3T3 não apresentam alteração na morte celular em privação de soro após superexpressão de ADRP. Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-ADRP, e sincronizadas conforme descrito na Fig. 4.15A. Após confluência e privação de soro, células NIH3T3 transduzidas foram suplementadas com meio contendo 0,2% de soro. Conteúdo de DNA Sub-G₀ foi avaliado através de marcação por iodeto de propídio (IP) e análise por citometria de fluxo nos tempos indicados. A percentagem de conteúdo Sub-G₀ está indicada. Dados representativos de pelo menos três experimentos.

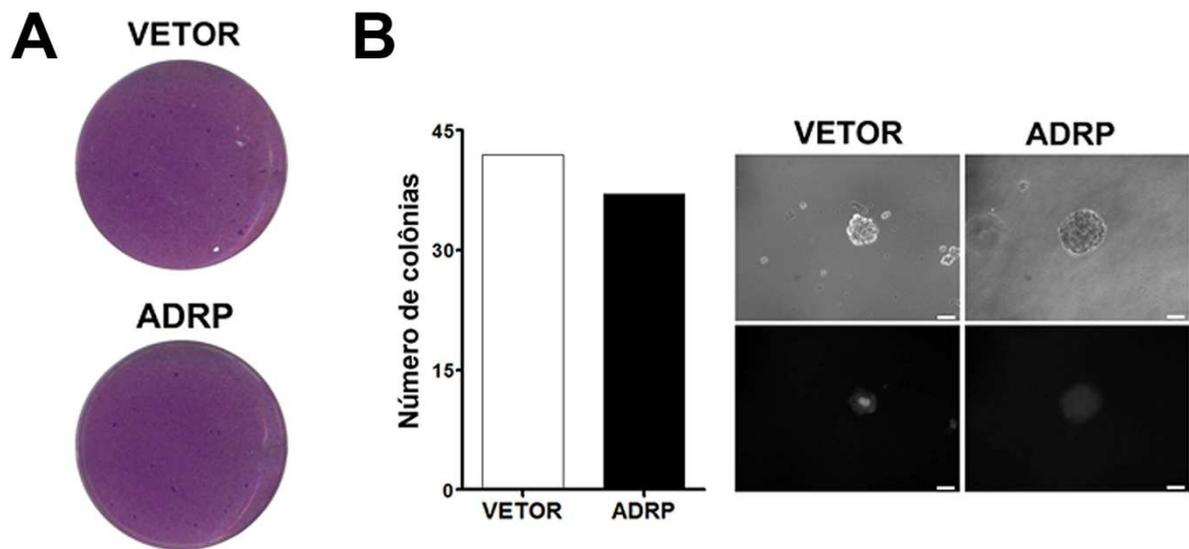


FIGURA 4.20. Células NIH3T3 não apresentam fenótipo de transformação *in vitro* após superexpressão de ADRP. Células NIH3T3 foram transduzidas com retrovírus contendo os vetores pLIREs-EGFP ou pLIREs-EGFP-ADRP, e sincronizadas conforme descrito na Fig. 4.15A. **(A)** Ensaio de formação de foco. Após transdução, células foram misturadas 1:5 com células NIH3T3 selvagens e cultivadas em placas de 6 poços. Após 12 dias, células foram visualizadas através de marcação por cristal violeta. Dados representativos de pelo menos três experimentos. **(B)** Ensaio de crescimento celular em meio semissólido. Após transdução, células foram cultivadas em meio DMEM contendo 0,3% de agarose e cultivadas em placas de 6 poços. Após 20 dias, o número de colônias foi contado (gráfico) e colônias representativas foram visualizadas por contraste de fase (painel superior) e microscopia de fluorescência para detecção de expressão de EGFP (painel inferior).

5. DISCUSSÃO

Há cada vez mais evidências de que corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas e funcionalmente ativas. Corpúsculos lipídicos interagem com outras organelas envolvidas em atividades metabólicas fundamentais para a homeostase celular, como mitocôndrias (WAN *et al.*, 2007), retículo endoplasmático (OZEKI *et al.*, 2005) e peroxissomos (BINNS *et al.*, 2007). Além disso, a estrutura dessas organelas é composta por uma combinação complexa de lipídios e proteínas, que variam conforme o estímulo ou tipo celular (MURPHY, 2001; MARTIN e PARTON, 2006; BOZZA *et al.*, 2007). Corpúsculos lipídicos estão envolvidos em funções tão diversas como metabolismo lipídico (MARTIN e PARTON, 2005; LONDOS *et al.*, 2005), tráfego de membranas (LIU *et al.*, 2003) e na resposta imune (BOZZA *et al.*, 2007, 2009).

Dentre as diversas funções celulares mencionadas anteriormente nas quais corpúsculos lipídicos estão implicados, é importante destacar o possível papel que estas organelas desempenham na proliferação e na transformação celular. Em primeiro lugar, corpúsculos lipídicos apresentam em sua estrutura proteínas envolvidas na sinalização intracelular mitogênica como PI3K, MAP cinases e PKC (YU *et al.*, 1998, 2000; CHEN *et al.*, 2002). Em segundo lugar, as proteínas caveolina-1 e Tgl4, residentes de corpúsculos lipídicos e inicialmente relacionadas com o metabolismo de lipídios, foram apontadas como peças chave na progressão do ciclo celular em hepatócitos e leveduras, respectivamente (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006; KURAT *et al.*, 2009). Por fim, foi sugerido o papel de corpúsculos lipídicos no fenótipo hiperproliferativo de células tumorais de cólon (ACCIOLY *et al.*, 2008). Baseado nesses dados, este trabalho teve por objetivo estudar o papel de corpúsculos lipídicos na progressão do ciclo celular, avaliando a regulação dessas organelas nos diferentes estágios do ciclo, e na transformação celular, avaliando a capacidade dessas organelas de estabelecer um fenótipo carcinogênico *in vitro*.

A sincronização da proliferação de células em cultura é um procedimento amplamente utilizado para estudar os mecanismos que regulam a entrada e progressão de células pelo ciclo celular (SCHORL e SEDIVY, 2007). Culturas em crescimento exponencial proliferam de forma não-sincrônica, ou seja, cada célula da cultura progride pelo ciclo celular de forma independente às células vizinhas. Por outro lado, células sincronizadas são artificialmente induzidas a progredir pelo ciclo celular de maneira homogênea, a partir do enriquecimento de uma população celular

em um determinado estágio do ciclo. Considerando esses fatos, a sincronização de células da linhagem NIH3T3 foi realizada por confluência e privação de soro. Por esta linhagem ser caracteristicamente não transformada e apresentar inibição de proliferação por contato célula-célula (JAINCHILL *et al.*, 1969), era esperado o arresto observado na fase G_0/G_1 do ciclo celular após este procedimento. Entretanto, a capacidade de restabelecer a proliferação é uma característica fundamental para a utilização de uma população homogênea de células geradas por sincronização (SCHORL e SEDIVY, 2007). Pôde-se confirmar a sincronização de células NIH3T3 após observar o restabelecimento da proliferação após suplementação com meio contendo 10% de soro fetal bovino. A análise por iodeto de propídio mostrou ainda uma baixa proporção de células com conteúdo de DNA Sub- G_0 , sugerindo que o período em que estas células permaneceram em privação de soro foi suficiente para causar sincronização sem desencadear processo de morte celular.

Para avaliar se células NIH3T3 progridem de forma homogênea pelo ciclo celular, foi necessário avaliar a re-entrada em ciclo de células sincronizadas através de marcação de BrdU incorporado em conjunto com a incorporação de iodeto de propídio (IP). Para isso, células foram incubadas por trinta minutos com BrdU em meio de cultura e fixadas imediatamente depois, de forma a assegurar que somente células em síntese ativa de DNA fossem marcadas positivamente para BrdU nas análises subsequentes. Durante avaliação da progressão do ciclo celular, a marcação conjunta de BrdU e iodeto de propídio em análises de citometria de fluxo tem uma grande vantagem em relação à marcação única com IP; a incorporação de BrdU ocorre somente em células presentes na fase S, portanto a dupla marcação com IP é capaz de separar completamente células em início da fase S de células ainda na fase G_1 tardia, bem como separar células em fim da fase S de células presentes em G_2 . Por outro lado, a simples quantificação do conteúdo de DNA por IP não é capaz de separar completamente a população de células em fase S da população de células em G_0/G_1 ou G_2/M . Devido a essa importante característica da análise de BrdU incorporado, esta técnica foi utilizada sempre que possível nos experimentos de análise de progressão de ciclo celular.

Logo, por citometria de fluxo foi possível notar um grande acúmulo de células na fase G_0/G_1 12 horas após suplementação com soro, com algumas poucas células já presentes no início da fase S. No entanto, 24 horas após o estímulo proliferativo a maioria das células localizava-se tanto na fase G_0/G_1 quanto na fase S do ciclo celular. Em relação a este resultado, é importante mencionar que a análise

realizada ainda impossibilita a distinção entre células progredindo pelas fases G₁ inicial e G₁ tardio. Além disso, cada célula em cultura possui seu ritmo próprio de progressão do ciclo, de forma que células previamente sincronizadas passam a proliferar de forma não-sincronizada após algumas rodadas de divisão, e a detecção de células tanto na fase G₀/G₁ quanto na fase S após 24 horas de suplementação pode ser consequência de diferentes ritmos de proliferação individuais dentro de uma população de células sincronizadas. Apesar desses pontos, este resultado indica que células sincronizadas foram capazes de entrar em S após 24 horas de estimulação mitogênica.

Ainda para determinar a re-entrada de células em ciclo celular, foi realizada a análise dos níveis de fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb), dos níveis de ciclina A2, e dos níveis de fosforilação de histona-H3. Rb é um regulador central da entrada de células no ciclo celular, levando à ativação de genes envolvidos na transição G₁/S mediante hiperfosforilação (HARBOUR e DEAN, 2000). Foi observado por *western blot* que células em arresto na fase G₀/G₁ (0h) apresentaram tanto proteínas Rb hipofosforiladas quanto hiperfosforiladas. A maior parte das proteínas Rb encontrava-se hipofosforilada, mostrando bloqueio da progressão do ciclo celular. Por outro lado, proteínas hiperfosforiladas podem ter sido originadas de células não sincronizadas ainda presentes na cultura. A partir do estímulo proliferativo por suplementação com soro, é possível observar um aumento na proporção de proteínas Rb hiperfosforiladas após 12 horas, culminando com hiperfosforilação máxima de Rb em 24 horas. No mesmo período foi possível observar um pico de síntese de ciclina A2, cuja expressão é inicialmente regulada pelo fator de transcrição E2F (SCHULZE *et al.*, 1995) e inicia-se durante a fase G₁ tardia, atingindo seu ápice durante a fase S. Esta ciclina se liga com a cinase dependente de ciclina 2 (CDK2), e este complexo é requerido para progressão pela fase S (GIRARD *et al.*, 1991; WALKER e MALLER, 1991). Estes resultados sugerem que, no período de 24 horas após suplementação com soro, células NIH3T3 sincronizadas progrediram pela fase G₁ do ciclo celular. Por fim, a fosforilação de histona H3 na serina 10 está correlacionada com a condensação de cromossomos durante a mitose e meiose (HENDZEL *et al.*, 1997), e em função disso a análise de fosforilação da histona H3 é usualmente utilizada como marcador desses processos durante o ciclo celular. Foi possível observar a fosforilação de histona H3 48 horas após suplementação, sugerindo que, neste período, células NIH3T3 sincronizadas estavam em mitose.

A partir da análise de expressão do mRNA das ciclinas D2, E2, A2 e B2, foi possível estabelecer um panorama da progressão do ciclo celular de células NIH3T3 sincronizadas. Foram observados picos de expressão das diferentes ciclinas em períodos bem delimitados dentro dos tempos analisados. Em função disso, foi possível discernir os estágios do ciclo celular correspondentes a cada um destes tempos, correlacionando os picos de expressão de cada ciclina com o seu período correspondente de expressão no ciclo celular. Portanto, o período de 12 horas após estímulo mitogênico corresponderia a células progredindo pela fase G1 inicial do ciclo celular em função da expressão de ciclina D2; o período de 24 horas corresponderia à transição G1/S e progressão pela fase S em razão da expressão de ciclinas E2 e A2; e finalmente, os períodos de 36 e 48 horas corresponderiam à progressão pelas fases G2 e M do ciclo celular pelo aumento de expressão da ciclina B2. Esses dados mostram que células NIH3T3 sincronizadas progridem de forma uniforme pelo ciclo celular após receberem um estímulo proliferativo. Uma observação em relação à expressão de ciclina D2 deve ser feita. É bem estabelecido que a expressão de ciclinas D é ativada e mantida em função da presença de agentes mitogênicos (SHERR *et al.*, 1994). No entanto, observamos a expressão de ciclina D2 restrita ao período de 12 horas após suplementação com soro; após este tempo é possível notar a inibição de expressão do gene em questão. Uma possível explicação para o que foi observado é que a regulação de expressão de cada ciclina D tem um padrão distinto de expressão, específico para cada tecido, e cada uma dessas ciclinas acumula com diferentes cinéticas após estímulo mitogênico (MATSUSHIME *et al.*, 1991; MOTOKURA *et al.*, 1992). Como exemplo, as diversas ciclinas D apresentam padrões de expressão drasticamente distintos durante a diferenciação terminal de células musculares (RAO *et al.*, 1994; KIESS *et al.*, 1995; SKAPEK *et al.*, 1995) e neurônios (TAMARU *et al.*, 1993; 1994). A expressão restrita de ciclina D2 observada pode ser uma representação de como a expressão desta ciclina é regulada em fibroblastos da linhagem NIH3T3.

Além do modelo em células de fibroblasto murino, células da linhagem IEC-6, derivadas de epitélio intestinal de rato, também foram utilizadas como modelo alternativo para análise da progressão do ciclo celular. Assim como células NIH3T3, células IEC-6 não possuem fenótipo de transformação *in vitro*, apresentando inibição de proliferação por contato e incapacidade de formação de colônias em meio semissólido, e também não formam tumores *in vivo* (QUARONI *et al.*, 1979). Além disso, já foi descrita a presença de corpúsculos lipídicos nessas células (ACCIOLY

et al., 2008; MOREIRA *et al.*, 2009), justificando a utilização desta linhagem como modelo. Por fim, seria interessante comparar dados entre duas linhagens de origens teciduais distintas; neste caso, entre células de origem fibroblásticas e células epiteliais. Quando submetidas ao mesmo procedimento de sincronização por confluência e privação de soro, seguido por suplementação, células IEC-6 apresentaram resultados semelhantes aos de células NIH3T3. Foi observado, portanto, arresto do ciclo celular com baixa proporção de células com conteúdo de DNA Sub-G₀, e reentrada em ciclo celular após estímulo com soro. Por outro lado, a proliferação de células IEC-6 foi mais lenta que a apresentada por células NIH3T3, já que é possível observar uma grande quantidade de células em fase S ainda no período de 36 horas após suplementação. Possivelmente, a ausência de insulina durante a suplementação de células IEC-6 sincronizadas pode ter diminuído o máximo potencial proliferativo desta linhagem, mas este era um passo necessário já que a insulina pode interferir diretamente na biogênese de corpúsculos lipídicos por ser um potente estimulador de adipogênese (HAUNER *et al.*, 1990).

Em resumo, células NIH3T3 ou IEC-6 submetidas à sincronização do ciclo celular por confluência e privação de soro apresentam um arresto na fase G₀/G₁ sem desencadear morte celular, e são capazes de retomar proliferação de forma homogênea após suplementação com soro. Além disso, a partir da análise do conteúdo de DNA e da expressão de mRNA de ciclinas, foi possível distinguir em que estágio específico do ciclo celular estavam localizadas a maior parte das células NIH3T3 em cada tempo avaliado. Juntos, estes resultados mostram que a sincronização de células NIH3T3 e IEC-6 por confluência e privação de soro proporciona um bom modelo para avaliar a regulação de corpúsculos lipídicos durante celular.

Uma particularidade da natureza dinâmica de corpúsculos lipídicos é sua capacidade de se redistribuir pelo citoplasma. Em algumas células, a distribuição de toda população de corpúsculos lipídicos pode passar por mudanças drásticas, em uma escala de tempo que pode variar de minutos até algumas horas (WELTE, 2007). De maneira semelhante, este trabalho mostrou a redistribuição dinâmica de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3 durante a progressão do ciclo celular. Basicamente, corpúsculos lipídicos mostram uma distribuição perinuclear durante grande parte do ciclo, ocorrendo uma rápida dispersão dessas organelas pelo citoplasma dependente de entrada na fase S, observado primeiramente através da progressão pelo ciclo celular de células NIH3T3 após estimulação mitogênica.

Células IEC-6 apresentaram os mesmos resultados, mostrando que esta regulação ocorre de forma semelhante em dois tipos celulares de origens teciduais bem distintas e, portanto, sugere que essa característica de mudança de localização de corpúsculos lipídicos possua uma significância biológica durante a progressão do ciclo celular. A localização subcelular de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3 também foi feita em concomitância com marcação com BrdU, de forma a assegurar a análise de células em progressão especificamente pela fase S do ciclo celular, e compará-las com células presentes em outras fases. Não só foi observado que células positivas para BrdU apresentavam corpúsculos lipídicos mais frequentemente dispersos pelo citoplasma, mas também que células em diferentes etapas da síntese de DNA apresentavam diferentes graus de dispersão. Esses dados não só confirmam, mais uma vez, os dados observados inicialmente em NIH3T3, como também sugerem que a dispersão de corpúsculos lipídicos é dinâmica durante toda a progressão pela fase S do ciclo celular, em paralelo com as diferentes etapas de síntese de DNA. Por fim, estes resultados foram novamente confirmados através da análise de células especificamente sincronizadas na fase S por incorporação de timidina (BOOTSMA *et al.*, 1964; STEIN e BORUM, 1972). Um possível mecanismo que regule o processo de movimentação de corpúsculos lipídicos é o transporte mediado por microtúbulos, já que desestruturação de microtúbulos por agentes farmacológicos interrompe a mobilidade de corpúsculos lipídicos (POL *et al.*, 2004). Além disso, a proteína dineína citoplasmática, uma proteína motora direcionada para a extremidade menos de microtúbulos, já foi descrita associada fisicamente a corpúsculos lipídicos (GROSS *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2000; BOSTRÖM *et al.*, 2005), e é necessária para o deslocamento dessas organelas (BÖSTROM *et al.*, 2005; BOULANT *et al.*, 2008).

A translocação de corpúsculos lipídicos pela célula durante o ciclo celular pode ter implicações importantes na regulação deste processo. Como foi descrito anteriormente, corpúsculos lipídicos interagem com ribossomos ou com diversas organelas como retículo endoplasmático e mitocôndrias (WAN *et al.*, 2007), inclusive com interações funcionais, tendo como exemplo a β -oxidação de ácidos graxos a partir de interação com peroxissomos em leveduras (BINNS *et al.*, 2006). Essas interações com outras organelas podem permitir troca de lipídios (MURPHY *et al.*, 2009; ZEHMER *et al.*, 2009) e, portanto, sugerem que corpúsculos lipídicos possam ser transportadores de lipídios entre diferentes compartimentos. Paralelamente, corpúsculos lipídicos podem também ser transportadores de proteínas,

principalmente no caso de proteínas hidrofóbicas que são instáveis em meio aquoso intracelular. Um exemplo marcante são proteínas Core recém-sintetizadas de vírus da hepatite C; foi sugerido que a translocação perinuclear de corpúsculos lipídicos contendo proteínas Core auxilia a montagem de novas partículas virais, ao posicioná-la em proximidade aos sítios de replicação do RNA viral (BOULANT *et al.*, 2008). Baseado nessas características, e em função da localização de proteínas importantes para a sinalização mitogênica em corpúsculos lipídicos, como MAP cinases, PI3K e PKC, é interessante supor que estas organelas possam ser importantes mediadores desse tipo de sinalização, compartimentalizando essas proteínas e deslocando-as para diferentes partes da célula. Além disso, em função da dispersão de corpúsculos lipídicos ocorrer especificamente na fase S do ciclo celular, é possível imaginar que proteínas envolvidas na regulação da transição G₁/S, da progressão da fase S, ou da replicação do DNA estivessem envolvidas nesse processo. Uma possibilidade interessante seria o transporte ou depósito de histonas, ou até mesmo outras proteínas cromossomais, baseando-se em um relato anterior descrevendo a estocagem de histonas em corpúsculos lipídicos durante o desenvolvimento de *Drosophila* (CERMELLI *et al.*, 2006). De acordo com isso, já foi relatada a presença de histonas em corpúsculos lipídicos em análises de proteômica (WAN *et al.*, 2007).

Foi observado que o número de corpúsculos lipídicos varia conforme o ciclo celular. É interessante notar a grande quantidade de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3 quando comparadas com outras células como, por exemplo, macrófagos (PACHECO *et al.*, 2007) ou células endoteliais, como é o caso da linhagem IEC-6 observado neste trabalho e em trabalhos de outros grupos (MOREIRA *et al.*, 2009). Essa diferença pode ser característica da própria linhagem NIH3T3. O aumento no número de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular é um processo observado exclusivamente a partir de entrada das células na fase S, e pode ser um fator que, em conjunto com a dispersão dessas organelas, promova a progressão do ciclo celular. A biogênese de novos corpúsculos lipídicos pode potencializar os possíveis papéis no transporte de lipídios ou proteínas, ou na transdução de sinais estimulatórios que podem estar envolvidos nesse processo. Além disso, o metabolismo de lipídios é fundamental para a obtenção de energia e materiais necessários para suportar a proliferação celular (BRASAEMLE, 2006). É possível observar essa dependência durante a regeneração do fígado, como foi demonstrado por Fernández e colaboradores (FERNÁNDEZ *et*

al., 2006). Camundongos deficientes para caveolina-1 apresentavam baixos índices de regeneração do fígado após hepatectomia parcial, processo acompanhado desbalanço lipídico em hepatócitos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Células extraídas de fígados de camundongos deficientes em caveolina-1 apresentavam menos corpúsculos lipídicos que hepatócitos de camundongos selvagens (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Análise de proteínas envolvidas no ciclo celular revelou que o antígeno nuclear de células em proliferação (PCNA, um marcador de progressão pela fase S) não era expresso ou estava muito reduzido em camundongos deficientes para caveolina-1 quando comparados com camundongos selvagens (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Por outro lado, tratamento com glicose antes e durante o processo de regeneração restabeleceu a proliferação celular e a regeneração hepática (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006). Portanto, é possível concluir que a entrada na fase S do ciclo celular é regulada metabolicamente pela disponibilidade de corpúsculos lipídicos ou glicose (FERNÁNDEZ *et al.*, 2006), e o aumento dessas organelas durante a fase S observado neste trabalho vai de acordo com esta idéia.

Embora alguns eventos do ciclo celular solicitem a mobilização de lipídios, como nos grandes rearranjos de membrana plasmática, ainda não existe um grande conhecimento sobre os papéis específicos que lipídios podem desempenhar durante esse processo. No entanto, um trabalho recentemente publicado mostrou que células HeLa regulam ativamente a produção e localização de lipídios durante o processo de divisão celular. Atilla-Gockumen e colaboradores mostram diferenças entre lipidomas de células sincronizadas na fase S e ciclo celular e de células em citocinese, revelando que 11 espécies específicas de lipídios são acumuladas durante o processo de citocinese (ATILLA-GOCKUMEN *et al.*, 2014). Essa especificidade revela que a regulação do conteúdo lipídico entre uma célula em interfase e uma célula em divisão é bastante precisa, embora na verdade somente uma pequena parte do lipidoma sofreu modificações extensivas em sua quantidade (ATILLA-GOCKUMEN *et al.*, 2014). Alguns lipídios acumulados são, inclusive, usualmente pouco encontrados, como alguns derivados de esteróis, ou derivados de um conjunto alternativo de enzimas de síntese, como no caso de fosfolipídios éter-ligados (ATILLA-GOCKUMEN *et al.*, 2014). Interessantemente, membranas plasmáticas moldadas *in vitro* usando lipídios extraídos de células em fase S ou em citocinese apresentam diferenças importantes em sua topologia e resistência, sendo membranas derivadas de lipídios de células em citocinese menos homogêneas e mais rígidas que membranas derivadas de células na fase S (ATILLA-GOCKUMEN

et al., 2014). Por fim, o estudo mostrou que a inibição de enzimas envolvidas na biossíntese de lipídios, como a enzima final da síntese de triacilgliceróis DGAT2, é capaz de impedir a conclusão da citocinese (ATILLA-GOCKUMEN *et al.*, 2014), e que a localização de lipídios para o segmento central da citocinese (*midbody*) é fundamental para a conclusão deste processo (ATILLA-GOCKUMEN *et al.*, 2014). Interessante notar a importância da localização de lipídios em compartimentos específicos da célula, algo observado em corpúsculos lipídicos neste trabalho, embora em períodos diferentes do ciclo celular. Além disso, corpúsculos lipídicos apresentam lipídios comumente não encontrados em outros compartimentos celulares, incluindo componentes éter-ligados (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002; BARTZ *et al.*, 2007). Por serem sítios importantes de acúmulo de lipídios intracelulares, corpúsculos lipídicos podem ser fontes importantes de lipídios para diferentes eventos do ciclo celular como a citocinese. Um maior enfoque nos tipos de enzimas envolvidas nas etapas de síntese, hidrólise e, principalmente, modificações de lipídios e ácidos graxos se revela como um caminho a se explorar para elucidar a formação de espécies lipídicas específicas. Duas enzimas reveladas neste trabalho como cruciais para o processo de divisão celular, DGAT2 e CGI/ABHD5, já foram descritas em corpúsculos lipídicos (TURKISH e STURLEY, 2007; YAMAGUCHI *et al.*, 2004). Em suma, esses dados revelam uma importância fundamental de lipídios para um evento crucial da divisão celular e, conseqüentemente, implicam que estudo da lipidogênese é fundamental para a completa elucidação de um processo biológico fundamental como a progressão do ciclo celular.

A avaliação de corpúsculos lipídicos durante o ciclo celular em uma linhagem celular transformada mostrou uma regulação diferencial destas organelas em comparação a uma linhagem celular normal. Células NIH3T3-H-rasV12 apresentam características típicas de células transformadas, conforme mostrado anteriormente (ROBBS *et al.*, 2008) e também neste trabalho. Estas células não apresentam inibição por contato e foram capazes de entrar em ciclo celular mesmo após cultivo em confluência e privação de soro. Portanto, foi interessante comparar a regulação de corpúsculos lipídicos nestas células, que nitidamente apresentam defeitos no controle do ciclo celular. A comparação com a linhagem NIH3T3 mostrou que células NIH3T3-H-rasV12 apresentam corpúsculos lipídicos constitutivamente dispersos pelo citoplasma, e em maior quantidade. Em relação ao que foi discutido anteriormente, principalmente em relação à necessidade metabólica para progressão do ciclo celular e à presença de proteínas de sinalização mitogênica

nessas organelas, muitas das quais estão superexpressas ou mutadas no câncer (MASSAGUÉ, 2004), supõe-se que o aumento quantitativo e a dispersão de corpúsculos lipídicos em células transformadas potencializem as vias de sinalização envolvidas na entrada da célula em ciclo, e que também possam sustentar metabolicamente a proliferação celular, acelerando dessa forma sua progressão pelo ciclo celular. Como consequência, a regulação diferencial de corpúsculos lipídicos pode dar uma vantagem proliferativa para células em processo de transformação maligna e, portanto, contribuir com o estabelecimento e progressão tumoral. De fato, o estudo conduzido por Accioly e colaboradores mostrou estes efeitos ao analisar a transformação de células IEC-6 com a oncoproteína H-rasV12, no qual foi visto que o aumento no número de corpúsculos lipídicos implicou na produção de mediadores inflamatórios, potencializando uma via de sinalização proliferativa para estas células e promovendo um aumento na sua taxa de proliferação (ACCIOLY *et al.*, 2008). Como uma última observação, é necessário mencionar que a ativação constitutiva da proteína Ras nessas células pode ter um papel direto no aumento de corpúsculos lipídicos, pois esta via ativa proteínas MAP cinase e PI3K, que promovem a biogênese de corpúsculos lipídicos (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001b; ANDERSSON *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2009). Isto pode ser uma das possíveis causas do aumento no número dessas organelas em células NIH3T3-H-rasV12.

A observação de que algumas células neoplásicas exibem um maior número de corpúsculos lipídicos criou a possibilidade de utilizar a detecção dessas organelas ou a superexpressão de proteínas da família PAT (perilipina, ADRP e TIP47) como biomarcadores para tipos específicos de câncer, assim como para diferentes estadiamentos e níveis de agressividade. Por exemplo, já foi descrito que proteínas PAT são frequentemente expressas em tecidos neoplásicos que desenvolvem algum grau de esteatose, como os tecidos hepático, colorretal e carcinomas de células renais, embora cada um desses diferentes tipos de cânceres apresentem um padrão distinto de expressão de cada proteína PAT (STRAUB *et al.*, 2010). Dentre todas as proteínas PAT, é de particular interesse a relevância que ADRP tem atraído como um potencial biomarcador para tumorigênese. Isso é corroborado pela expressão diferencial de ADRP em diversos carcinomas humanos, como em carcinoma renal, hepático, de cólon e no carcinoma apócrino de mama (KUROKAWA *et al.*, 2004; MATSUBARA *et al.*, 2011; MORITANI *et al.*, 2011; RAE *et al.*, 2000; YAO *et al.*, 2005; 2007). Superexpressão de ADRP também foi encontrada

em lesões cutâneas malignas e pré-malignas (OSTLER *et al.*, 2010). Além disso, ADRP foi recentemente descrita como um importante biomarcador para linfoma de Burkitt, especialmente em função de um padrão específico de superexpressão desta proteína em comparação com linfomas difuso de grandes células B (AMBROSIO *et al.*, 2012). Baseado nisso, seria interessante investigar dentro do nosso modelo de tumorigênese uma possível expressão diferencial de ADRP em células NIH3T3-H-*rasV12* em relação à linhagem parental NIH3T3. De fato, foi possível observar um aumento nos níveis protéicos de ADRP na linhagem transformada, o que vai de acordo com os trabalhos citados anteriormente. A proteína ADRP tem sido apontada como um fator importante durante o processo de biogênese de corpúsculos lipídicos, ao estimular o acúmulo de lipídios intracelulares (IMAMURA *et al.*, 2002; GAO e SERRERO, 1999; BRASAEMLE *et al.*, 1997), e pode estar envolvida no acúmulo de corpúsculos lipídicos observado nessas células. Além disso, ao averiguar sua localização subcelular, foi possível observar uma associação de ADRP com corpúsculos lipídicos, o que sugere que estas proteínas sejam funcionais. Entretanto, ainda são necessárias mais evidências do real impacto que a superexpressão de ADRP possa exercer na biogênese de novos corpúsculos lipídicos em células transformadas.

Baseado nas evidências que mostram uma correlação entre a superexpressão de ADRP e diversas malignidades, bem como nos resultados obtidos com a linhagem NIH3T3-H-*rasV12*, realizamos a superexpressão de ADRP humana em células NIH3T3 não transformadas com o objetivo de avaliar as possíveis modificações na regulação de corpúsculos lipídicos, bem como alterações na proliferação celular e seu possível potencial para a transformação celular. A superexpressão de hADRP causou um aumento no número e área total de corpúsculos lipídicos em NIH3T3 quando comparadas às células transduzidas com vetor vazio. Além disso, a superexpressão de hADRP alterou a localização subcelular de corpúsculos lipídicos, que passaram a se apresentar de forma dispersa no citoplasma. Esses dados vão de acordo com o que é apresentado por células NIH3T3-H-*rasV12*, e também se correlacionam com o que foi observado durante a progressão do ciclo celular. Portanto, mostram que a superexpressão de hADRP foi capaz de alterar a regulação de corpúsculos lipídicos em células NIH3T3. Por outro lado, a superexpressão de hADRP não foi capaz de induzir aumento na proliferação celular, nem alterações pra progressão do ciclo celular, e também não foi capaz de proteger células da morte em ausência de soro. Mais ainda, não foi

possível observar, em células previamente não transformadas, marcos da transformação celular *in vitro* como proliferação além da confluência ou na ausência de ancoragem a um substrato, após superexpressão desta proteína. Esses dados mostram claramente que ADRP não apresenta características de oncogenes, e sugerem que o metabolismo lipídico não tem um impacto tão grande no início do estabelecimento tumoral. No entanto, estes dados não descartam um papel de corpúsculos lipídicos na manutenção de tumores já bem estabelecidos, que dependem de modificações importantes no metabolismo energético, assim como de um microambiente permissivo à manutenção ou invasão de células tumorais. Dentro dessas características, necessárias às células malignas mais agressivas, uma regulação diferencial do metabolismo lipídico poderia estar diretamente envolvido no desenvolvimento tumoral.

Até o momento, este trabalho foi capaz de mostrar a regulação diferencial de corpúsculos lipídicos durante a progressão do ciclo celular, e propõe um possível papel destas organelas na sua regulação. No entanto, resta ainda elucidar os mecanismos que controlam esse processo. Mudanças no metabolismo lipídico podem afetar inúmeros aspectos da homeostasia celular, como a disponibilidade de lipídios estruturais pra síntese de membranas, produção de energia, e a magnitude dos mediadores inflamatórios lipídicos que podem ser produzidos. Cada um desses fatores tem um grande impacto em processos celulares vitais, incluindo crescimento e proliferação celular, diferenciação e motilidade e, portanto, tem um efeito na promoção e no crescimento tumoral (SANTOS e SCHULZE, 2012). Portanto, um maior enfoque papel que o aumento na formação de corpúsculos lipídicos em tumores ainda é necessário, embora no presente momento a utilização de proteínas associadas a corpúsculos lipídicos como biomarcadores de transformação possa ser útil para distinguir tipos tumorais e estadiamento. Um maior conhecimento desses processos poderá contribuir, no futuro, para o desenvolvimento de novas estratégias e terapias para o controle de neoplasias.

6. CONCLUSÕES

- A quantidade e localização subcelular de corpúsculos lipídicos varia conforme a progressão do ciclo celular e é dependente de entrada na fase S;
- Células NIH3T3 transformadas com oncoproteína H-Ras constitutivamente ativa apresentam mais corpúsculos lipídicos, e com localização mais dispersa, que células NIH3T3 selvagens;
- Células NIH3T3 transformadas apresentam maior expressão da proteína estrutural de corpúsculos lipídicos ADRP;
- A superexpressão de ADRP em células NIH3T3 selvagens altera a regulação de corpúsculos, mas não é capaz de ocasionar transformação celular *in vitro*;
- Os resultados obtidos mostram que corpúsculos lipídicos são organelas reguladas durante a progressão do ciclo celular, e que esta regulação está alterada em células transformadas. Além disso, mostram que ADRP não é uma oncoproteína.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, M.T., PACHECO, P., MAYA-MONTEIRO, C.M., CARROSSINI, N., ROBBS, B.K., OLIVEIRA, S.S., KAUFMANN, C., MORGADO-DIAZ, J.A., BOZZA, P.T., VIOLA, J.P. **Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells.** *Cancer Res.*, 68:1732-1740, 2008.
- ACKERMAN, W.E.T., ROBINSON, J.M., KNISS, D.A. **Despite transcription and functional coordination, cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase-2 largely reside in distinct lipid microdomains in WISH epithelial cells.** *J. Histochem. Cytochem.*, 53:1391-1401, 2005.
- ACQUAVIVA, C., PINES, J. **The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C.** *J. Cell Sci.*, 119:2401-2404, 2006.
- ADAMS, P.D. **Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/CDKs.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1471:123-133, 2001.
- AI, H., BARRERA, J.E., MEYERS, A.D., SHROYER, K.R., VARELLA-GARCIA, M. **Chromosomal aneuploidy precedes morphological changes and supports multifocality in head and neck lesions.** *Laryngoscope*, 111:1853-1858, 2001.
- ALCORTA, D.A., XIONG, Y., PHELPS, D., HANNON, G., BEACH, D., BARRET, J.C. **Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:13742-13747, 1996.
- ALEVIZOPOULOS, K., VLACH, J., HENNECKE, S., AMATI, B. **Cyclin E and c-Myc promote cell proliferation in the presence of p16NK4a and of hypophosphorylated retinoblastoma family proteins.** *EMBO J.*, 16:5322-5333, 1997.
- ALVISI, G., MADAN, V., BARTENSCHLAGER, R. **Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection.** *RNA Biology*, 8:258-269, 2011
- AMBROSIO, M.R., PICCALUGA, P.P., PONZONI, M., ROCCA, B.J., MALAGNINO, V., ONORATI, M., DE FALCO, G., CALBI, V., OGWANG, M., NARESH, K.N., PILERI, S.A., DOGLIONI, C., LEONCINI, L., LAZZI, S. **The alteration of lipid metabolism in burkitt lymphoma identifies a novel marker: adipophilin.** *PLoS One* 7:e44315, 2012.
- AMIEL, A., GRONICH, N., YUKKA, M., SULIMAN, S., JOSEF, G., GABER, E., DRORI, G., FEJGIN, M.D., LISHNER, M. **Random aneuploidy in neoplastic and pre-neoplastic diseases, multiple myeloma, and monoclonal gammopathy.** *Cancer Genet. Cytogenet.*, 162:78-81, 2005.
- ANDERSSON, L., BOSTRÖM, P., ERICSON, J., RUTBERG, M., MAGNUSSON, B., MARCHESAN, D., RUIZ, M., ASP, L., HAUNG, P., FROHMAN, M.A., BOREN, J., OLOFSSON, S.O. **PLD1 and ERK2 regulate cytosolic lipid droplet formation.** *J. Cell Sci.*, 119:2246-2257, 2006.

- ANGELINI, C., PHILPPART, M., BORRONE, C., BRESOLIN, N., CANTINE, M., LUCKE, S. **Multisystem triglyceride storage disorder with impaired with long-chain fatty acid oxidation.** Ann. Neurol., 7:5-10, 1980.
- AREND, A., MASSO, R., MASSO, M., SELSTAM, G. **Electron microscope immunocytochemical localization of cyclooxygenase-1 and -2 in pseudopregnant rat corpus luteum during luteolysis.** Prostaglandins Other Lipid Mediat., 74:1-10, 2004.
- ARGAWAL, A.K., GARG, A. **Genetic disorders of adipose tissue development, differentiation, and death.** Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 7:175-199, 2006.
- ATHENSTAEDT, K., ZWEYTICK, D., JANDROSITZ, A., KOHLWEIN, S.D., DAUM, G. **Identification and characterization of major lipid particle proteins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** J. Bacteriol., 181:6441-6448, (1999).
- ATILLA-GOKCUMEN, G.E., MURO, E., RELAT-GOBERNA, J., SASSE, S., BEDIGIAN, A., COUGHLIN, M.L., GARCIA-MANYES, S., EGGERT, U.S. **Dividing cells regulate their lipid composition and localization.** Cell, 156:428-439, 2014.
- BAERGA, R., ZHANG, Y., CHEN, P.H., GOLDMAN, S., JIN, S. **Targeted deletion of autophagy-related 5 (*atg5*) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice.** Autophagy, 5:1118-1130, 2009.
- BALDIN, V., PELPEL, K., CAZALES, M., CANS, C., DUCOMMUM, B. **Nuclear localization of CDC25B1 and serine 146 integrity are required for induction of mitosis.** J. Biol. Chem., 277:35176-35182, 2002.
- BANDEIRA-MELO, C., HERBST, A., WELLER, P.F. **Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation.** Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 24:653-657, 2001a.
- BANDEIRA-MELO, C., PHOOFOLO, M., WELLER, P.F. **Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C₄ production in eosinophils and basophils.** J. Biol. Chem., 276:22779-22787, 2001b.
- BANDEIRA-MELO, C., BOZZA, P.T., WELLER, P.F. **The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function.** J. Allergy Clin. Immunol., 109:393-400, 2002a.
- BANDEIRA-MELO, C., SUGIYAMA, K., WOODS, L.J., PHOOFOLO, M., CENTER, D.M., CRUIKSHANK, W.W., WELLER, P.F. **IL-16 promotes leukotriene C₄ and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling.** J. Immunol., 168:4756-4763, 2002b.
- BANDEIRA-MELO, C., WELLER, P.F. **Mechanisms of eosinophil cytokine release.** Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 100, Supl.1:73-81, 2005.
- BARR, F.A., GRUNEBERG, U. **Cytokinesis: placing and making the final cut.** Cell, 131:847-860,

2007.

BARTEMES, K.R., MCKINNEY, S., GLEICH, G.J., KITA, H. **Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG.** J. Immunol., 162:2982-2989, 1999.

BARTZ, R., ZEHMER, J.K., ZHU, M., CHEN, Y., SERRERO, G., ZHAO, Y., LIU, P. **Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and and GTP-mediated protein translocation.** J. Proteome Res., 6:3256-3265, 2007.

BAUBY, H., LOPEZ-VERGÈS, S., HOEFFEL, G., DELCROIX-GENÈTE, D., JANVIER, K., MAMMANO, F., HOSMALIN, A., BERLIOZ-TORRENT, C. **TIP47 is required for the production of infectious HIV-1 particles from primary macrophages.** Traffic, 11:455-467, 2010.

BEIL, W.J., WELLER, P.F., PEPPERCORN, M.A., GALLI, S.J., DVORAK, A.M. **Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF- α in colonic Crohn's disease.** J. Leukoc. Biol., 58:284-298, 1995.

BELL, M., WANG, H., CHEN, H., MCLENITHAN, J.C., GONG, D.W., YANG, R.Z., YU, D., FRIED, S.K., QUON, M.J., LONDOS, C., SZTALRYD, C. **Consequences of lipid droplet coat protein downregulation in liver cells: abnormal metabolism and induction of insulin resistance.** Diabetes, 57:2037-2045, 2008.

BELL, S.P., STILLMAN, B. **Nucleotide dependent recognition of chromosomal origins by a multi-protein complex.** Nature, 357:128-134, 1992.

BELL, S.P., DUTTA, A. **DNA replication in eukaryotic cells.** Annu. Rev. Biochem., 71:333-371, 2002.

BETTENCOURT-DIAS, M., GLOVER, D.M. **Centrosome biogenesis and function: centrosomes brings new understandings.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 8:451-463, 2007.

BICKEL, P.E., TANSEY, J.T., WELTE, M.A. **PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores.** Biochem. Biophys. Acta, 1791:419-440, 2009.

BILDIRICI, I., ROH, C.R., SCHAIFF, W.T., LEWKOWSKI, B.M., NELSON, D.M., SADOVSKY, Y. **The lipid droplet-associated protein adipophilin is expressed in human trophoblasts and is regulated by peroxisomal proliferator-activated receptor-gamma/retinoid X receptor.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 88:6056-6062, 2005.

BINNS, D., JANUSZEWSKI, T., CHEN, Y., HILL, J., MARKIN, V.S., ZHAO, Y., GILPIN, C., CHAPMAN, K.D., ANDERSON, R.G.W., GOODMAN, J.M. **An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies.** J. Cell Biol., 173:719-731, 2006.

BLAIN, S.W., MONTALVO, E., MASSAGUÉ, J. **Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (Cdk) inhibitor p27^{Kip1} with cyclin A-Cdk2 and cyclin D-Cdk4.** J. Biol. Chem., 272:25863-

25872, 1997.

BLANGY, A., LANE, H.A., D'HERIN, P., HARPER, M., KRESS, M., NIGG, E.A. **Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesis-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo.** *Cell*, 83:1159-1169, 1995.

BLOUIN CM, LE LAY S, EBERL A, KÖFELER HC, GUERRERA IC, KLEIN C, LE LIEPVRE X, LASNIER F, BOURRON O, GAUTIER JF, FERRÉ P, HAJDUCH E, DUGAIL I. **Lipid droplet analysis in caveolin-deficient adipocytes: alterations in surface phospholipid composition and maturation defects.** *J Lipid Res.*, 51:945-956, 2010.

BLOW, J.J., HODGSIN, B. **Replication licensing-defining the proliferative state?** *Trends Cell Biol.*, 12:72-78, 2002.

BOIVIN, G.P., WASHINGTON, K., YANG, K., WARD, J.M., PRETLOW, T.P., RUSSELL, R., BESSELSSEN, D.G., GODFREY, V.L., DOETSCHMAN, T., DOVE, W.F., PITOT, H.C., HALBERG, R.B., ITZKOWITZ, S.H., GRODEN, J., COFFEY, R.J. **Pathology of mouse models of intestinal cancer: consensus report and recommendations.** *Gastroenterology*, 124:762-77, 2003.

BOOHER, R.N., HOLMAN, P.S., FATTAEY, A. **Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity.** *J. Biol. Chem.*, 272:22300-22306, 1997.

BOOTSMA, D., BUDKE, L., VOS, O. **Studies on synchronized division of tissue culture cells initiated by excess thymidine.** *Exp. Cell Res.*, 33:301-304, 1964.

BOSTRÖM, P., RUTBERG, M., ERICSSON, J, M HOLMDAHL, P., ANDERSSON, L., FROHMAN, M.A., BOREM, J., OLOFSSON, S.O. **Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25:1945-1951, 2005.

BOSTRÖM, P., ANDERSSON, L., RUTBERG, M., PERMAN, J., LIDBERG, U., JOHANSSON, B.R., FERNANDEZ-RODRIGUEZ, J., ERICSON, J., NILSSON, T., BORÉN, J., OLOFSSON, S.O. **SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity.** *Nat. Cell Biol.*, 9:1286-1293, 2007.

BOSTRÖM, P., ANDERSSON, L., VIND, B., HÅVERSEN, L., RUTBERG, M., WICKSTRÖM, Y., LARSSON, E., JANSSON, P.A., SVENSSON, M.K., BRÅNEMARK, R., LING, C., BECK-NIELSEN, H., BORÉN, J., HØJLUND, K., OLOFSSON, S.O. **The SNARE protein SNAP23 and the SNARE-interacting protein Munc18c in human skeletal muscle are implicated in insulin resistance/type 2 diabetes.** *Diabetes*, 59:1870-1878, 2010.

BOULANT, S., TARGETT-ADAMS, P., MCLAUCHLAN, J.. **Disrupting th association of hepatitis C virus core protein with lipid droplets correlates with a loss in production of infectious virus.** *J. Gen. Virol.*, 88:2204-2213, 2007

BOULANT, S., DOUGLAS, M.W., MOODY, L., BUDKOWSKA, A., TARGETT-ADAMS, P.,

- MCLAUHLAM, J. **Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner.** *Traffic*, 9:1268-1282, 2008.
- BOUTROS, R., DOZIER, C., DUCOMMUN, B. **The when and wheres of CDC5 phosphatases.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, 18:185-191, 2006.
- BOZZA, P.T., PAYNE, J.L., GOULET, J.L., WELLER, P.F. **Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids.** *J. Exp. Med.*, 183:1515-1525, 1996a.
- BOZZA, P.T., PAYNE, J.L., MORHAM, S.G., LANGENBACH, R., SMITHIES, O., WELLER, P.F. **Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cycl oxygenase-independent inhibition by aspirin.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:11091-11096, 1996b.
- BOZZA, P.T., YU, W., PENROSE, J.F., MORGAN, E.S., DVORAK, A.M., WELLER, P.F. **Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid production.** *J. Exp. Me.*, 186:909-920, 1997.
- BOZZA, P.T., YU, W., CASSARA, J., WELLER, P.F. **Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects.** *J. Leukoc. Biol.*, 64:563-569, 1998.
- BOZZA, P.T., MELO, R.C.N., BANDEIRA-MELO, C. **Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense.** *Pharmac. Ther.*, 113:30-49, 2007.
- BOZZA, P.T., NAGALHÃES, K.G., WELLER, P.F. **Leukocyte lipid bodies – biogenesis and functions in inflammation.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1791:540-551, 2009.
- BOZZA, P.T., VIOLA, J.P. **Lipid droplets in inflammation and cancer.** *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 82:243-250, 2010.
- BRASAEMLE, D.L., BARBER, T., WOLINS, N.E., SERRERO, G., BLANCHETTE-MACKIE, E.J., LONDOS, C. **Adipose differentiation-related protein is and ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein.** *J. Lipid Res.*, 38:2249-2263, 1997.
- BRASAEMLE, D.L., RUBIN, B., HARTEN, I.A., GRUIA-GRAY, J., KIMMEL, A.R., LONDOS, C. **Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis.** *J. Biol. Chem.*, 275:38486-38493, 2000.
- BRASAEMLE, D.L., DOLIOS, G., SHAPIRO, L., WANG, R. **Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes.** *J. Biol. Chem.*, 279:46835-46842, 2004.
- BRASAEMLE, D.L. **A metabolic push to proliferate.** *Science*, 313:1581-1582, 2006.
- BRASAEMLE, D.L. **The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid**

droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.*, 48:2547-2559, 2007.

BREHM, A., MISKA, E.A., MCCANCE, D.J., REID, J.L., BANNISTER, A.J., KOUZARIDES, T. **Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription.** *Nature*, 391:597-601, 1998.

BREMNER, R., COHEN, B.L., SOPTA, M., HAMEL, P.A., INGLES, C.J., GALLIE, B.L., PHILLIPS, R.A. **Direct transcriptional repression by pRB and its reversal by specific cyclins.** *Mol. Cell. Biol.*, 15:3256-3265, 1995.

BUCHKOVICH, K., DUFFY, L.A., HARLOW, E. **The retinoblastoma protein is phosphorylated during specific phases of the cell cycle.** *Cell*, 58:1097-1105, 1989.

BULANKINA, A.V., DEGGERICH, A., WENZEL, D., MUTENDA, K., WITTMANN, J.G., RUDOLPH, M.G., BURGER, K.N.J., HÖNING, S. **TIP47 functions in the biogenesis of lipid droplets.** *J. Cell Sci.*, 185:641-655, 2009.

BUECHLER, C., RITTER, M., DUONG, C.Q., ORSO, E., KAPINSKY, M., SCHMITZ, G. **Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1532:97-104, 2001.

BUSSELL, R. JR., ELIEZER, D. **A structural and functional role for 11-mer repeats in alpha-synuclein and other exchangeable lipid binding proteins.** *J Mol Biol*, 329:763-778, 2003.

CARDONA, P.J., LLATJOS, R., GORDILLO, S., DIAZ, J., OJANGUREN, I., ARIZA, A., AUSINA, V. **Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*.** *Scand. J. Immunol.*, 52:156-163, 2000.

CARDOSO, J., MOLENAAR, L., DE MENEZES, R.X., VAN LEERDAM, M., ROSENBERG, C., MOSLEIN, G., SAMPSON, J., MORREAU, H., BOER, J.M., FODDE, R. **Chromosomal instability in MYH- and APC-mutant adenomatous polyps.** *Cancer Res.*, 66:2514-2519, 2006.

CERMELLI, S., GUO, Y., GROSS, S.P., WELTE, M.A. **The lipid-droplet proteome reveals that droplets are a protein-storage depot.** *Curr. Biol.*, 16:1783-1795, 2006.

CHAE, H.D., YUN, J., BANG, Y.J., SHIN, D.Y. **Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions.** *Oncogene*, 23:4084-4088, 2004.

CHAN, C.S., BOTSTEIN, D. **Isolation and characterization of chromosome-gain and increase-in-ploidy mutants in yeast.** *Genetics*, 135:677-691, 1993.

CHAN, F.K., ZHANG, J., CHENG, L., SHAPIRO, D.N., WINOTO, A. **Identification of human and mouse p19, a novel CDK4 and CDK6 inhibitor with homology to p16ink4.** *Mol. Cell. Biol.*, 15:2682-2688, 1995.

- CHANG., B.H.-J., LI, L., PAUL, A., TANIGUCHI, S., NANNEGARI, V., HEIRD, W.C., CHAN, L. **Protection against fatty liver but normal adipogenesis in mice lacking adipose differentiation-related protein.** *Mol. Cell. Biol.*, 26:1063-1076, 2006.
- CHANG, T.Y., CHANG, C.C, OHGAMI, N., YAMAUCHI, Y. **Cholesterol sensing, trafficking, and esterification.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 22:129-157, 2006.
- CHAWLA, A., LEE, C.H., BARAK, Y., HE, W., ROSENFELD, J., LIAO, D., HAN, J., KANG, H., EVANS, R.M. **PPAR δ is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:1268-1273, 2003.
- CHEN, J.S., GREENBERG, A.S., WANG, S.M. **Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages.** *J. Cell Biochem.*, 86:784-791, 2002.
- CHEN, H.Z., TSAI, S.Y., LEONE, G. **Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control.** *Nat. Rev. Cancer*, 9:785-797, 2009.
- CHEN, Z., TROTMAN, L.C., SHAFFER, D., LIN, H.K., DOTAN, Z.A., NIKI, M., KOUTCHER, J.A., SCHER, H.I., LUDWIG, T., GERALD, W., CORDON-CARDO, C., PANDOLFI, P.P. **Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis.** *Nature*, 436:725-730, 2005.
- CHENG, M., OLIVER, P., DIEHL, J.A., FERRO, M., ROUSSEL, M.F., ROBERTS, J.M., SHERR, C.J. **The p21^{Cip1} and p27^{Kip1} CDK “inhibitors” are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts.** *EMBO J.*, 18:1571-1583, 1999.
- CHO, S.Y., SHIN, E.S., PARK, P.J., SHIN, D.W., CHANG, K., KIM, D., LEE, H.H., LEE, J.H., KIM, S.H., SONG, M.J., CHANG, I.-S., LEE, O.S., LEE, T.R. **Identification of mouse Prp19p as a lipid droplet-associated protein and its possible involvement in the biogenesis of lipid droplets.** *J. Biol. Chem.*, 282:2456-2465, 2007.
- CHONG, B.M., REIGAN, P., MAYLE-COMBS, K.D., ORLICKY, D.J., MCMANAMAN, J.L. **Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion.** *Trends Endocrinol Metab*, 22:211-217, 2011.
- CHUNG, S., BROWN, J.M., SANDBERG, M.B., MCINTOSH, M. **Trans-10,cis-12 CLA increases adipocyte lipolysis and alters lipid droplet-associated proteins: role of mTOR and ERK signaling.** *J. Lipid Res.*, 46:885-895, 2005
- CLARK, J.D., MILONA, N., KNOPF, J.L. **Purification of a 100-kilodalton cytosolic phospholipase A₂ from the human monocytic cell line U937.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:7708-7712, 1990.
- CLURMAN, B.E., SHEAFF, R.J., THRESS, K., GROUDINE, M., ROBERTS, J.M. **Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by CDK2 binding and cyclin phosphorylation.** *Genes Dev.*, 10:1979-1990, 1996.

COCKER, J.H., PIATTI, S., SANTOCANALE, C., NASMYTH, K., DIFFLEY, J.F.X. **An essential role of the Cdc6 protein in forming the prereplicative complexes of budding yeast.** Nature, 379:180-182, 1995.

COLEMAN, M.L., MARSHALL, C.J., OLSON, M.F. **RAS and RHO GTPases in G1-phase cell-cycle regulation.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:355-366, 2004.

DALEN, K.T., DAHL, T., HOLTER, E., ARNTSEN, B., LONDOS, C., SZTALRYD, C., NEBB, H.I. **LSDP5 is a PAT protein specifically expressed in fatty acid oxidizing tissues.** Biochim. Biophys. Acta, 1771:210-227, 2007.

DANOVI, D., MEULMEESTER, E., PAISNI, D., MIGLIORINI, D., CAPRA, M., FRENK, R., DE GRAAF, P., FRANCOZ, S., GASPARINI, P., GOBBI, A., HELIN, K., PELICCI, P.G., JOCHEMSEN, A.G., MARINE, J.C. **Amplification of Mdmx (or Mdm4) directly contributes to tumor formation by inhibiting p53 tumor suppressor activity.** Mol. Cell. Biol., 24:5835-5843, 2004.

DAVEY, M.J., JERUZALMI, D., KURIYAN, J., O'DONNELL, M. **Motors and switches: AAA⁺ machines within the replisome.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 3:826-835, 2002.

D'AVILA, H., MELO, R.C.N., PARREIRA, G.G., WERNECK-BARROSO, E., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., BOZZA, P.T. **Mycobacterium bovis BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo.** J. Immunol., 176:3087-3097, 2006.

D'AVILA, H., ROQUE, N.R., CARDOSO, R.M., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., MELO, R.C., BOZZA, P.T. **Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages.** Cell Microbiol. 10:2589-604, 2008.

DE ASSIS, E.F., SILVA, A.R., CAIADO, L.F., MARATHE, G.K., ZIMMERMAN, G.A., PRESCOTT, S.M., MCINTYRE, T.M., BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO, H.C. **Synergism between platelet-activation factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes.** J. Immunol., 171:2090-2098, 2003.

DE WILDE, J., SMIT, E., SNEPVANGERS, F.J., DE WIT, N.W., MOHREN, R., HULSHOF, M.F., MARIMAN, E.C. **Adipophilin protein expression in muscle--a possible protective role against insulin resistance.** FEBS J., 277:761-773, 2003.

DEN ELZEN, N., PINES, J. **Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase.** J. Cell Biol., 153:121-136, 2001.

DIDONATO, D., BRASAEMLE, D.L. **Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy.** J. Histochem. Cytochem., 51:773-780, 2003.

- DONG, H., CZAJA, M.J. **Regulation of lipid droplets by autophagy.** Trends Endocrinol. Metab., 22:234-240, 2011.
- DOAK, S.H., JENKINS, G.J., PARRY, E.M., GRIFFITHS, A.P., BAXTER, J.N., PARRY, J.M. **Differential expression of the MAD2, BUB1 and HSP27 genes in Barrett's oesophagus – their association with aneuploidy and neoplastic progression.** Mutat. Res., 547:133-144, 2004.
- DORSAM, R.T., GUTKIND, J.S. **G-protein-coupled receptors and cancer.** Nat. Rev. Cancer, 7:79-94, 2007.
- DOWNWARD, J. **Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy.** Nat. Rev. Cancer, 3:11-22, 2003.
- DRAETTA, G., BRIZUELA, L., POTASHKIN, J., BEACH, D. **Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2*⁺ and *suc1*⁺.** Cell, 50:319-325, 1987.
- DRAETTA, G., BEACH, D. **Activation of *cdc2* protein kinase during mitosis in human cells: cell cycle-dependent phosphorylation and subunit rearrangement.** Cell, 54:17-26, 1988.
- DRAETTA, G., LUCA, F., WESTENDORF, J., BRIZUELA, L., RUDERMAN, J., BEACH, D. **Cdc2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B: evidence for proteolytic inactivation of MPF.** Cell, 56:829-838, 1989.
- DUENSING, S., MUNGER, K. **Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins.** Int. J. Cancer, 109:1107-1110, 2004.
- DUNAIEF, J.L., STROBER, B.E., GUHA, S., KHAVARI, P.A., ALIN, K., LUBAN, J., BEGEMANN, M., CRABTREE, G.R., GOFF, S.P. **The retinoblastoma protein and BGR1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest.** Cell, 79:119-130, 1994.
- DURKACZ, B., CARR, A., NURSE, P. **Transcription of the *cdc2* cell cycle control gene of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.** EMBO J., 5:369-373, 1986.
- DVORAK, A.M. **Biochemical contents of granules and lipid bodies – two distinctive organelles found in basophils and mast cells.** Basophil and Mast Cell Degranulation and Recovery, vol. 4 (p.27). New York: Plenum Press, 1991.
- DVORAK, A.M., MORGAN, E., SCHLEIMER, R.P., RYEOM, S.W., LICHTENSTEIN, L.M., WELLER, P.F. **Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils.** J. Histochem. Cytochem., 40:759-769, 1992.
- DVORAK, A.M., WELLER, P.F., HARVEY, V.S., MORGAN, E.S., DVORAK, H.F. **Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified**

fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. Int. Arch. Allergy Immunol., 101:136-142, 1993.

DVORAK, A.M., MORGAN, E.S., TZIZIK, D.M., WELLER, P.F. **Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts.** Int. Arch. Allergy Immunol., 105:245-250, 1994.

DVORAK, A.M., MORGAN, E.S., WELLER, P.F. **Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor in lipid bodies and secretory granules in human mast cells.** Histochem. J., 33:397-402, 2001.

DVORAK, A.M., MORGAN, E.S., WELLER, P.F. **RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies.** Histol. Histopathol., 18:943-968, 2003.

DYNLACHT, B.D., FLORES, O., LEES, J.A., HARLOW, E. **Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes.** Genes Dev., 8:1772-1786, 1994.

DYSON, N. **The regulation of E2F by pRB-family proteins.** Genes Dev., 12:2246-2262, 1998.

EDVARDSSON, U., LJUNGBERG, A., LINDEN, D., WILLIAM-OLSSON, L., PEILOT-SJOGREN, H., AHNMARK, A., OSCARSSON. **PPAR α activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes.** J. Lipid Res., 47:329-340, 2006.

EASTON, J., WEI, T., LAHTI, J.M., KIDD, V.J. **Disruption of the cyclin D/cyclin-dependent kinase/INK4/retinoblastoma protein regulatory pathway in human neuroblastoma.** Cancer Res., 58:2624-2632, 1998.

EGGBERT, U.S., MITCHISON, T.J., FIELD, C.M. **Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms.** Annu. Rev. Genet., 75:543-566, 2006.

EL-DEIRY, W.S., TOKINO, T., VELCULESCU, V.E., LEVY, D.B., PARSONS, R., TENT, J.M., LIN, D., MERCER, E., KINZLER, K.W., VOLGELSTEIN, B. **WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression.** Cell, 75:817-825, 1993.

EVANS, T., ROSENTHAL, E.V., YOUNGBLOM, J., DISTEL, D., HUNT, T. **Cyclins: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division.** Cell, 33:389-396, 1983.

EZHEVKSY, S.A., HAGAHARA, H., VOCERO, A.A., GIUS, D.R., WEI, M.C., DOWDY, S.F. **Hypo-phosphorylation of the retinoblastoma protein (pRb) by cyclin D:Cdk4/6 complexes results in active pRb.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:10699-10704, 1997.

EZHEVKSY, S.A., HO, A., BEVKER-HAPAK, M., DAVIS, P.K., DOWDY, S.F. **Differential regulation of retinoblastoma tumor suppressor protein by G₁ cyclin-dependent kinase complexes *in vivo*.** Mol. Cell. Biol., 21:4773-4784, 2001.

- FABRINO, D.L., LEON, L.L., PARREIRA, G.G., GENESTRA, M., LAMEIDA, P.E., MELO, R.C. (2004). **Peripheral blood monocytes show morphological pattern of activation and decreased nitric oxide production during acute Chagas' disease in rats.** *Nitric Oxide*, 11:166-174, 2004.
- FALECK, D.M., ALI, K., ROAT, R., GRAHAM, M.J., CROOKE, R.M., BATTISTI, R., GARCIA, E., AHIMA, R.S., IMAI, Y. **Adipose differentiation-related protein regulates lipids and insulin in pancreatic islets.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299:E249-E257, 2010.
- FAN, B., IKUYAMA, S., GU, J.Q., WEI, P., OYAMA, J., INOBUCHI, T., NISHIMURA, J. **Oleic acid-induced ADRP expression requires both AP-1 and PPAR response elements, and is reduced by Pycnogenol through mRNA degradation in NMuLi liver cells.** *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 297:E112-123, 2009.
- FANTI, V., STAMP, G., ANDREWS, A., ROSEWELL, I., DICKSON, C. **Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development.** *Genes Dev.*, 9:2364-2372, 1995.
- FEI, W., SHUI, G., GAETA, B., DU, X., KUERSCHENER, L., LI, P., BROWN, A.J., WENK, M.R., PARTON, R.G. **Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast.** *J. Cell Biol.*, 180:473-482, 2008.
- FEINGOLD, K.R., KAZEMI, M.R., MAGRA, A.L., MCDONALD, C.M., CHUI, L.G., SHIGENAGA, J.K., PATZEK, S.M., CHAN, Z.W., LONDOS, C, GRUNFELD C. **ADRP/ADFP and Mal1 expression are increased in macrophages treated with TLR agonists.** *Atherosclerosis*, 209:81-88, 2010.
- FERNÁNDEZ, M., ALBOR, C., INGELMO-TORRES, M., NIZON, S.J., CHARLES, F., KURZCHALIA, T., TEBAR, F., ENTICH, C., PARTON, R.G., POL, A. **Caveolin-1 is essential for liver regeneration.** *Science*, 313:1628-1632, 2006.
- FIELDING, C.J., FIELDING, P.E. **Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol.** *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 49:251-264, 2001.
- FISHER, D.L., NURSE, P. **A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins.** *EMBO J.*, 15:850-860, 1996.
- FLEMINGTON, E.K., SPECK, S.H., KAELIN, W.G. **E2F1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:6914-6918, 1993.
- FORSBURG, S.L. **Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 68:109-168, 2004.
- FRANKE, W.W., HERGT, M., GRUND, C. **Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules.** *Cell*, 49:131-141, 1987.

FRIEDBERG, E.C. **How nucleotide excision repair protects against cancer.** *Nat. Rev. Cancer*, 1:22-33, 2001.

FRY, A., MERALDI, P., NIGG, E.A. **A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators.** *EMBO J.*, 17:470-481, 1998.

FUJII, H., IKURA, Y., ARIMOTO, J., SUGIOKA, K., IEZZONI, J.C., PARK, S.H., NARUKO, T., ITABE, H., KAWADA, N., CALDWELL, S.H., UEDA, M. **Expression of perilipin and adipophilin in nonalcoholic fatty liver disease; relevance to oxidative injury and hepatocyte ballooning.** *J Atheroscler Thromb*, 16:893-901, 2009.

FUJIMOTO, T., KOGO, H., ISHIGURO, K., TAUCHI, K., NOMURA, R. **Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new “membrane domain” in the cell.** *J. Cell. Biol.*, 152:1079-1085, 2001.

FUJIMOTO, T., OHSAKI, Y., CHENG, J., SUZUKI, M., SHINOHARA, Y. **Lipid droplets: a classic organelle with new outfits.** *Histochem. Cell Biol.*, 130:263-279, 2008.

FUJIMOTO, Y., ITABE, H., SAKAI, J., MAKITA, M., NODA, J., MORI, M., HIGASHI, Y., KOJIMA, S., TAKANO, T. **Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1644:47-59, 2004.

GAO, J., SERRERO, G. **Adipose differentiation-related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake.** *J. Biol. Chem.*, 274:16825-16830, 1999.

GAO, J., YE, H., SERRERO, G. **Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids.** *J. Cell Physiol.*, 182:297-302, 2000.

GAO, J.G., SIMON, M. **Molecular screening for GS2 lipase regulators: inhibitors of keratinocyte retinylester hydrolysis by TIP47.** *J. Invest. Dermatol.*, 126:2087-2095, 2006.

GELEY, S., KRAMER, E., GIEFFERS, C., GANNON, J., PETERS, J.M., HUNT, T. **Anaphase-promoting complex/cyclosome-dependent proteolysis of human cyclin A starts at the beginning of mitosis and is not subject to the spindle assembly checkpoint.** *J. Cell Biol.*, 153:137-148, 2001.

GENG, Y., EATON, E.N., PICON, M., ROBERTS, J.M., LUNDBERG, A.S., GIFFORD, A., SARDET, C., WEINBERG, R.A. **Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein.** *Oncogene*, 12:1173-1180, 1996.

GENG, Y., WHORISKEY, W., PARK, M.Y., BRONSON, R.T., MEDEMA, R.H., LI, T., WEINBERG, R.A., SICINSKI, P. **Rescue of cyclin D1 deficiency by knockin cyclin E.** *Cell*, 97:767-777, 1999.

GIRARD, F., STRAUSFELD, U., FERNANDEZ, A., LAMB, N.J. **Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts.** *Cell*, 67:1169-1179, 1991.

GLOVER, D.M., LEIBOWITZ, M.H., MCLEAN, D.A., PARRY, H. **Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles.** *Cell*, 81:95-105, 1995.

GOULD, K.L., NURSE, P. **Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis.** *Nature*, 342:39-45, 1989.

GRANNEMAN, J.G., MOORE, H.P., GRANNEMAN, R.L., GREENBERG, A.S., OBIN, M.S., ZHU, Z. **Analysis of lipolytic protein trafficking and interactions in adipocytes.** *J. Biol. Chem.*, 282:5726-5735, 2007.

GRANNEMAN, J.G., MOORE, H.P., KRISHNAMOORTHY, R., RATHOD, M. **Perilipin controls lipolysis by regulating the interactions of AB-hydrolase containing 5 (Abhd5) and adipose triglyceride lipase (Atgl).** *J. Biol. Chem.*, 284:34538-34544, 2009.

GREENBERG, A.S., EGAN, J.J., WEK, S.A., GARTY, N.B., BLANCHETTE-MACKIE, E.J., LONDOS, C. **Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets.** *J. Biol. Chem.*, 266:11341-11346, 1991.

GRETEN, F.R., ECKMANN, L., GRETEN, T.F., PARK, J.M., LI, Z.W., EGAN, L.J., KAGNOFF, M.F., KARIN, M. **IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer.** *Cell*, 118:285-296, 2004.

GREENSPAN, P., MAYER, E.P., FOWLER, S.D. **Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets.** *J. Cell. Biol.*, 100:2742-2744, 1985.

GROSS, S., WELTE, M., BLOCK, S., WIESCHAUS, E. **Dynein-mediated cargo transport in vivo: a switch controls travel distance.** *J. Cell Biol.*, 148:945-956, 2000.

GSCHWIND, A., FISCHER, O.M., ULLRICH, A. **The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy.** *Nat. Rev. Cancer*, 4:361-370, 2004.

GUAN, K.L., JENKINS, C.W., LI, Y., NICHOLS, M.A., WU, X., O'KEEFE, C.L., MATERA, A.A., XIONG, Y. **Growth suppression by p18, a p16^{INK4a/MST1} – and p15^{INK4b/MTS2} – related CDK6 inhibitor, correlates with wild-type pRb function.** *Genes Dev.*, 8:2939-2952, 1994.

GUBERN, A., CASAS, J., BARCELÓ-TORNS, M., BARNEDA, D., DE LA ROSA, X., MASGRAU, R., PICATOSTE, F., BALSINDE, J., BALBOA, M.A., CLARO, E. **Group IVA phospholipase A₂ is necessary for the biogenesis of lipid droplets.** *J. Biol. Chem.*, 283:27369-27382, 2008.

GUBERN, A., BARCELÓ-TORNS, M., BARNEDA, D., LÓPEZ, J.M., MASGRAU, R., PICATOSTE, F., CHALFANT, C.E., BALSINDE, J., BALBOA, M.A., CLARO, E. **JNK and ceramide kinase govern the biogenesis of lipid droplets through activation of group IVA phospholipase A₂.** *J. Biol. Chem.*, 284:32359-32369, 2009.

GUNJAN, A., VERREAU, A. **A Rad53 kinase-dependent surveillance mechanism that regulates histone protein levels in *S. cerevisiae*.** *Cell*, 115:537-549, 2003.

GUNJAN, A., PAIK, J., VERREAULT, A. **Regulation of histone synthesis and nucleosome assembly.** *Biochimie*, 87:625-635, 2005.

GUO, Y., WALTHER, T.C., RAO, M., STUURMAN, N., GOSHIMA, G., TARAYAMA, K., WONG, J.S., VALE, R.D., WALTER, P., FARESE JR, R.V. **Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization.** *Nature*, 453:657-661, 2008

GÜTTINGER, S., LAURELL, E., KUTAY, U. **Orchestrating nuclear envelope disassembly and reassembly during mitosis.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10:178-191, 2009.

HAINAUT, P., HOLLSTEIN, M. **p53 and human cancer: the first ten thousand mutations.** *Adv. Cancer Res.*, 77:81-137, 2000.

HALL, M., PETERS, G. **Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependnet kinases, and CDK inhibitors in human cancer.** *Adv. Cancer Res.*, 68:67-108, 1996.

HANAHAH, D., WEINBERG, R.A. **The hallmarks of cancer.** *Cell*, 100:57-70, 2000.

HANAHAH, D., WEINBERG, R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*, 144:646-674, 2011.

HANNON, G.J., BEACH, D. **p15^{INK4b} is a potential effector of TGF β -induced cell cycle arrest.** *Nature*, 371:257-261, 1994.

HARA, E., SMITH, R., PARRY, D., TAHARA, H., STONE, S., PETERS, G. **Regulation of p16^{CDKN2} expression and its implications for cell immortalization and senescence.** *Mol. Cell. Biol.*, 16:859-867, 1996.

HARBOUR, J.W., LUO, R.X., DEI SANTI, A., POSTIGO, A.A., DEAN, D. (1999). **Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G₁.** *Cell*, 98:859-869, 1999.

HARBOUR, J.W., DEAN, D. **The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms.** *Genes Dev.*, 14:2393-2409, 2000.

HARPER, J.W., ADAMI, G.R., WEI, N., KEYOMARSI, K., ELLEDGE, S.J. **The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases.** *Cell*, 75:805-816, 1993.

HARPER, J.W., ELLEDGE, S.J. **Cdk inhibitors in development and cancer.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:56-64, 1996.

HARTWELL, L., WEINHART, T. **Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.** *Science*, 246:629-634, 1989.

HAUNER, H. **Complete adipose differentiation of 3T3 L1 cells in a chemically defined medium: comparison to serum-containing culture conditions.** *Endocrinology*, 127:865-872, 1990.

- HEALD, R., MCLOUGHLIN, M., MCKEON, F. **Human wee1 maintains mitotic timing by protecting the nucleus from cytoplasmically activated Cdc2 kinase.** *Cell*, 74:463-474, 1993.
- HEID, H.W., SCHNOLZER, M., KEENAN, T.W., **Adipocyte differentiation-related protein is secreted into milk as a constituent of milk lipid globule membrane.** *Biochem. J.*, 320:1025-1030, 1996.
- HEID, H.W., MOLL, R., SCHWETLICK, I., RACKWITZ, H.R., KEENAN, T.W. **Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases.** *Cell Tissue Res.*, 294:309-321, 1998).
- HELIN, K., HARLOW, E., FATTAEY, A. **Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein.** *Mol. Cell. Biol.*, 15:3082-3089, 1993.
- HENDZEL, M.J., WEI, Y., MANCINI, M.A., VAN HOOSER, A., RANALLI, T., BRINKLEY, B.R., BAZETT-JONES, D.P., ALLIS, C.D. **Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation.** *Chromosoma*, 106:348-360, 1997.
- HERNANDES-PANDO, R., PAVON, L., ARRIAGA, K., OROZCO, H., MADRID-MARINA, V., ROOK, G. **Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection.** *Infect. Immun.*, 65:3317-3327, 1997.
- HERKER, E., HARRIS, C., HERNANDEZ, C., CARPENTIER, A., KAEHLCKE, K., ROSENBERG, A.R., FARESE, R.V. JR, OTT, M. **Efficient hepatitis C virus particle formation requires diacylglycerol acyltransferase-1.** *Nat. Med.*, 16:1295-1298, 2010.
- HICKENBOTTON, S.J., KIMMEL, A.R., LONDOS, C., HURLEY, J.H. **Structure of a lipid droplet protein; the PAT family member TIP-47.** *Structure*, 12:1199-1207, 2004.
- HIRAI, H., ROUSSEL, M.F., KATO, J., ASHMUN, R.A., SHERR, C.J. **Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin-dependent kinases CDK4 and CDK6.** *Mol. Cell. Biol.*, 15:2672-2681, 1995.
- HOCSAK, E., RACZ, B., SZABO, A., MESTER, L., RAPOLTI, E., POZSGAI, E., JAVOR, S., BELYEI, S., GALLYAS, F. Jr., SUMEGI, B., SZIGETI, A. **TIP47 protects mitochondrial membrane integrity and inhibits oxidative-stress-induced cell death.** *FEBS Lett.*, 584:2953-2960, 2010.
- HOFFMANN, I., CLARKE, P.R., MARCOTE, M.J., KARSENTI, E., DRAETTA, G. **Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis.** *EMBO J.*, 12:53-63, 1993.
- HOLLAND, A.J., CLEVELAND, D.W. **Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10:478-487, 2009.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., HARRIS, C.C. **p53 mutations in human**

cancers. Science, 253:49-53, 1991.

HONG, W. **SNAREs and traffic.** Biochim. Biophys. Acta, 1744:493-517, 2005.

HOOPER, C., PUTTAMADAPPA, S.S., LORING, Z., SHEKHTMAN, A., BAKOWSKA, J.C. **Spartin activates atrophin-1-interacting protein 4 (AIP4) E3 ubiquitin ligase and promotes ubiquitination of adipophilin on lipid droplets.** BMC Biol., 8:72, 2010

HOPE, R.G., MCLAUCHLAN, J. **Sequence motifs required for lipid droplet association and protein stability are unique to the hepatitis C virus core protein.** J. Gen. Virol., 81:1913-1925, 2000.

HOUTGRAAF, J.H., VERSMISSEN, J., VAN DER GIESSEN, W. **A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells.** Cardiovasc. Revasc. Med., 7:165-172, 2006.

HSU, J.Y., REIMANN, J.D., SORENSEN, C.S., LUKAS, J., JACKSON, P.K. **E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1).** Nat. Cell Biol., 4:358-366, 2002.

HUNT, T. **Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase.** Curr. Opin. Cell Biol., 1:268-274, 1989.

HUNTER, T., PINES, J. **Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age.** Cell, 79:573-582, 1994.

HUSSAIN, M.M. **A proposed model for the assembly of chylomicrons.** Atherosclerosis, 148:1-15., 2000.

IGAL, R.A., RHOADS, J.M., COLEMAN, R.A. **Neutral lipid storage disease with fatty liver and cholestasis.** J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 25:541-547, 1997.

IKONEN, E. PARTON, R.G. **Caveolins and cellular cholesterol balance.** Traffic, 1:212-217, 2000.

IKONEN, E., HEINO, S., LUSA, S. **Caveolins and membrane cholesterol.** Biochem. Soc. Trans., 32:121-123, 2004.

IMAMURA, M., INOBUCHI, T., IKUYAMA, S., TANIGUCHI, S., KOBAYASHI, K., NAKASHIMA, N., NAWATA, H. **ADRP stimulates accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts.** Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 283:E775-E783, 2002.

IMANISHI, Y., BATTEN, M.L., PISTON, D.W., BAEHR, W., PALCZEWSKI, K. **Non-invasive two-photon imaging reveals retinyl ester storage structures in the eye.** J. Cell. Biol., 164:373-383, 2004.

INAZAWA, Y., MAKATSU, M., YASUGI, E., SAEKI, K., YUO, A. **Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating**

factor: possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. Cell Struct. Funct., 28:487-493, 2003.

JAHN, R., SCHELLER, R.H. **SNAREs – engines for membrane fusion.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 7:631-643, 2006.

JAINCHILL, J.L., AARONSON, S.A., TODARO, G.J. **Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells.** J. Virol., 4:549-553, 1969.

JIANG, H.P., HARRIS, S.E., SERRERO, G. **Molecular cloning of a differentiation-related mRNA in the adipogenic cell line 1246.** Cell Growth Diff., 3:21-30, 1992a.

JIANG, H.P., SERRERO, G. **Isolation and characterization of a full-length cDNA coding for and adipocyte differentiation-related protein.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:7856-7860, 1992b.

JINNO, S., HUNG, S.C., YAMAMOTO, H., LIN, J., NAGATA, A., OKAYAMA, H. **Oncogenic stimulation recruits cyclin-dependent kinase in the cell cycle start in rat fibroblast.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:13197-13202, 1999.

JOHNSON, D.G., SCHWARTZ, J.K., CRESS, W.D., NEVINS, J.R. **Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase.** Nature, 365:349-35, 1993.

KAMB, A. **Cyclin-dependent kinase inhibitors and human cancer.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., 227:139-148, 1998

KAMIJO, T., WEBER, J.D., ZAMBETTI, G., ZINDY, F., ROUSSEL, M.F., SHERR, C.L. **Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:8292-8297, 1998.

KANDLI, M., FEIGE, E., CHEN, A., KILFIN, G., MOTRO, B. **Isolation and characterization of two evolutionary conserved murine kinases (Nek6 and nek7) related to the fungal mitotic regulator, NIMA.** Genomics, 68:187-196, 2000.

KASTAN, M.B., BARTEK, J. **Cell-cycle checkpoints and cancer.** Nature, 432:316-323, 2004.

KATO, J., MATSUSHIME, H., HIEBERT, S.W., EWEN, M.E., SHERR, C.J. **Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (Rb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4.** Genes Dev., 7:331-342, 1993.

KAUSELMANN, G., WEILER, M., WULFF, P., JESSBERGER, S., KONIETZKO, U., SCAFIDI, J., STAUBLI, U., BEREITER-HAHN, J., STREBHARDT, K., KUHL, D. **The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca⁺²- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity.** EMBO J., 18:5528-5539, 1999.

KEENAN, T.W. **Assembly and secretion of the lipid globules of milk.** Adv. Exp. Med. Biol., 501:125-136, 2001.

- KELLY, T.J., BROWN, G.W. **Regulation of chromosome replication.** Annu. Rev. Biochem., 69:829-880, 2000.
- KEMP, C.J., DONEHOWER, L.A., BRADLEY, A., BALMAIN, A. **Reduction of p53 gene dosage does not increase initiation or promotion but enhances malignant progression of chemically induced skin tumors.** Cell, 74:813-822, 1993.
- KIESS, M., GILL, R.M., HAMEL, P.A. **Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes.** Oncogene, 10:159-166, 1995.
- KIM, J.H., KANG, M.J., PARK, C.U., KWAK, H.J., HWANG, Y., KOH, G.Y. **Amplified CDK2 and cdc2 activities in primary colorectal carcinoma.** Cancer, 85:546-553, 1999.
- KIM, C.A., DELEPINE, M., BOUTET, E., EL MOURABIT, H., LE LAY, S., MEIER, M., NEMANI, M., BRIDEL, E., LEITE, C.C., BERTOLA, D.R., SEMPLÉ, R.K., O'RAHILLY, S., DUGAIL, I., CANPEAU, J., LATHROP, M., MAGRE, J. **Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with berardinelli-seip congenital lipodystrophy.** J. Clin. Endocrinol. Metab., 93:1129-1134, 2008.
- KIMMEL, A.R., BRASAEMLE, D.L., MCANDREWS-HILL, M., SZTALRYD, C., LONDOS, C. **Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins.** J Lipid Res, 51:4684-71, 2010
- KIMURA, K., HIRANO, M., KOBAYASHI, R., HIRANO, T. **Phosphorylation and activation of 13S condensin by Cdc2 in vitro.** Science, 282:487-490, 1998.
- KITAGAWA, M., HIGASHI, M., JUNG, H.K., SUZUKI-TAKAHASHI, I., IKEDA, M., TAMAI, K., KATO, J., SEGAWA, K., YOSHIDA, E., NISHIMURA, S., TAYA, Y. **The consensus motif for phosphorylation by cyclin D1-Cdk4 is different form that for phosphorylation by cyclinA/E-Cdk2.** Embo J., 15:7060-7069, 1996.
- KHOR, V.K., SHEN, W.J., KRAEMER, F.B. **Lipid droplet metabolism.** Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care, 16:632-637, 2013.
- KNUDSON, A.G.Jr. **Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68:820-823, 1971.
- KOH, J., ENDERS, G.H., DYNLACHT, B.D., HARLOW, E. **Tumor-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell cycle inhibition.** Nature, 375:506-510, 1995.
- KOPS, G.J., WEAVER, B.A., CLEVELAND, D.W. **On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint.** Nature Rev. Cancer, 5:773-785, 2005.
- KREK, W., EWEN, M.E., SHIRODKAR, S., ARANY, Z., KAELIN JR, W.G., LIVINGSTON, D.M. **Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase.** Cell, 78:161-172, 1994.

- KREK, W., XU, G., LIVINGSTON, D.M. **Cyclin A-kinase regulation of E2F-1 DNA binding function underlies suppression of an S phase checkpoint.** *Cell*, 83:1149–1158, 1995
- KUHAJDA, F.P. **Fatty acid synthase and cancer: new application of an old pathway.** *Cancer Res.*, 66: 5977–5980, 2006.
- KURAT, C.F., WOLINSKI, H., PETSCHNIGG, J., KALUARACHCHI, S., ANDREWS, B., NATTER, K., KOHLWEIN, S.D. **Cdk1/Cdc28-dependent activation of the major triacylglycerol lipase Tgl4 in yeast links lipolysis to cell-cycle progression.** *Mol. Cell*, 33:53-63, 2008.
- KUROKAWA, Y., MATOBA, R., NAKAMORI, S., TAKEMASA, I., NAGANO, H., DONO, K., UMESHITA, K., SAKON, M., MONDEN, M., KATO, K. **PCR-array gene expression profiling of hepatocellular carcinoma.** *J Exp Clin Cancer Res.*, 23:135-141, 2004.
- LABAER, J., GARRET, M.D., STEVENSON, L.F., SLINGERLAND, J.M., SANDHU, C., CHOU, H.S., FATTAEY, A., HARLOW, E. **New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors.** *Genes Dev.*, 11:847-862, 1997.
- LAOUKILI, J., ALVAREZ, M., MEIJER, L.A., STAHL, M., MOHAMMED, S., KLEIJ, L., HECK, A.J., MEDEMA, R.H. **Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk2-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain.** *Mol. Cell. Biol.*, 28:3076-3087, 2008.
- LARIGAUDERIE, G., FURMAN, C., JAYE, M., LASSELIN, C., COPIN, C., FRUCHARD, J.C., CASTRO, G., ROUIS, M. **Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24:504-510, 2004.
- LARIGAUDERIE, G., CUAZ-PÉROLIN, C., YOUNES, A.B., FURMAN, C., LASSELIN, C., COPIN, C., JAYE, M., FRUCHART, J.C., ROUIS, M. **Adipophilin increases triglyceride storage in human macrophages by stimulation of biosynthesis and inhibition of beta-oxidation.** *FEBS J.*, 273:3498-3510, 2006.
- LASS, A., ZIMMERMANN, R., HAEMMERLE, G., RIEDERER, M., SCHOISWOHL, G., SCHWEIGER, M., KIENESBERGER, P., STRAUSS, J.G., GORKIEWICZ, G., ZECHNER, R. **Adipose triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Cholesterol Esterase Deficiency Syndrome.** *Cell Metab.*, 3:309-319, 2006.
- LEE, J., KUMAGAI, A., DUNPHY, W.G. **Positive regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 proteins.** *Mol. Cell. Biol.*, 12:551-563, 2001.
- LEE, M.G., NURSE, P. **Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*.** *Nature*, 327:31-35, 1987.
- LEE, M.H., REYNISDOTTIR, I., MASSAGUÉ, J. **Cloning of p57^{Kip2}, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution.** *Genes Dev.*, 9:639-649, 1995.

- LEFEVRE, C., JOBARD, F., CAUX, F., BOUADJAR, B., KARADUMAN, A., HEILIG, R., LAKHDAR, H., WOLLENBERG, A., VERRET, J.L., WEISSENBACH, J., OZGÜK, M., LATHROP, M., PRUD'HOMME, J.F., FISCHER, J. **Mutations in CGI-58, the gene encoding a new protein of the esterase/lipase/thioesterase subfamily, in Chanarin-Dorfman syndrome.** *Am. J. Hum. Genet.*, 69:1002-1012, 2001.
- LEI, M. **The MCM complex: its role in DNA replication and implications for cancer therapy.** *Curr. Cancer Drug Targets*, 5:365-380, 2005.
- LENG, X., CONNELL, C.L., GOODRICH, D., HARPER, J.W. **S-phase entry upon ectopic expression of G1 cyclin-dependent kinases in the absence of retinoblastoma protein phosphorylation.** *Curr. Biol.*, 7:709-712, 1997.
- LESLIE, C.C. **Kinetic properties of a high molecular mass arachidonyl-hydrolyzing phospholipase A₂ that exhibits lysophospholipase activity.** *J. Biol. Chem.*, 266:11366-11371, 1991.
- LEUNG, J.K., CASES, S., VU, T.H. **P311 functions in an alternative pathway of lipid accumulation that is induced by retinoic acid.** *J. Cell Sci.*, 121:2751-2758, 2008.
- LEVINE, A.J., MOMAND, J., FINLAY, C.A. **The p53 tumor suppressor gene.** *Nature*, 351:453-456, 1991.
- LIM, K.G., WAN, H.C., BOZZA, P.T., RESNICK, M.B., WONG, D.T., CRUIKSHANK, W.W., KORNFIELD, H., CENTER, D.M., WELLER, P.F. **Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES.** *J. Immunol.*, 156:2566-2570, 1996.
- LIN, L.L., WARTMANN, M., LIN, A.Y., KNOPF, J.L., SETH, A., DAVIS, R.J. **cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase.** *Cell*, 72:269-278, 1993.
- LINDQVIST, A., RODRÍGUEZ-BRAVO, V., MEDEMA, R.H. **The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network.** *J. Cell. Biol.*, 185:193-202, 2009.
- LISTENBERGER, L.L., OSTERMEYER-FAY, A.G., GOLDBERG, E.B., BROWN, W.J., BROWN, D.A. **Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover.** *J. Lipid res.*, 48:2751-2761, 2007.
- LIU, F., STANTON, J.J., WU, Z., PIWNICA, W.H. **The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex.** *Mol. Cell. Biol.*, 17:571-583, 1997.
- LIU, P., YING, Y., ZHAO, Y., MUNDY, D.I., ZHU, M., ANDERSON, R.G.W. **Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic.** *J. Biol. Chem.*, 279:3787-3792, 2004.

- LIU, P., BARTZ, R., ZEHMER, J.K., YING, Y.S., ZHU, M., SERRERO, G., ANDERSON, R.G. **Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets.** *Biochim Biophys Acta*, 1773:784-793, 2007
- LONDOS, C., SZTALRYD, C., TANSEY, J.T., KIMMEL, A.R. **Role of PAT proteins in lipid metabolism.** *Biochimie*, 87:45-49, 2005.
- LOPEZ-VERGÈS, S., CAMUS, G., BLOT, G., BEAUVOIR, R., BENAROUS, R., BERLIOZ-TORRENT, C. **Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:14947-14952, 2006.
- LOWE, S.W., CEPERO, E., EVAN, G. **Intrinsic tumor suppression.** *Nature*, 432:307-315, 2004.
- LUKAS, J., PARRY, D., AAGAARD, L., MANN, D.J., BARTKOVA, J., STRAUSS, M., PETERS, G., BARTEK, J. **Retinoblastoma protein-dependent cell cycle inhibition by the suppressor p16.** *Nature*, 375:503-506, 1995.
- LUKAS, J., HERZINGER, T., HANSEN, K., MORONI, M.C., RESNITZKY, D., HELIN, K., REED, S.I., BARTEK, J. **Cyclin E-induced S phase without activation of the Rb/E2F pathway.** *Genes Dev.*, 11:1479-1492, 1997.
- LUKAS, C., SORENSEN, C.S., KRAMER, E., SANTONI-RUGIU, E., LINDENEG, C., PETERS, J.M., BARTEK, J., LUKAS, J. **Accumulation of cyclin B1 requires E2F and cyclin-A-dependent rearrangement of the anaphase-promoting complex.** *Nature*, 401:119-123, 1999.
- LUNDBERG, A.S., WEINBERG, R.A. **Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two cyclin-CDK complexes.** *Mol. Cell. Biol.*, 18:753-761, 1998.
- LYN, R.K., KENNEDY, D.C., STOLOW, A., RIDSDALE, A., PEZACKI, J.P. **Dynamics of lipid droplets induced by the hepatitis C virus core protein.** *Biochem Biophys Res Commun*, 399:518-524, 2011.
- MAGRÉ, J., DELÉPINE, M., KHALLOUF, E., GEDDE-DAHL, T. JR., VAN MALDERGEM, L., SOBEL, E., PAPP, J., MEIER, M., MÉGARBANÉ, A., BACHY, A., VERLOES, A., D'ABRONZO, F.H., SEEMANOVA, E., ASSAN, R., BAUDIC, N., BOURUT, C., CZERNICHOW, P., HUET, F., GRIGORESCU, F., DE Kerdanet, M., Lacombe, D., Labrune, P., Lanza, M., Loret, H., Matsuda, F., Navarro, J., Nivelon-Chevalier, A., Polak, M., Robert, J.J., Tric, P., Tubiana-Rufi, N., Vigouroux, C., Weissenbach, J., Savasta, S., Maassen, J.A., Trygstad, O., Bogalho, P., Freitas, P., Medina, J.L., Bonnicci, F., Joffe, B.I., Loyson, G., Panz, V.R., Raal, F.J., O'RAHILLY, S., STEPHENSON, T., KAHN, C.R., LATHROP, M., CAPEAU, J. **Identification of the gene altered in Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13.** *Nat. Genet.*, 28:365-370, 2001.
- MAILAND, N., PODTELEJNIKOV, A.V., GROTH, A., MANN, M., BARTEK, J., LUKAS, J. **Regulation**

of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. EMBO J., 21:5911-5920, 2002.

MAJOR, M.L., LEPE, R., COSTA, R.H. **Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coatcivators.** Mol. Cell. Biol., 24:2649-2661, 2004.

MALUMBRES, M., BARBACID, M. **To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer.** Nat. Rev. Cancer, 1:222-231, 2001.

MALUMBRES, M., BARBACID, M. **Mammalian cyclin-dependent kinases.** Trends Biochem. Sci., 30:630-641, 2005.

MALUMBRES, M., BARBACID, M. **Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm.** Nat. Rev. Cancer, 9:153-166, 2009.

MARTIN, S., DRIESSEN, K., NIXON, S.J., ZERIAL, M., PARTON, R.G. **Regulated localization of Rab18 to lipid droplets: effects of lipolytic stimulation and inhibition of lipid droplet catabolism.** J. Biol. Chem., 280:42325-42335, 2005.

MARTIN, S., PARTON, R.G. **Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle.** Nat. Rev. Moll. Cell Biol., 7:373-378, 2006.

MARTINEZ-BOTAS, J., ANDERSON, J.B., TESSIER, D., LAPILLONNE, A., CHANG, B.H., QUAST, M.J., GORENSTEIN, D., CHEN, K.H., CHAN, L. **Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr^{db/db}* mice.** Nat. Genet., 26:474-479, 2000.

MASAI, H., ARAI, K. **Cdc7 kinase complex: a key regulator in the initiation of DNA replication.** J. Cell Physiol., 190:287-296, 2002.

MASSAGUÉ, J. **G1 cell-cycle control and cancer.** Nature, 432:298-306, 2004.

MASUDA, Y., ITABE, H., ODAKI, M., HAMA, K., FUJIMOTO, Y., MORI, M., SASABE, N., AOKI, J., ARAI, H., TAKANO, T. **ADRP/adipophilin is degraded through the proteasome-dependent pathway during regression of lipid-storing cells.** J. Lipid Res., 47:87-98, 2005.

MATSUBARA, J., HONDA, K., ONO, M., SEKINE, S., TANAKA, Y., KOBAYASHI, M., JUNG, G., SAKUMA, T., NAKAMORI, S., SATA, N., NAGAI, H., IOKA, T., OKUSAKA, T., KOSUGE, T., TSUCHIDA, A., SHIMAHARA, M., YASUNAMI, Y., CHIBA, T., YAMADA, T. **Identification of adipophilin as a potential plasma biomarker for colorectal cancer using label-free quantitative mass spectrometry and protein microarray.** Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 20:2195-2203, 2011.

MATSUOKA, S., EDWARDS, M., BAI, C., PARKER, S., ZHANG, P., BALDINI, A., HARPER, J.W., ELLEDGE, S.J. **p57^{Kip2}, a structurally distinct member of the p21^{Cip1} cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene.** Genes Dev., 9:650-662, 1995.

MATSUSHIME, H., ROUSSEL, M.F., ASHUM, R.A., SHERR, C.J. **Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle.** *Cell*, 65:701-713, 1991.

MAYA-MONTEIRO, C.M., ALMEIDA, P.E., D'AVILA, H., MARTINS, A.S., REZENDE, A.P., CASTO-FARIA-NETO, H., BOZZA, P.T. **Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism.** *J. Biol. Chem.*, 283:2203-2210, 2008.

MCMANAMAN, J.L., ZABARONICK, W., SCHAACK, J., ORLICKY, D.J. **Lipid droplet targeting domains of adipophilin.** *J. Lipid Res.*, 44:668-673, 2003.

MEDEMA, R.H., HERRERA, R.E., LAM, F., WEINBERG, R.A. **Growth suppression by p16^{INK4a} requires functional retinoblastoma protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:6289-6293, 1995.

MEEK, D.W. **Tumor suppression by p53: a role for the DNA damage response?** *Nat. Rev. Cancer*, 9:714-723, 2009.

MELO, R.C., D'AVILA, H., FABRINO, D.L., ALMEIDA, P.E., BOZZA, P.T. **Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection.** *Tissue Cell*, 35:59-67, 2003.

MELO, R.C., FABRINO, D.L., DIAS, F.F., PARREIRA, G.G. **Lipid bodies: structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity.** *Inflamm. Res.*, 55:342-348, 2006.

MESQUITA-SANTOS, F.P., VIEIRA-DE-ABREU, A., CALHEIROS, A.S., FIGUEIREDO, J.H., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., WELLER, P.F., BOZZA, P.T., DIAZ, B.L., BANDEIRA-MELO, C. **Cutting edge: prostaglandin D2 enhances leukotriene C4 synthesis by eosinophils during allergic inflammation: synergistic in vivo role of endogenous eotaxin.** *J. Immunol*, 176:1326-30, 2006.

MEYERSON, M., HARLOW, E. **Identification of G₁ kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner.** *Mol. Cell. Biol.*, 14:2077-2086, 1994.

MIURA, S., GAN, J.W., BRZOSTOWSKI, J., PARISI, M.J., SCHULTZ, C.J., LONDOS, C., OLIVER, B., KIMMEL, A.R. **Functional conservation for lipid storage droplet association among perilipin, ADRP and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, Drosophila, and Dictyostelium.** *J. Biol. Chem.*, 277:32253-32257, 2002.

MIYANARI, Y., ATSUZAWA, K., USUDA, N., WATASHI, K., TAKAYUKI, H., MARGARITA, Z., BARTENSCHLAGER, R., WAKITA, T., HIJIKATA, M., SHIMOTOHNO, K. **The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production.** *Nat. Cell Biol.*, 9:961-969, 2007.

MONTAGNOLI, A., FIORE, F., EYTAN, E., CARRANO, A.C., DRAETTA, G.F., HERSHKO, A., PAGANO, M. **Ubiquitination of p27 is regulated by Cdk-dependent phosphorylation and trimeric complex formation.** *Genes Dev.*, 13:1181-1189, 1999.

- MOREIRA, L.S., PIVA, B., GENTILE, L.B., MESQUITA-SANTOS, F., D'AVILA, H., MAYA-MONTEIRO, C.M, BOZZA, P.T., BANDEIRA-MELO, C., DIAZ, B.L. **Cytosolic phospholipase A₂-driven PGE₂ synthesis within unsaturated fatty acids-induced lipid bodies of epithelial cells.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1791:156-165, 2009.
- MORGAN, D.O. **Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors.** *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 13:261-291, 1997.
- MORIISHI, K., MATSUURA, Y. **Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection.** *Front. Microbiol.*, 3:1-14, 2012
- MORITANI, S., ICHIHARA, S., HASEGAWA, M., ENDO, T., OIWA, M., SHIRAIWA, M., NISHIDA, C., MORITA, T., SATO, Y., HAYASHI, T., KATO, A. **Intracytoplasmic lipid accumulation in apocrine carcinoma of the breast evaluated with adipophilin immunoreactivity: a possible link between apocrine carcinoma and lipid-rich carcinoma.** *Am. J. Surg. Pathol.*, 35:861-867, 2011.
- MORRIS, E.J., DYSON, N.J. **Retinoblastoma protein partners.** *Adv. Cancer Res.*, 82:1-54, 2001.
- MORSE, L., CHEN, D., FRANKLIN, D., XIONG, Y., CHEN-KIANG, S. **Induction of cell cycle arrest and B cell terminal differentiation by CDK inhibitor p18(INK4c) and IL-6.** *Immunity*, 6:47-56, 1997.
- MOTOKURA, T., BLOOM, T., KIM, H.G., JÜPPNER, H., RUDERMAN, J.V., KRONENBERG, H.M., ARNOLD, A. **A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene.** *Nature*, 350:512-515, 1990.
- MOTOKURA, T., KEYOMARSI, K., KRONENBERG, H.M., ARNOLD, A. **Cloning and characterization of human cyclin D3, a cDNA closely related in sequence to the PRAD1/Cyclin D1 proto-oncogene.** *J. Biol. Chem.*, 267:20412-20415, 1992.
- MURATA, M., PERANEN, J., SCHREINER, R., WIELAND, F., KURZCHALIA, T.V., SIMONS, K. **VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:10339-10343, 1995.
- MURPHY, D.J., VANCE, J. **Mechanisms of lipid-body formation.** *Trends Biochem. Sci.*, 24:109-115, 1999.
- MURPHY, D.J. **The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms.** *Prog. Lipid Res.*, 40:325-438, 2001.
- MURPHY, S., MARTIN, S., PARTON, R.G. **Lipid droplet-organelle interactions; sharing the fats.** *Biochim. Biophys. Acta*, 1791:441-447, 2009.
- MURPHY, S., MARTIN, S., PARTON, R.G. **Quantitative analysis of lipid droplet fusion: inefficient steady state fusion but rapid stimulation by chemical fusogens.** *PLoS One*, 5:e15030, 2010.
- MURRAY, A.W., KIRSCHNER, M.W. **Cyclin synthesis drives the early embryonic cell state.**

Nature, 339:275-280, 1989.

NAGY, L., TONTONOZ, P., ALVAREZ, H., CHEN, H., EVANS, R.M. **Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ .** Cell, 93:229-240, 1998.

NAKAJIMA, H., TOYOSHIMA-MORIMOTO, F., TANIGUCHI, E., NISHIDA, E. **Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate.** J. Biol. Chem., 278:25277-25280, 2003.

NAKAMURA, N., FUJIMOTO, T. **Adipocyte differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 306:333-338, 2003.

NAKAMURA, N., AKASHI, T., TANEDA, T., KOGO, H., KIKUCHI, A., FUJIMOTO, T. **ADRP is dissociated from lipid droplets by ARF-1-dependent mechanism.** Biochem. Biophys. Res. Commun., 322:957-965, 2004.

NASMYTH, K., HAERING, C.H. **Cohesin: its roles and mechanism.** Annu. Rev. Genet., 43:525-558, 2009.

NEUFELD, T.P., EDGAR, B.A. **Connections between growth and the cell cycle.** Curr. Opin. Cell Biol., 10:784-790, 1998.

NEVINS, J.R. **Toward an understanding of the functional complexity of the E2F and retinoblastoma families.** Cell Growth Diff., 9:585-593, 1998.

NGUYEN, H., GITIG, D.M., KOFF, A. **Cell-free degradation of p27(kip1), a G1 cyclin-dependent kinase inhibitor, is dependent on CDK2 activity and the proteasome.** Mol. Cell. Biol., 19:1190-1201, 1999.

NGUYEN, V.Q., CO, C., LI, J.J. **Cyclin-dependent kinases prevent DNA replication through multiple mechanisms.** Nature, 411:1068-1073, 2001.

NIGG, E.A. **Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish.** Curr. Opin. Cell Biol., 10:776-783, 1998.

NIGG, E.A. **Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints.** Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2:21-32, 2001.

NIIDA, H., NAKANISHI, M. **DNA damage checkpoints in mammals.** Mutagenesis, 21:3-9, 2006.

NISHINO, N., TAMORI, Y., TATEYA, S., KAWAGUCHI, T., SHIBAKUSA, T., MIZUNOYA, W., INOUE, K., KITAZAWA, R., KITAZAWA, S., MATSUKI, Y., HIRAMATSU, W., MASUBUCHI, S., OMACHI, A., KIMURA, K., SAITO, M., AMO, T., OHTA, S., YAMAGUICHI, T., OSUMI, T., CHENG, J., FUJIMOTO, T., NAKAO, H., NAKAO, K., AIBA, A., OKAMURA, H., FUSHIKI, T., KASUGA, M. **FSP27 contributes to efficient energy storage in murine white adipocytes by promoting the formation of unilocular lipid droplets.** J. Clin. Invest., 118:2808-2821, 2008.

- NOBLE, M.E.M., ENDICOTT, J.A., BROWN, N.R., JOHNSON, L.N. **The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control.** *Trends Biochem. Sci.*, 22:482-487, 1997.
- NOBURY, C., NURSE, P. **Animal cell cycles and their control.** *Annu. Rev. Biochem.*, 61:441-470, 1992
- NURSE, P. **Universal control mechanism regulating onset of M-phase.** *Nature*, 344:503-508, 1990.
- NURSE, P. **A long twentieth century of the cell cycle and beyond.** *Cell*, 100:71-78, 2000.
- O'FARRELL, P.H. **Triggering the all-or-nothing switch into mitosis.** *Trends Cell Biol.*, 11:512-519, 2001.
- OHSAKI, Y., CHENG, J., FUJITA, A., TOKUMOTO, T., FUJIMOTO, T. **Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B.** *Mol. Biol. Cell*, 17:2674-2683, 2006.
- OHSAKI, Y., CHENG, J., SUZUKI, M., FUJITA, A., FUJIMOTO, T. **Lipid droplets are arrested in the ER membrane by tight binding of lipidated apolipoprotein B-100.** *J. Cell. Sci.*, 121:2415-2422, 2008.
- OHTANI, K., DEGREGORI, J., NEVINS, J.R. **Regulation of cyclin E gene by transcription factor E2F.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:12146-12150, 1995.
- OKAYASU I., OHKUSA, T., KALIURA, K., KANNO, J., and SAKAMOTO, S. **Promotion of colorectal neoplasia in experimental murine ulcerative colitis.** *Gut* 39:87–92, 1996.
- O'KEEFE, R.T., HENDERSON, S.C., SPECTOR, D.L. **Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences.** *J. Cell. Biol.*, 116:1095-1110, 1992.
- OLOFSSON, S.O., ASP, L., BORÉN, J. **The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins.** *Curr. Opin. Lipidol.*, 10:341-346, 1999.
- ONEL, K., CORDON-CARDO, C. **MDM2 and prognosis.** *Mol. Cancer Res.*, 2:1-8, 2004
- ORLICKY, D.J., DEGALA, G., GREENWOOD, C., BALES, E.S., RUSSEL, T.D., MCMANAMAN, J.L. **Multiple functions encoded by the N-terminal PAT domain of adipophilin.** *J. Cell. Sci.*, 121:2921-2929, 2008.
- OSMANI, S.A., YE, X.S. **Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases.** *Biochem. J.*, 317:633-641, 1996.
- OST, A., SVENSSON, K., RUISSALME, I., BRÄNNMARK, C., FRANCK, N., KROOK, H., SANDSTRÖM, P., KJOLHEDE, P., STRÅLFORS, P. **Attenuated mTOR signaling and enhanced**

autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol. Med.*, 16:235-246, 2010.

OSTERMEYER, A.G., PACI, J.M., ZENG, Y., LUBLIN, D.M., MUNRO, S., BROWN, D.A. **Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets.** *J. Cell. Biol.*, 152:1071-1078, 2001.

OSTLER, D.A., PRIETO, V.G., REED, J.A., DEEVERS, M.T., LAZAR, A.J., IVAN, D. **Adipophilin expression in sebaceous tumors and other cutaneous lesions with clear cell histology: an immunohistochemical study of 117 cases.** *Mod Pathol.*, 23:567-573, 2010.

OZEKI, S., CHENG, J., TAUCHO-SATO, K., HATANO, N., TANIGUCHI, H., FUJIMOTO, T. **Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane.** *J. Cell Sci.*, 118:2601-2611, 2005.

PACHECO, P., BOZZA, F.A., GOMES, R.N., BOZZA, M., WELLER, P.F., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., BOZZA, P.T. **Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism.** *J. Immunol.*, 169:6498-6506, 2002.

PACHECO, P., VIEIRA-DE-ABREU, A., GOMES, R.N., BARBOSA-LIMA, G., WERMELINGER, L.B., MAYA-MONTEIRO, C., SILVA, A.R., BOZZA, M.T., CASTRO-FARIA-NETO, H., BANDEIRA-MELO, C., BOZZA, P.T. **Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response.** *J. Immunol.*, 179:8500-8508, 2007.

PAGANO, M., TAM, S.W., THEODORAS, A.M., BEER-ROMANO, P., DAL SAL, G., CHAU, V., YEW, P.R., DRAETTA, G.F., ROLFE, M. **Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulation abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27.** *Science*, 269:682-685, 1995.

PALMERO, I., MCCONNELL, B., PARRY, D., BROOKES, S., HARA, E., BATES, S., JAT, P., PETERS, G. **Accumulation of p16INK4a in mouse fibroblasts as a function of replicative senescence and not of retinoblastoma gene status.** *Oncogene*, 15:495-503, 1997.

PARDEE, A.B. **A restriction point for control of normal animal cell proliferation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:1286-1290, 1974.

PAUL, A., CHAN, L., BICKEL, P.E. **The PAT Family of Lipid Droplet Proteins in Heart and Vascular Cells.** *Curr Hypertens Rep.*, 10: 461–466, 2008.

PETER, M., NAKAGAWA, J., DOREE, M., LABBE, J.C., NIGG, E.A. **In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase.** *Cell*, 61:591-602, 1990.

PETERS, J.M. **The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy.** *Nat. Re. Mol. Cell Biol.*, 7:644-656, 2006.

- PHELPS, D.E., HSIAO, K.M., LI, Y., HU, N., FRANKLIN, D.S., WESTPHAL, E., LEE, E.Y., XIONG, Y. **Coupled transcriptional and translational control of cyclin-dependent kinase inhibitor p18INK4c expression during myogenesis.** *Mol. Cell. Biol.*, 18:2334-2343, 1998.
- PLANAS-SILVA, M.D., WEINBERG, R.A. **The restriction point and control of cell proliferation.** *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9:768-772, 1997.
- PLOEN, D., HAFIRASSOU, M.L., HIMMELSBACH, K., SAUTER, D., BINIOSSEK, M.L., WEISS, T.S., BAUMERT, T.F., SCHUSTER, C., HILDT, E. **TIP47 plays a crucial role in the life cycle of hepatitis C virus.** *J. Hepatol.*, 58:1081-1088, 2013.
- POL, A., LUETTERFORST, R., LINDSAY, M., HEINO, S., IKONEN, E., PARTON, R.G. **A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance.** *J. Cell. Biol.*, 152:1057-1070, 2001.
- POL, A., MARTIN, S., FERNANDEZ, M.A., FERGUSON, C., CAROZZI, A., LUETTERFORST, R., ENRICH, C., PARTON, R.G. **Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant.** *Mol. Biol. Cell*, 15:99-110, 2004.
- POLYAK, K., KATO, J.Y., SOLOMON, M.J., SHERR, C.J., MASSAGUÉ, J., ROBERTS, J.M., KOFF, A. **p27^{Kip1}, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor- β and contact inhibition to cell cycle arrest.** *Genes Dev.*, 8:9-22, 1994a.
- POLYAK, K., LEE, M.H., ERDJUMENT-BROMAGE, H., KOFF, A., ROBERTS, J.M., TEMPEST, P., MASSAGUÉ, J. **Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals.** *Cell*, 78:59-66, 1994b.
- PRASANTH, S.G., MENDEZ, J., PRASANTH, K.V., STILLMAN, B. **Dynamics of pre-replication complex proteins during the cell division cycle.** *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 359:7-16, 2004.
- PRZEWLOKA, M.R., GLOVER, D.M. **The kinetochore and the centromere: a working long distance relationship.** *Annu. Rev. Genet.*, 43:439-465, 2009.
- PURI, V., KONDA, S., RANJIT, S., AOUADI, M., CHAWLA, A., CHOUINARD, M., CHAKLADAR, A., CZECH, M.P. **Fat-specific protein 27, a novel lipid droplet proteins that enhances triglyceride storage.** *J. Biol. Chem.*, 282:34213-34218, 2007.
- QIN, X.Q., LIVINGSTON, D.M., EWEN, M., SELLERS, W.R., ARANY, Z., KAELIN JR., W.G. **The transcription factor E2F-1 is a downstream target of RB action.** *Mol. Cell. Biol.*, 15:742-755, 1995.
- QUARONI, A., WANDS, J., TRELSTAD, R.L., ISSELBACHER, K.J. **Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria.** *J. Cell. Biol.*, 80:248-265, 1979.
- RAE, F.K., STEPHENSON, S.A., NICOL, D.L., CLEMENTS, J.A. **Novel association of a diverse**

range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. *Int. J. Cancer*, 88:726-732, 2000

RANE, S.G., DUBUS, P., METTUS, R.V., GALBREATH, E.J., BODEN, G., REDDY, P., BARBACID, M. **Loss of Cdk4 expression causes insulin-deficient diabetes and Cdk4 activation results in β -islet cell hyperplasia.** *Nature Gen.*, 22:44-52, 1999.

RAO, S.S., CHU, C., KOHTZ, D.S. **Ectopic expression of cyclin D1 prevents activation of gene transcription by miogenic basic helix-loop-helix regulators.** *Mol. Cell. Biol.*, 14:5259-5267, 1994.

REYNISDÓTTIR, I., POLYAK, K., IAVARONE, A., MASSAGUÉ, J. **Kip/Cip and Ink4 cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF- β .** *Genes Dev.*, 9:1831-1845, 1995.

REYNISDÓTTIR, I., MASSAGUÉ, J. **The subcellular locations of p15^{INK4a} ANF P27^{Kip1} coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2.** *Genes Dev.*, 11:492-503, 1997.

RIDLEY, D.S., RIDLEY, M.J. **Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification.** *Pathology*, 19:186-192, 1987.

RIED, T., HESELMAYER-HADDAD, K., BLEGEN, H., SCHROCK, E., AUER, G. **Genomic changes defining the genesis, progression, and malignancy potential in solid human tumors: a phenotype/genotype correlation.** *Genes Chromosomes Cancer*, 25:195-204, 1999.

ROBBS, B.K., CRUZ, A.L.S., WERNECK, M.B.F., MOGNOL, G.P., VIOLA, J.P. **Dual role for NFAT transcription factor genes as oncogenes and tumor suppressors.** *Mol. Cell. Biol.*, 28:7168-7181, 2008.

ROBENEK, M.J., SEVERS, N.J., SCHLATTMANN, K., PLENZ, G., ZIMMER, K.P., TROYER, D., ROBENEK, H. **Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis.** *FASEB J.*, 18:866-868, 2004.

ROBENEK, H., LORKOWSKI, S., SCHNOOR, M., TROYER, D. **Spatian integration of TIP47 and adipophilin in macrophage lipid bodies.** *J. Biol. Chem.*, 280:5789-5794, 2005.

ROBENEK, H., HOFNAGEL, O., BUERS, I., ROBENEK, M.J., TROYER, D., SEVERS, N.J. **Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are the sites of lipid droplet biogenesis.** *J. Cell Sci.*, 119:4215-4224, 2006.

ROSENTHAL, E.T., HUNT, T., RUDERMAN, J.V. **Selective translation of mRNA controls: the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima*.** *Cell*, 20:487-494, 1980.

RUAS, M., PETERS, G. **The p16^{INK4a}/CDKN2A tumor suppressor and its relatives.** *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer*, 1378:F115-F177, 1998.

RUSSELL, P., NURSE, P. **cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast.**

Cell, 45:145-153, 1986a.

RUSSELL, P., NURSE, P. **Schizosaccharomyces pombe and Saccharomyces cerevisiae: a look at yeasts divided.** Cell, 45:781-782, 1986b.

RUSSELL TD, PALMER CA, ORLICKY DJ, BALES ES, CHANG BH, CHAN L, MCMANAMAN JL. **Mammary glands of adipophilin-null mice produce an amino-terminally truncated form of adipophilin that mediates milk lipid droplet formation and secretion.** J Lipid Res., 49:206-216, 2008.

SA, G., MURUGESAN, G., JAYE, M., IVASHCHENKO, Y., FOX, P.L. **Activation of cytosolic phospholipase A₂ by basic fibroblast growth factor via a p42 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells.** J. Biol. Chem., 270:2360-2366, 1995

SAARIKOSKI, S.T., RIVERA, S.P., HANKINSON, O. **Mitogen-inducible gene 6 (MIG-6), adipophilin and tuftelin are inducible by hypoxia.** FEBS Lett., 530:186-190, 2002.

SAITO, K., WILLIAMS, S., BULANKINA, A., HONING, S., MUSTELIN, T. **Association of protein-tyrosine phosphatase MEG2 via its Sec14p homology domain with vesicle-trafficking proteins.** J. Biol. Chem., 282:15170-15178, 2007.

SALAÜM, P., RANNOU, Y., PRIGENT, C. **Cdk1, Plks, Auroras and Neks: the mitotic bodyguards.** Adv. Exp. Med. Biol., 617:41-56, 2008.

SAMSA, M.M., MONDOTTE, J.A., IGLESIAS, N.G., ASSUNÇÃO-MIRANDA, I., BARBOSA-LIMA, G., DA POIAN, A.T., BOZZA, P.T., GAMARNIK, A.V. **Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation.** PLoS Pathog., 5:e1000632, 2009.

SANDS, A.T., SURAOOKAR, M.B., SANCHEZ, A., MARTH, J.E., DONEHOWER, L.A., BRADLEY, A. **p53 deficiency does not affect the accumulation of point mutations in a transgene target.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8517-8521, 1995.

SANTAMARIA, D., BARRIÈRE, C., CERQUEIRA, A., HUNT, S., TARDY, C., NEWTON, K., CÁRCERES, J.F., DUBUS, P., MALUMBRES, M., BARBACID, M. **Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle.** Nature, 448:811-815, 2007.

SANTOS, C.R., SCHULZE, A. **Lipid metabolism in cancer.** FEBS J 279:2610-2623, 2012.

SATO, S., FUKASAWA, M., YAMAKAWA, Y., NATSUME, T., SUZUKI, T., SHOJI, I., AIZAKI, H., MIYAMURA, T., NISHIJIMA, M. **Proteomic profiling of lipid droplet proteins in hepatoma cell lines expressing hepatitis C virus core protein.** J. Biochem., 139:921-930, 2006.

SAVILLE, M.K., WATSON, R.J. **The cell-cycle regulated transcription factor B-Myb is phosphorylated by cyclin A/Cdk2 at sites that enhance its transactivation properties.** Oncogene, 17:2679-2689, 1998.

- SAWYERS, C.L. **Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer.** *Genes Dev.*, 17:2998-3010, 2003.
- SCARFO LM, WELLER PF, FARBER HW. **Induction of endothelial cell cytoplasmic lipid bodies during hypoxia.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280:H294-301, 2001
- SCHADINGER, S.E., BUCHER, N.L., SCHREIBER, B.M., FARMER, S.R. **PPAR γ 2 regulates lipogenesis and lipid accumulation in steatotic hepatocytes.** *Am. J. Physiol.: Endocrinol. Metab.*, 288:E1195-E1205, 2005.
- SCHMUTH, M., HAQQ, C.M., CAIRNS, W.J., HOLDER, J.C., DORSAM, S., CHANG, S., LAU, P., FOWLER, A.J., CHUANG, G., MOSER, A.H., BROWN, B.E., MAO-QUIANG, M., UCHIDA, Y., SCHOONJANS, K., AUWERX, J., CHAMBON, P., WILLSON, T.M., ELIAS, P.M., FEINGOLD, K.R. **Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes.** *Jl. Invest. Dermatol.*, 122:971-983, 2004.
- SCHORL, C., SEDIVY, J.M. **Analysis of cell cycle phases and progression in cultured mammalian cells.** *Methods*, 41:143-150, 2007.
- SCHRADER, M. **Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets.** *J. Histochem. Cytochem.*, 49:1421-1430, 2001.
- SCHULZE, A., ZERFASS, K., SPITKOVSKY, D., MIDDENDORP, S., BERGES, J., HELIN, K., JANSEN-DURR, P., HENGLEIN, B. **Cell cycle regulation of the cyclin A gene promoter is mediated by a variant E2F site.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11264-11268, 1995.
- SCHWEIGER, M., LASS, A., ZIMMERMANN, R., EICHMANN, T.O., ZECHNER, R. **Neutral lipid storage disease: genetic disorders caused by mutations in adipose triglyceride lipase/PNPLA2 or CGI-58/ABHD5.** *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 297:E289–E296, 2009.
- SCLAFANI, R.A. **Cdc7p-Dbf4p becomes famous in the cell cycle.** *J. Cell Sci.*, 113:2111-2113, 2000.
- SCLAFANI, R.A., HOLZEN, T.M. **Cell cycle regulation of DNA replication.** *Annu. Rev. Genet.*, 41:237-280, 2007.
- SEABRA, M.C., MULES, E.H., HUME, A.N. **Rab GTPases, intracellular traffic and disease.** *Trends Mol. Med.*, 8:23-30, 2002.
- SELLERS, W.R., RODGERS, J.W., KAELIN JR., W.G. **A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:11544-11548, 1995.
- SENGUPTA, S., HARRIS, C.C. **p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6:44-55, 2005.

- SERRANO, M., HANNON, G.J., BEACH, D.A. **A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4.** *Nature*, 366:704-707, 1993.
- SERRANO, M., LIN, A.W., MCCURRACH, M.E., BEACH, D., LOWE, S.W. **Oncogenic *ras* provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}.** *Cell*, 88:593-602, 1997.
- SETH, D., LEO, M.A., MCGUINNESS, P.H., LIEBER, C.S., BRENNAN, Y., WILLIAMS, R., WANG, X.M., MCCAUGHAN, G.W., GORRELL MD., HABER, P.S. **Gene expression profiling of alcoholic liver disease in the baboon (*Papio hamadryas*) and human liver.** *Am. J. Pathol.*, 163:2303-2317, 2003.
- SHEAFF, R., GROUDINE, M., GORDON, M., ROBERTS, J., CLURMAN, B. **Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1.** *Genes Dev.*, 11:1464-1478, 1997.
- SHERR, C.J. **Mammalian G₁ cyclins.** *Cell*, 73:1059-1065, 1993.
- SHERR, C.J. **G₁ phase progression cycling on cue.** *Cell*, 79:551-555, 1994.
- SHERR, C.J. **D-type cyclins.** *Trends Biochem. Sci.*, 20:187-190, 1995.
- SHERR, C.J. **Cancer cell cycles.** *Science*, 274:1672-1677, 1996.
- SHERR, C.J., ROBERTS, J.M. **Positive and negative regulation by CDK inhibitors.** *Genes Dev.*, 12:1501-1512, 1999.
- SHERR, C.J. **The INK4a/ARF network in tumour suppression.** *Nat. Rev. mol. Cell Biol.*, 2:731-737, 2001.
- SICINSKI, P., DONAHER, J.L., PARKER, S.B., LI, T., FAZELI, A., GARDNER, H., HASLAM, S.Z., BRONSON, R.T., ELLEDGE, S.J., WEINBERG, R.A. **Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast.** *Cell*, 82:621-630, 1995.
- SILVA, A.R., DE ASSIS, E.F., CAIADO, L.F., MARATHE, G.K., BOZZA, M.T., MCINTYRE, T.M., ZIMMERMAN, G.A., PRESCOTT, S.M., BOZZA, P.T., CASTRO-FARIA-NETO, H.C. **Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein.** *J. Immunol.*, 168:4112-4120, 2002.
- SINGH, R., KAUSHIK, S., WANG, Y., XIANG, Y., NOVAK, I., KOMATSU, M., TANAKA, K., CUERVO, A.M., CZAJA, M.J. **Autophagy regulates lipid metabolism.** *Nature*, 458:1131-1135, 2009.
- SKAPEK, S.X., RHEE, J., SPICER, D.B., LASSAR, A.B. **Inhibition of myogenic differentiation in proliferating myoblasts by cyclin-D1-dependent kinase.** *Science*, 267:1022-1024, 1995.
- SÖLLNER, T.H. **Lipid droplets highjack SNAREs.** *Nat. Cell Biol.*, 9:1219-1220. 2007.

- SOOS, T.J., KIYOKAWA, H., YAN, J.S., RUBIN, M.S., GIORDANO, A., DEBLASIO, A., BOTTEGA, S., WONG, B., MENDELSON, J., KOFF, A. **Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle.** *Cell Growth Diff.*, 7:135-146, 1996.
- SOUZA, S.C., DE VARGAS, L.M., YAMAMOTO, M.T., LIEN, P., FRANCIOSA, M.D., MOSS, L.G., GREENBERG, A.S. **Overexpression of perilipin A and B blocks the ability of tumor necrosis factor alpha to increase lipolysis in 3T3-L1 adipocytes.** *J. Biol. Chem.*, 275:28486-28493, 1998.
- SOUZA, S.C., MULIRO, K.V., LISCUM, L., LIEN, P., YAMAMOTO, M.T., SCHAFFER, J.E., DALLAL, G.E., WANG, X., KRAEMER, F.B., OBIN, M., GREENBERG, A.S. **Modulation of hormone-sensitive lipase and protein kinase A-mediated lipolysis by perilipin A in an adenoviral reconstituted system.** *J. Biol. Chem.*, 277:8267-8272, 2002.
- SREBRNIK, A., BRENNER, S., ILIE, B., MESSES, G. **Dorfman-Chanarin syndrome: morphologic studies and presentation of new cases.** *Am. J. Dermatopathol.*, 20:79-85, 1998.
- STEIGEMANN, P., GERLICH, D.W. **Cytokinetic abscission: cellular dynamics at the midbody.** *Trends Cell Biol.*, 19:606-616, 2009.
- STEIN, G.S., BORUM, T.W. **The synthesis of acidic chromosomal proteins during the cell cycle of HeLa cells.** *J. Cell Biol.*, 52:292-296, 1972.
- STILLMAN, B. **Origin recognition and the chromosome cycle.** *FEBS Lett.*, 579:877-884, 2005.
- STRAUB, B.K., HERPEL, E., SINGER, S., ZIMBELMANN, R., BREUHANN, K., MACHER-GOEPFINGER, S., WARTH, A., LEHMANN-KOCH, J., LONGERICH, T., HEID, H., SCHIRMACHER, P. **Lipid droplet-associated PAT-proteins show frequent and differential expression in neoplastic steatogenesis.** *Mod Pathol.*, 23:480-492, 2010.
- SUBRAMANIAN, V., ROTHENBERG, A., GOMEZ, C., COHEN, A.W., GARCIA, A., BHATTACHARYYA, S., SHAPIRO, L., DOLION, G., WANG, R., LISANTI, M.P., BRASAEMLE, D.L. **Perilipin A mediates the reversible binding of CGI-58 to lipid droplets in 3T3-L1 adipocytes.** *J. Biol. Chem.*, 279:42062-42071, 2004.
- SWINNEN, J.V., BRUSSELMANS, K., VERHOEVEN, G. **Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets.** *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 9:358-365, (2006).
- SZTALRYD, C., XU, G., DORWARD, H., TANSEY, J.T., CONTRERAS, J.A., KIMMEL, A.R., LONDOS, C. **Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation.** *J. Cell Biol.*, 161:1093-1103, 2003.
- SZTALRYD, C., BELL, M., LU, X., MERTZ, P., HICKENBOTTOM, S., CHANG, B.H.-J., CHAN, L., KIMMEL, A.R., LONDOS, C. **Functional compensation for adipose differentiation-related protein (ADFP) by Tip47 in an ADFP null embryonic cell line.** *J. Bio. Chem.*, 281:34341-34348, 2006
- SZYMANSKI, K.M., BINNS, D., BARTZ, R., GRISHIN, N.V., LI, W.-P., AGARWAL, A.K., GARG, A.,

- ANDERSON, R.G.W., GOODMAN, J.M. **The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**:20890-20895., 2007.
- TAKEDA, D.Y., DUTTA, A. **DNA replication and progression through S phase.** *Oncogene*, **24**:2827-2843, 2005.
- TAMARU, T., TRIGUN, S.K., OKADA, M., NAKAGAWA, H. **Identification of cells expressing a D type G1 cyclin in matured brain: implication for its role in neuronal function.** *Neurosci. Lett.*, **153**:169-172, 1993.
- TAMARU, T., OKADA, M., NAKAGAWA, H. **Differential expression of D type cyclins during neuronal maturation.** *Neurosci. Lett.*, **168**:229-232, 1994.
- TANSEY, J.T., SZTALRYD, C., GRUIA-GRAY, J., ROUSH, D.L., ZEE, J.V., GAVRILOVA, O., REITMAN, M.L., DENG, C.X., LI, C., KIMMEL, A.R., LONDOS, C. **Perilipin ablation results in a lean mouse with aberrant adipocyte lipolysis, enhanced leptin production, and resistance to diet-induced obesity.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**:6494-9499, 2001.
- TANSEY, J.T., HUML, A.M., VOGT, R., DAVIS, K.E., JONES, J.M., FRASER, K.A., BRASAEMLE, D.L., KIMMEL, A.R., LONDOS, C. **Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis on triacylglycerols.** *J. Biol. Chem.*, **278**:8401-8406, 2003.
- TARGETT-ADAMS, P., CHAMBERS, D., GLEDHILL, S., HOPE, R.G., COY, J.F., GIROD, A., MCLAUHLAN, J. **Live cell analysis and targeting of the lipid droplet-binding adipocyte differentiation-related protein.** *J. Biol. Chem.*, **278**:15998-16007, 2003.
- TARGETT-ADAMS, P., MCELWEE, M.J., EHRENBORG, E., GUSTAFSSON, M.C., PALMER, C.N., MCLAUHLAN, J. **A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein.** *Biochim. Biophys. Acta*, **1728**:95-104, 2005.
- TARGETT-ADAMS, P., BOULANT, S., MCLAUHLAN, J. **Visualization of double-stranded RNA in cells supporting hepatitis C virus RNA replication.** *J. Virol.*, **82**:2182-2195. 2008
- TASKINEN, M.R. **Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice.** *Diabetologia*, **46**:733-749, 2003.
- TAUCHI-SATO, K., OZEKI, S., HOUJOU, T., TAGUCHI, R., FUJIMOTO, T. **The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition.** *J. Biol. Chem.*, **15**:44507-44512, 2002.
- TEIXEIRA, L.K., FONSECA, B.P., VIEIRA-DE-ABREU, A., BARBOZA, B.A., ROBBS, B.K., BOZZA, P.T., VIOLA, J.P. **IFN-gamma production by CD8+ T cells depends on NFAT1 transcription factor and regulates Th differentiation.** *J Immunol.* **175**:5931-9, 2005

- TONTONOZ P, NAGY L, ALVAREZ JG, THOMAZY VA, EVANS RM. **PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.** *Cell.* 93(2):241-52, 1998.
- TOYOSHIMA, H., HUNTER, T. **p27, a novel inhibitor of G1 cyclin/cdk protein kinase activity, is related to p21.** *Cell,* 78:67-74, 1994.
- TRIGATTI, B.L., ANDERSON, R.G., GERBER, G.E. **Identification of caveolin-1 as a fatty acid binding protein.** *Biochim. Biophys. Res. Commun.,* 279:46835-46842, 1999.
- TRIGGIANI, M., ORIENTE, A., SEEDS, M.C., BASS, D.A., MARONE, G., CHILTON, F.H. **Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool.** *J. Exp. Med.,* 182:1181-1190, 1995.
- TSAI, T., DAVALATH, S., RANKIN, C., RADICH, J.P., HEAD, D., APPELBAUM, F.R., BOLDT, D.H. **Tumor suppressor gene alteration in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). Analysis of retinoblastoma (Rb) and p53 gene expression in lymphoblasts of patients with de novo, relapsed, or refractory ALL treated in Southwest Oncology Group studies.** *Leukemia,* 10:1901-1910, 1996.
- TSIHLIAS, J., KAPUSTA, L., SLINGERLAND, J. **The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer.** *Annu. Rev. Med.,* 50:401-423, 1999.
- TSUTSUI, T., HESABI, B., MOONS, D.S., PANDOLFI, P.P., HANSEL, K.S., KOFF, A., KIYOKAWA, H. **Targeted disruption of CDK4 delays cell cycle entry with enhanced p27^{kip1} activity.** *Mol. Cell. Biol.,* 19:7011-7019, 1999.
- TURKISH, A., STURLEY, S.L. **Regulation of triglyceride metabolism. 1. Eukaryotic neutral lipid synthesis: many ways to skin ACAT or a DGAT.** *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.,* 292:G953-G957, 2007.
- TYE, B.K. **MCM proteins in DNA replication.** *Annu. Rev. Biochem.,* 68:649-668, 1999.
- UMLAUF, E., CSASZAR, E., MOERTELMAIER, M., SCHUETZ, G.J., PARTON, R.G. **Association of stomatin with lipid bodies.** *J. Biol. Chem.,* 279:23699-23709, 2004.
- UPENDER, M.B., HABERMANN, J.K., MCSHANE, L.M., KORN, E.L., BARRETT, J.C., DIFILIPPANTONIO, M.J., RIED, T. **Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells.** *Cancer Res.,* 64:6941-6949, 2004.
- VAN LEUKEN, R., CLIJSTERS, L., WOLTHUIS, R. **To cell cycle, swing the APC/C.** *Biochim. Biophys. Acta,* 1786:49-59, 2008.
- VAN MANEN, H.J., KRAAN, Y.M., ROOS, D., OTTO, C. **Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 102:10159-10164, 2005.

VARELA, G.M., ANTWI, D.A., DHIR, R., YIN, X., SINGHAL, N.S., GRAHAM, M.J., CROOKE, R.M., AHIMA, R.S. **Inhibition of ADRP prevents diet-induced insulin resistance.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295:G621-G628, 2011.

VENTURA, A., KIRSCH, D.G., MCLAUGHLIN, M.E., TUVESON, D.A., GRIMM, J., LINTAULT, L., NEWMAN, J., RECZEK, E.E., WEISSLEDER, R., JACKS, T. **Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo.** *Nature*, 445:661-665, 2007.

VIEIRA-DE-ABREU, A., ASSIS, E.F., GOMES, G.S., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., WELLER, P.F., BANDEIRA-MELO, C., BOZZA, P.T. **Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C₄ synthesis within eosinophils.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 33:254-261, 2005.

VIVANCO, I., SAWYERS, C.L. **The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer.** *Nat. Rev. Cancer*, 2:489-501, 2002.

VLACH, J., HENNECKE, S., AMATI, B. **Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{Kip1}.** *EMBO J.*, 16:5334-5344, 1997.

VOGELSTEIN, B., LANE, D., LEVINE, A.J. **Surfing the p53 network.** *Nature*, 408:307-310, 2000.

VOGT, D.A., CAMUS, G., HERKER, E., WEBSTER, B.R., TSOU, C.L., GREENE, W.C., YEN, T.S., OTT, M. **Lipid droplet-binding protein TIP47 regulates hepatitis C Virus RNA replication through interaction with the viral NS5A protein.** *PLoS Pathog.*, 9:e1003302, 2013

VOSPER, H., PATEL, L., GRAHAM, T.L., KHOUDOLI, G.A., HILL, A., MACPHEE, C.H., PINTO, I., SMITH, S.A., SUCKLING, K.E., WOLF, C.R., PALMER, C.N. **The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages.** *J. Biol. Chem.*, 276:44258-44265, 2001.

VOUSDEN, K.H., LANE, D.P. **p53 in health and disease.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8:275-283, 2007.

WALCZAK, C.E., CAI, S., KHODJAKOV, A. **Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11:91-102, 2010.

WALKER, D.H., MALLER, J.L. **Role for cyclin A in the dependence of mitosis on completion of DNA replication.** *Nature*, 354:314-317, 1991.

WÄLTERMANN, M., STEINBÜCHEL, A. **Neutral lipid bodies in prokaryotes: recent insights into structure, formation, and relationship to eukaryotic lipid depots.** *J. Bacteriol.*, 187:3607-3619, 2005

WAN, H.-C., MELO, R.C.N., JIN, Z., DVORAK, A.M., WELLER, P.F. **Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies.** *FASEB J.*, 21:167-178, 2007.

WANG, X., REAPE, T.J., LI, X., RAYNER, K., WEBB, C.L., BURNAND, K.G., LYSKO, P.G. **Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density**

lipoprotein and in atherosclerotic lesions. FEBS Lett., 462:145-150, 1999.

WANG, S.M., HWANG, R.D., GREENBERG, A.S., YEO, H.L. **Temporal and spatial assembly of lipid droplet-associated proteins in 3T3-L1 preadipocytes.** Histochem. Cell Biol., 120:285-292, 2003.

WATANABE, N., ARAI, H., NISHIHARA, Y., TANIGUCHI, M., WATANABE, N., HUNTER, T., OSADA, H. **M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:4419-4424, 2004.

WEAVER, B.A.A., CLEVELAND, D.W. **Does aneuploidy cause cancer?** Curr. Opin. Cell Biol., 18:658-667, 2006.

WEI, P., TANIGUCHI, S., SAKAI, Y., IMAMURA, M., INOYAMA, T., NAWATA, H., ODA, S., NAKABEPPU, Y., NISHIMURA, J., IKUYAMA, S. **Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) is conjointly regulated by PU.1 and AP-1 in macrophages.** J. Biochem., 138:399-412, 2005.

WEINBERG, R.A. **The biology of cancer.** Garland Science, 2007.

WEINTRAUB, S.J., CHOW, K.N., LUO, R.X., ZHANG, S.H., HE, S., DEAN, D.C. **Mechanism of active transcriptional repression by the retinoblastoma protein.** Nature, 375:812-815, 1995.

WELCH, P.J., WANG, J.Y.J. **A C-terminal protein-binding domain in the retinoblastoma protein regulates nuclear c-Abl tyrosine kinase in the cell cycle.** Cell, 75:779-790, 1993.

WELLER, P.F., DVORAK, A.M. **Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils.** Blood, 65:1269-1274, 1985.

WELLER, P.F., ACKERMAN, S.J., NICHOLSON-WELLER, A., DVORAK, A.M. **Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes.** Am. J. Pathol., 135:947-959, 1989.

WELLER, P.F., RYEOM, S.W., PICARD, S.T., ACKERMAN, S.J., DVORAK, A.M. **Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C.** J. Cell. Biol., 113:137-146, 1991.

WELTE, M.A. **Proteins under new management: lipid droplet deliver.** Trends Cell Biol., 17:363-369, 2007.

WILFLING, F., WANG, H., HAAS, J.T., KRAHMER, N., GOULD, T.J., UCHIDA, A., CHENG, J.X., GRAHAM, M., CHRISTIANO, R., FRÖHLICH, F., LIU, X., BUHMAN, K.K., COLEMAN, R.A., BEWERSDORF, J., FARESE, R.V.JR., WALTHER, T.C. **Triacylglycerol synthesis enzymes mediate lipid droplet growth by relocalizing from the ER to lipid droplets.** Dev. Cell, 24:384-399, 2013.

WITTMANN, T., HYMAN, A., DESAI, A. **The spindle: a dynamic assembly of microtubules and**

motors. Nat. Cell Biol., 3:E28-E34, 2001.

WOLFEL, T., HAUER, M., SCHNEIDER, J., SERRANO, M., WOLFEL, C., KLEHMANN, H.E., DE PLAEN, E., HANKELN, T., MEYERZUM-BUSCHENFELDE, K.H., BEACH, D. **A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma.** Science, 269:1281-1284, 1995.

WOLINS, N.E., SKINNER, J.R., SCHOENFISH, M.J., TZEKOV, A., BENSCH, K.G., BICKEL, P.E. **Adipocyte protein S3-12 coats nascent lipid droplets.** J. Biol. Chem., 278:37713-37721, 2003.

WOLINS, N.E., QUAYNOR, B.K., SKINNER, J.R., SCHOENFISH, M.J., TZEKOV, A., BICKEL, P.E. **S3-12, adipophilin, and TIP47 package lipid in adipocytes.** J. Biol. Chem., 280:19146-19155, 2005.

WOLINS, N.E., BRASAEMLE, D.L., BICKEL, P.E. **A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins.** FEBS Lett., 580:5484-5491, 2006.

WON, K.A., REED, S.I. **Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E.** EMBO J., 15:4182-4193, 1996.

WU, C.C., HOWELL, K.E., NEVILLE, M.C., YATES, III, J.R., MCMANAMAN, J.L. **Proteomics reveal a link between the endoplasmic reticulum and lipid secretory mechanisms in mammary epithelial cells.** Electrophoresis, 21:3470-3482, 2000.

WU, R., TERRY, A.V., SINGH, P.B., GILBERT, D.M. **Differential subnuclear localization and replication timing of histone H3 lysine 9 methylation states.** Mol. Biol. Cell., 16:2872-2881, 2005.

XIE, Y., KANG, X., ACKERMAN, W.E.T., BELURY, M.A., KOSTER, C., ROVIN, B.H., LANDON, M.B., KNISS, D.A. **Differentiation-dependent regulation of the cyclooxygenase cascade during adipogenesis suggests a complex role for prostaglandins.** Diabetes Obes. Metab., 8:83-93, 2006.

XIONG, Y., MENNINGER, J., BEACH, D., WARD, D.C. **Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins.** Genomics, 13:575-584, 1992.

XIONG, Y., HANNON, G.J., ZHANG, H., CASSO, D., KOBAYASHI, R., BEACH, D. **p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases.** Nature, 366:701-704, 1993.

XU, G., SZTALRYD, C., LU, X., TANSEY, J.T., GAN, J., DORWARD, H., KIMMEL, A.R., LONDOS, C. **Post-translational regulation of adipose differentiation-related protein by the ubiquitin/proteasome pathway.** J. Biol. Chem., 280:42841-42847, 2005.

XUE, W., ZENDER, L., MIETHING, C., DICKENS, R.A., HERNANDO, E., KRIZHANOVSKY, V., CORDON-CARDO, C., LOWE, S.W. **Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas.** Nature, 445:656-660, 2007.

YAMAGUCHI, T., OMATSU, N., MATSUSHITA, S., OSIMI, T. CGI-58 interacts with perilipin and is

localized to lipid droplets. **Possible involvement of CGI-58 mislocalization in Chanarin-Dorfman syndrome.** J. Biol. Chem., 279:30490-30497, 2004.

YAMAGUCHI, T., OMATSU, N., MORIMOTO, E., NAKASHIMA, H., UENO, K., TANAKA, T., SATOUCHI, K., HIROSE, F., OSUMI, T. **CGI-58 facilitates lipolysis on lipid droplets but is not involved in the vesiculation of lipid droplets caused by hormonal stimulation.** J. Lipid Res., 48:1078-1089, 2007.

YAMAGUCHI, T., MATSUSHITA, S., MOTOJIMA, K., HIROSE, F., OSUMI, T. **MLDP, a novel PAT family protein localized to lipid droplets and enriched in the heart, is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha.** J. Biol. Chem., 281:14232-14240, 2006.

YAMAGUCHI, T., OSUMI, T. **Chanarin-Dorfman syndrome: deficiency in CGI-58, a lipid droplet-bound coactivator of lipase.** Biochim. Biophys. Acta, 1791:519-523, 2009.

YAMAMOTO, H., MONDEN, T., MIYOSHI, H., IZAWA, H., IKEDA, K., TSUJIE, M., OHNISHI, T., SEKIMOTO, M., TOMITA, N., MONDEN, M. **Cdk2/cdc2 expression in colon carcinogenesis and effects of cdk2/cdc2 inhibitor in colon cancer cells.** Int. J. Oncol., 13:233-239, 1998.

YANG, L., LI, P., FU, S., CALAY, E.S., HOTAMISLIGIL, G.S. **Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance.** Cell Metab. 9;11:467-478, 2010

YAO, M., TABUCH, H. I., NAGASHIMA, Y., BABA, M., NAKAIGAWA N., ISHIGURO, H., HAMADA, K., INAYAMA, Y., KISHIDA, T., HATTORI, K., YAMADA-OKABE, H., KUBOTA, Y. **Gene expression analysis of renal carcinoma: adipose differentiation-related protein as a potential diagnostic and prognostic biomarker for clear-cell renal carcinoma.** J. Pathol., 205:377–387, 2005.

YAO, M., HUANG, Y., SHIOI, K., HATTORI, K., MURAKAMI, T., NAKAIGAWA, N., KISHIDA, T., NAGASHIMA, Y., KUBOTA, Y. **Expression of adipose differentiation-related protein: a predictor of cancer-specific survival in clear cell renal carcinoma.** Clin. Cancer Res., 13: 152-160, 2007.

YU, W., BOZZA, P.T., TZIZIK, D.M., GRAY, J.P., CASSARA, J., DVORAK, A.M., WELLER, P.F. **Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies.** Am. J. Pathol., 152:759-769, 1998.

YU, W., CASSARA, J., WELLER, P.T. **Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells.** Blood, 95:1078-1085, 2000.

ZEHMER, J.K., HUANG, Y., PENG, G., PU, J., ANDERSON, R.G., LIU, P. **A role for lipid droplets in inter-membrane lipid traffic.** Proteomics, 9:914-921, 2009.

ZHANG, H.S., GAVIN, M., DAHIYA, A., POSTIGO, A.A., MA, D., LUO, R.X., HARBOUR, J.W., DEAN, D. **Exit from G₁ and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF.** Cell, 101:79-89, 2000.

ZHU, L., VAN DEN HEUVEL, S., HELIN, K., FATTAEY, A., EWEN, M., LIVINGSTON, D., DYSON, N., HARLOW, E. **Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein.** Genes Dev., 7:1111-1125, 1993.

ZIEBOLD, U., BARTSCH, O., MARAIS, R., FERRARI, S., KLEMPNAUER, K.H. **Phosphorylation and activation of B-Myb by cyclin A-Cdk2.** Curr. Biol., 7:253-260, 1997.

ZINDY, F., QUELLE, D.E., ROUSSEL, M.F., SHERR, C.J. **Expression of the p16^{INK4a} tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging.** Oncogene, 15:203-211, 1997a.

ZINDY, F., SOARES, H., HERZOG, K.H., MORGAN, J., SHERR, C.J., ROUSSEL, M.F. **Expression of INK4 inhibitors in cyclin D-dependent kinases during mouse brain development.** Cell Growth Differ., 8:1139-1150, 1997b.

ZWEYTICK, D., ATHENSTAEDT, K., DAUM, G. **Intracellular lipid particles of eukaryotic cells.** Biochim. Biophys. Acta, 1469:101-120, 2000.

8. ANEXOS

8.1. Capítulos de livro publicados

8.1.1. VIOLA, J.P., CRUZ, A.L.S., WERNECK, M.B.F., BOZZA, P.T. Formation and Function of Lipid Droplets in Inflammation and Cancer. Em: R. Resende; H. Ulrich. Trends in Stem Cell Proliferation and Cancer Research. 1ed.: Springer Netherlands, 2013, p.139-165. 2;18;23;55;59;60;61;63;66-68;71-73;76;79;81