

Tamara Dal Mora

**ESTABELECIMENTO DE ESFEROIDES MULTICELULARES
TIPO TECIDO ADIPOSEO: ASPECTOS MORFO-FUNCIONAIS
DA ADIPOGÊNESE**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Farmácia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Farmácia.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Fabíola Branco
Filippin Monteiro

Florianópolis
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dal-Mora, Tamara

Estabelecimento de esferoides multicelulares
tipo tecido adiposo: : aspectos morfo-funcionais da
adipogênese / Tamara Dal-Mora ; orientador, Fabíola
Branco Filippin-Monteiro, 2018.

106 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Obesidade. 3. Tecido adiposo. 4.
Cultura celular 3D. 5. Co-cultura celular 3D. I.
Filippin-Monteiro, Fabíola Branco. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmácia. III. Título.

Tamara Dal Mora

**ESTABELECIMENTO DE ESFEROIDES MULTICELULARES
TIPO TECIDO ADIPOSEO: ASPECTOS MORFO-FUNCIONAIS
DA ADIPOGÊNESE**

Dissertação julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 01 de março de 2018.

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do curso de Pós-Graduação

Banca Examinadora

Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Rabello de Moraes
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a Deus, à minha mãe Beloni e, à minha eterna amiga Simone Cristina Dutra (*In memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar, iluminar e por nunca ter me deixado desistir deste sonho.

Aos meus pais e irmãos, por todo o apoio, carinho, amor e por serem meu porto seguro, minha razão para continuar seguindo em frente.

À minha amiga Taíse Dobner, por me incentivar na busca deste sonho, por toda ajuda carinho e amizade.

À minha eterna amiga Simone Dutra (*In memoriam*), meu exemplo de força e coragem! A ti minha eterna gratidão. Eu amo você!

À minha amiga Daiane Anzilaggo, pela ajuda antes da prova e, depois, por morar comigo, tornando os meus dias mais felizes.

Aos meus amigos de infância, minha “Patotinha”, pela amizade verdadeira e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Amo vocês!

À minha amiga Bárbara de Lima, por ter sido minha companhia em muitos finais de semana.

Ao meu namorado Dian Borges, pela parceria, por ter respeitado minha ausência e por me incentivar a seguir em frente. Obrigada pela paciência, ajuda e por todo o teu amor e carinho. Eu amo você!

Ao professor Sharbel W. Maluf, por ter aberto as portas da UFSC para mim.

À professora Tânia Beatriz Creczynski Pasa, por ter cedido espaço em seu laboratório para que eu pudesse realizar este trabalho.

À minha orientadora Fabíola Branco Filippin Monteiro, por ter me recebido tão bem e acreditado em mim mesmo não me conhecendo. Obrigada pela confiança, ajuda, por estar sempre presente e pelas constantes demonstrações de sabedoria e amor pela profissão.

Aos grupos LAITA e GEIMM, vocês foram sensacionais! Obrigada pela troca de experiências e por compartilharem comigo momentos de angústia e felicidade. Em especial, à Najla Saleh e à Michele Rode, por todos os conselhos, paciência e por me fazerem acreditar que sou capaz. Obrigada por toda ajuda e ensinamentos compartilhados.

Aos membros da banca examinadora, agradeço pelas contribuições e disponibilidade em avaliar o meu trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina, em especial, ao Programa de Pós-graduação em Farmácia, pela oportunidade em realizar o mestrado e, a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.
(José de Alencar)

RESUMO

Considerada uma doença multifatorial, a obesidade ocorre devido à interação entre fatores genéticos, comportamentais, fisiológicos, ambientais, sociais e econômicos. O aumento dos casos de obesidade está relacionado com o aumento da prevalência de diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. O envolvimento do tecido adiposo, considerado um órgão endócrino complexo, aumenta a importância de uma melhor compreensão do seu estado metabólico a nível celular. Assim, os modelos tridimensionais (3D) *in vitro* poderiam representar uma nova alternativa aos clássicos modelos de cultura *in vitro* e fornecer novos conhecimentos sobre o estudo da obesidade e doenças relacionadas à obesidade. Sendo assim, desenvolveu-se um modelo *in vitro* 3D utilizando três linhagens celulares que são constituintes do tecido adiposo nativo (pré-adipócitos, fibroblastos e macrófagos). Foram obtidos modelos de mono e co-culturas em placa de 96 poços revestida com gel de agarose 2% em uma densidade de $1,2 \times 10^4$ células/poço. Após 4 dias de cultura em condições padrões, os esferoides foram expostos ao meio de diferenciação adipogênica (MDI) ou mantidos em meio controle. O tempo total de cultura 3D foi de 11 dias e, ao final deste período, os esferoides foram corados com *Nile red*, um marcador fluorescente seletivo para gotículas lipídicas intracelulares. De acordo com os resultados, obteve-se esferoides homogêneos em diâmetro e forma nos modelos de mono e co-cultura. Os esferoides formados em meio controle apresentaram menor diâmetro do que os expostos ao MDI, sugerindo que o MDI é um estímulo de crescimento adicional que também refletiu sobre viabilidade celular. Além disso, as análises de citometria de fluxo e microscopia confocal mostraram que os esferoides formados em meio controle apresentaram diferenciação adipogênica sem estímulos hormonais, demonstrando que as células cultivadas no modelo 3D exerceram auto-diferenciação. Adicionalmente, os modelos de co-cultura analisados produziram e liberaram óxido nítrico, sugerindo que o processo de diferenciação adipogênica ocorrido contribuiu para a formação de um modelo 3D com perfil inflamatório. Em conclusão, foi possível desenvolver um modelo 3D tipo tecido adiposo que pode ser usado para estudar novas vias metabólicas e novos alvos terapêuticos para a terapia da obesidade e doenças relacionadas à obesidade sem o estímulo hormonal clássico usado em sistemas de cultura celular *in vitro* convencional.

Palavras-chave: obesidade, tecido adiposo, cultura celular 3D, co-cultura celular 3D, diferenciação adipogênica.

ABSTRACT

Considered a multifactorial disease, obesity occurs due to the interaction among genetic, behavioral, physiological, environmental, social and economic factors. The increase in obesity cases is related to the increase in the prevalence of type 2 diabetes mellitus, cardiovascular diseases, and some cancers. The involvement of the adipose tissue, considered a complex endocrine organ, raises the importance for a better understanding of its metabolic state at a cellular level. Thus, three-dimensional (3D) *in vitro* models could represent a new alternative to the classic *in vitro* culture models and provide new insights on the study of obesity and obesity-related diseases. Thus, an *in vitro* 3D model was developed using three cell lines that are constituents of the native adipose tissue (pre-adipocyte, fibroblasts and macrophages). Mono and co-cultures were obtained in a 96-well plate coated with 2% agarose gel at a density of 1.2×10^4 cells/well. After 4 days of culture in standard conditions, the spheroids were exposed to the adipogenic differentiation medium (MDI) or maintained in control medium. The total 3D culture time was 11 days, and at the end of this period, the spheroids were stained with *Nile red*, a fluorescent marker selective for intracellular lipid droplets. According to the results, homogeneous spheroids were obtained in diameter and shape in the mono and co-culture models. Spheroids formed in control medium exhibited smaller diameter than MDI-treated spheroids, suggesting that MDI is an additional growth stimulus that also reflected on cell viability. In addition, flow cytometry and confocal microscopy analyzes showed that the spheroids formed in the control medium showed adipogenic differentiation without hormonal stimuli, demonstrating that the cells cultured in the 3D model exerted self-differentiation. Additionally, the analyzed co-culture models produced and released nitric oxide, suggesting that the adipogenic differentiation process that occurred contributed to the formation of a 3D model with an inflammatory profile. In conclusion, it was possible to develop an adipose tissue-like 3D model that can be used to study new metabolic pathways and new therapeutic targets for to the therapy of obesity and obesity-related diseases without the classical hormonal stimuli used in conventional *in vitro* cell culture systems.

Keywords: obesity, adipose tissue, 3D cell culture, 3D cell co-culture, adipogenic differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Evolução da prevalência da obesidade no mundo	27
Figura 2: Constituintes do TA	32
Figura 3: Resposta do TA a hipertrofia dos adipócitos	36
Figura 4: Fatores pró-adipogênicos que regulam a diferenciação de pré-adipócitos	39
Figura 5: Desenho experimental.....	45
Figura 6: Linhagens celulares utilizadas	47
Figura 7: Protocolo de formação dos esferoides	51
Figura 8: Indução da diferenciação adipogênica no modelo 3D	52
Figura 9: Diferenciação adipogênica da linhagem 3T3-L1	58
Figura 10: Formação de mono e heteroesferoides.....	59
Figura 11: Representação gráfica do diâmetro dos modelos esferoides formados em meio controle ou MDI	61
Figura 12: Viabilidade celular dos esferoides no 11º dia de cultivo 3D	66
Figura 13: Análise morfológica dos esferoides por microscopia eletrônica de varredura	68
Figura 14: Perfil de marcação e porcentagem de células diferenciadas/ <i>Nile Red</i> positivas	70
Figura 15: Intensidade média de fluorescência de mono e heteroesferoides mantidos em condição controle ou submetidos ao MDI	72
Figura 16: Análise do tamanho e da granulosidade de pré-adipócitos cultivados em modelo 2D submetidos ou não a diferenciação adipogênica	73
Figura 17: Análise do tamanho e da granulosidade de mono e heteroesferoides mantidos em condição controle ou submetidos ao MDI	74
Figura 18: Visualização da diferenciação adipogênica por microscopia confocal	76
Figura 19: Determinação de proteínas totais	77
Figura 20: Determinação de NO após 11 dias de cultivo 3D	79
Figura 21: <i>Dot plots</i> das células coradas com <i>Nile Red</i> em modelo 2D e 3D.....	105
Figura 22: Curvas analíticas - teor de proteínas totais e NO	106

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Lista de reagentes	46
------------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação internacional da obesidade a partir do IMC	29
Tabela 2: Circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas.....	29
Tabela 3: Diâmetro dos modelos esferoides mantidos em meio controle	62
Tabela 4: Diâmetro dos modelos esferoides submetidos ao MDI.....	62
Tabela 5: Diâmetro dos modelos esferoides mantidos em meio controle em função do tempo	63
Tabela 6: Diâmetro dos modelos esferoides submetidos ao MDI em função do tempo.....	64
Tabela 7: Influência do MDI no crescimento dos modelos esferoides..	65
Tabela 8: Número e viabilidade celular dos esferoides no 11º dia de cultivo 3D.....	66
Tabela 9: Porcentagem média de células diferenciadas/ <i>Nile red</i> positivas	71
Tabela 10: Intensidade média de fluorescência de mono e heteroesferoides.....	72
Tabela 11: Tamanho e granulidade média das células em mono e heteroesferoides.....	75
Tabela 12: Determinação de proteínas totais.....	78
Tabela 13: Determinação de *NO após 11 dias de cultivo 3D	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
3T3-L1	Linhagem celular murina de pré-adipócitos
ANOVA	Análise de variância
CO ₂	Dióxido de carbono
CS	Soro de bezerro
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEX	Dexametasona
DMEM	Dulbecco Modified Eagles's Medium
HEPES	N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico]
IBMX	3-isobutyl-1-Methylxanthine
IL	Interleucina
INS	Insulina
J774	Linhagem celular murina de macrófagos
MEC	Matriz extracelular
MDI	Meio de diferenciação adipogênica
NIH/3T3	Linhagem celular murina de fibroblastos
·NO	<i>Nitric Oxide</i>
NO ₂	Nitrito
NR	<i>Nile red</i>
OR	<i>Oil red</i>
PBS	Tampão fosfato salino
SBF	Soro bovino fetal
TA	Tecido adiposo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE.....	27
2.2 DIAGNÓSTICO.....	28
2.3 TRATAMENTOS PARA A OBESIDADE.....	29
2.4 TECIDO ADIPOSEO.....	30
2.4.1 Embriologia.....	30
2.4.2 Características do Tecido Adiposo.....	31
2.4.3 Funções do Tecido Adiposo.....	33
2.5 FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE.....	34
2.6 DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS.....	36
2.6.1 Modelo de diferenciação de adipócitos <i>in vitro</i>.....	37
2.7 MODELOS <i>IN VITRO</i> DE OBESIDADE UTILIZANDO A LINHAGEM 3T3-L1.....	39
2.8 CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL.....	41
3 OBJETIVOS.....	43
3.1 OBJETIVO GERAL.....	43
4 METODOLOGIA.....	45
4.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	45
4.2 REAGENTES.....	46
4.3 LINHAGENS E CONDIÇÕES DE CULTURA CELULAR.....	46
4.4 CULTURA CELULAR BIDIMENSIONAL (2D).....	48
4.4.1 Diferenciação adipogênica da linhagem 3T3-L1.....	48
4.4.2 Análise dos lipídeos intracelulares em modelo 2D.....	48
4.4.2.1 Coloração com <i>Oil red O</i>	48
4.4.2.2 Coloração com <i>Nile red</i>	49
4.5 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D) TIPO TECIDO ADIPOSEO.....	49
4.5.1 Cultura 3D.....	49
4.5.2 Formação dos modelos esféricos.....	50
4.5.3 Indução da diferenciação adipogênica no modelo de cultura celular 3D.....	51
4.6 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D.....	52
4.6.1 Tamanho dos esféricos.....	52
4.6.2 Quantificação e viabilidade celular.....	53
4.6.3 Morfologia celular.....	53
4.6.4 Diferenciação adipogênica.....	54

4.6.4.1	Quantificação de lipídeos intracelulares no modelo de cultura celular 3D.....	54
4.6.4.2	Visualização da diferenciação adipogênica por microscopia confocal.....	54
4.6.5	Perfil de liberação de ¹⁴NO.....	55
4.6.5.1	Extração de proteínas totais	55
4.6.5.2	Determinação de ¹⁴ NO.....	56
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
5	RESULTADOS	57
5.1	DIFERENCIAÇÃO DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1 UTILIZANDO MODELO 2D.....	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO MODELO 3D TIPO TECIDO ADIPOSEO.....	58
5.2.1	Formação e tamanho dos esferoides	58
5.2.1	Número e viabilidade celular dos esferoides	65
5.2.2	Morfologia celular	67
5.2.3	Diferenciação adipogênica.....	68
5.2.3.1	Quantificação de lipídeo intracelular	68
5.2.3.2	Tamanho e granulosidade	73
5.2.3.3	Diferenciação adipogênica por microscopia confocal.....	75
5.2.4	Perfil de liberação de ¹⁴NO.....	76
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICE A – Análise dos esferoides por citometria de fluxo... 105	
	APÊNDICE B – Curvas de calibração..... 106	

1 INTRODUÇÃO

A obesidade tornou-se um importante problema de saúde pública em todo o mundo. O aumento significativo de novos casos de obesidade está associado ao aumento de doenças metabólicas incluindo, diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, hiperlipidemia, alguns tipos de câncer, dentre outras comorbidades (TANTI et al., 2013). Estima-se que a obesidade e as doenças relacionadas à obesidade sejam causa de morte de aproximadamente 2,8 milhões de pessoas por ano (WHO, 2012). No Brasil, os últimos dados registrados revelaram que cerca de 110 milhões de adultos apresentam excesso de peso e 38 milhões são obesos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016).

Além do armazenamento de energia na forma de gordura, sabe-se que o tecido adiposo secreta um grande número de adipocinas que atuam através de ações autócrinas, parácrinas ou endócrinas na regulação da homeostasia energética sistêmica, proporcionando proteção a diversos tecidos do organismo contra a lipotoxicidade e disfunções metabólicas (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). Os adipócitos são os principais constituintes do tecido adiposo branco e são importantes tanto para o armazenamento de energia quanto para a atividade endócrina (OUCHI et al., 2011). O processo de desenvolvimento da obesidade pode resultar em uma remodelação rápida do órgão através da hipertrofia e hiperplasia de adipócitos, promovendo a infiltração de macrófagos no tecido adiposo e o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias que resultam no desenvolvimento e manutenção de um processo inflamatório crônico de baixa intensidade que pode comprometer a homeostasia metabólica de diferentes órgãos.

Desta forma, os mecanismos moleculares e celulares envolvidos durante o desenvolvimento da obesidade têm sido extensivamente estudados em modelos *in vitro* tridimensionais (3D) (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; TURNER et al., 2014, 2015). Os sistemas 3D, principalmente os sistemas de co-cultura 3D, refletem a organização natural das células encontradas em tecidos vivos e podem fornecer respostas fisiologicamente mais relevantes além de serem plataformas úteis para a triagem de potenciais novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (RAVI et al., 2015).

Diante disso, com o intuito de aperfeiçoar os sistemas *in vitro* descritos até hoje para o estudo da obesidade, foi desenvolvido e caracterizado um modelo *in vitro* 3D multicelular utilizando linhagens

celulares que constituem o microambiente do tecido adiposo vivo. Este modelo pode servir como uma importante ferramenta para o entendimento dos processos envolvidos no desenvolvimento da obesidade, bem como para o estudo de possíveis novos compostos com potencial terapêutico para o tratamento da obesidade.

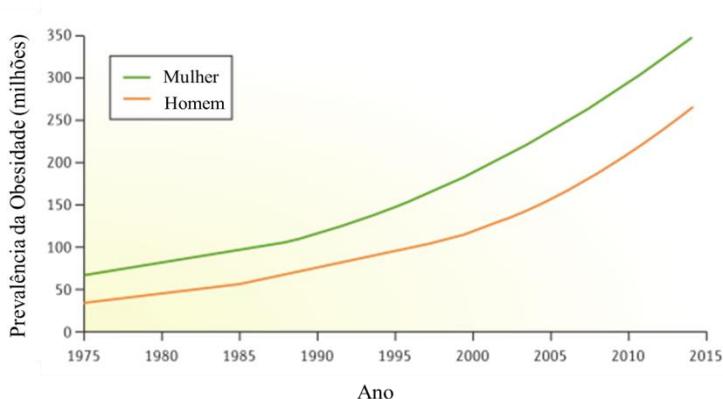
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE

A obesidade tornou-se um dos principais problemas de saúde pública no mundo, sendo considerada a desordem nutricional mais importante tanto para países desenvolvidos quanto em desenvolvimento (HRUBY; HU, 2015; TREMMEL et al., 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças associadas ao sobrepeso e a obesidade são causa de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano (WHO, 2012). Em 2014, 39 % dos adultos com 18 anos ou mais estavam acima do peso e 13 % eram clinicamente obesos, o que representa mais de 2 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 600 milhões de obesos (WHO, 2016). Desde 1975, a prevalência global de adultos obesos quase triplicou (Figura 1). A porcentagem de sobrepeso e de obesidade entre os homens aumentou de 28,8 % em 1980 para 36,9 % em 2013. Entre as mulheres, o aumento foi de 29,8 % para 38,0 % no mesmo período. Sendo assim, estima-se que até 2030, 57,8 % da população adulta mundial terá sobrepeso ou obesidade (MORGEN; SØRENSEN, 2014; MUNIESA-GONZÁLEZ et al., 2017).

Figura 1: Evolução da prevalência da obesidade no mundo



Fonte: adaptado de Muniesa-González (2017).

No Brasil, de acordo com os últimos dados fornecidos pela Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016) no ano de 2016, 53,8 % dos adultos apresentavam sobrepeso, e 18,9 % eram obesos. Ainda, um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2015) em 2011, mostrou que os custos atribuíveis à obesidade no Brasil totalizaram US\$ 269,6 milhões (1,86 % de todos os gastos com assistência médica de média e alta complexidade). Estes achados condizem com a afirmação feita pela OMS, de que o excesso de peso e a obesidade constituem uma das ameaças mais importantes à saúde pública mundial.

2.2 DIAGNÓSTICO

Diferentes métodos foram desenvolvidos para determinar se o indivíduo é obeso. Dentre eles inclui-se a avaliação antropométrica, análise da impedância bioelétrica, densitometria e métodos baseados em imagens (MUNIESA-GONZÁLEZ et al., 2017). Embora o Índice de Massa Corporal (IMC) seja uma ferramenta imprecisa, é o método de medida de adiposidade mais utilizado para definir obesidade e sobrepeso. O IMC é calculado com base no peso do indivíduo em quilogramas dividido pela altura em metros elevada ao quadrado (kg/m^2).

Segundo a OMS, $\text{IMC} \geq 25\text{kg}/\text{m}^2$ caracteriza sobrepeso e $\text{IMC} \geq 30\text{kg}/\text{m}^2$ define obesidade. A definição também descreve os graus de obesidade como grau 1, 2 e 3, sendo o grau 3 considerado obesidade mórbida (Tabela 1) (ABESO, 2009, 2016). Por não distinguir gordura de massa magra, o IMC não reflete a real distribuição da gordura corporal. Desta forma, recomenda-se que este método seja usado em conjunto com outras medidas para a determinação da gordura corporal (WOHLFAHRT et al., 2014). Um exemplo é a medida da circunferência abdominal, um método simples e clinicamente útil para a medida da adiposidade central, contribuindo para a avaliação mais precisa de fatores de risco de mortalidade (NORDSTRAND et al., 2011). Como especificado na Tabela 2, a OMS estabelece como ponto de corte para risco de complicações metabólicas associadas com a obesidade uma circunferência abdominal entre 94-102 cm para homens e 80-88 cm para mulheres (ABESO, 2009, 2016).

Tabela 1: Classificação internacional da obesidade a partir do IMC

IMC (kg/m ²)	Classificação	Risco de comorbidades
< 18,5	Baixo peso	Baixo
18,5-24,9	Peso normal	Normal
25-29,9	Sobrepeso	Aumentado
30-34,9	Obeso Grau I	Moderado
35-39,9	Obeso Grau II	Grave
≥ 40	Obeso Grau III	Muito Grave

Fonte: Adaptado de ABESO, 2009, 2016.

Tabela 2: Circunferência abdominal e risco de complicações metabólicas

Risco de complicações metabólicas	Circunferência abdominal (cm)	
	Homem	Mulher
Aumentado	≥ 94	≥ 80
Aumentado substancialmente	≥ 102	≥ 88

Fonte: Adaptado de ABESO, 2009.

2.3 TRATAMENTOS PARA A OBESIDADE

O sobrepeso e a obesidade bem como as doenças metabólicas relacionadas podem ser tratados. O tratamento inicial envolve a terapia não medicamentosa, baseada em modificações na dieta de indivíduos com sobrepeso e/ ou obesidade (redução no consumo de gorduras e açúcares e aumento na ingestão de frutas, vegetais e grãos), associado à prática regular de atividades físicas (60 minutos/dia para crianças e 150 minutos/semana para adultos) (WHO, 2016).

Para que o tratamento farmacológico seja iniciado, é necessário que o indivíduo apresente síndrome metabólica com obesidade ou sobrepeso associado a algum tipo de comorbidade e que não tenha perdido 1 % do peso inicial por mês, após um a três meses de tratamento não medicamentoso (SBC, 2005).

Os medicamentos para o tratamento da obesidade da classe das anfetaminas, proibidos de serem comercializados em 2011 devido ao potencial de causarem dependência, foram liberados para a produção, comercialização e consumo em 2017 (BRASIL., 2017). Desde então, no Brasil, além das substâncias sibutramina, orlistat, liraglutida e locarserina (ABESO, 2016; ANVISA, 2017), os anorexígenos femproporex, anfepramona e mazindol, também vem sendo utilizados na terapia da obesidade. Existem também, os medicamentos *off label*, que possuem indicações diferentes daquelas que constam na bula do medicamento, é o caso do topiramato, bupropiona, citalopran, sertralina e fluoxetina, que além de serem usados para o tratamento da depressão, também auxiliam na perda de peso (ABESO, 2016; SBC, 2005).

Em relação ao tratamento cirúrgico, a indicação é somente para casos específicos. As cirurgias classificam-se em restritivas (diminuem a entrada de alimentos no tubo digestivo), disabsortivas (diminuem a absorção de alimentos) e mistas (SBCBM, 2006).

Sabe-se que o aumento global nos índices de obesidade representa um sério problema de saúde pública com implicações para a sociedade e para os sistemas de saúde. Desta forma, é fundamental que os mecanismos envolvidos no processo de desenvolvimento da obesidade sejam compreendidos a fim de melhorar as medidas preventivas e intensificar a busca por novos fármacos, sejam eles, compostos isolados, sintéticos e semi-sintéticos ou naturais, de modo a atuarem com eficácia no tratamento da obesidade. Diante disso, muitos autores tem estudado a obesidade em nível celular (CEPPO et al., 2014; TURNER et al., 2014, 2015; WEISBERG et al., 2003), relacionando o estado metabólico das células e o estresse ambiental, na tentativa de encontrar novos mecanismos celulares e novos alvos terapêuticos que possam contribuir na terapia da obesidade e das doenças relacionadas.

2.4 TECIDO ADIPOSEO

2.4.1 Embriologia

Os adipócitos desenvolvem-se a partir de células precursoras, os chamados pré-adipócitos. Estes derivam do mesênquima, tecido embrionário derivado do mesoderma (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014). Entretanto, existem relatos de que os adipócitos presentes na região cefálica derivam do neuroectoderma (ALI et al., 2013; BILLON et al., 2007; POPE et al., 2016).

Em humanos, a formação das células adipocitárias inicia durante o segundo trimestre de gestação e persiste até o nascimento (BILLON; MONTEIRO; DANI, 2008; POPE et al., 2016). Os adipócitos formados na região subcutânea e visceral podem expandir de forma variável de 15 a 80 micrometros (μm) de diâmetro até o nascimento. A proliferação destas células perdura durante a infância e adolescência (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; POPE et al., 2016). Desta forma, este período define o número total de adipócitos que o indivíduo terá na fase adulta, sendo que este número, não será alterado mesmo no contexto da obesidade (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

O tempo de vida médio de um adipócito em humanos adultos é de aproximadamente 10 anos, sendo 10 % renovados a cada ano. O *turnover* de adipócitos é sustentado ao longo da vida por um equilíbrio entre adipogênese e apoptose, e isso requer uma fonte constante de células progenitoras de adipócitos (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

2.4.2 Características do Tecido Adiposo

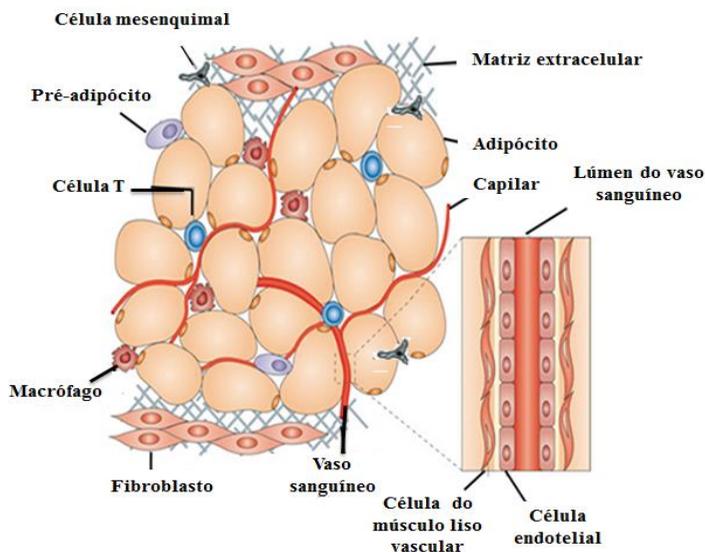
O tecido adiposo (TA) pode ser classificado em dois tipos: tecido adiposo marrom (TAM) e tecido adiposo branco (TAB), ambos desempenham um papel muito importante na detecção e resposta às mudanças no balanço energético sistêmico (COOKE et al., 2016). Sabe-se que o TAM exerce sua atividade em processos relacionados à termogênese por possuir um grande número de mitocôndrias. É encontrado principalmente em recém-nascidos, localizado nas regiões interescapular e supraclavicular, bem como em torno dos rins, coração, aorta, pâncreas e traqueia (MUNIESA-GONZÁLEZ et al., 2017). Depósitos de TAM diminuem com a idade, mas ainda podem ser encontrados em pequenas quantidades na fase adulta (FONSECA-ALANIZ et al., 2006; NEDERGAARD; BENGTSSON; CANNON, 2007).

Em contraste, o TAB é encontrado em abundância em adultos, exercendo a função de armazenamento de energia na forma de triacilglicerol (TAG).

O TAB é constituído basicamente por pré-adipócitos, matriz extracelular, vasos sanguíneos e capilares, células imunes, fibroblastos, macrófagos, células mesenquimais e adipócitos, sendo que, este último, constitui grande parte do órgão (Figura 2) (OUCHI et al., 2011). Dentre os constituintes do TAB, destacam-se os macrófagos. Duas populações

distintas de macrófagos podem ser encontradas no TAB. Em TAB metabolicamente saudável, encontram-se os macrófagos M2, alternativamente ativados, sendo responsáveis pela secreção de citocinas anti-inflamatórias e, em TAB metabolicamente disfuncional, encontram-se os macrófagos M1, classicamente ativados, presentes em situações de obesidade (COOKE et al., 2016; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). Os macrófagos M1 são responsáveis pela secreção de citocinas pró-inflamatórias. Segundo Weisberg e colaboradores (2003), a presença de macrófagos pode aumentar de 10-15 % em um tecido magro, para 45-60 % em um tecido obeso.

Figura 2: Constituintes do TA



Os adipócitos são os principais constituintes do TA. Os demais tipos de células presentes são as células precursoras (mesenquimais e pré-adipócitos), macrófagos e células T, fibroblastos, células vasculares (endoteliais e do músculo liso vascular), matriz extracelular, vasos sanguíneos e capilares. Fonte: modificado de Ouchi et al., 2011.

Além dos constituintes celulares, o TAB pode ser classificado de acordo com sua localização anatômica em tecido adiposo subcutâneo e visceral (CHOE et al., 2016). Essa divisão pode determinar a atividade metabólica do TAB e suas funções centrais. Sabe-se que a gordura

encontrada em depósitos subcutâneos (abaixo da pele, região abdominal, glútea e femoral) pode fornecer efeito protetor sobre a homeostasia energética, entretanto, é rica em pré-adipócitos suscetíveis à replicação rápida, o que pode ocasionar um aumento da sua capacidade de tamponamento, contribuindo para a instalação de quadros de lipotoxicidade (deposição ectópica de gordura em outros órgãos). Os depósitos de gordura viscerais, encontrados próximo ou no interior dos órgãos da cavidade abdominal estão associados ao risco de desenvolvimento de síndrome metabólica (BERRY et al., 2013; COOKE et al., 2016; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016).

2.4.3 Funções do Tecido Adiposo

Após a descoberta da leptina (ZHANG et al., 1994), a primeira citocina secretada pelas células adipocitárias, o TAB passou a ser reconhecido como um importante e complexo órgão endócrino, pois, além da função de armazenar energia, também é capaz de secretar diversos fatores conhecidos como adipocinas e, através de efeitos parácrinos, autócrinos e endócrinos, pode atuar na regulação da homeostase energética sistêmica, conferindo proteção a diversos tecidos do organismo contra a lipotoxicidade e disfunções metabólicas (COOKE et al., 2016; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

A leptina está envolvida na regulação do balanço energético. Esta citocina atua no hipotálamo e tem a função de aumentar a expressão de neuropeptídeos que suprimem o apetite e conseqüentemente, inibir neuropeptídeos responsáveis por estimular o apetite (CHOE et al., 2016; DÂMASO, 2003). Outra importante citocina envolvida no metabolismo saudável do TAB é a adiponectina, esta, promove aumento da sensibilidade à insulina e contribui com respostas anti-inflamatórias (CHOE et al., 2016).

O TAB também é responsável pela síntese endógena de ácidos graxos catalisados pela enzima ácido graxo sintase (FASN, do inglês *fatty acid synthase*) e acetil-CoA carboxilase, bem como seu armazenamento na forma de TAG. O aumento da ingestão calórica (fonte exógena de produção de ácidos graxos), estimula a lipogênese e o excesso de ácidos graxos também é armazenado na forma de TAG (DÂMASO, 2003; SAPONARO et al., 2015).

Os TAGs armazenados nos adipócitos são recobertos por proteínas denominadas perilipina, que atuam protegendo os TAGs da hidrólise. No entanto, durante períodos de jejum, os TAGs são liberados

na forma de ácidos graxos através da lipólise (SHI; BURN, 2004; SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011).

2.5 FISIOPATOLOGIA DA OBESIDADE

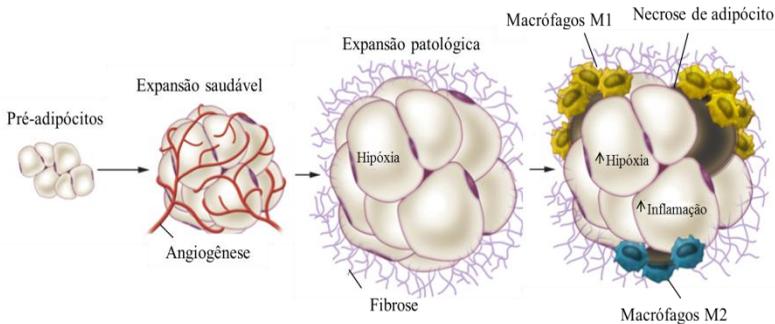
Considerada uma doença multifatorial, a obesidade ocorre devido à interação entre fatores genéticos, comportamentais, fisiológicos, ambientais, sociais e econômicos. Por essa razão, é considerada uma doença crônica, endócrino-metabólica e heterogênea, sendo um dos fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 (BHUPATHIRAJU; HU, 2016; CASTOLDI et al., 2016; KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; MAGNO et al., 2014). Além disso, associa-se a outras desordens metabólicas como doenças cardiovasculares, incluindo a hipertensão arterial e o acidente vascular cerebral, cirrose, doenças articulares, apneia do sono e alguns tipos de tumores (MALTA et al., 2014). A causa fundamental da obesidade tem sido caracterizada pelo excesso de gordura corporal resultante de um desequilíbrio energético prolongado. Este desequilíbrio pode ser causado pelo aumento da ingestão calórica e diminuição de atividades físicas, o que ocasiona um declínio do gasto energético. Além disso, o aumento da capacidade das células em estocar gordura, bem como, a diminuição da capacidade de oxidação destas gorduras também pode levar ao desenvolvimento de obesidade (BHUPATHIRAJU; HU, 2016; CASTOLDI et al., 2016; QUEIROZ et al., 2009; WANNMACHER, 2016).

O TAB é capaz de responder de forma rápida e dinâmica a alterações tanto de privação quanto de excesso de nutrientes através da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011). O microambiente de um TA metabolicamente saudável, por meio de eosinófilos e células T reguladoras presentes, secreta citocinas como interleucina 4 (IL-4), IL-13 e IL-10 respectivamente, que possuem a função de polarizar os macrófagos do tecido para o fenótipo M2 - anti-inflamatório (CASTOLDI et al., 2016; MANTOVANI et al., 2002). Ainda, em condições fisiológicas, a secreção do hormônio adiponectina é alta, proporcionando o aumento da sensibilidade à insulina. Essa combinação de fatores pode ajudar a preservar o TA saudável, promovendo a reparação tecidual e a angiogênese (SUN; KUSMINSKI; SCHERER, 2011).

Em contraste, durante o balanço energético positivo persistente, o TAB expande para facilitar o armazenamento de TAGs que se encontram em excesso. Esse processo pode resultar em considerável

disfunção do órgão (COOKE et al., 2016). Neste contexto, macrófagos M2, que antes exibiam um perfil anti-inflamatório, são polarizados por citocinas como interferon- γ para um fenótipo M1, que estão associados a um perfil pró-inflamatório (CASTOLDI et al., 2016). Os macrófagos M1 são responsáveis pelo aumento da secreção de fatores pró-inflamatórios como, o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor - α*), proteína quimioatratante de monócitos-1 (MCP-1, do inglês *monocyte chemoattractant protein-1*), IL-6, IL-1 β , IL-12 e IL-23 (CASTOLDI et al., 2016; OUCHI et al., 2011). Além disso, macrófagos M1 também são responsáveis pela produção de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) através da ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS, do inglês *inducible nitric oxide synthase*). Paralelo a esse ambiente pró-inflamatório, os fatores anti-inflamatórios como IL-10 e adiponectina diminuem, resultando em diminuição da sensibilidade à insulina e diminuição da função vascular, levando ao desenvolvimento de fibrose e hipóxia. Além disso, à medida que a hipertrofia progride, a MCP-1 recruta novos monócitos circulantes, que se infiltram no TAB e polarizam-se em M1, dando continuidade ao ambiente inflamatório gerado (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016). A Figura 3 ilustra as etapas de remodelação do TAB durante o desenvolvimento da obesidade.

Figura 3: Resposta do TA a hipertrofia dos adipócitos



A expansão saudável do TA é definida como um aumento das células adipocitárias por meio do recrutamento de células precursoras em proporções adequadas, vascularização suficiente e inflamação mínima. Em contraste, a expansão patológica está associada à inflamação crônica, podendo ser descrita pela rápida expansão das células, aumento da infiltração de macrófagos M1 e redução de macrófagos M2, desenvolvimento limitado dos vasos, fibrose e hipóxia, resultando em necrose dos adipócitos.

Fonte: Adaptada de Sun et al., (2011).

2.6 DIFERENCIAÇÃO DE ADIPÓCITOS

A diferenciação adipogênica ou adipogênese não ocorre somente durante o desenvolvimento embrionário, mas ao longo da vida do indivíduo, tanto em resposta ao *turnover* celular quanto em resposta a necessidade adicional de armazenamento de gordura, que ocorre em períodos em que a ingestão calórica excede os parâmetros nutricionais (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2007).

Os adipócitos provêm de células tronco mesenquimais multipotentes residentes no estroma do tecido adiposo e na medula óssea e que possuem a capacidade de se diferenciar em diversos tecidos como, adiposo, cartilaginoso, ósseo e muscular (AVRAM; AVRAM; JAMES, 2007; POULOS; DODSON; HAUSMAN, 2010; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014; TANG; LANE, 2012). Em nível celular, a diferenciação destas células compreende duas fases: determinação e diferenciação terminal (CRISTANCHO; LAZAR, 2011; ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

A fase de determinação resulta no comprometimento de uma célula tronco mesenquimal com o fenótipo adipocítico. Sendo assim, a célula mesenquimal, semelhante a fibroblasto, é convertida em pré-

adipócito, que não pode ser distinguido morfológicamente de sua célula precursora, mas perdeu o potencial de se diferenciar em outros tipos celulares. Na segunda fase, o pré-adipócito passa a expressar diversos fatores de transcrição que induzem a sua diferenciação em adipócitos (ARMANI et al., 2010; ROSEN; MACDOUGALD, 2006).

Dentre os fatores de transcrição envolvidos neste processo, destacam-se o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR γ), considerado o regulador central do processo de adipogênese e a família de proteínas ligadas ao amplificador CAAT, os C/EBPs (C/EBP- α , C/EBP- β e C/EBP- δ) (FARMER, 2006; LEFTEROVA; LAZAR, 2009; ROSEN; MACDOUGALD, 2006).

Um estudo realizado por Tontonoz e colaboradores (1994) mostrou que a expressão ectópica de PPAR γ em fibroblastos murinos foi suficiente para iniciar o processo de adipogênese. Além disso, um estudo utilizando camundongos *knockout* para PPAR γ 2, uma isoforma presente em abundância no TA, mostrou que além de os camundongos terem apresentado formação reduzida do TA, ainda exibiram resistência à insulina, sugerindo que PPAR γ 2 pode desempenhar um papel seletivo na regulação da sensibilidade à insulina (ZHANG et al., 2004).

Os mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de adipogênese têm sido amplamente estudados em sistemas *in vitro* (CEPPO et al., 2014; FILIPPIN-MONTEIRO et al., 2012; GUO et al., 2009; MOON et al., 2007). A linhagem celular 3T3-L1, originalmente estabelecida por Green e Kehinde (1975), pode facilitar os conhecimentos sobre os mecanismos que regulam a adipogênese.

2.6.1 Modelo de diferenciação de adipócitos *in vitro*

O modelo que melhor representa a adipogênese utiliza pré-adipócitos imortalizados da linhagem 3T3-L1, derivada da linhagem fibroblástica 3T3, oriunda de embriões de camundongos Swiss extraídos prematuramente (CHURCH; BROWN; RODEHEFFER, 2015; FARMER, 2006; GREEN; MEUTH, 1975). O estudo deste sistema levou a elucidação dos eventos celulares e biológicos que ocorrem e da hierarquia transcricional existente durante a conversão dessas células originalmente semelhantes a fibroblastos para células semelhantes à adipócitos (BERRY et al., 2013).

O processo de diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1 pode ser dividido em três etapas distintas: inibição do crescimento celular pelo contato célula-célula, de acordo com a densidade celular, expansão

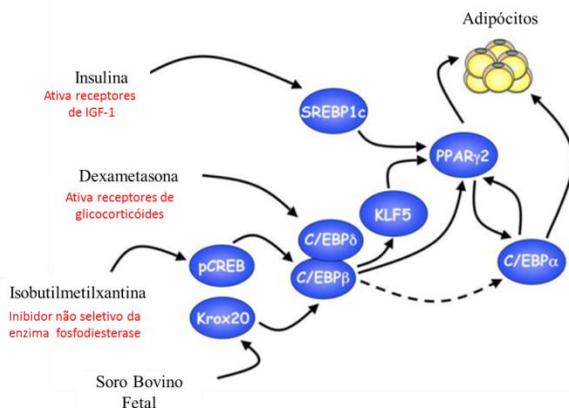
clonal e diferenciação terminal (FARMER, 2006; GREEN; MEUTH, 1975; GUO et al., 2009).

Pré-adipócitos confluentes diferenciam-se após serem expostos a um coquetel adipogênico constituído pela combinação de Soro Bovino Fetal (SBF), **Insulina** (ativa receptores do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 - IGF-1), **Dexametasona** (ativa receptores de glicocorticoides) e **Isobutilmetilxantina** (inibidor não seletivo da enzima fosfodiesterase). Este coquetel é conhecido como MDI (NTAMBI; KIM, 2000; ZEBISCH et al., 2012).

As células estimuladas reentram no ciclo celular e realizam pelo menos dois ciclos de divisão celular (expansão clonal). Durante este período, ocorre a expressão dos fatores de transcrição C/EBP- β e C/EBP- δ . A presença de isobutilmetilxantina favorece a expressão de C/EBP- β mediada pela sinalização de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), enquanto que a expressão de C/EBP- δ pode ser ativada tanto por C/EBP- β quanto por glicocorticoides (FARMER, 2005; WU; BUCHER; FARMER, 1996). Juntos, estes fatores de transcrição induzem a expressão de PPAR γ 2 e C/EBP- α , que se autorregulam para manterem-se expressos, atuando na indução da transcrição de centenas de genes anteriormente silenciados, envolvidos na geração e na manutenção do fenótipo dos adipócitos. A diferenciação terminal é manifestada pela alteração morfológica das células adipocíticas para o formato esférico, acúmulo de lipídeos no seu citoplasma, além de expressarem progressivamente características bioquímicas de adipócito maduro (FARMER, 2006; LEFTEROVA; LAZAR, 2009; ZEBISCH et al., 2012).

A insulina é amplamente utilizada para induzir a proliferação e diferenciação de pré-adipócitos (GREEN; MEUTH, 1975). Devido ao fato de estas células não possuírem receptores de insulina de forma expressiva, esta atua através do receptor IGF-1 (NTAMBI; KIM, 2000). Nas células indiferenciadas, a concentração de receptores IGF-1 é duas vezes maior do que a concentração de receptores de insulina. No entanto, após a diferenciação de adipócitos, a concentração de receptores IGF-1 permanece constante enquanto que o número de receptores de insulina aumenta quase 25 vezes à medida que adipócitos em desenvolvimento se tornam sensíveis à insulina (SMITH et al., 1988). A Figura 4 ilustra a cascata de fatores envolvidos na diferenciação adipogênica.

Figura 4: Fatores pró-adipogênicos que regulam a diferenciação de pré-adipócitos



Pré-adipócitos expostos ao coquetel adipogênico constituído por insulina, dexametasona, isobutilmetilxantina e soro bovino fetal, ativam diferentes fatores de transcrição que resultam na ativação de PPAR γ 2 e C/EBP α , envolvidos na diferenciação terminal dos adipócitos.

Fonte: modificado de Farmer, 2006.

Em razão da presença de diferentes tipos celulares no TA, modelos *in vitro* bidimensional (2D) ou tridimensional (3D) associando um ou mais tipos de células tem sido desenvolvidos, a fim de obter uma melhor compreensão sobre as conexões existentes entre os adipócitos e as células que circundam no tecido adiposo (FISCHBACH et al., 2004; SUBRAMANIYAN; KIM; HWANG, 2016; TURNER et al., 2015).

2.7 MODELOS *IN VITRO* DE OBESIDADE UTILIZANDO A LINHAGEM 3T3-L1

Embora apresente limitações, a linhagem celular 3T3-L1 continua sendo muito utilizada em modelos *in vitro* para o estudo da obesidade. Neste sentido, os modelos já descritos na literatura estão relacionados à avaliação de novos compostos com potencial terapêutico para o tratamento da obesidade, atuando principalmente na inibição da adipogênese e consequente diminuição de citocinas pró-inflamatórias (KANG et al., 2016; MUKHTAR et al., 2016; SEO et al., 2015). Ainda, esta linhagem celular também vem sendo utilizada para elucidar os efeitos de antioxidantes, espécies reativas de oxigênio (ROS) e da

melatonina, sobre a diferenciação adipogênica (CALZADILLA et al., 2013; KATO et al., 2015).

Adicionalmente, vários compostos que já apresentaram efeitos *in vivo* na inibição da obesidade, têm sido testados em modelos *in vitro*, sendo úteis para estudar os mecanismos de ação durante as etapas de diferenciação da célula (MAMMI et al., 2016).

Além disso, a relação da obesidade com doenças como o câncer e o diabetes, também vem sendo estudadas em modelos *in vitro* utilizando a linhagem 3T3-L1 (BALABAN et al., 2017; CEPPO et al., 2014; LO et al., 2013). Somado a isso, técnicas de silenciamento de genes tem sido desenvolvidas com o objetivo de elucidar as diferentes funções de genes envolvidos na adipogênese da célula 3T3-L1 (ABDESSELEM et al., 2016; MA et al., 2012; SOM et al., 2016).

A maioria dos modelos *in vitro* desenvolvidos para o estudo da obesidade utilizam a técnica de mono ou co-cultura bidimensional (2D) (FILIPPIN-MONTEIRO et al., 2012; MOON et al., 2007; PANDURANGAN et al., 2012). Os modelos de co-cultura de adipócitos com outros tipos celulares, são ferramentas importantes para compreender as múltiplas conexões existentes entre o TA e os outros tecidos do organismo (SUBRAMANIYAN; KIM; HWANG, 2016; SUGANAMI et al., 2007).

Apesar das suas limitações, a metodologia 2D continua sendo utilizada pois, contribui na avaliação das respostas das células a determinados estímulos e permite a realização de *screening* de potenciais novos agentes para o tratamento de diversas doenças (PEREIRA-FERNANDES et al., 2013).

Em sistemas 2D, as células aderem e crescem sobre uma superfície planar e todas recebem quantidades homogêneas de nutrientes e fatores de crescimento. No entanto, pelo fato de apresentarem organização e morfologia diferentes do que é encontrado *in vivo*, esse sistema pode influenciar em processos como proliferação celular, diferenciação, apoptose, expressão de genes e proteínas (DORST et al., 2014; EDMONDSON et al., 2014).

Por essa razão, sistemas tridimensionais (3D) vêm sendo desenvolvidos, pois reproduzem de maneira mais precisa a organização celular encontrada *in vivo*, contribuindo para a obtenção de resultados clínicos mais relevantes (DORST et al., 2014).

2.8 CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL

Os modelos *in vitro* 3D multicelulares têm sido extensivamente utilizado, no campo da oncologia (KIM; LEE; KUH, 2015; ZANONI et al., 2016), biologia de células tronco (SASAI, 2013; TSAI et al., 2015) e engenharia de tecidos (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2012; LASCHKE; MENGER, 2017).

As células cultivadas em modelos 3D, principalmente os sistemas de co-cultura tridimensional, refletem a organização natural das células encontradas em tecidos vivos, uma vez que, no organismo, as células além de estarem envolvidas por matriz extracelular (MEC) estão em contato direto com outros tipos celulares.

Em modelos 3D, as células são cultivadas na ausência de uma superfície aderente, o que permite a agregação celular e consequente formação de estruturas esféricas, denominadas esferoides (SILVA et al., 2015). No esferoide, as células estão imersas dentro de uma rede de MEC produzida pelas próprias células, e em contato direto célula-célula, célula-matriz, constituindo um microambiente complexo que fornece suporte e crescimento celular (ACHILLI; MEYER; MORGAN, 2012).

Segundo Ravi e colaboradores (2015), as matrizes ou *scaffolds* utilizadas para a formação da estrutura 3D são muito importantes e variam de acordo com o tipo de células. O gel de agarose, por exemplo, é muito utilizado, por ser simples e de fácil manipulação. No entanto, de acordo com a linhagem celular, a concentração, composição e volume dos géis podem sofrer alterações. Este recobrimento é adicionado sobre placas de cultivo celular e deixado polimerizar antes da adição da suspensão de células. Assim, as células são capazes de crescerem sem aderir, promovendo agregação celular e compactação (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

Os modelos esferoides são compostos por células em proliferação (região externa) e, quiescentes ou necróticas (região interna), e essa heterogeneidade celular é semelhante à encontrada em tecidos vivos (EDMONDSON et al., 2014). A troca de oxigênio e nutrientes é limitada pelo tamanho do esferoide. Em esferoides que apresentam tamanho superior a 500 µm, regiões necróticas centrais são comuns devido à falta de nutrientes e acúmulo de resíduos tóxicos (CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017; ZANONI et al., 2016).

Apesar de algumas limitações, metodologias 3D têm sido extensivamente utilizadas em técnicas *in vitro*, pois além de recriarem a arquitetura *in vivo*, possibilitam a interação da célula de interesse com outros tipos celulares (EDMONDSON et al., 2014). No contexto da

obesidade, estes sistemas têm sido desenvolvidos com o objetivo de compreender o real papel dos adipócitos na adipogênese e investigar respostas celulares promovidas por estímulos pró-inflamatórios, a fim de encontrar alternativas para o tratamento da obesidade e suas comorbidades (FISCHBACH et al., 2004; RUIZ-OJEDA et al., 2016; TURNER et al., 2015).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi desenvolver um modelo *in vitro* de cultura celular tridimensional (3D) a fim de representar as células encontradas no tecido adiposo nativo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

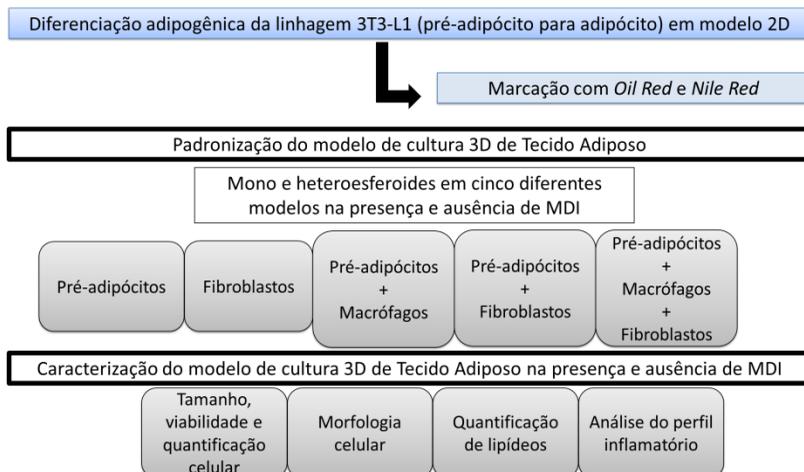
- Estabelecer os constituintes celulares, as condições de cultura e o protocolo de diferenciação adipogênica no modelo 3D;
- Caracterizar o modelo 3D em relação à organização celular, tamanho e viabilidade;
- Quantificar lipídeos intracelulares no modelo 3D;
- Avaliar a liberação de óxido nítrico nas células no modelo 3D.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A Figura 5 apresenta um esquema do desenho experimental deste trabalho.

Figura 5: Desenho experimental

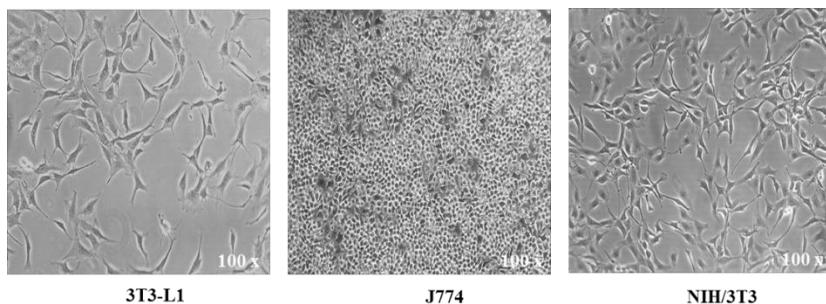


Legenda: MDI – Meio de diferenciação adipogênica

cultura celular *Dulbecco Modified Eagles's Medium* (DMEM), pH 7,4, suplementado com 10 % de soro bovino fetal (SBF), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10 mM de ácido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), em estufa umidificada a 37°C e atmosfera com 5 % de dióxido de carbono (CO₂). A linhagem 3T3-L1 foi mantida nas mesmas condições, entretanto, o meio de cultura celular DMEM foi suplementado com 10 % de soro de bezerro (do inglês *Calf serum* – CS). A cada dois dias, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS 1×) para remoção de restos celulares e o meio de cultura substituído. Todos os experimentos foram realizados com as células entre as passagens 2 a 7. Ao atingirem 80-90 % de confluência, o subcultivo foi realizado. As linhagens 3T3-L1 e NIH/3T3 foram dissociadas pelo método enzimático, utilizando a enzima proteolítica tripsina 0,25 % por 5 minutos (min) a 37 °C. A linhagem J774, por possuir um mecanismo de adesão diferente, foi subcultivada por método mecânico, utilizando o *cell scraper* um dispositivo semelhante a um rodo estéril para cultura celular.

Para a realização dos experimentos, as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando a metodologia de exclusão por Azul de Tripano. Este corante incorpora-se em células que apresentam membrana celular comprometida (não viáveis), corando-as de azul. O número de células plaqueadas e o tempo de incubação foram determinados para cada experimento.

Figura 6: Linhagens celulares utilizadas



3T3-L1 (pré-adipócito); J774 (macrófago); NIH/3T3 (fibroblasto).

Fonte: elaborado pela autora.

4.4 CULTURA CELULAR BIDIMENSIONAL (2D)

4.4.1 Diferenciação adipogênica da linhagem 3T3-L1

O protocolo de diferenciação adipogênica foi estabelecido em modelo de cultura celular 2D, classicamente utilizado em técnicas in vitro.

Para a diferenciação adipogênica, as células 3T3-L1 (2×10^4 células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços com meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de CS e incubadas em estufa umidificada a 37 °C e 5 % de CO₂. Após uma confluência de 80-90%, aguardou-se 48 horas e o meio de cultura foi substituído pelo meio de indução da diferenciação adipogênica – MDI, contendo 500 µM de 3-isobutyl-1-Methylxanthine (IBMX), 1 µM de Dexametasona (DEX) e 1,67 µM de Insulina (INS) em DMEM suplementado com 10 % de SBF. Após 72 horas, o MDI foi substituído por um meio de manutenção, contendo somente DMEM suplementado com 10 % de SBF e 1,67 µM de INS, sendo trocado a cada dois dias durante 7 dias (MOON et al., 2007).

4.4.2 Análise dos lipídeos intracelulares em modelo 2D

4.4.2.1 Coloração com *Oil red O*

O Oil red O (OR) é um corante de lipídeos (triacilglicerois) intracelulares, por isso, tem sido usado para avaliar a diferenciação adipogênica das células 3T3-L1. As análises qualitativas podem ser realizadas através de imagens de microscopia de luz em que, pré-adipócitos diferenciados, apresentam lipídeos intracelulares corados em vermelho, enquanto que, as análises quantitativas são possíveis através da eluição do corante com metanol seguido da leitura da absorbância em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 490 nanômetros (nm) (KRAUS et al., 2016; VANKONINGSLOO et al., 2006).

Neste trabalho, foi realizada análise qualitativa dos lipídeos intracelulares. Para isso, as células foram coradas como descrito por Moon et al. (2007), com algumas modificações.

Após a etapa de diferenciação adipogênica, foi preparada uma solução estoque filtrada de OR a 5 % em isopropanol. As células foram lavadas com PBS 1× e fixadas com formaldeído 10 % por 15 min à temperatura ambiente. Após a fixação, procederam-se duas lavagens com água destilada por 5 min cada. A solução estoque de OR foi diluída

em água destilada na proporção 2:3 (OR:água) e adicionada sobre as células por 15 min à temperatura ambiente. Após, procederam-se 3 lavagens com água destilada por 5 min seguido de uma lavagem com isopropanol 50 %. Por fim, uma lavagem com água destilada foi realizada e as células foram visualizadas e fotografadas em microscópio óptico Nikon Eclipse TS100, câmera DCM510, usando o programa de captura ScopePhoto 3.0.

4.4.2.2 Coloração com *Nile red*

O Vermelho do Nilo (NR, do inglês *Nile red*) é um corante seletivo para lipídeos intracelulares, emitindo fluorescência em uma faixa entre 528 a 570 nm (ALDRIDGE et al., 2013). O reagente se torna fluorescente em ambiente lipofílico, emitindo fluorescência máxima quando em contato com gotas lipídicas (PEREIRA-FERNANDES et al., 2013).

Nesta técnica, também foi realizada análise qualitativa dos lipídeos intracelulares. Para isso, adaptou-se o protocolo descrito por Shu-Hui e colaboradores (2013). As células foram lavadas com PBS 1× e fixadas com formaldeído 4 % por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a solução de NR em uma concentração final de 1 µg/mL em PBS 1× por 30 min protegido da luz. Após, as células foram lavadas com PBS 1× e incubadas por 5 min com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), diluição 1:5000 em PBS 1×. Por fim, as células foram lavadas uma vez com PBS 1× e, em seguida, visualizadas e fotografadas em microscópio invertido de fluorescência Olympus IX83, câmera Olympus DP73, usando o programa de captura *CellSens*, disponível no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC.

4.5 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR TRIDIMENSIONAL (3D) TIPO TECIDO ADIPOSEO

4.5.1 Cultura 3D

Para a realização do modelo 3D tipo tecido adiposo, partimos de um estudo 3D realizado previamente em nosso grupo de pesquisa (SALEH, 2017). Neste estudo, optou-se por usar como revestimento da placa de cultura celular o gel de agarose na concentração de 2 %, uma vez que, nesta concentração, houve a formação de um único

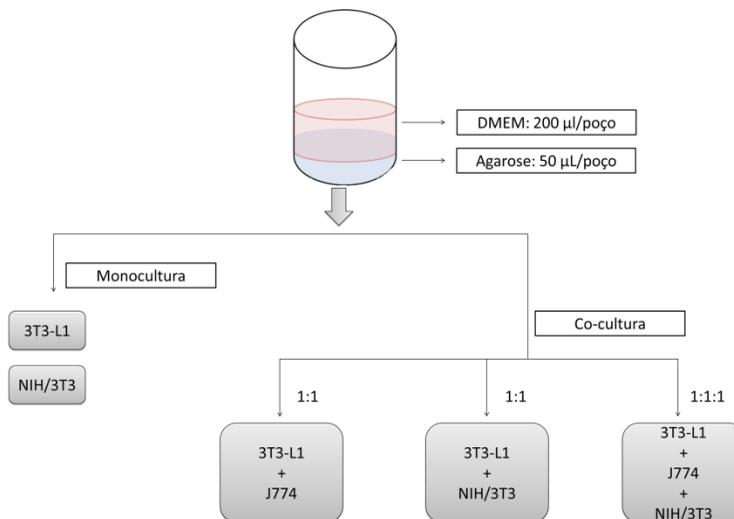
esferoide/poço. Segundo Friedrich et al. (2009), a agarose diluída em meio aquoso forma uma superfície côncava semi-sólida e, não aderente, sendo apropriada para a cultura de esferoides, pois permite que as células cresçam sem aderirem à placa, favorecendo a agregação e compactação celular. Desta forma, o pó de agarose foi dissolvido em água destilada para uma concentração final de 2 % (m/v). Após, a solução foi aquecida à temperatura de 60-80 °C até completa dissolução, obtendo um aspecto límpido. Em seguida, em cabine de segurança biológica, a solução de agarose foi transferida para placas de 96 poços no volume de 50 µl/poço. A fim de esterilização, as placas contendo o gel de agarose foram mantidas sob radiação de luz ultra violeta por 30 min. Em seguida, permaneceram em estufa a 37 °C até utilização (tempo máximo de 60 min).

4.5.2 Formação dos modelos esferoides

As linhagens celulares foram cultivadas em condições isoladas (monoesferoides) ou em co-cultura (heteroesferoides) na densidade total de $1,2 \times 10^4$ células/poço, sendo esta densidade padronizada no estudo de Saleh (2017). Foram estabelecidas cinco condições celulares diferentes. Os monoesferoides foram formados pelas linhagens 3T3-L1 e NIH/3T3 e, os heteroesferoides foram formados pelas linhagens 3T3-L1:J774, 3T3-L1:NIH/3T3 na proporção 1:1 e 3T3-L1:J774:NIH/3T3 na proporção 1:1:1, conforme ilustrado na Figura 7.

Inicialmente, a linhagem 3T3-L1 foi dissociada e suspensa em DMEM suplementado com 10 % de CS, enquanto as linhagens J774 e NIH/3T3 foram dissociadas e suspensas em DMEM suplementado com 10 % de SBF. Em seguida, 200 µL de cada suspensão de células, representativas de cada condição 3D foram adicionados sobre o gel de agarose. Todas as condições foram mantidas em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂ por 4 dias, tempo necessário para a formação dos esferoides.

Figura 7: Protocolo de formação dos esferoides



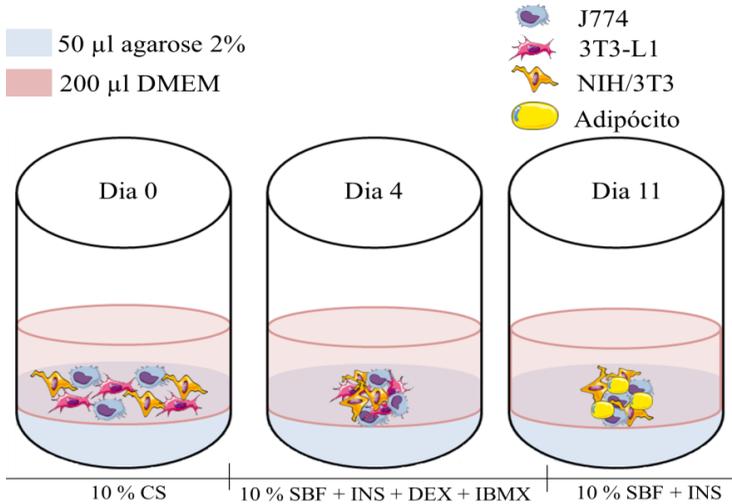
Representação esquemática da formação dos cinco modelos de esferoides utilizando placa 96 poços, gel de agarose na concentração 2 % e densidade celular de $1,2 \times 10^4$ células/poço nas proporções descritas. Legenda: 3T3-L1 (pré-adipócito); NIH/3T3 (fibroblasto); J774 (macrófago); DMEM (*Dulbecco Modified Eagles's Medium*).

Fonte: elaborado pela autora.

4.5.3 Indução da diferenciação adipogênica no modelo de cultura celular 3D

Após 4 dias de cultivo 3D, as células foram estimuladas a diferenciação adipogênica através da adição do MDI, seguindo o mesmo protocolo usado para a diferenciação das células no modelo 2D (Item 4.4.1). Para isso, metade do meio de cultura celular (100 µL) foi substituído pelo mesmo volume de MDI, por 72 horas e, após, a cada 48 horas, metade do meio MDI foi substituído pelo mesmo volume de meio de manutenção até completar 11 dias de cultivo 3D. A Figura 8 ilustra como a diferenciação adipogênica foi realizada. Os esferoides formados foram fotografados em microscópio Nikon Eclipse TS100 no aumento de $40 \times$ nos dias 4, 7 e 11.

Figura 8: Indução da diferenciação adipogênica no modelo 3D



Formação do esferoide 3D e diferenciação adipogênica. Legenda: J774 (macrófago); 3T3-L1 (pré-adipócito); NIH/3T3 (fibroblasto); DMEM (*Dulbecco Modified Eagles's Medium*); CS (*calf serum*); SBF (soro bovino fetal); INS (insulina); DEX (dexametasona); IBMX (3-isobutil-1-metilxantina).
Fonte: elaborado pela autora.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE CULTURA CELULAR 3D

Após finalizar a etapa de padronização da cultura celular 3D, iniciou-se a caracterização do modelo, avaliando a viabilidade celular, morfologia, tamanho, diferenciação adipogênica e perfil inflamatório. Para a realização de todas as análises citadas, com exceção da análise do tamanho, foram utilizados apenas os esferoides formados no dia 11, sendo processados de acordo com cada experimento. O sobrenadante celular do mesmo dia foi armazenado em freezer -80°C para análises posteriores.

4.6.1 Tamanho dos esferoides

O crescimento dos esferoides foi avaliado através da medida do diâmetro (μm). Para isso, os esferoides foram fotografados em microscópio de luz, câmera DCM 510, no aumento de $40\times$ nos dias 4, 7

e 11. As imagens foram obtidas pelo *software ScopePhoto 3.0* e o diâmetro calculado pelo *software ImageJ*, sendo considerado apenas o valor do diâmetro horizontal.

4.6.2 Quantificação e viabilidade celular

Para análise da viabilidade e a quantificação celular, 8 esferoides de cada condição 3D foram transferidos para microtubos, lavados com PBS 1× e dissociados por ação enzimática. A ação da tripsina foi interrompida adicionando DMEM suplementado com 10 % de SBF. Após a dissociação, procedeu-se mais uma lavagem com PBS 1× seguida de centrifugação. Posteriormente, as células foram coradas com Azul de Tripano (1:1 v/v) e contadas em câmera de Neubauer. Células viáveis e não viáveis foram contadas separadamente. Após a contagem, a viabilidade celular foi determinada transformando o número total de células viáveis por esferoide em porcentagem.

4.6.3 Morfologia celular

A morfologia celular externa de cada condição 3D foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para esta análise, adaptou-se o protocolo seguido por Dorst e colaboradores (2014). Após 11 dias de cultivo 3D, os esferoides foram transferidos para microtubos e lavados duas vezes com PBS 1×. Após, foram fixados com solução FIX (paraformaldeído 4 % + glutaraldeído 2,5 %) por 30 min, seguido de duas lavagens com PBS 1×. Posteriormente, adicionou-se tetróxido de ósmio por 1 hora (protegido da luz), seguido de 4 lavagens com água destilada. Após, os esferoides foram submetidos à desidratação gradual (80, 90, 96 e 100 %) em etanol diluído em água destilada. Em seguida, adicionou-se hexametildisilazano (HMDS) diluído em álcool absoluto (1:1) por 15 min. Após, adicionou-se HMDS puro duas vezes de 15 min. Por fim, os esferoides foram recobertos por HDMS puro *overnight* até completa evaporação e após, transferidos para uma membrana de carbono adesivo, recobertos com partículas de ouro e analisados em microscópio de varredura JEOL JSM-6390LV disponível no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

4.6.4 Diferenciação adipogênica

4.6.4.1 Quantificação de lipídeos intracelulares no modelo de cultura celular 3D

A quantificação dos lipídeos intracelulares foi realizada pela técnica de citometria de fluxo, usando o corante lipofílico NR. Para a realização desta metodologia, seguiu-se o protocolo descrito por Shu-Hui e colaboradores (2013), com modificações. Inicialmente, 16 esferoides de cada condição celular 3D foram transferidos para microtubos, lavados com PBS 1×, dissociados por ação enzimática e centrifugados por 5 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi fixado com formaldeído 2 % por 20 min a temperatura ambiente. Procedeu-se mais uma lavagem com PBS 1× seguida de centrifugação e então adicionou-se 1 µg/mL de NR por 30 min protegido da luz. Mais uma lavagem seguida de centrifugação foi realizada e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi suspenso com 200 µL de PBS 1× e o conteúdo foi transferido para tubos específicos. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACS CANTO II, BD Biosciences, disponível no LAMEB/UFSC. As populações de células foram analisadas por *dot plots* e histogramas com o auxílio do programa *Flowing 2.5* e consideradas da seguinte forma:

- Células não diferenciadas: NR negativo
- Células diferenciadas: NR positivo

4.6.4.2 Visualização da diferenciação adipogênica por microscopia confocal

A fim de visualizar a diferenciação adipogênica nos esferoides, adaptamos o protocolo descrito por Weiswald e colaboradores (2010). Para isso, esferoides foram transferidos para microtubos, lavados duas vezes com PBS 1× e fixados com paraformaldeído 4 % por 20 min a temperatura ambiente. Após, procedeu-se duas lavagens com PBS 1× e adicionou-se 1 µg/mL de NR por 30 min protegido da luz. Em seguida, duas lavagens com PBS 1× foram realizadas seguida da incubação dos esferoides com DAPI, diluição 1:1000 em PBS 1× por 10 min, protegido da luz. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com PBS 1× e os esferoides foram visualizados em microscópio confocal LEICA DMI6000 B disponível no LCME da UFSC. As imagens foram adquiridas em objetiva de 20 × com óleo de imersão, com excitação de

405 nm para DAPI e 488 nm para NR e analisadas utilizando o *software* LAS AF Lite.

4.6.5 Perfil de liberação de NO

Para analisar a liberação basal de mediadores inflamatórios em cada condição 3D, o sobrenadante proveniente de um *pool* de 8 esferoides foi coletado no 11º dia de cultivo. As análises foram realizadas determinando a concentração de nitrito (NO₂), um metabólito do óxido nítrico (NO) em cada sobrenadante celular. Uma vez que, as condições 3D apresentaram número total de células diferentes entre si, os resultados de NO₂ foram normalizados pelo número total de proteínas extraídas de cada condição.

4.6.5.1 Extração de proteínas totais

A fim de realizar a extração de proteínas totais, 8 esferoides de cada condição 3D foram transferidos para microtubos, lavados com PBS 1× e dissociados por ação enzimática da tripsina. A ação da tripsina foi interrompida adicionando PBS 1× suplementando com 10 % de SBF. As células dissociadas foram centrifugadas por 10 min a 1500 rpm. Após a remoção total do PBS, as células foram lisadas com 120 µL de tampão RIPA contendo 10 mM de TrisHCl (pH 7,5), 150 mM de cloreto de sódio, 1 % de Triton X-100®, 0,1 % de SDS, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 5 µg/mL de aprotinina, 1 µg/mL de pepstatina e 1 µg/mL de leupeptinina, homogeneizadas em vórtex e incubadas por 30 min a 4 °C. Após a lise celular, as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 10 min a 4 °C sendo utilizado o sobrenadante.

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Lowry e colaboradores (1951) com algumas modificações. A reação baseia-se na redução de cobre (II) quando em contato com proteínas presentes na amostra. A formação do complexo proteína-cobre (I) reduz uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotungstístico (reagente de Folin-Ciocalteu) formando tungstato e molibdato e produzem um composto de coloração azul. Esta reação pode ser lida em espectrofotômetro após 30 min da adição dos reagentes.

Para esta metodologia, foi utilizada uma curva padrão através da diluição de uma solução estoque de albumina sérica bovina (BSA) em água destilada. Um volume final de 20 µL de sobrenadante da cultura de esferoides foi utilizado neste experimento, sendo diluído, quando

necessário, em água destilada. Após a adição das amostras, foi adicionado uma solução cupro alcalina (160 μL) contendo 4 % de carbonato de sódio, 0,2 M de hidróxido de sódio, 1 % de sulfato de cobre e 2 % de tartarato de sódio e potássio em todos os poços (branco, padrões e sobrenadante celular) por 10 min. Em seguida, adicionou-se o reagente Folin-Ciocalteu na diluição 1:4 em PBS 1 \times (16 μL) em todos os poços por 30 min com agitação constante e protegido da luz. Após, foi realizado a leitura em 750 nm e a concentração de proteínas nas amostras foi obtida através de regressão linear.

4.6.5.2 Determinação de NO

A determinação de NO foi realizada utilizando o método colorimétrico descrito por (GRIESS, 1879). A reação determina a concentração de NO_2 que é proporcional ao NO presente no sobrenadante celular, usando o reagente sulfanilamida 1 % (solução A) em meio ácido. O composto diazo, formado nessa reação, reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED – solução B) 0,1 %, formando um composto rosa que pode ser quantificado por espectrofotometria em um comprimento de onda de 540 nm entre 10 min e 2 horas. Para esta análise, foi utilizado uma curva padrão, através da diluição de uma solução estoque de nitrito de sódio (NaNO_2) em PBS 1 \times . O reagente de Griess [solução A + solução B (100 μL)] foi adicionado em todos os poços (branco, padrões e sobrenadante celular). Para este experimento, foi utilizado 100 μL do sobrenadante da cultura de esferoides de cada condição 3D.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão de ensaios realizados em duplicata ou triplicata em dias alternados. A análise estatística foi realizada pelo programa *Graphpad Prism*®, utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste Bonferroni e Dunnett's ou, t-Student não pareado para comparação com grupo controle. A significância estatística foi considerada em $p < 0,05$.

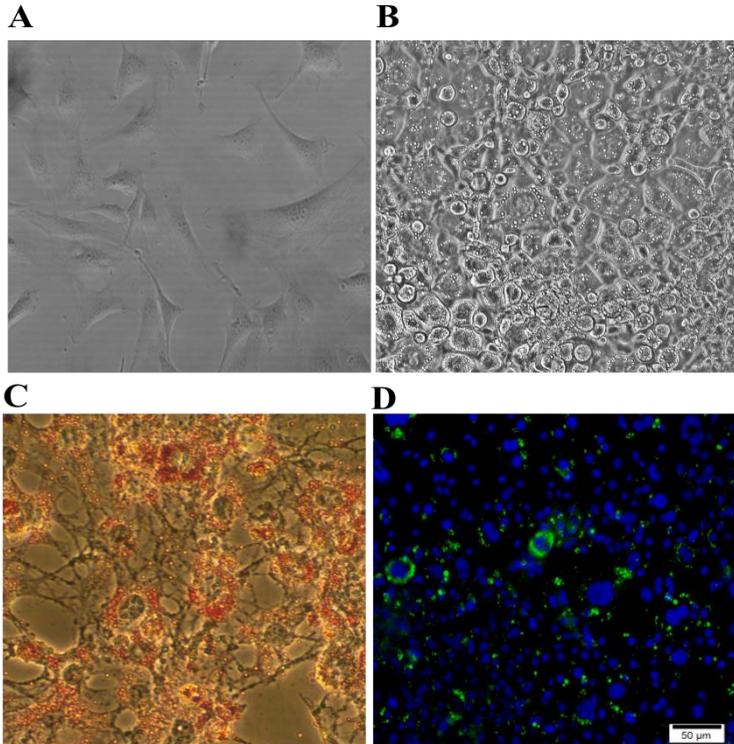
5 RESULTADOS

5.1 DIFERENCIAÇÃO DE PRÉ-ADIPÓCITOS 3T3-L1 UTILIZANDO MODELO 2D

O protocolo de diferenciação adipogênica da linhagem de pré-adipócitos foi estabelecido em modelo 2D. Para induzir a adipogênese, os pré-adipócitos 3T3-L1 foram submetidos ao MDI e após 7 dias, as células diferenciadas foram coradas com OR ou NR e visualizadas em microscópio de luz ou fluorescência.

Durante a fase de proliferação, os pré-adipócitos 3T3-L1 apresentam morfologia semelhante a fibroblastos (Figura 9 A). No entanto, quando expostos a um meio hormonal específico, estas células reiniciam o ciclo celular, sofrem expansão clonal e entram na fase de diferenciação terminal, apresentando alteração da morfologia e armazenamento de lipídeos intracelulares, como demonstrado na Figura 9 B. Neste trabalho, os lipídeos foram visualizados em vermelho na microscopia de luz, após a coloração com OR (Figura 9 C) e, em verde, na microscopia de fluorescência, após a coloração com NR (Figura 9 D). Ainda, nesta última análise, a marcação com DAPI proporcionou a visualização do núcleo das células.

Figura 9: Diferenciação adipogênica da linhagem 3T3-L1



(A) Pré-adipócitos. Aumento de 200× (B) Pré-adipócitos diferenciados em adipócitos. Aumento 200× (C) Pré-adipócitos diferenciados em adipócitos corados com OR. Aumento de 200×. (D) Pré-adipócitos diferenciados em adipócitos corados com NR (verde) e DAPI (azul). Barra de escala: 50 μm .

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO 3D TIPO TECIDO ADIPOSEO

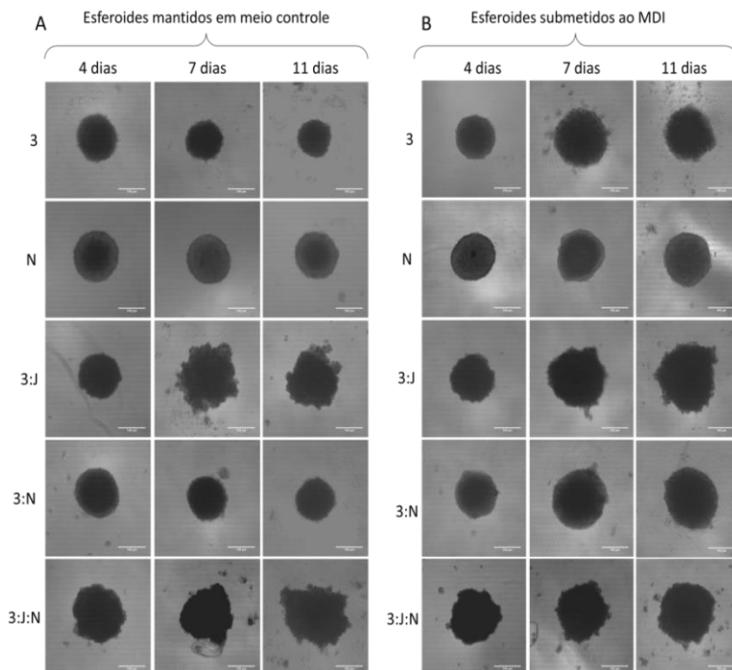
5.2.1 Formação e tamanho dos esferoides

Neste trabalho, propomos dois modelos de monoesferoides e três modelos de heteroesferoides. Todas as análises foram realizadas comparando os esferoides mantidos em meio controle (DMEM + 10 % CS) com os esferoides submetidos ao MDI.

Para que as células formem agregados únicos com formato de esfera, a aderência das células na placa deve ser impedida. Para isso, uma camada de gel de agarose foi utilizada. A concentração de agarose usada neste estudo foi de 2 % por já ter sido testada nos experimentos de cultura 3D de Saleh (2017). Além disso, conforme descrito no mesmo estudo, a densidade celular utilizada foi de $1,2 \times 10^4$ células/poço em placa de 96 poços.

Como pode ser observado na Figura 10 A e B, houve a formação de esferoides em todos os modelos testados, tanto na condição controle quanto na condição MDI e ainda, o crescimento entre os modelos ocorreu de forma homogênea.

Figura 10: Formação de mono e heteroesferoides

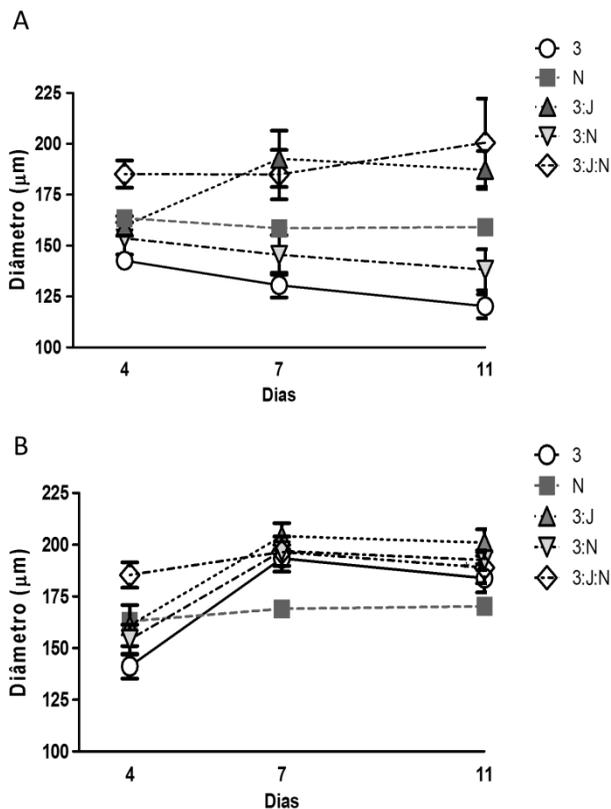


Imagens representativas da formação de esferoides mantidos em meio controle (A) e expostos ao MDI (B) no período de tempo analisado. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Barra de escala: 100 μ m.

O tamanho dos esferoides foi avaliado no dia 4, 7 e 11, através da medida do diâmetro (horizontal) de todos os modelos 3D. O perfil do crescimento de cada condição (controle e MDI) está apresentado na Figura 11 A e B respectivamente. Os resultados obtidos (Figura 11 A e Tabela 3) indicam que alguns dos modelos esferoides mantidos em meio controle apresentaram diminuição do tamanho. O monoesferoide formado pela linhagem 3T3-L1 (3), por exemplo, foi o modelo que apresentou o menor tamanho no 11º dia de cultivo. No entanto, o modelo de heteroesferoide formado pelas linhagens 3T3-L1+J774 (3:J) foi o único que apresentou característica de crescimento no 11º dia de cultivo. Adicionalmente, o heteroesferoide formado pelas três linhagens 3T3-L1+J774+NIH/3T3 (3:J:N) apresentou o maior tamanho no 4º dia, e manteve-se constante ao longo do tempo apresentando tamanho máximo de $200,6 \pm 21,66 \mu\text{m}$ de diâmetro no 11º dia de cultivo.

A análise do diâmetro dos esferoides submetidos ao MDI (Figura 11 B e Tabela 4) indica que estes modelos apresentaram aumento do tamanho quando expostos ao meio hormonal. O heteroesferoide 3:J:N apresentava o maior diâmetro no dia 4, no entanto, no dia 7, todos os outros modelos exibiram tamanho semelhante a ele, com exceção do monoesferoide de NIH/3T3 (N), que foi o único modelo que não apresentou aumento de tamanho quando exposto ao meio hormonal em todos os dias analisados

Figura 11: Representação gráfica do diâmetro dos modelos esféricos formados em meio controle ou MDI



Perfil de crescimento de esféricos mantidos em meio controle (A) e MDI (B).
 Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3;
 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Dados expressos como média \pm desvio padrão,
 n=3.

Tabela 3: Diâmetro dos modelos esferoides mantidos em meio controle

	Diâmetro (μm)		
	Dia 4	Dia 7	Dia 11
3	142,6 \pm 3,04 ***	130,6 \pm 6,04 ***	120,2 \pm 5,91 ***
N	163,5 \pm 9,85 *** γ	158,5 \pm 3,11 *** γ	159,1 \pm 6,60 *** γ
3:J	159,7 \pm 4,85 *** β	192,6 \pm 13,86 $\gamma \epsilon$	187,2 \pm 9,28 $\gamma \delta$
3:N	153,6 \pm 7,87 ***	145,5 \pm 9,72 ***	138,2 \pm 10,07 *** ϕ
3:J:N	185,2 \pm 6,65	184,9 \pm 12,14	200,6 \pm 21,66

Diâmetro dos esferoides controles no dia 4, 7 e 11. Dados expressos como média \pm desvio padrão, n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. *** (p < 0,001) em relação ao modelo 3:J:N no dia 4, 7 e 11; γ (p < 0,001) em relação ao modelo 3 no dia 4, 7 e 11; β (p < 0,01) em relação ao modelo 3 no dia 4; ϵ (p < 0,001) em relação ao modelo N e 3:N no dia 7; δ (p < 0,01) em relação ao modelo N no dia 11; ϕ (p < 0,05) em relação ao modelo N no dia 11. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3

Tabela 4: Diâmetro dos modelos esferoides submetidos ao MDI

	Diâmetro (μm)		
	Dia 4	Dia 7	Dia 11
3	141,2 \pm 6,00 ***	193,4 \pm 6,42	183,8 \pm 6,89
N	162,9 \pm 3,37 *** γ	169,0 \pm 5,87 *** γ	170,2 \pm 9,45 ** α
3:J	160,9 \pm 9,89 *** γ	204,0 \pm 6,33 $\phi\phi\phi$	201,0 \pm 6,43 $\phi\phi\phi \beta$
3:N	154,1 \pm 7,21 *** α	196,8 \pm 7,11 $\phi\phi\phi$	192,5 \pm 4,75 $\phi\phi\phi$
3:J:N	185,3 \pm 6,11	196,4 \pm 4,29	188,8 \pm 7,54

Diâmetro dos esferoides submetidos ao MDI no dia 4, 7 e 11. Dados expressos como média \pm desvio padrão, n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. *** (p < 0,001) em relação ao modelo 3:J:N no dia 4 e 7; γ (p < 0,001) em relação ao modelo 3 no dia 4 e 7; α (p < 0,05) em relação ao modelo 3 no dia 4 e 11; $\phi\phi\phi$ em relação ao modelo N no dia 7 e 11; ** (p < 0,01) em relação ao modelo 3:J:N no dia 11; β (p < 0,01) em relação ao modelo 3 no dia 11. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3.

Da mesma forma, quando cada condição foi comparada entre si em função do tempo (Tabela 5), o monoesferoide de 3T3-L1 e o heteroesferoide de 3T3-L1+NIH/3T3 (3:N), foram os modelos que apresentaram a maior redução de tamanho, 15,6 e 10 % respectivamente, no 11º dia de cultivo 3D quando comparados ao tamanho apresentado no 4º dia. No entanto, como observado na análise anterior, o heteroesferoide 3:J apresentou aumento no tamanho tanto na condição controle quanto na condição MDI (17 e 25 % respectivamente) e, o modelo 3:J:N, exibiu tamanho constante ao longo do tempo.

O MDI, de maneira geral, contribuiu com o aumento do tamanho de alguns modelos esféricos ao longo do tempo (Tabela 6). O monoesferoide de 3T3-L1 e os heteroesferóides de 3:J e 3:N foram os modelos que apresentaram maior aumento no tamanho quando expostos ao MDI. O monoesferoide de 3T3-L1, por exemplo, apresentou um aumento de 30 % no 11º dia em relação ao 4º dia de cultivo 3D. Ainda, é possível notar que o monoesferoide de NIH/3T3 e o heteroesferoide de 3:J:N não apresentaram alterações significativas no tamanho tanto na presença quanto na ausência do MDI

Tabela 5: Diâmetro dos modelos esféricos mantidos em meio controle em função do tempo

	Diâmetro (μm)		
	Dia 4	Dia 7	Dia 11
3	142,6 \pm 3,049	130,6 \pm 6,049 **	120,2 \pm 5,919 ***
N	163,5 \pm 9,851	158,5 \pm 3,111	159,1 \pm 6,603
3:J	159,7 \pm 4,857	192,6 \pm 13,86 ***	187,2 \pm 9,284 ***
3:N	153,6 \pm 7,871	145,5 \pm 9,727	138,2 \pm 10,07 *
3:J:N	185,2 \pm 6,650	184,9 \pm 12,14	200,6 \pm 21,66

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Dados expressos como média \pm desvio padrão, n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Dunnett's. * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,001$) em relação ao dia 4.

Tabela 6: Diâmetro dos modelos esféricos submetidos ao MDI em função do tempo

	Diâmetro (μm)		
	Dia 4	Dia 7	Dia 11
3	141,2 \pm 6,003	193,4 \pm 6,427 ***	183,8 \pm 6,896 ***
N	162,9 \pm 3,375	169,0 \pm 5,871	170,2 \pm 9,459
3:J	160,9 \pm 9,897	204,0 \pm 6,337 ***	201,0 \pm 6,437 ***
3:N	154,1 \pm 7,219	196,8 \pm 7,110 ***	192,5 \pm 4,752 ***
3:J:N	185,3 \pm 6,116	196,4 \pm 4,298 *	188,8 \pm 7,548

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Dados expressos como média \pm desvio padrão, n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Dunnett's. * (p < 0,05) ** (p < 0,01) *** (p < 0,001) em relação ao dia 4.

Adicionalmente, foi possível analisar a influência do MDI no crescimento dos modelos esféricos no 7º e no 11º dia de cultivo 3D. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 7, o monoesferoide de 3T3-L1 apresentou aumento no tamanho de 41,5 % no dia 7 e 53 % no dia 11 quando comparado ao mesmo modelo mantido em meio controle, já o heteroesferoide 3:N, apresentou um aumento de 39 % quando comparado ao modelo mantido em meio controle no 11º dia de cultivo. De maneira geral, os resultados demonstram que o MDI contribuiu com o crescimento de todos os modelos esféricos com exceção do modelo 3:J:N que apresentou tamanho constante mesmo em condição controle.

Tabela 7: Influência do MDI no crescimento dos modelos esferoides

Diâmetro (μm) Dia 7		
	CONTROLE	MDI
3	130,6 \pm 6,04	193,4 \pm 6,42***
N	158,5 \pm 3,11	169,0 \pm 5,87**
3:J	192,6 \pm 13,86	204,0 \pm 6,33
3:N	145,5 \pm 9,72	196,8 \pm 7,11***
3:J:N	184,9 \pm 12,14	196,4 \pm 4,29

Diâmetro (μm) Dia 11		
	CONTROLE	MDI
3	120,2 \pm 5,91	183,8 \pm 6,89***
N	159,1 \pm 6,60	170,2 \pm 9,45*
3:J	187,2 \pm 9,28	201,0 \pm 6,43*
3:N	138,2 \pm 10,07	192,5 \pm 4,75***
3:J:N	200,6 \pm 21,66	188,8 \pm 7,54

Diâmetro dos esferoides mantidos em meio controle e MDI no 7º e 11º dia de cultivo 3D. Valores expressos em média \pm desvio padrão, n=3. Análise estatística por t-Student não pareado. * ($p < 0,05$) ** ($p < 0,01$) *** ($p < 0,001$). Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3.

5.2.1 Número e viabilidade celular dos esferoides

A análise do número total de células (viáveis e não-viáveis) por esferoide foi realizada através da quantificação celular no 11º dia de cultivo 3D. Adicionalmente, foi determinada a porcentagem de células viáveis em todos os modelos (Tabela 8 e Figura 12).

De maneira geral, o monoesferoide de NIH/3T3 foi o modelo que apresentou o maior número de células totais. Além disso, mesmo que o número de células totais tenha diminuído se comparado com o total de células plaqueadas para a formação dos modelos esferoides ($1,2 \times 10^4$ células/poço), os modelos mantidos em condição controle e MDI apresentaram uma viabilidade média de 81,01 % e 85,53 % respectivamente. Adicionalmente, apesar de não significativo, pode-se perceber que o MDI contribuiu com o aumento da viabilidade celular e do número total de células. O heteroesferoide 3:J, por exemplo, apresentou uma viabilidade de $66,76 \pm 7,68$ % na condição controle e $79,78 \pm 4,43$ % na condição MDI e, o heteroesferoide 3:J:N, apresentou uma viabilidade de $76,87 \pm 15,17$ e $84,49 \pm 8,33$ % na condição controle e MDI respectivamente.

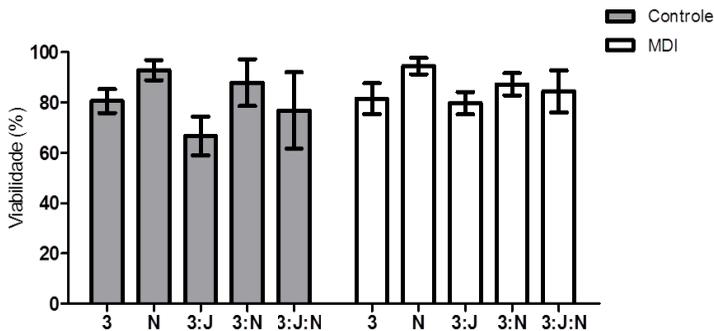
Tabela 8: Número e viabilidade celular dos esferoides no 11º dia de cultivo 3D

	Total/Controle	Viáveis (%)
3	1730 ± 500,2	80,63 ± 4,77
N	3216 ± 646,8	92,85 ± 3,99
3:J	1084 ± 109,6 *	66,76 ± 7,68
3:N	2391 ± 1346	87,95 ± 9,30
3:J:N	1162 ± 511,8 *	76,87 ± 15,17

	Total/MDI	Viáveis (%)
3	2490 ± 1100	81,55 ± 6,17
N	4446 ± 1260	94,56 ± 3,26
3:J	1711 ± 607,1	79,78 ± 4,43
3:N	3732 ± 1873	87,26 ± 4,41
3:J:N	1925 ± 804,1	84,49 ± 8,33

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Valores expressos em média ± desvio padrão, n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. * ($p < 0,05$) em relação ao modelo N da condição controle.

Figura 12: Viabilidade celular dos esferoides no 11º dia de cultivo 3D



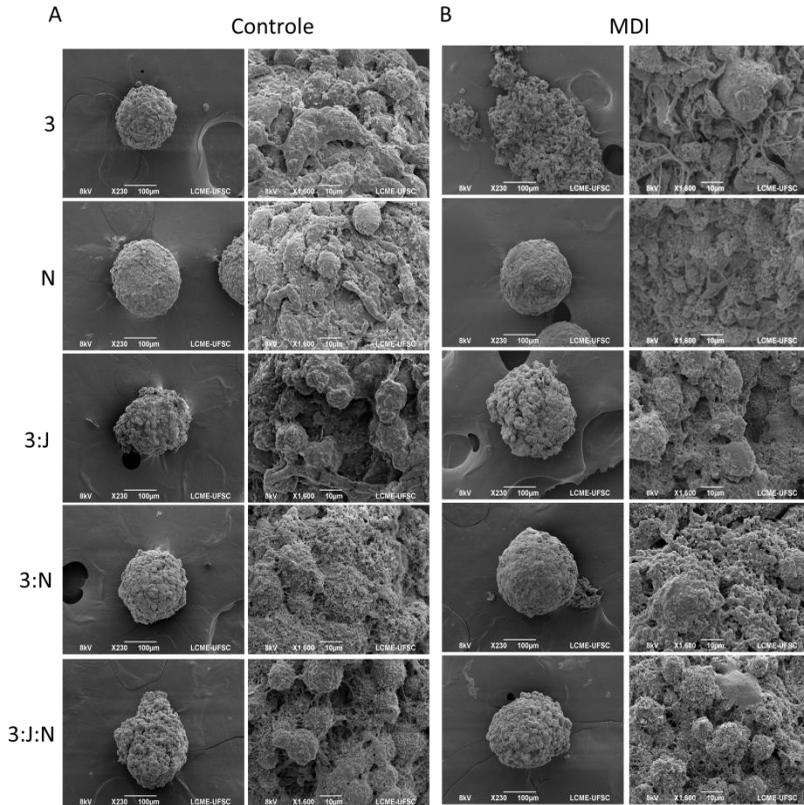
O gráfico apresenta a porcentagem de células viáveis em todos os modelos esferoides mantidos em meio controle ou MDI respectivamente. Dados expressos em média ± desvio padrão, n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3.

5.2.2 Morfologia celular

A estrutura superficial de cada modelo 3D foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura após 11 dias de cultivo, conforme ilustrado na Figura 13.

De maneira geral, tanto os modelos esferoides formados na condição controle quanto na condição MDI exibiram uma superfície rugosa, sendo possível a visualização das células. Apenas os monoesferoides de 3T3-L1 e NIH/3T3 formados na condição controle, apresentaram uma superfície um pouco mais lisa. Além disso, o maior aumento da microscopia eletrônica de varredura permitiu observar a intensa conexão entre as células em todas as condições e também a presença de estruturas em forma de fibras principalmente no heteroesferoide 3:J:N da condição controle e no monoesferoide 3T3-L1 submetido ao MDI. Além disso, este último apresentou formato mais irregular e menos compacto.

Figura 13: Análise morfológica dos esferoides por microscopia eletrônica de varredura



Diferenças na morfologia externa de cada modelo de esferoide 3D mantido em meio controle (A) ou submetido ao MDI (B). Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3.

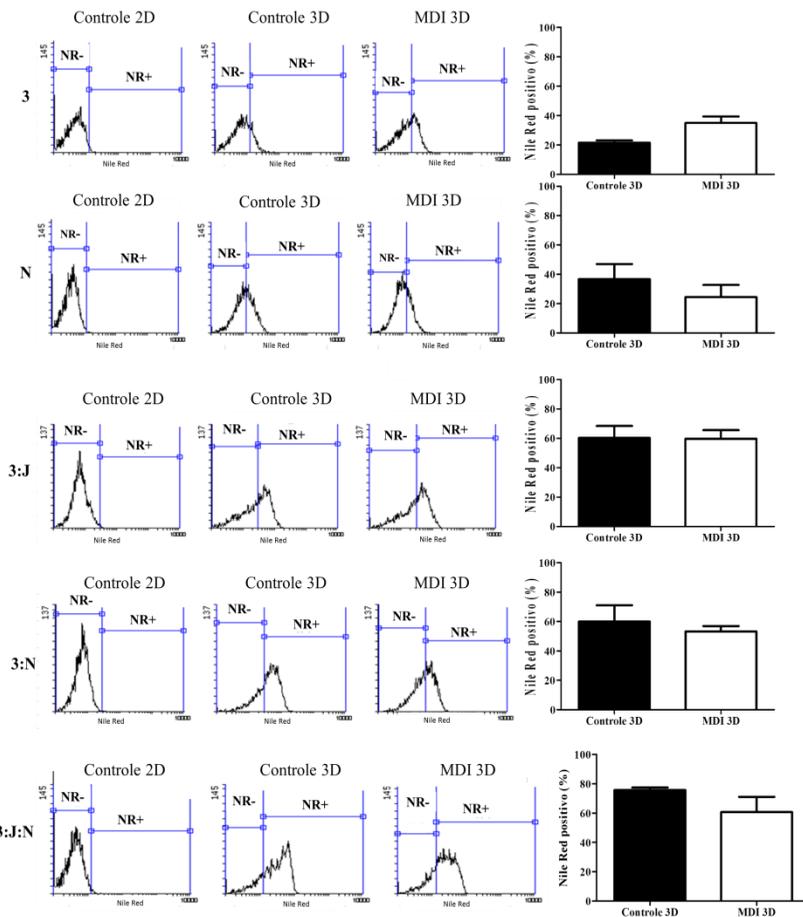
5.2.3 Diferenciação adipogênica

5.2.3.1 Quantificação de lipídeo intracelular

A quantificação de lipídeos intracelulares foi realizada por citometria de fluxo utilizando o marcador fluorescente *Nile red* (NR). Exclusivamente para esta metodologia, células cultivadas em modelo

2D e não diferenciadas foram usadas como controle negativo. A Figura 14 apresenta os histogramas das células na condição 2D não diferenciadas e na condição controle e MDI 3D, dos cinco modelos de esferoides analisados. Além disso, o gráfico representativo da porcentagem de células NR positivas de cada modelo em cada condição também está apresentado. Após a aquisição das células no citômetro de fluxo, o total de eventos adquiridos em cada modelo foi ajustado para 5000 eventos. A porcentagem de fluorescência foi obtida através da análise estatística fornecida pelo programa *Flowing 2.5*.

Figura 14: Perfil de marcação e porcentagem de células diferenciadas/*Nile Red* positivas



Representação em histogramas do perfil de marcação com *Nile red* das células em monocamada e provenientes de esferoides em condição controle e MDI respectivamente. Representação gráfica da porcentagem de células *Nile red* positivas. Análise estatística por t-Student não pareado, n=3. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N = 3T3-L1:J774:NIH/3T3. NR: *Nile red*.

Nesta metodologia, surpreendentemente, os modelos esferoides mantidos em condição controle apresentaram diferenciação adipogênica. Sendo assim, não houve diferença significativa no percentual de células

NR positivas entre a condição controle e MDI (Figura 14). No entanto, foi observado que os modelos de heteroesferoides promoveram aumento no percentual de células NR positivas quando comparados aos modelos de mono-esferoides (Tabela 9). O heteroesferoide de 3:J, por exemplo, apresentou um aumento no percentual de células NR positivas tanto na condição controle quanto na condição MDI de 2,8 e 1,7 x respectivamente, quando comparado com o mono-esferoide de 3T3-L1. Já o heteroesferoide de 3:J:N da condição controle, exibiu aumento de 3,5 x no percentual de células NR positivas quando comparado ao mono-esferoide de 3T3-L1 e 2 x quando comparado ao mono-esferoide de NIH/3T3. Com esses resultados é possível inferir que a co-cultura estimula a diferenciação adipogênica da linhagem de pré-adipócitos e fibroblastos.

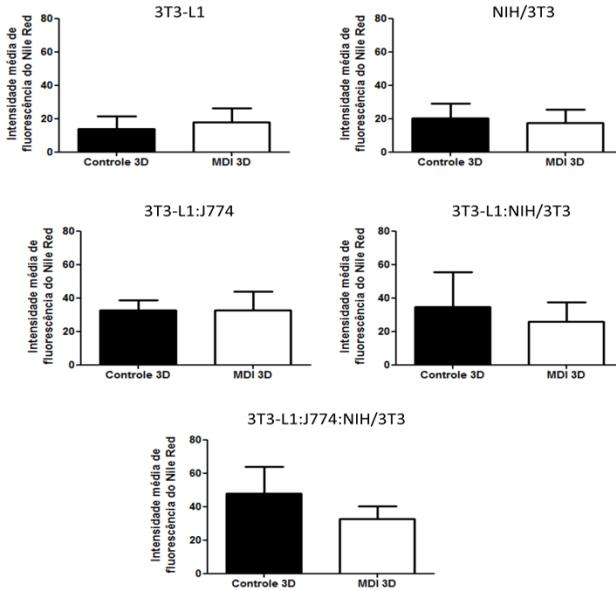
Tabela 9: Porcentagem média de células diferenciadas/*Nile red* positivas

	<i>Nile red</i> positivo (%)	
	Controle	MDI
3	21,57 ± 1,59 ***	34,97 ± 4,36 *
N	36,75 ± 10,17 **	24,58 ± 8,13 **
3:J	60,39 ± 8,10 β	59,75 ± 5,85 α γ γ
3:N	59,97 ± 11,13 α	53,31 ± 3,63 φ φ
3:J:N	75,73 ± 1,70	60,74 ± 10,39

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Dados expressos como média ± desvio padrão, n=3. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. *** (p < 0,001) ** (p < 0,01) * (p < 0,05) em relação ao modelo 3:J:N; β (p < 0,01) em relação ao modelo 3; α (p < 0,05) em relação ao modelo 3; γ γ (p < 0,01) em relação ao modelo N; φ φ (p < 0,01) em relação ao modelo N.

Adicionalmente, a intensidade média de fluorescência das células marcadas com NR em todos os modelos de esferoides também foi avaliada (Figura 15 e Tabela 10). Da mesma forma, como observado na análise anterior, os heteroesferoides das condições controle e MDI apresentaram maior intensidade média de fluorescência do que os modelos de mono-esferoides.

Figura 15: Intensidade média de fluorescência de mono e heteroesferoides mantidos em condição controle ou submetidos ao MDI



Os gráficos representam a intensidade média de fluorescência dos cinco modelos esféricos mantidos em condição controle ou submetidos ao MDI. Análise estatística por t-Student não pareado, $n=2$.

Tabela 10: Intensidade média de fluorescência de mono e heteroesferoides

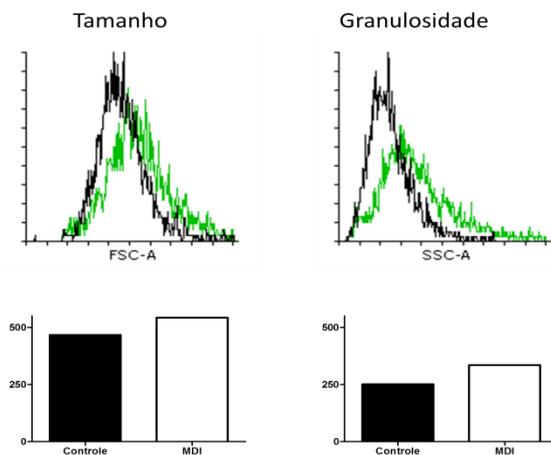
	Intensidade média de fluorescência	
	Controle	MDI
3	13,89 ± 7,70	17,91 ± 8,41
N	20,13 ± 9,05	17,54 ± 7,98
3:J	32,55 ± 6,28	32,52 ± 11,42
3:N	34,47 ± 20,83	26 ± 11,36
3:J:N	47,99 ± 16,02	32,85 ± 7,49

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Dados expressos como média ± desvio padrão, $n=2$.

5.2.3.2 Tamanho e granulosidade

A citometria de fluxo também permitiu avaliar características de diferenciação adipogênica avaliando o tamanho e a granulosidade das células. A estratégia de *gating* partiu da análise do *dot plot* de pré-adipócitos (3T3-L1) cultivados em modelo 2D submetidos a diferenciação adipogênica sendo estes, comparados àqueles mantidos em condição controle (Figura 16). A partir desta estratégia, os *dot plots* de todos os modelos de esferoide foram analisados (Apêndice A).

Figura 16: Análise do tamanho e da granulosidade de pré-adipócitos cultivados em modelo 2D submetidos ou não a diferenciação adipogênica

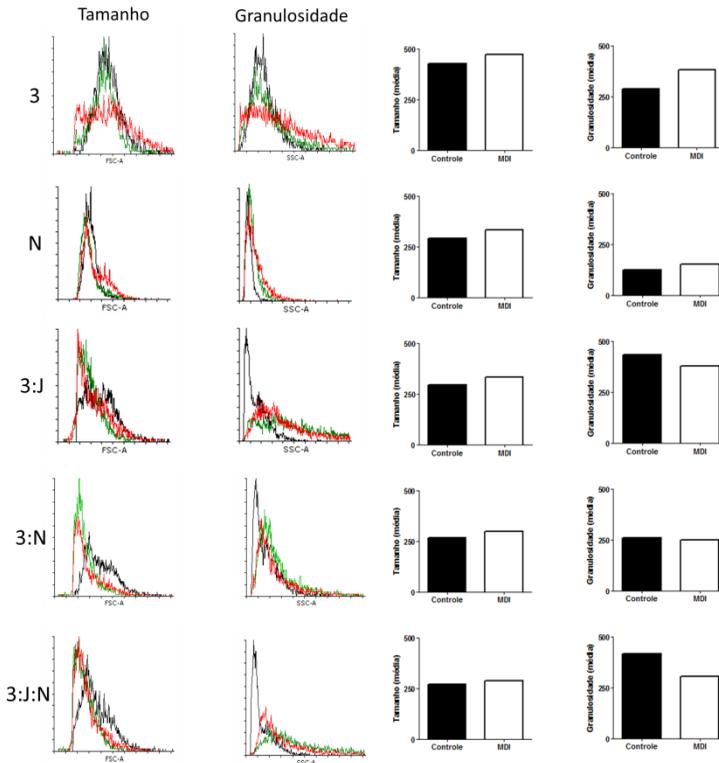


Representação em histogramas do tamanho e da granulosidade respectivamente de pré-adipócitos (3T3-L1) cultivados em modelo 2D mantidos em condição controle (linha preta) ou submetidos a diferenciação adipogênica (linha verde). Representação gráfica do tamanho e granulosidade média de pré-adipócitos (3T3-L1) cultivados em modelo 2D em condição controle ou MDI, n=1. Legenda: FSC-A: tamanho; SSC-A: granulosidade.

Como pode ser observado na Figura 16, o MDI influenciou no aumento do tamanho e da granulosidade dos pré-adipócitos 3T3-L1 cultivados em modelo 2D. Quando esta mesma análise foi realizada para os cinco modelos esferoides mantidos em condição controle ou MDI (Figura 17 e Tabela 11), percebe-se que, de maneira geral, não houve diferença no tamanho e granulosidade das células entre as condições

controle e MDI. No entanto, nota-se que as células presentes no monoesferoide de 3T3-L1 da condição controle, apresentaram um tamanho médio de 473,3, enquanto que as células presentes no monoesferoide de NIH/3T3 apresentaram um tamanho médio de 335,3.

Figura 17: Análise do tamanho e da granulosidade de mono e heteroesferoides mantidos em condição controle ou submetidos ao MDI



Representação em histogramas do tamanho e da granulosidade das células em monocamada em condição controle (linha preta) e provenientes de esferoides mantidos em condição controle (linha verde) ou submetidos ao meio MDI (linha vermelha). Representação gráfica do tamanho e granulosidade média de cada modelo 3D em condição controle ou MDI, n=1. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. FSC-A: tamanho; SSC-A: granulosidade.

Tabela 11: Tamanho e granulosidade média das células em mono e heteroesferoides

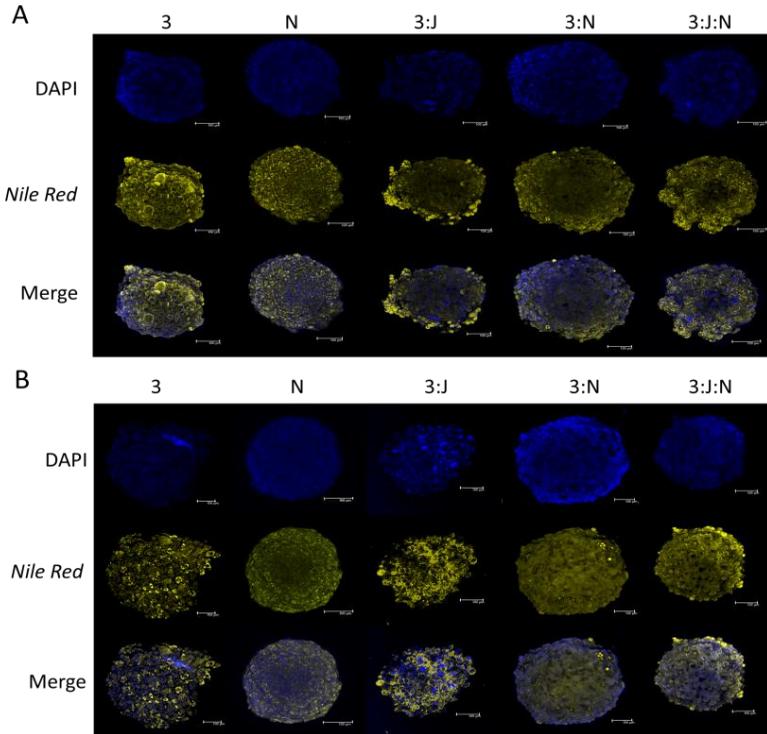
	Tamanho (FSC-A)		Granulosidade (SSC-A)	
	Controle	MDI	Controle	MDI
3	429,3	473,3	289,5	382,2
N	292,9	335,3	124,6	154,0
3:J	294,6	333,5	436,1	377,9
3:N	266,3	298,2	262,0	251,9
3:J:N	270,4	289,9	416,1	305,7

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Dados expressos como média, n=1.

5.2.3.3 Diferenciação adipogênica por microscopia confocal

A diferenciação adipogênica dos modelos esferoides mantidos em condição controle ou submetidos ao meio MDI também foi visualizada por microscopia confocal, sendo possível a visualização do núcleo das células corados em azul com DAPI, as gotículas lipídicas em amarelo com NR, bem como, a sobreposição das imagens (Figura 18).

Figura 18: Visualização da diferenciação adipogênica por microscopia confocal



A figura ilustra a marcação dos lipídeos intracelulares em amarelo marcados com *Nile red* e o núcleo das células presentes nos esferoides marcados em azul com DAPI. (A) Esferoides mantidos em meio controle. (B) Esferoides submetidos a diferenciação adipogênica. Imagens de projeção máxima. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N = 3T3-L1:J774:NIH/3T3. n=2.

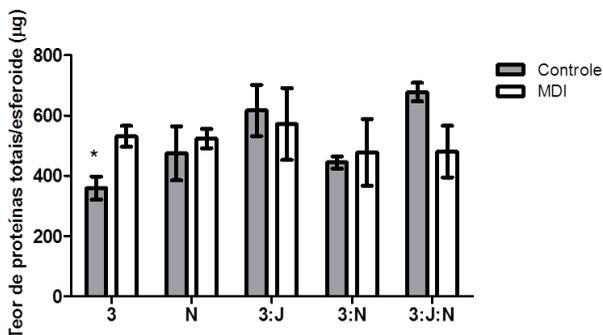
5.2.4 Perfil de liberação de NO

A caracterização dos modelos esferoides tipo tecido adiposo foi finalizada após a análise do perfil inflamatório das células presentes nos esferoides.

Para analisar o perfil inflamatório das células foi determinado a concentração de NO_2 (nitrito), proporcional ao NO presente no sobrenadante celular dos esferoides coletado após 11 dias de cultivo 3D. Os resultados obtidos nesta análise correspondem à produção basal de NO pelas células, ou seja, não foram utilizados agentes estimuladores nesta metodologia.

Pelo fato de os modelos esferoides terem apresentado número total de células diferentes entre si, os resultados de NO_2 obtidos foram normalizados pela quantidade total de proteínas em cada modelo de esferoide. Os resultados do teor de proteínas totais/esferoide estão apresentados na Figura 19 e Tabela 12. O sobrenadante celular utilizado para a quantificação de NO_2 foi proveniente dos esferoides usados para a quantificação de proteínas totais. As curvas analíticas e equações da reta encontram-se no apêndice B deste trabalho.

Figura 19: Determinação de proteínas totais



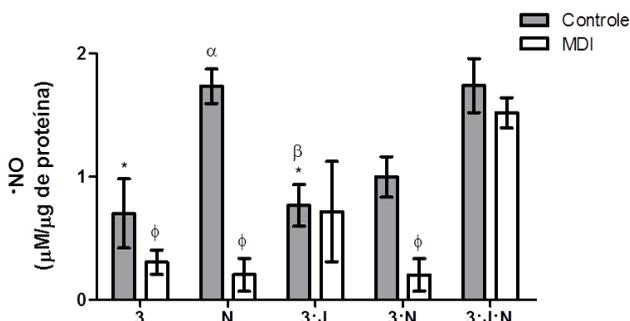
O gráfico apresenta o teor de proteínas totais produzidas por cada modelo esferoide em condição controle ou MDI respectivamente, após 11 dias de cultivo 3D. Análise estatística por t-Student não pareado. * ($p < 0,05$), $n=3$. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N = 3T3-L1:J774:NIH/3T3.

Tabela 12: Determinação de proteínas totais

	Proteínas totais/esferoide (μg)	
	Controle	MDI
3	359,3 \pm 38,12	530,9 \pm 34,92
N	474,5 \pm 89,62	523,7 \pm 31,97
3:J	616,8 \pm 85,12	571,7 \pm 119,5
3:N	444,0 \pm 20,19	477,9 \pm 110,0
3:J:N	677,5 \pm 30,71	480,6 \pm 85,76

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Valores expressos em média \pm desvio padrão, n=3.

Os resultados obtidos na determinação de NO_2 (Figura 20) indicam que o heteroesferoide de 3:J:N foi o modelo que produziu maior concentração de NO_2 em ambas as condições (controle e MDI), não havendo diferenças entre si ($1,7 \pm 0,2$ vs $1,5 \pm 0,1$) (Tabela 13). Este resultado sugere que o processo de diferenciação adipogênica que ocorre no heteroesferoide 3:J:N é capaz de gerar um ambiente pró-inflamatório. Sendo assim, o conjunto de resultados obtidos até o momento sugere a formação de um modelo 3D *in vitro* tipo tecido adiposo que exibiu perfil inflamatório sem a presença de um mediador.

Figura 20: Determinação de NO após 11 dias de cultivo 3D

Perfil de liberação basal de NO no sobrenadante de esferoides mantidos em meio controle ou submetidos ao MDI. Dados expressos como média \pm desvio padrão, $n=3$. Análise estatística por ANOVA de uma via seguido de pós-teste Bonferroni. * ($p < 0,05$) em relação ao modelo 3:J:N; α ($p < 0,05$) em relação ao modelo 3; β ($p < 0,05$) em relação ao modelo N; ϕ ($p < 0,05$) em relação ao modelo 3:J:N. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3.

Tabela 13: Determinação de NO após 11 dias de cultivo 3D

	NO ($\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína)	
	Controle	MDI
3	$0,69 \pm 0,28$	$0,30 \pm 0,09$
N	$1,73 \pm 0,14$ **	$0,20 \pm 0,13$
3:J	$0,76 \pm 0,16$	$0,71 \pm 0,40$
3:N	$0,99 \pm 0,16$ *	$0,20 \pm 0,13$
3:J:N	$1,74 \pm 0,21$	$1,51 \pm 0,12$

Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N= 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N= 3T3-L1:J774:NIH/3T3. Valores expressos como média \pm desvio padrão, $n=3$. Análise estatística por t-Student não pareado. * ($p < 0,05$) ** $p < 0,01$.

6 DISCUSSÃO

O tecido adiposo (TA) é responsável por regular uma variedade de processos fisiológicos no organismo e por essa razão, deixou de ser visto apenas como um reservatório de energia e passou a ser reconhecido como um importante órgão endócrino. Por ser capaz de alterar seu microambiente em função da hipertrofia dos adipócitos em casos de obesidade, a disfunção desse órgão está diretamente relacionada com a progressão da síndrome metabólica (CHOE et al., 2016; COOKE et al., 2016). Desta forma, muitos estudos *in vitro* têm focado no entendimento do microambiente do TA e sua relação na saúde e na doença. Porém, a maioria desses estudos são realizados em modelos *in vitro* bidimensional (2D) que falham em recapitular a arquitetura tridimensional (3D) e multicelular encontrada em tecidos vivos (BRADLEY; FISHER; MARATOS-FLIER, 2008; LI et al., 2016; SCHMID et al., 2005; SOUZA et al., 2003).

Neste trabalho, primeiramente estabelecemos o protocolo de diferenciação das células 3T3-L1 em modelo 2D. Segundo o estudo desenvolvido por Guo et al. (2009), o tempo de 48 h pós-confluência promove inibição do crescimento celular por contato e esse fator é fundamental para uma diferenciação adipogênica efetiva. Desta forma, o protocolo estabelecido foi o de adição do MDI após 48 h de confluência com um tempo total de diferenciação de 7 dias. O mesmo protocolo foi usado para a diferenciação das células no modelo 3D.

A diferenciação adipogênica foi confirmada por marcação dos lipídeos intracelulares com *oil red O* e *Nile red*. Tanto *oil red O* quanto *Nile red* são empregados para a detecção de lipídeo intracelular. No entanto, o *Nile red* pode ser aplicado em células dissolvidas em meio aquoso e sua fluorescência será apenas detectada na presença de lipídeos, enquanto que o *oil red O*, limita-se a dissolução em solventes orgânicos, que podem influenciar na coloração e detecção dos lipídeos (FOWLER, STANLEY D. AND GREENSPAN, 1985).

Os modelos *in vitro* 3D utilizando a linhagem 3T3-L1 descritos até então, apresentam-se em sistemas de mono ou co-cultura utilizando duas (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; DAYA; LOUGHLIN; MACQUEEN, 2007; FISCHBACH et al., 2004; TURNER et al., 2014, 2015, 2017) ou três linhagens para a formação do esferoide (RAMA-ESENDAGLI et al., 2014), sendo que, este último foi desenvolvido para o estudo do microambiente tumoral.

O TA *in vivo* está em constante interação com uma variedade de células e componentes da MEC que juntos são responsáveis pelas

respostas celulares. Desta forma, é necessário que o microambiente *in vivo* seja recapitulado *in vitro* de modo que as células possam responder efetivamente a determinados estímulos. No entanto, modelos de co-cultura 3D são difíceis de serem estabelecidos. Como já mencionado, a maioria dos estudos de co-cultura envolvem no máximo três populações de células, uma vez que o aumento do número de populações pode resultar em um sistema altamente complexo e instável em relação às interações moleculares (GOERS; FREEMONT; POLIZZI, 2014).

A linhagem de pré-adipócitos 3T3-L1 tem sido amplamente descrita na literatura como modelo para o estudo da adipogênese (FARMER, 2006; GUO et al., 2009; OTTO; LANE, 2005) enquanto que, fibroblastos e macrófagos, têm sido utilizados associados à linhagem 3T3-L1 em modelos de co-cultura 2D para o estudo de vias inflamatórias e doenças metabólicas como o diabetes (NAKARAI et al., 2012; SUBRAMANIYAN; KIM; HWANG, 2016; SUGANAMI; NISHIDA; OGAWA, 2005). Além disso, em sistemas 3D, fibroblastos conferem suporte ao modelo esferoide (AMANN et al., 2014; RAMA-ESENDAGLI et al., 2014) enquanto que macrófagos são importantes mediadores da diferenciação adipogênica (CHAZENBALK et al., 2011).

Desta forma, os modelos 3D desenvolvidos neste trabalho foram criados baseado em um estudo tridimensional que utilizou uma linhagem tumoral de melanoma associada a macrófagos e fibroblastos (SALEH, 2017) para o estudo do microambiente tumoral. Sendo assim, desenvolvemos e caracterizamos dois modelos de monocultura (3T3-L1) e (NIH/3T3) e três modelos de co-cultura (3T3-L1 + J774), (3T3-L1 + NIH/3T3) e (3T3-L1 + J774 + NIH/3T3). Os esferoides foram obtidos através da técnica de sobreposição líquida (LOT, do inglês *liquid-overlay technique*) em placa de 96 poços revestida com gel de agarose na concentração 2 %.

Após a formação do esferoide que ocorre no 4º dia de cultura 3D, a diferenciação adipogênica foi induzida, conforme o protocolo estabelecido em modelo 2D. Adicionalmente, esferoides mantidos em meio padrão (DMEM + 10 % CS) foram usados como controle em todas as análises. Sendo assim, permaneceram em cultura pelo mesmo período de tempo daqueles expostos ao meio hormonal.

Ao final de 11 dias de cultura 3D, a estrutura dos esferoides se manteve nos cinco modelos estabelecidos neste estudo e, em ambas as condições, controle e MDI. De maneira geral, a tendência dos esferoides mantidos em meio controle foi de diminuição do tamanho, diferentemente dos esferoides expostos ao MDI.

Desta forma, foi possível estabelecer um modelo *in vitro* 3D tipo tecido adiposo composto por adipócitos, fibroblastos e macrófagos. Este modelo de co-cultura 3D permitiu a diferenciação adipogênica e ainda apresentou um perfil inflamatório, sendo estas características úteis para o estudo dos processos envolvidos no desenvolvimento da obesidade, podendo servir também como uma importante plataforma para o estudo de possíveis novos compostos para o tratamento da obesidade.

Um dos modelos avaliados neste estudo foi o monoesferoide de 3T3-L1. Foi observado que a organização 3D das células foi capaz de induzir a auto-diferenciação da linhagem 3T3-L1 na condição controle, embora a porcentagem de células *Nile red* positivas, a intensidade média de fluorescência, o tamanho das células e a granulosidade tenham sido relativamente menores quando comparadas com o monoesferoide da condição MDI. Além disso, o monoesferoide da condição controle apresentou uma diminuição de 15,6 % no tamanho ao longo dos 11 dias de cultivo 3D, enquanto que a condição MDI apresentou um aumento de 30 % no tamanho. Quando o crescimento do monoesferoide foi comparado entre as condições (controle e MDI), o aumento no tamanho foi de 41,5 % no dia 7 e 53 % no dia 11.

Outro estudo 3D utilizando a linhagem 3T3-L1, também demonstrou que a exposição dos esferoides ao meio de diferenciação adipogênica favoreceu o aumento no tamanho, quando comparados àqueles não expostos. No entanto, para a criação do modelo 3D, os autores utilizaram um polipeptídeo associado a um polímero como revestimento da placa de cultura. Neste estudo, os esferoides submetidos à diferenciação adipogênica apresentaram aumento no tamanho de $39 \pm 2 \mu\text{m}$ (3 dias após a formação) para $133 \pm 10 \mu\text{m}$ após 11 dias de cultura 3D (TURNER et al., 2015). Daquinag et al., (2013) desenvolveram um sistema 3D utilizando levitação magnética e também relataram aumento no tamanho de monoesferoides de 3T3-L1 submetidos à diferenciação adipogênica em relação aos controles.

No presente estudo, a diminuição do tamanho na condição controle juntamente com o baixo número de células sugerem o aumento da morte celular devido a falta de nutrientes. Segundo Stephan e colaboradores (2011), a quantidade de glicose e soro disponíveis para as células no ambiente 3D pode influenciar na capacidade de proliferação e sobrevivência das células no modelo. Outra possibilidade seria a inibição por contato exibida por pré-adipócitos quando não expostos ao MDI, como observado por Rama-Esendagli e colaboradores (2014).

Apesar de a diferenciação adipogênica ter sido observada na condição controle, o MDI além de ter sido um estímulo adicional para o

processo de diferenciação adipogênica, se mostrou importante para a manutenção do sistema. A suplementação do MDI (insulina + soro) suporta a maior demanda por nutrientes requerida pelas células diferenciadas (JACKSON et al., 2017). Além disso, outra diferença observada entre o monoesferoide de 3T3-L1 controle e MDI foi a presença de estruturas em forma de fibras através das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) na condição MDI. Embora no presente estudo não tenha sido avaliado os componentes específicos da MEC, estas estruturas já foram descritas como formas de colágeno importantes para o processo de comunicação celular durante a adipogênese (FISCHBACH et al., 2004). Além disso, de acordo com Ruehl e colaboradores (2005) o colágeno tipo XIV, um componente da MEC é expresso em tecidos diferenciados e é capaz de promover a diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos.

Outro modelo avaliado neste trabalho foi o monoesferoide de NIH/3T3. Apesar de ter sido o modelo que apresentou maior número e viabilidade celular, o tamanho apresentado por este modelo foi pequeno e constante. Isso pode ser explicado pelo intenso contato entre as células que contribuiu com a maior compactação do modelo. Estudos têm relatado que além dos pré-adipócitos, fibroblastos também são produtores de componentes da MEC como colágeno e fibronectina (AMANN et al., 2014; KURI-HARCUCH; ARGUELLO; MARSCH-MORENO, 1984; METZGER et al., 2011) que além de contribuírem com a diferenciação das células (RUEHL et al., 2005) conferem suporte e compactação do modelo esferoide e contribuem para a formação de uma superfície lisa como observado nas imagens de MEV. Além da compactação, o tamanho reduzido do monoesferoide pode ser devido ao pequeno tamanho das células pois, como observado nas análises de citometria de fluxo, as células presentes no monoesferoide de 3T3-L1 da condição MDI por exemplo, apresentaram um tamanho médio de 473,3 enquanto que as células no monoesferoide de NIH/3T3 apresentaram um tamanho médio de 335,3.

Apesar de ter apresentado um pequeno tamanho, o monoesferoide de NIH/3T3 apresentou marcação positiva para *Nile red*, como já relatado na literatura (SHAO et al., 2013). Os autores demonstraram que a linhagem NIH/3T3 foi capaz de se diferenciar em adipócitos quando exposta ao mesmo meio hormonal usado para pré-adipócitos 3T3-L1, no entanto, a presença do fator de transcrição C/EBP α não foi requerida para o processo de diferenciação de NIH/3T3.

Adicionalmente, no presente estudo, pode ser observado que o MDI parece ter uma discreta influência negativa na diferenciação destas

células. Embora tenha contribuído com o aumento em diâmetro deste modelo, as análises de citometria de fluxo mostraram que apesar de não significativa, a porcentagem de células *Nile red* positivas e a intensidade média de fluorescência foram menores no monoesferoide exposto ao MDI quando comparado ao controle. Os dados obtidos sugerem que o MDI no modelo de monoesferoide de NIH/3T3 parece não ter contribuído com o processo de diferenciação adipogênica.

No presente trabalho também foram desenvolvidos modelos de heteroesferoides ou co-cultura 3D. Um dos modelos de heteroesferoides foi formado pela linhagem de pré-adipócitos e macrófagos (3:J). Como pode ser observado, este modelo apresentou aumento no tamanho tanto na condição controle quanto na condição MDI ao longo do tempo de cultivo 3D (17 e 25 % respectivamente). O aumento no tamanho do esferoide pode ser explicado em razão do processo de diferenciação adipogênica ocorrido neste modelo. De acordo com os dados da citometria de fluxo, a co-cultura 3:J da condição controle apresentou porcentagem de células *Nile red* positivas 2,8 x maior que a monocultura de 3T3-L1. Já na condição MDI a porcentagem foi 1,7 x maior. Resultados semelhantes foram encontrados na análise da intensidade média de fluorescência.

A alta porcentagem de células *Nile red* positivas encontrada em ambas as condições (controle e MDI) pode ser justificada pela presença dos macrófagos. De acordo com a literatura, sistemas de co-cultura contendo cultura primária de macrófagos do tecido adiposo e células tronco derivadas do tecido adiposo induzem a formação de novos pré-adipócitos que exibem acúmulo de lipídeo intracelular e expressão gênica de fatores relacionados à adipogênese (CHAZENBALK et al., 2011). Além disso, os autores relataram que os pré-adipócitos formados após a co-cultura podem ter sido originados, em parte, a partir dos macrófagos derivados do tecido adiposo. Sendo assim, sugere-se que uma parte do percentual de células *Nile red* positivas encontradas no modelo heteroesferoide 3:J pode ter sido originada a partir dos macrófagos. Outra possível explicação para o aumento do tamanho pode estar relacionada com a presença de espaços internos nos modelos esferoides. Embora não tenham sido realizada análise da morfologia interna neste trabalho, alguns estudos associam a presença de espaços internos no esferoide com a diminuição da proliferação celular e consequente morte das células (GASKELL et al., 2016; SALEH, 2017; STEPHAN; JOHNSON; ROBERTS, 2011). Os espaços internos promovidos pela morte celular podem favorecer a reorganização das células remanescentes para uma área com maior concentração de

oxigênio (periferia) (GASKELL et al., 2016). Essa reorganização pode influenciar no aumento do tamanho dos esferoídes que não necessariamente está relacionado com o aumento da viabilidade. Além disso, mesmo que a porcentagem de células *Nile red* positivas tenha sido semelhante entre a condição controle e MDI, o número e a viabilidade celular do heteroesferoide 3:J da condição controle foi menor do que o encontrado na condição MDI, sugerindo novamente a importância deste meio no suporte nutricional do sistema assim como observado para o monoesferoide de 3T3-L1.

Levando em consideração a literatura e os resultados obtidos neste modelo, é possível sugerir que sistemas de co-cultura 3D contendo macrófagos refletem as interações celulares encontradas no tecido adiposo *in vivo* e podem ser bons modelos para o estudo de processos relacionados à adipogênese.

O outro modelo de co-cultura envolveu pré-adipócitos e fibroblastos (3:N). O conjunto de resultados obtidos a partir do heteroesferoide 3:N controle, mostraram que este modelo apresentou características que também foram observadas nos monoesferoídes, tais como: diminuição do tamanho ao longo do tempo de cultivo, como observado no monoesferoide de 3T3-L1 e número e viabilidade celular semelhante ao observado no monoesferoide de NIH/3T3. Em relação ao heteroesferoide 3:N da condição MDI, foi observado um aumento de 39 % no tamanho ao final dos 11 dias de cultivo quando comparado a condição controle do mesmo período. Além disso, foi observado também que o percentual de células *Nile red* positivas foi 2 x maior no modelo 3:N quando comparado ao monoesferoide de NIH/3T3 e, embora não significativo, também houve um aumento em relação ao monoesferoide de 3T3-L1. Como já discutido, a diminuição do tamanho do heteroesferoide em condição controle pode ter ocorrido devido a maior compactação do modelo como pode ser observado nas imagens da MEV, no entanto, não foi observado diminuição no número e na viabilidade celular neste modelo. Enquanto que o aumento no tamanho pode estar relacionado ao processo de diferenciação adipogênica ocorrido. Sendo assim, como demonstrado no heteroesferoide 3:J, o sistema de co-cultura 3D promoveu uma maior interação entre as células e resultou em respostas mais significativas em relação ao processo de diferenciação adipogênica.

Outro modelo de heteroesferoide caracterizado neste estudo envolveu a presença das três linhagens celulares, pré-adipócitos, macrófagos e fibroblastos (3:J:N). De acordo com os resultados, esse foi o único modelo que apresentou maior tamanho em diâmetro no 4º dia de

cultivo. Além disso, a presença ou ausência do MDI não influenciou no tamanho deste heteroesferoide. Adicionalmente, observa-se que o MDI contribuiu com o aumento do número e da viabilidade celular neste modelo, embora o monoesferoide de NIH/3T3 tenha apresentado melhores resultados em relação a esta análise. Como já discutido, esferoides que apresentam tamanhos maiores podem apresentar espaços internos promovidos pela morte das células.

De acordo com a literatura, o transporte de moléculas como o oxigênio limita-se a esferoides com tamanhos entre 150 e 200 μm (CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017; MEHTA et al., 2012). Neste trabalho, o heteroesferoide 3:J:N apresentou tamanho máximo de $200,6 \pm 21,66 \mu\text{m}$ de diâmetro e a porcentagem de células viáveis na condição controle e MDI foi de $76,87 \pm 15,7$ e $84,49 \pm 8,33$ % respectivamente. Adicionalmente, durante os 11 dias de cultivo 3D muitas células desagregaram-se do esferoide e morreram, e isso refletiu na diminuição do número total de células.

Viabilidades semelhantes têm sido encontradas na literatura. Amann e colaboradores (2014) desenvolveram um modelo 3D utilizando linhagens de câncer de pulmão de células não pequenas associadas a fibroblastos e demonstraram que os monoesferoides apresentaram viabilidade de 79 % após 10 dias de cultivo enquanto que heteroesferoides, dependendo da linhagem, apresentaram diminuição da viabilidade de 82 para 76 % após 10 dias. Outro estudo utilizando o mesmo modelo, mas com células de câncer de mama, encontrou uma viabilidade de 87 % após 4 dias de cultivo (HO et al., 2012). Estes resultados sugerem que os modelos desenvolvidos neste estudo refletem a estrutura esferoidal encontrada na literatura, composta basicamente por células em proliferação, localizadas na periferia do esferoide, células quiescentes, mas que podem se tornar viáveis se expostas a nutrientes, localizadas em uma região intermediária e, um centro necrótico, composto por células com membranas e núcleos desintegrados devido à falta de nutrientes, privação de oxigênio e consequente hipóxia, bem como acúmulo de resíduos tóxicos e metabólitos (CUI; HARTANTO; ZHANG, 2017; HAMILTON, 1998; MEHTA et al., 2012; MUELLER-KLIESER; FREYER; SUTHERLAND, 1986).

Embora alguns estudos apontem que o estímulo hormonal é necessário para haver um significativo acúmulo de lipídeos nas estruturas 3D (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; FISCHBACH et al., 2004; TURNER et al., 2015), nossos resultados demonstraram que esferoides não expostos ao meio hormonal também apresentaram diferenciação adipogênica, como pode ser observado nas imagens da

microscopia confocal e, adicionalmente, os sistemas de co-cultura apresentaram um percentual de células *Nile red* positivas e uma intensidade média de fluorescência maior do que modelos de monocultura. O modelo 3:J:N da condição controle, exibiu aumentou de 3,5 x no percentual de células NR positivas quando comparado ao monoesferoide de 3T3-L1 e 2 x quando comparado ao monoesferoide de NIH/3T3. Somado a isso, as imagens da MEV revelaram que este modelo também exibiu estruturas em forma de fibras, semelhantes às encontradas no monoesferoide de 3T3-L1 da condição MDI. Além disso, apesar de os heteroesferoide formados por duas linhagens (3:J) e (3:N) terem apresentado resultados semelhantes em relação ao número e viabilidade celular bem como diferenciação adipogênica, o heteroesferoide 3:J:N apresentou um perfil inflamatório maior.

Sabe-se que a hipertrofia dos adipócitos em casos de obesidade promove uma série de disfunções no tecido adiposo. O aumento da infiltração de macrófagos e a elevada produção de citocinas pró-inflamatórias, por exemplo, promovem um estado de inflamação crônica de baixa intensidade que pode desencadear o aparecimento de diversas doenças. A produção de NO por macrófagos M1 (classicamente ativados) mediada pelo aumento da expressão da enzima iNOS também está relacionada a manutenção do perfil inflamatório em casos de obesidade (KUSMINSKI; BICKEL; SCHERER, 2016; OUCHI et al., 2011).

Neste trabalho, o heteroesferoide 3:J:N foi o modelo que apresentou maior produção basal de NO ($1,7 \pm 0,2$ vs $1,5 \pm 0,1$ $\mu\text{m}/\mu\text{g}$ de proteína) para o grupo controle e MDI respectivamente. Ou seja, o único estímulo para esta produção foi o processo de adipogênese ocorrido no modelo 3D, em ambas as condições. Segundo Fite et al., (2015) modelos de co-cultura (macrófagos e pré-adipócitos) liberam quantidades significativamente maiores de NO do que sistemas de monocultura e, essa produção aumentada, pode desencadear inibição da sinalização de insulina e do consumo de glicose (XIE et al., 2010). No entanto, outros estudos relatam que o NO pode estimular o transporte de glicose através de um mecanismo diferente da via de sinalização de insulina (HIGAKI et al., 2001; TANAKA et al., 2003). Da mesma forma, alguns autores apontam que o NO pode promover a adipogênese (PENNINGTON et al., 2007), enquanto outros relatam que a produção deste mediador a partir de macrófagos pode comprometer a diferenciação de pré-adipócitos (JANG et al., 2016).

Como discutido, as interações parácrinas e o *cross-talk* existente entre os adipócitos e as células que compõe o tecido adiposo é

extremamente complexa e precisa ser mais bem compreendida. Desta forma, a criação de plataformas mais robustas para o estudo do microambiente do tecido adiposo têm se tornado muito importante. O modelo 3D multicelular tipo tecido adiposo proposto neste estudo exibiu um perfil inflamatório e características de diferenciação adipogênica na presença e ausência de um meio hormonal e pode ser usado como um modelo que mimetiza a obesidade *in vitro*, sendo uma plataforma útil para compreender os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no processo de desenvolvimento da obesidade bem como, para a busca de potenciais novos fármacos para o tratamento da obesidade.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- Foi possível estabelecer um sistema *in vitro* 3D em condições controladas utilizando 3 linhagens celulares;

- Apesar da redução do número total de células, os modelos esferoides apresentaram uma boa viabilidade celular;

- Modelos de co-cultura promovem a diferenciação adipogênica mais efetivamente do que modelos de monocultura;

- O meio MDI se mostrou importante para a manutenção nutricional e sustentação do modelo 3D.

- A estrutura 3D, juntamente com as interações célula-célula e célula-matriz promovem a diferenciação adipogênica de modelos esferoides que não são expostos a meio hormonal indutor;

- Heteroesferoides constituídos por 3 linhagens celulares além de apresentarem diferenciação adipogênica com e sem estímulo hormonal, ainda exibem perfil inflamatório;

REFERÊNCIAS

- ABDESSELEM, H. et al. SIRT1 limits adipocyte hyperplasia through c-Myc inhibition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 5, p. 2119–2135, 2016.
- ABESO. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. 3. ed. São Paulo: Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2009.
- ABESO. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. 4. ed. São Paulo: Diretrizes Brasileiras de Obesidade, 2016.
- ACHILLI, T.-M.; MEYER, J.; MORGAN, J. R. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 10, p. 1347–1360, 2012.
- ALDRIDGE, A. et al. Assay validation for the assessment of adipogenesis of multipotential stromal cells—a direct comparison of four different methods. **Cytotherapy**, v. 15, n. 1, p. 89–101, 2013.
- ALI, A. T. et al. Adipocyte and Adipogenesis. **European Journal of Cell Biology**, v. 92, n. 6–7, p. 229–236, 2013.
- AMANN, A. et al. Development of an innovative 3D cell culture system to study tumour - Stroma interactions in non-small cell lung cancer cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 10 dez. 2017.
- ARMANI, A. et al. Cellular Models for Understanding Adipogenesis, Adipose Dysfunction, and Obesity. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 572, n. April, p. 564–572, 2010.
- AVRAM, M. M.; AVRAM, A. S.; JAMES, W. D. Subcutaneous fat in normal and diseased states 3. Adipogenesis: From stem cell to fat cell. **American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 3, p. 472–492, 2007.
- BALABAN, S. et al. Adipocyte lipolysis links obesity to breast cancer growth : adipocyte-derived fatty acids drive breast cancer cell proliferation and migration. **Cancer & Metabolism**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2017.

BERRY, D. C. et al. The developmental origins of adipose tissue. **Development**, v. 140, n. 19, p. 3939–3949, 2013.

BHUPATHIRAJU, N. S.; HU, B. F. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. **Circulation Research**, v. 118, n. 11, p. 1723–1735, 2016.

BILLON, N. et al. The generation of adipocytes by the neural crest. **Development**, v. 134, n. 12, p. 2283–2292, 2007.

BILLON, N.; MONTEIRO, M. C.; DANI, C. Developmental origin of adipocytes : new insights into a pending question. **Biology of the Cell**, v. 100, n. 10, p. 563–575, 2008.

BRADLEY, R. L.; FISHER, F. F. M.; MARATOS-FLIER, E. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes. **Obesity**, v. 16, n. 5, p. 938–944, 2008.

BRASIL. **LEI Nº 13.454, DE 23 DE JUNHO DE 2017**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/L13454.htm>. Acesso em: 16 dez. 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Vigitel Brasil 2016: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. 1ª ed. Brasília: [s.n.].

CALZADILLA, P. et al. N -Acetylcysteine affects obesity-related protein expression in 3T3-L1 adipocytes. **Redox Report**, v. 18, n. 6, p. 210–218, 2013.

CASTOLDI, A. et al. The macrophage switch in obesity development. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JAN, p. 1–11, 2016.

CEPPO, F. et al. Implication of the Tpl2 kinase in inflammatory changes and insulin resistance induced by the interaction between adipocytes and macrophages. **Endocrinology**, v. 155, n. 3, p. 951–964, 2014.

CHAZENBALK, G. et al. Novel Pathway of Adipogenesis through Cross-Talk between Adipose Tissue Macrophages , Adipose Stem Cells and Adipocytes : Evidence of Cell Plasticity. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, 2011.

CHOE, S. S. et al. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, p. 1–16, 2016.

CHURCH, C.; BROWN, M.; RODEHEFFER, M. S. Conditional immortalization of primary adipocyte precursor cells. **Adipocyte**, v. 4, n. 3, p. 203–211, 2015.

COOKE, A. A. et al. Fatty acids and chronic low grade inflammation associated with obesity and the metabolic syndrome. **European Journal of Pharmacology**, v. 785, p. 207–214, 2016.

CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 11, p. 722–734, 2011.

CUI, X.; HARTANTO, Y.; ZHANG, H. Advances in multicellular spheroids formation. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 14, n. 127, p. 2–15, 2017.

DÂMASO, A. **Obesidade** (Guanabara, Ed.)Rio de Janeiro, 2003.

DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 19, n. 5, p. 336–344, 2013.

DAYA, S.; LOUGHLIN, A. J.; MACQUEEN, H. A. Culture and differentiation of preadipocytes in two-dimensional and three-dimensional in vitro systems. **Differentiation**, v. 75, n. 5, p. 360–370, 2007.

DORST, N. et al. Analysis of cellular composition of co-culture spheroids. **Annals of Anatomy**, v. 196, n. 5, p. 303–311, 2014.

EDMONDSON, R. et al. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. **ASSAY and Drug Development Technologies**, v. 12, n. 4, p. 207–218, 2014.

FARMER, S. R. Regulation of PPAR α activity during adipogenesis. **International Journal of Obesity**, v. 29, p. 13–16, 2005.

FARMER, S. R. Transcriptional control of adipocyte formation. **Cell Metabolism**, v. 4, n. 4, p. 263–273, 2006.

FILIPPIN-MONTEIRO, F. B. et al. Serum amyloid A is a growth factor for 3T3-L1 adipocytes, inhibits differentiation and promotes insulin resistance. **International Journal of Obesity**, v. 36, n. 8, p. 1032–1039, 2012.

FISCHBACH, C. et al. Three-dimensional in vitro model of adipogenesis: comparison of culture conditions. **Tissue engineering**, v. 10, n. 1, p. 215–29, 2004.

FITE, A.; ABOU-SAMRA, A. B.; SEYOUM, B. Macrophages Inhibit Insulin Signalling in Adipocytes: Role of Inducible Nitric Oxide Synthase and Nitric Oxide. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 39, n. 1, p. 36–43, 2015.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 50, n. 2, p. 188–194, 2006.

FOWLER, STANLEY D. AND GREENSPAN, P. Application of Nile Red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neural lipid deposits in tissue sections: comparison with Oil Red O⁷. **Journal of Histochemistry and Histochemistry**, v. 33, n. 8, p. 833–836, 1985.

FRIEDRICH, J. et al. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 309–324, 2009.

GASKELL, H. et al. Characterization of a functional C3A liver spheroid model. **Toxicology Research**, v. 5, n. 4, p. 1053–1065, 2016.

GOERS, L.; FREEMONT, P.; POLIZZI, K. M. Co-culture systems and technologies : taking synthetic biology to the next level. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 11, n. 96, p. 1–13, 2014.

GREEN, H.; MEUTH, M. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. **Cell**, v. 5, n. 1, p. 19–27, 1975.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt “Ueber einige Azoverbindungen”. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426–428, 1879.

GUO, W. et al. Adipogenesis licensing and execution are disparately linked to cell proliferation. **Cell Research**, v. 19, n. 2, p. 216–23, 2009.

HAMILTON, G. Multicellular spheroids as an in vitro tumor model. **Cancer Letters**, v. 131, n. 1, p. 29–34, 1998.

HIGAKI, Y. et al. Nitric Oxide Increases Glucose Uptake Through a Mechanism That Is Distinct From the Insulin and Contraction Pathways in Rat Skeletal Muscle. **Diabetes**, v. 50, n. 2, p. 241–247, 2001.

HO, W. Y. et al. Development of Multicellular Tumor Spheroid (MCTS) Culture from Breast Cancer Cell and a High Throughput Screening Method Using the MTT Assay. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, 2012.

HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673–689, 2015.

JACKSON, R. M. et al. Glucose availability controls adipogenesis in mouse 3T3-L1 adipocytes via upregulation of nicotinamide metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 45, p. 1–26, 2017.

JANG, J. E. et al. Nitric Oxide Produced by Macrophages Inhibits Adipocyte Differentiation and Promotes Profibrogenic Responses in Preadipocytes to Induce Adipose Tissue Fibrosis. **Diabetes**, v. 65, n. 9, p. 2516–2528, 2016.

KANG, M. et al. Anti-obesity effects of seaweeds of Jeju Island on the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet. **Food and Chemical Toxicology**, v. 90, p. 36–44, 2016.

KATO, H. et al. Melatonin promotes adipogenesis and mitochondrial biogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 59, n. 2, p. 267–275, 2015.

KIM, S. A.; LEE, E. K.; KUH, H. J. Co-culture of 3D tumor spheroids with fibroblasts as a model for epithelial-mesenchymal transition in vitro. **Experimental Cell Research**, v. 335, n. 2, p. 187–196, 2015.

KRAUS, N. A. et al. Quantitative assessment of adipocyte differentiation in cell culture. **Adipocyte**, v. 5, n. 4, p. 351–358, 2016.

KURI-HARUCH, W.; ARGUELLO, C.; MARSCH-MORENO, M. Extracellular matrix production by mouse 3T3-F442A cells during adipose differentiation in culture. **Differentiation**, v. 28, n. 2, p. 173–178, 1984.

KUSMINSKI, C. M.; BICKEL, P. E.; SCHERER, P. E. Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 15, n. 9, p. 639–660, 2016.

LASCHKE, M. W.; MENGER, M. D. Life is 3D: Boosting Spheroid Function for Tissue Engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 133–144, 2017.

LEFTEROVA, M. I.; LAZAR, M. A. New developments in adipogenesis.

Trends in Endocrinology and Metabolism, v. 20, n. 3, p. 107–114, 2009.

LI, S. et al. Resveratrol inhibits lipogenesis of 3 T3-L1 and SGBS cells by inhibition of insulin signaling and mitochondrial mass increase. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1857, n. 6, p. 643–652, 2016.

LO, K. A. et al. Analysis of in vitro insulin resistance models and their physiological relevance to in vivo diet-induced adipose insulin resistance. **Cell Reports**, v. 5, n. 1, p. 1–20, 2013.

LOWRY, OLIVER H. ROSEBROUGH, NIRA J. FARR, A. LEWIS. RANDAL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

MA, X. et al. LOC66273 Isoform 2 , a Novel Protein Highly Expressed in White Adipose Tissue , Induces Adipogenesis in 3T3-L1 Cells. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 3, p. 448–455, 2012.

MAGNO, F. C. C. M. et al. Perfil nutricional de pacientes em programa multidisciplinar de tratamento da obesidade grave e em pré-operatório de cirurgia bariátrica. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 27, n. Suplemento 1, p. 31–34, 2014.

MALTA, D. C. et al. Trends in prevalence of overweight and obesity in adults in 26 Brazilian state capitals and the Federal District from 2006 to 2012. **Revista brasileira de epidemiologia**, v. 17 Suppl 1, p. 267–76, 2014.

MAMMI, C. et al. A novel combined glucocorticoid-mineralocorticoid receptor selective modulator markedly prevents weight gain and fat mass expansion in mice fed a high-fat diet. **Journal of Obesity**, v. 40, n. 6, p. 964–972, 2016.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 11, p. 549–555, 2002.

MEHTA, G. et al. Opportunities and Challenges for use of Tumor Spheroids as Models to Test Drug Delivery and Efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 2, p. 192–204, 2012.

METZGER, W. et al. The liquid overlay technique is the key to formation of co-culture spheroids consisting of primary osteoblasts , fibroblasts and endothelial cells. **Cytotherapy**, v. 13, n. 8, p. 1000–1012, 2011.

MOON, H.-S. et al. Inhibitory effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on lipid accumulation of 3T3-L1 cells. **Obesity**, v. 15, n. 11, p. 2571–2582, 2007.

MORGEN, C. S.; SØRENSEN, T. I. A. Global trends in the prevalence of overweight and obesity. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 10, n. 9, p. 513–514, 2014.

MUELLER-KLIESER, W.; FREYER, J. P.; SUTHERLAND, R. M. Influence of glucose and oxygen supply conditions oxygenation of multicellular spheroids. **British Journal of Cancer**, v. 53, n. 3, p. 345–353, 1986.

MUKHTAR, F. et al. Coumarin and Biscoumarin Inhibit in Vitro Obesity Model. **Advances in Biological Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 152–168, 2016.

MUNIESA-GONZÁLEZ, P. et al. Obesity. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 17034, p. 1–18, 2017.

NAKARAI, H. et al. Adipocyte-macrophage interaction may mediate LPS-induced low-grade inflammation: potential link with metabolic complications. **Innate Immunity**, v. 18, n. 1, p. 164–170, 2012.

NEDERGAARD, J.; BENGTSSON, T.; CANNON, B. Unexpected evidence for active brown adipose tissue in adult humans. **American Journal of Physiology Endocrinology Metabolism**, v. 293, n. 2, p. 444–452, 2007.

NORDSTRAND, N. et al. The relationship between various measures of obesity and arterial stiffness in morbidly obese patients. **BMC Cardiovascular Disorders**, v. 11, n. 1, p. 7, 2011.

NTAMBI, M. J.; KIM, Y.-C. Symposium: Adipocyte Function, Differentiation and Metabolism Regulation of Leptin Production in Humans. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 3127–3131, 2000.

OLIVEIRA, M. L. DE et al. Direct Healthcare Cost of Obesity in Brazil: An Application of the Cost-of-Illness Method from the Perspective of the Public Health System in 2011. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.

OTTO, T. C.; LANE, M. D. Adipose Development : From Stem Cell to Adipocyte. **Critical Reviews in Biochemistry Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, p. 229–242, 2005.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease.

Immunology, v. 11, n. 2, p. 85–97, 2011.

PANDURANGAN, M. et al. Co-culture of C2C12 and 3T3-L1 preadipocyte cells alters the gene expression of calpains, caspases and heat shock proteins. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 48, n. 9, p. 577–582, 2012.

PENINGTON, A. J. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Nitric Oxide Promote Adipogenesis in a Model That Mimics Obesity. **Obesity**, v. 15, n. 12, 2007.

PEREIRA-FERNANDES, A. et al. Evaluation of a Screening System for Obesogenic Compounds: Screening of Endocrine Disrupting Compounds and Evaluation of the PPAR Dependency of the Effect. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–17, 2013.

POPE, B. D. et al. Microenvironmental Control of Adipocyte Fate and Function. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 10, p. 745–755, 2016.

POULOS, S. P.; DODSON, M. V; HAUSMAN, G. J. Cell line models for differentiation: preadipocytes and adipocytes. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 10, p. 1185–1193, 2010.

QUEIROZ, J. C. F. DE et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 582–594, 2009.

RAMA-ESENDAGLI, D. et al. Spheroid formation and invasion capacity are differentially influenced by co-cultures of fibroblast and macrophage cells in breast cancer. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 5, p. 2885–2892, 2014.

RAVI, M. et al. 3D cell culture systems: Advantages and applications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 1, p. 16–26, 2015.

ROSEN, E. D.; MACDOUGALD, O. A. Adipocyte differentiation from the inside out. **Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 12, p. 885–96, 2006.

ROSEN, E. V.; SPIEGELMAN, B. M. What We Talk About When We Talk About Fat. **Cell Press**, v. 156, n. 0, p. 20–44, 2014.

RUEHL, M. et al. The Elongated First Fibronectin Type III Domain of Collagen XIV Is an Inducer of Quiescence and Differentiation in

Fibroblasts and Preadipocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 46, p. 38537–38543, 2005.

RUIZ-OJEDA, F. J. et al. Cell models and their application for studying adipogenic differentiation in relation to obesity: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1–26, 2016.

SALEH, N. A. **Cultura Celular Tridimensional: Desenvolvimento de um modelo para avaliação da relação entre o microambiente tumoral e a ação de novos agentes antitumorais**. Dissertação (Mestrado em Farmácia)—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

SAPONARO, C. et al. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis : A Critical Point in Metabolic Homeostasis. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9453–9474, 2015.

SASAI, Y. Perspective Next-Generation Regenerative Medicine: Organogenesis from Stem Cells in 3D Culture. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 5, p. 520–530, 2013.

SBC. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**. [s.l.] I Diretriz Brasileira de Diagnóstico e Tratamento da Síndrome Metabólica, 2005. v. 84

SBCBM. **Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. Consenso Bariátrico**, 2006.

SCHMID, B. et al. Inhibition of fatty acid synthase prevents preadipocyte differentiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 328, n. 4, p. 1073–1082, 2005.

SEO, M. J. et al. The inhibitory effects of quercetin on obesity and obesity-induced inflammation by regulation of MAPK signaling. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, n. 11, p. 1308–1316, 2015.

SHAO, H. et al. Prolonged Induction Activates Cebp a Independent Adipogenesis in NIH/3T3 Cells. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 2–9, 2013.

SHI, Y.; BURN, P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 3, n. 8, p. 695–710, 2004.

SHU-HUI, S. et al. Caffeine inhibits adipogenic differentiation of primary adipose-derived stem cells and bone marrow stromal cells. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 6, p. 1830–7, 2013.

SILVA, K. R. et al. Human Adipose-Derived Stem Cells Spheroids as Tools for Drug Discovery and Development. In: **Adult Stem Cells: Recent Advances**. [s.l: s.n.]. p. 1–14.

SMITH, P. J. et al. Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 19, p. 9402–9408, 1988.

SOM, D. et al. c-Jun regulates adipocyte differentiation via the KLF15-mediated mode. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 469, n. 3, p. 552–558, 2016.

SOUZA, S. C. et al. TNF- α Induction of lipolysis is mediated through activation of the extracellular signal related kinase pathway in 3T3-L1 adipocytes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 89, n. 6, p. 1077–1086, 2003.

STEPHAN, S.; JOHNSON, W. E.; ROBERTS, S. The influence of nutrient supply and cell density on the growth and survival of intervertebral disc cells in 3D culture. **European cells & materials**, v. 22, p. 97–108, 2011.

SUBRAMANIYAN, S. A.; KIM, S.; HWANG, I. Cell-Cell Communication Between Fibroblast and 3T3-L1 Cells Under Co-culturing in Oxidative Stress Condition Induced by H₂O₂. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 4, p. 668–681, 2016.

SUGANAMI, T. et al. Role of the Toll-like receptor 4/NF- κ B pathway in saturated fatty acid-induced inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 1, p. 84–91, 2007.

SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: Role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 25, n. 10, p. 2062–2068, 2005.

SUN, K.; KUSMINSKI, C. C. M.; SCHERER, P. E. P. Adipose tissue remodeling and obesity. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2094–2101, 2011.

TANAKA, T. et al. Nitric oxide stimulates glucose transport through insulin-independent GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. **European Journal of Endocrinology**, v. 149, n. 1, p. 61–67, 2003.

TANG, Q. Q.; LANE, M. D. Adipogenesis : From Stem Cell to Adipocyte. **Annual review of biochemistry**, v. 81, n. March, p. 715–736, 2012.

TANTI, J.-F. et al. Implication of inflammatory signaling pathways in obesity-induced insulin resistance. **Frontiers in Endocrinology**, v. 3, n. 181, p. 1–15, 2013.

TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Stimulation of Adipogenesis in Fibroblasts by PPAR γ 2 , a Lipid-Activated Transcription. **Cell**, v. 79, n. 7, p. 1147–1156, 1994.

TREMMELE, M. et al. Economic Burden of Obesity: A Systematic Literature Review. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 4, p. 435, 2017.

TSAI, A.-C. et al. Compaction, fusion, and functional activation of three-dimensional human mesenchymal stem cell aggregate. **Tissue engineering. Part A**, v. 21, n. 9–10, p. 1705–19, 2015.

TURNER, P. A. et al. A surface-tethered spheroid model for functional evaluation of 3T3-L1 adipocytes. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 1, p. 174–183, 2014.

TURNER, P. A. et al. Three-Dimensional Spheroid Cell Model. **Tissue Engineering**, v. 21, p. 1837–1847, 2015.

TURNER, P. A. et al. Adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells grown as spheroids. **Process Biochemistry**, 2017.

VANKONINGSLOO, S. et al. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction triggers triglyceride accumulation in 3T3-L1 preadipocytes. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 7, p. 1266–1282, 2006.

WANNMACHER, L. Obesidade como fator de risco para morbidade e mortalidade: evidências sobre o manejo com medidas não medicamentosas. **Uso Racional de Medicamentos: fundamentação em condutas terapêuticas e nos macroprocessos da Assistência Farmacêutica**, v. 7, 2016.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796–1808, 2003.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical

cancer models in tumor biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 2015.

WEISWALD, L.-B. et al. In situ protein expression in tumour spheres: development of an immunostaining protocol for confocal microscopy. **BMC Cancer**, v. 10, n. 1, p. 106, 2010.

WHO. **World Health Statistics 2012**. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/WHS2012_IndicatorCompendium.pdf?ua=1>. Acesso em: 15 ago. 2017.

WHO. **Obesity and overweight**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

WOHLFAHRT, P. et al. Relationship between measures of central and general adiposity with aortic stiffness in the general population. **Atherosclerosis**, v. 235, n. 2, p. 625–631, 2014.

WU, Z.; BUCHER, N. L. R.; FARMER, S. R. Induction of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ during the Conversion of 3T3 Fibroblasts into Adipocytes Is Mediated by C/EBP β , C/EBP δ , and Glucocorticoids. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 8, p. 4128–4136, 1996.

XIE, L. et al. Interactive Changes between Macrophages and Adipocytes. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 4, p. 651–659, 2010.

ZANONI, M. et al. 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. **Scientific reports**, v. 6, n. 19103, p. 1–11, 2016.

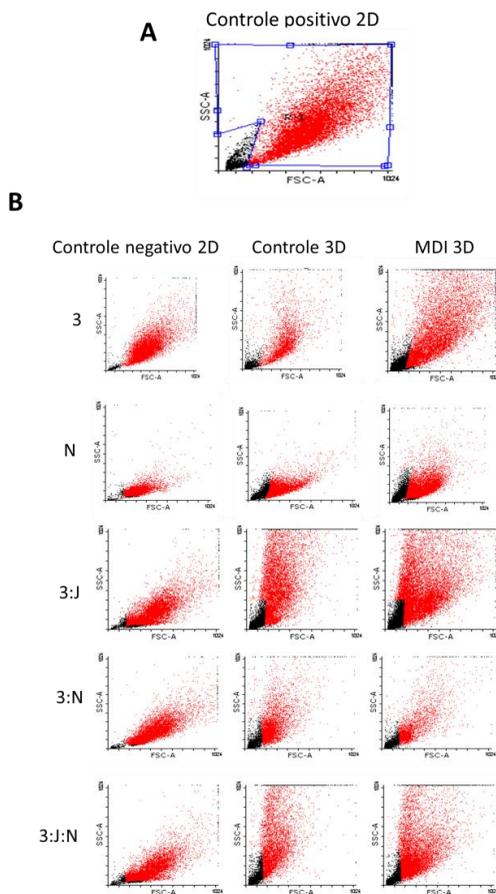
ZEBISCH, K. et al. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 425, n. 1, p. 88–90, 2012.

ZHANG, J. et al. Selective disruption of PPAR γ 2 impairs the development of adipose tissue and insulin sensitivity. **PNAS**, v. 101, n. 29, p. 10703–10708, 2004.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, n. 6505, p. 425–432, 1994.

APÊNDICE A – Análise dos esferoides por citometria de fluxo

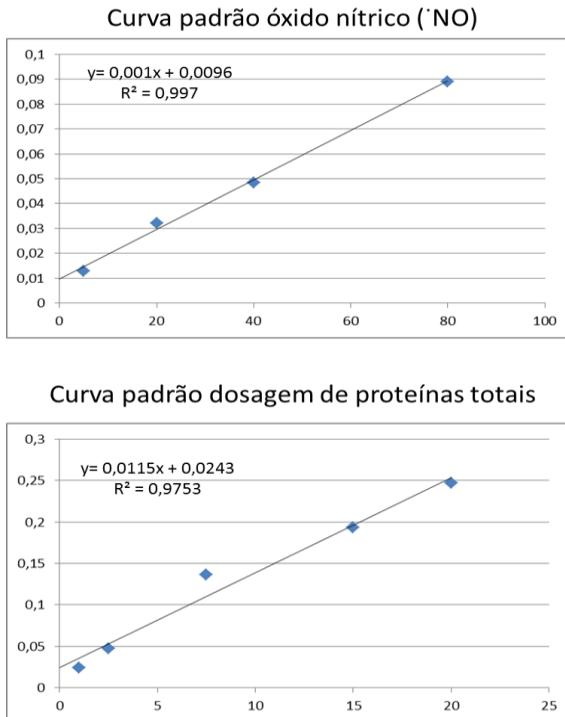
Figura 21: *Dot plots* das células coradas com *Nile Red* em modelo 2D e 3D



A) *Dot plot* e estratégia de *gating* da célula 3T3-L1 submetida a diferenciação adipogênica em modelo 2D. B) *Dot plots* das condições controle negativo 2D e de cada condição controle e MDI em 3D. Legenda: 3= 3T3-L1; N= NIH/3T3; 3:J= 3T3-L1:J774; 3:N 3T3-L1:NIH/3T3; 3:J:N = 3T3-L1:J774:NIH/3T3.

APÊNDICE B – Curvas de calibração

Figura 22: Curvas analíticas - teor de proteínas totais e NO



A absorvância dos padrões foi analisada em duplicata. O resultado expresso refere-se a média de duas determinações.