

LUISA REZENDE

Avaliação dos efeitos biomecânicos e funcionais da exposição
de macrófagos às lipoproteínas nativas e oxidadas.

Belo Horizonte-MG
2020

LUISA REZENDE

**Avaliação dos efeitos biomecânicos e funcionais da exposição
de macrófagos às lipoproteínas nativas e oxidadas.**

Versão final de dissertação apresentado ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Belo Horizonte -MG
2020

043

Rezende, Luisa.

Avaliação dos efeitos biomecânicos e funcionais da exposição de macrófagos às lipoproteínas nativas e oxidadas [manuscrito] / Luisa Rezende. - 2020.
92 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Luciana de Oliveira Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Aterosclerose. 2. Macrófagos. 3. Microdomínios da Membrana. 4. Lipoproteínas LDL. I. Andrade, Luciana de Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

LUISA REZENDE

329/2020
entrada
1º/2018
2018699070

Às oito horas e trinta minutos do dia 28 de fevereiro de 2020, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOMECÂNICOS E FUNCIONAIS DA EXPOSIÇÃO DE MACRÓFAGOS ÀS LIPOPROTEÍNAS NATIVAS E OXIDADAS ", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Luciana de Oliveira Andrade**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Luciana de Oliveira Andrade	UFMG	APROVADA
Dra. Juliana Alves da Silva	UFMG	APROVADA
Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.**

Dra. Luciana de Oliveira Andrade (Orientadora) _____

Dra. Juliana Alves da Silva _____

Dra. Jacqueline Isaura Alvarez Leite _____

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular ICBA/UFMG

“The show must go on”
Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço as agências de fomento: CAPES, FAPEMIG, CNPq e INCT-FCx e conseqüentemente ao povo brasileiro que financiaram esse projeto.

Agradeço também ao Centro de Microscopia da UFMG e ao Centro de aquisição e processamento de imagens (CAPI), onde a maior parte das imagens desse estudo foram obtidas.

Agradeço aos professores do programa de pós-graduação de biologia celular que foram muito importantes para minha formação. Em especial, agradeço a professora Dra. Luciana Andrade que durante sete anos foi minha orientadora, amiga e mãe científica, me ensinando não só ciência mas também oferecendo um ombro amigo e bons conselhos que nunca falham.

Também agradeço ao laboratório de genes inflamatórios (LGI) e ao Prof. Aristóbolo Mendes da Silva, bem como ao laboratório de biologia da neurotransmissão (LaBNeuro) e a Profa. Cristina Guatimosin por compartilharem não só o mesmo espaço de laboratório, mas também equipamentos, ideias e boas companhias.

Agradeço aos membros da banca Profa. Juliana Silva, Profa. Jacqueline Alvarez Leite e Prof. Thiago de Castro Gomes que aceitaram meu convite.

Agradeço imensamente meus amigos e colegas de laboratório que fizeram dessa difícil jornada que é a pós-graduação um experiência agradável e prazerosa. Obrigada a Natalia pelas ideias, pelas mãos extras em experimentos e pelos momentos de reflexão que não se restringiam somente a ciência. Agradeço ao Wesley pela ajuda no laboratório principalmente na hora de achar algum reagente ou equipamento no ICB. A Heliana, Brener, Ana Elisa, Victor, Jorge, Rai, Anny e Ana Carolina que foram amigos queridos muito importantes para as discussões que enriqueceram este trabalho.

Agradeço aos meus familiares e ao meu pai José Luiz, minha mãe Emília e minhas irmãs Emiliana e Ana Paula que sempre me apoiaram incondicionalmente mesmo não entendendo muito bem o que eu tanto fazia no laboratório.

Agradeço a todos meus amigos em especial a Camila que me ajudou de tantas formas que não há páginas suficientes que possam descrever o tanto que

sou grata a ela. Da mesma forma agradeço ao Pedro que me inspira a ser uma boa cientista e que me instiga a fazer boas perguntas.

Agradeço a tudo e a todos que de alguma forma contribuíram para esse trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT.....	12
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Aterosclerose e macrófagos	14
1.2. Balsas de membrana	19
1.3. oxLDL e balsas.....	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1. Objetivos gerais.....	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Células e tratamentos	31
3.2 Obtenção e oxidação de LDL	32
3.3. Marcação com toxina colérica fluorescente (CTXB) para avaliação das balsas de membrana	33
3.4. Microscopia eletrônica de varredura e transmissão	33
3.5. Microscopia de desfocalização.....	34
3.6. Marcação do citoesqueleto de actina.....	36
3.7. Marcação de integrínas.....	36
3.8. Filmagem de células vivas e avaliação morfológica dos macrófagos em microscopia de luz transmitida.	37
3.9 Ensaio de migração em fenda.....	37
3.10. Marcação de lisossomos e membrana plasmática.....	37
4. RESULTADOS	39
4.1. Tratamento com oxLDL ou M β CD alteram a disposição das balsas de membrana.	39
4.2. Tratamento com oxLDL ou M β CD alteram a morfologia celular promovendo encolhimento celular e desaparecimento de ondulações de membrana.....	41
4.3. Tratamento com oxLDL ou M β CD induz alteração no citoesqueleto de actina.	46

4.4. A inibição de ROCK reverte o encolhimento celular e a polimerização de actina induzidos por oxLDL.	48
4.5. O tratamento com M β CD ou oxLDL alteram a rigidez da membrana.	52
4.6. O tratamento com M β CD ou oxLDL diminui a mobilidade e migração celular.....	55
4.7. O tratamento com M β CD ou oxLDL altera a distribuição de integrinas β 2, mas não de β 1.	60
4.8. O tratamento com M β CD ou oxLDL aumentam a co-localização entre balsas de membrana e actina.	63
4.9. O tratamento com M β CD ou oxLDL causa espalhamento de lisossomos.....	65
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÕES.....	79
6. REFERÊNCIAS	80

LISTA DE FIGURAS

Fig.1: Desenvolvimento da lesão aterosclerótica.	16
Fig. 2: Molécula de β -ciclodextrina.....	20
Fig. 3: Organização dos pontos de adesão focal para propulsão e migração celular.	25
Fig. 4: Visualização das balsas de membrana em macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD.	40
Fig. 5: Análise da morfologia de macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD por microscopia de luz transmitida e microscopia eletrônica de varredura.	43
Fig. 6: Visualização de estruturas intracelulares de macrófagos tratados ou não com oxLDL.....	45
Fig. 7: Avaliação da organização do citoesqueleto de actina de macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD.	48
Fig. 8: Avaliação do efeito da inibição de ROCK no citoesqueleto de actina e morfologia celular de macrófagos tratados com oxLDL.....	51
Fig. 9: Microscopia de desfocalização de macrófagos tratados ou não com com nLDL, oxLDL e M β CD.....	54
Fig. 10: Visualização da movimentação randômica de BMDMs tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD por microscopia de luz transmitida. .	58
Fig. 11: Avaliação da migração de macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD.....	59
Fig. 12: Visualização de interinas β 1 por imunofluorescência em macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD.	61
Fig. 13: Visualização de interinas β 2 por imunofluorescência em macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD.	62
Fig. 14: Avaliação da co-localização do citoesqueleto de actina com balsas de membrana de macrófagos tratados ou não com com nLDL, oxLDL e M β CD.....	65
Fig. 15: Visualização da distribuição de lisossomos em macrófagos tratados ou não com com nLDL, oxLDL e M β CD.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

DAPI: (*4-6-diamidino-2-phenylindole*) corante nuclear.

DMEM: (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*).

HBSS: (*Hank's Balanced Salt Solution*).

PBS: (*Phosphate Buffered Saline*) Salina tamponada com fosfato.

WGA: (*Wheat Germ Agglutinin*) marcador de membranas.

SFB: Soro fetal bovino

BMDM:(*Bone marrow derived macrophages*) macrófagos derivados de medula óssea.

EDTA: (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

CTXb: (*Cholera enterotoxin subunit B*) Sub-unidade B da toxina colérica.

TA: Temperatura ambiente

LDL: (*low density lipoprotein*) lipoproteína de baixa densidade densidade.

oxLDL: lipoproteína de baixa densidade densidade oxidada.

nLDL: lipoproteína de baixa densidade densidade nativa.

M β CD: metil- β -ciclodextrina

ACAT1: Enzima acetil co-enzima A transferase 1

FAK: (*Focal adhesion kinase*) kinase de adesão focal.

PIP2: fosfatidilinositol 4,5- bifosfato

NF- κ B: (*Nuclear factor kappaB*) Fator nuclear KappaB

TNF: (*Tumor necrosis factor*) Fator de necrose tumoral

ROCK: (*Rho-associated protein kinase*) proteína kinase associada a Rho.

LAMP: (*Lysosomal associated membrane protein*) proteína de membrana associada a lisossomos.

M-CSF: (*Macrophage colony stimulating factor*) fator estimulador de colônia de macrófagos.

SNARE: *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*

RESUMO

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica caracterizada pela formação da placa de ateroma, que diminui a luz de vasos sanguíneos, podendo também se romper e obstruir vasos de menor calibre, levando a complicações como infartos e derrames. Esse processo é desencadeado pela presença de LDL oxidada (oxLDL) na túnica íntima do vaso sanguíneo e consequente recrutamento de macrófagos. Nestes sítios, macrófagos captam e acumulam oxLDL em seu citoplasma, se tornando células espumosas. Essas células produzem citocinas pró-inflamatórias e recrutam mais células do sistema imune, estimulando a progressão do processo inflamatório e o consequente crescimento da placa de ateroma. Muitos estudos tentam elucidar o efeito do acúmulo de oxLDL na ativação de macrófagos, a qual culmina na formação de células espumosas. Porém, pouco se sabe sobre os efeitos biomecânicos induzidos por essa molécula em macrófagos, bem como suas consequências para ativação celular que não sejam derivados diretamente do acúmulo de colesterol no citoplasma desta célula. Em células fagocíticas não-profissionais, como células endoteliais, a oxLDL induz aumento da rigidez de membrana e alteração do citoesqueleto de actina, efeitos reproduzidos parcialmente pelo tratamento com M β CD, uma vez que ambas as substâncias desestruturam balsas de membrana. Uma vez que as balsas de membrana são domínios importantes para o recrutamento, organização e atividade de várias proteínas celulares, alterações na sua dinâmica podem gerar diversos efeitos na célula. Já foi demonstrado em células fagocíticas não-profissionais que a desestruturação das balsas afeta a reorganização do citoesqueleto de actina e distribuição de integrinas na superfície celular, podendo afetar também a migração e rigidez da membrana. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos morfofuncionais da desestruturação das balsas de membrana em células fagocíticas profissionais. Portanto, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos morfológicos, mecânicos e funcionais do tratamento com oxLDL em macrófagos que sejam consequências da desorganização das balsas de membrana, visando elucidar sua contribuição para o processo patológico da aterosclerose. Observamos que o tratamento com oxLDL alterou a conformação das balsas de membrana em macrófagos murinos primários derivados de medula óssea, de forma semelhante

ao observado no tratamento com M β CD. A mesma semelhança entre esses tratamentos foi observada nas alterações do citoesqueleto de actina, na morfologia celular e na distribuição de integrinas. Macrófagos tratados com oxLDL apresentaram maior polimerização do citoesqueleto de actina, distribuição difusa de integrinas e encolhimento celular da mesma forma que macrófagos tratados com M β CD. Ambos os tratamentos também aumentaram a interação física do citoesqueleto de actina com as balsas de membrana, indicando mecanismos de ação semelhantes. Em consequência dessas alterações físicas, o tratamento com oxLDL ou M β CD também levou a uma menor capacidade de migração dos macrófagos. Esses resultados indicam que a oxLDL é capaz de causar alterações físicas em macrófagos, decorrentes da desorganização das balsas. Estas alterações por sua vez podem ter implicações na retenção dos macrófagos na placa de ateroma, formação de células espumosas e conseqüentemente na progressão da aterosclerose.

Palavras chaves: Aterosclerose, macrófagos, balsas de membrana, oxLDL

ABSTRACT

Atherosclerosis is chronic inflammatory disease characterised by the formation of an atheromatous plaque that diminish the blood vessel lumen. The plaque can also rupture and block small vessels, leading to complications such as strokes and heart attacks. This process is triggered by the presence of oxidised LDL (oxLDL) in the tunica intima of blood vessels and the consequent macrophage recruitment. In these sites, macrophages capture and accumulate oxLDL in their cytoplasm, turning into foam cells. These cells produce pro-inflammatory cytokines that recruit more immune cells, stimulating the inflammatory process progression and plaque growth. Many studies try to elucidate the role of oxLDL accumulation in macrophage activation and foam cell formation. However, little is known about the biomechanical effects induced by oxLDL in macrophages, as well as their consequences for cell activation that are not directly related to the cholesterol accumulation in the cytoplasm of these cells. In non-professional phagocytic cells, oxLDL induces increased membrane rigidity and actin cytoskeleton alteration. These effects are partially reproducible by cholesterol depletion and membrane rafts disorganization, induced by the treatment with M β CD. Since membrane rafts are important domains to the recruitment, organization and activity of plasma membrane proteins, alterations in raft dynamics can lead to several effects in the cell. It was shown in non-professional phagocytic cells that raft disruption affects actin reorganization and integrin distribution in the cell surface, also affecting cell migration and membrane rigidity. However, little is known about the morphofunctional effects of raft disruption in professional phagocytic cells, such as macrophages. Therefore, the goal of this study is to analyse the morphological, mechanical and functional effects of oxLDL treatment that are consequences of raft disruption, in macrophages, in order to elucidate the contribution of rafts for the pathologic process of atherosclerosis. We observed that the treatment with oxLDL alters raft conformation of bone marrow derived macrophages (BMDM). A similar effect was observed in the treatment with M β CD. The similarities between the treatments could also be observed in the actin cytoskeleton organization, cell morphology and integrin distribution. OxLDL-treated macrophages showed higher actin polymerization, diffuse integrin distribution and cell shrinkage similarly

with the observed in M β CD-treated macrophages. Both treatments also increased the physical interaction between the actin cytoskeleton and membrane rafts, indicating a similar action mechanism. The physical alterations induced by oxLDL and M β CD also lead to deficient migration in macrophages. These results indicate that oxLDL can induce physical alterations in macrophages due to raft desorganization. Those alterations can have implications in the macrophage retention in the atheromatous plaque, the formation of foam cells, and consequently, atherosclerosis progression.

Key words: Atherosclerosis, macrophages, membrane rafts, oxLDL

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aterosclerose e macrófagos

Atualmente, a aterosclerose é uma das doenças que lideram o ranking de mortes no mundo, incluindo o Brasil (de Souza *et al.*, 2006; Barquera *et al.*, 2015). A doença consiste em um processo inflamatório crônico que se desenvolve na túnica íntima do vaso sanguíneo, levando a formação da placa de ateroma, principalmente em regiões que sofrem maior estresse mecânico pela pressão sanguínea (Steffensen *et al.*, 2015). Esta placa, além de prejudicar o fluxo sanguíneo, pode se soltar e formar trombos que bloqueiam vasos de menores calibres, levando a complicações como infarto do miocárdio e derrames cerebrais.

Vários fatores de risco já foram relacionados à aterosclerose, como histórico familiar, diabetes tipo II, tabagismo e dislipidemia sanguínea. Dentre estes fatores a dislipidemia, em especial a hipercolesterolemia, se destaca, sendo o principal alvo para o tratamento desta doença (Stone *et al.*, 2014). A hipercolesterolemia se caracteriza por altos níveis sanguíneos de moléculas que carregam colesterol chamadas de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), um cenário que favorece o acúmulo e retenção dessas moléculas na camada íntima da parede do vaso (Tabas *et al.*, 2007). Além disso, a dislipidemia atua como situação de estresse que induz modificações no endotélio levando à disfunção endotelial e aumento da permeabilidade dessa camada celular, agravando o acúmulo de LDL na parede do vaso (Pirillo *et al.*, 2013; Gliozzi *et al.*, 2019;) (Fig. 1a). Uma vez retidas neste ambiente, moléculas de LDL sofrem modificações por enzimas ou agentes oxidantes presentes na matriz extracelular, que levam a oxidação da LDL (Yoshida & Kisugi, 2010). A LDL oxidada (oxLDL), por sua vez, induz a expressão de moléculas de adesão para leucócitos em células endoteliais, recrutando principalmente monócitos e dando início ao processo inflamatório (Maiolino *et al.*, 2013). Uma vez na túnica íntima da artéria, monócitos se diferenciam em macrófagos que reconhecem e captam moléculas de oxLDL (Fig. 1b). A captação excessiva de oxLDL pelos macrófagos induz a sua transformação em células espumosas que recebem esse nome por seu

aspecto morfológico, representado pelo excesso de lipídeos intracelulares (Moore & Freeman, 2006). As células espumosas secretam citocinas pró-inflamatórias que recrutam mais células do sistema imune, agravando o processo inflamatório e iniciando a lesão aterosclerótica (Hansson & Hermansson, 2011; Moore *et al.*, 2013). A aterogênese culmina na mobilização de células musculares lisas da túnica média que se multiplicam e migram para a túnica íntima, recobrando a placa de ateroma e formando a capa fibrosa (Fig. 1c). Essa capa recobre a placa contendo células espumosas, que eventualmente morrem e liberam seu conteúdo lipídico, formando uma lesão esbranquiçada visível na parede do vaso, chamada de estria gordurosa. Esse processo, por sua vez, recruta mais macrófagos que entram em um ciclo de eferocitose ineficiente e morte celular que contribui para o crescimento da placa de ateroma (Tabas, 2010).

Os macrófagos são células chave nesse processo patológico sendo as células imunes mais abundantes na placa de ateroma e as responsáveis pelo processo inflamatório não resolutivo dessa doença (Moore *et al.*, 2013). De fato, o bloqueio da migração de macrófagos para a íntima do vaso, por inibição de quimiocinas como CCL2 e seus receptores, diminui drasticamente a progressão da aterosclerose (Combadière *et al.* 2008). De forma semelhante, camundongos op/op, animais deficientes na produção funcional de fator de estimulação de colônia (M-CSF) e que, portanto, possuem ausência quase que completa de monócitos circulantes no sangue, são extremamente resistentes ao desenvolvimento da lesão aterosclerótica, mesmo com níveis altos de colesterol no sangue (Smith *et al.*, 1995; Qiao *et al.*, 1997). Esses estudos evidenciam a importância dos macrófagos para o desenvolvimento da doença. Além disso, a captação de lipoproteínas oxidadas pelos macrófagos e consequente formação de células espumosas, caracterizam um evento patológico primordial para o desenvolvimento da aterosclerose e tem sido intensamente estudados. Esse processo depende da ação de receptores *scavengers*, principalmente SR-A1 e CD36, que reconhecem e internalizam a oxLDL em macrófagos (Kunjathoor *et al.*, 2002). Diferentemente dos receptores de LDL, os receptores *scavengers* não são regulados negativamente pelo acúmulo de oxLDL intracelular, mas são na verdade, super-expressos na presença de oxLDL (Nagy *et al.*, 1998).

Adicionando-se a esse cenário, 7-cetocolesterol, subprodutos da oxidação de LDL, inibem o efluxo de colesterol das células espumosas (Gelissen *et al.*, 1996). Como consequência, há um desequilíbrio entre a captação e o efluxo de colesterol no macrófago, resultando em um acúmulo excessivo desse lipídio no citoplasma.

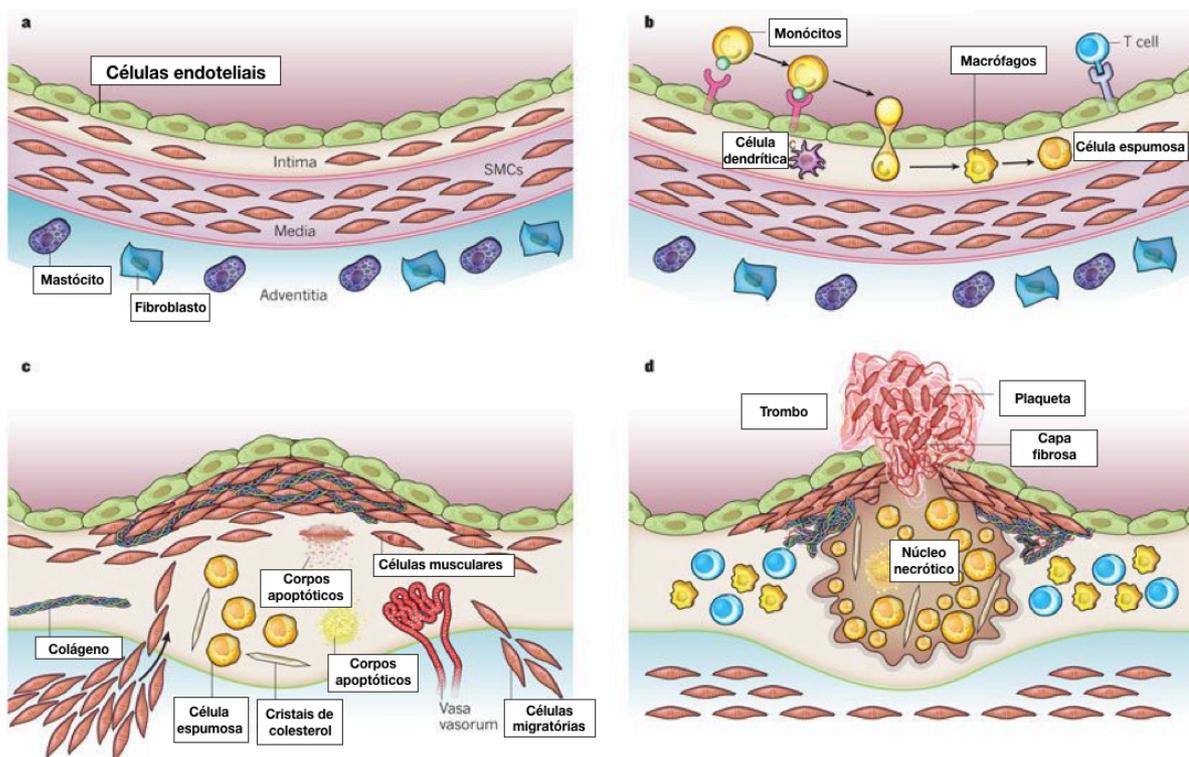


Fig.1: Desenvolvimento da lesão aterosclerótica.

(a) Desenho esquemático das camadas da parede de vasos sanguíneos: íntima, logo abaixo do endotélio; média, camada rica em músculo liso; e adventícia, camada rica em fibroblastos, fibras colágenas e mastócitos. (b) A lesão aterosclerótica se inicia com o recrutamento de monócitos pelo endotélio ativado em consequência do acúmulo de LDL. Os monócitos se diferenciam em macrófagos que ao internalizar moléculas de oxLDL se transformam em células espumosas. Há também o recrutamento de outras células do sistema imune. © A lesão progride com a migração de células musculares lisas da camada média para a íntima, formando a capa fibrosa. Enquanto isso ocorre a apoptose de células espumosas e formação de cristais de colesterol. (d) A placa aterosclerótica cresce pelo acúmulo de lipídeos e células espumosas que sofrem necrose, formando o núcleo necrótico. Com o fluxo sanguíneo a capa fibrosa pode se romper e com isso há a formação de trombos que podem interromper o fluxo sanguíneo. (Adaptado de Libby *et al.*, 2011)

Uma vez internalizadas, moléculas de oxLDL adentram a via endocítica onde ocorre sua degradação e a hidrolização de seus ésteres de colesterol a

colesterol livre. O colesterol na forma livre pode ser liberado no citoplasma e ser re-esterificado no retículo endoplasmático, pela enzima acetil-coenzima A (ACAT1), para armazenamento em gotículas lipídicas. O acúmulo dessas gotículas lipídicas é o responsável pelo aspecto espumoso dos macrófagos que são então chamados de células espumosas (Moore *et al.*, 2013). Devido a grande quantidade de colesterol internalizado pelos macrófagos, há uma sobrecarga da enzima ACAT1 e por isso também é possível observar colesterol na sua forma livre ou em cristais no citoplasma. O colesterol armazenado como colesterol-ester em gotas lipídicas é inerte, porém, colesterol livre ou em cristais podem oferecer toxicidade para a célula, levando ao estresse de retículo endoplasmático e contribuindo para má funcionalidade das células espumosas que culmina na apoptose (Tabas, 1997; Feng *et al.*, 2003; Zhang & Kaufman, 2003). O aumento da apoptose, desregulação do metabolismo lipídico dos macrófagos e a eferocitose deficiente resulta secundariamente em necrose das células espumosas e subsequente liberação do seu conteúdo lipídico intracelular, compondo, então, o núcleo necrótico de lesões ateroscleróticas avançadas (Fig. 1 d).

Além de alterar o metabolismo lipídico dos macrófagos pelo acúmulo de colesterol, a oxLDL também é capaz de ativar essas células a produzir espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF, através da sinalização de receptores de reconhecimento de padrão (PPRs) (Bae *et al.*, 2009, Chávez-Sánchez *et al.*, 2014). Dentre esses receptores podemos citar CD36, TLR-2 e 4 que induzem uma sinalização que culmina na ativação de NF κ B e produção de citocinas (Janabi *et al.*, 2000; Miller, 2005;).

Apesar de pouco exploradas, também já foram descritas alterações físicas e morfológicas induzidas pela oxLDL em macrófagos. Foi observado que o tratamento com oxLDL em macrófagos peritoneais induz a polimerização do citoesqueleto de actina e espalhamento celular (Miller *et al.*, 2003). Sabe-se, também que macrófagos tratados com oxLDL possuem migração deficiente (Pataki *et al.*, 1992). Portanto, as alterações físicas induzidas por oxLDL podem estar relacionadas com a deficiência de migração dos macrófagos, contribuindo para sua retenção na placa. A retenção de macrófagos na lesão aterosclerótica

pode favorecer a formação de células espumosas e impedir a regressão da lesão, um processo diretamente dependente da evasão de macrófagos (Llodrá *et al.*, 2004).

Não é claro, no entanto, se apenas o acúmulo de colesterol no citoplasma dos macrófagos é responsável por essas alterações físicas e na migração, ou se outros efeitos oriundos da exposição à oxLDL contribuem para esse fenótipo. Park e colaboradores também demonstraram uma deficiência na migração de macrófagos peritoneais tratados com LDL enzimaticamente oxidada (Park *et al.*, 2012). A deficiência na migração foi relacionada com a perda da polaridade celular e se mostrou dependente da sinalização de CD36. Essa sinalização envolve a ativação de Vav1/Rac e culmina na desfosforilação da cadeia leve de miosina. Uma vez desfosforilada, a miosina se torna inativa e a célula perde sua força contrátil, importante para a assimetria e migração celular (Park *et al.*, 2012). Apesar de ter sido demonstrado a importância de CD36 para a deficiência na migração induzida por oxLDL em macrófagos, não é inteiramente elucidado se há outros fatores envolvidos nessas alterações.

Em outros tipos celulares, como células endoteliais, sabe-se que a oxLDL induz alterações na mecânica celular que podem ter implicações importantes para a aterogênese. Essas alterações mecânicas são atribuídas a diminuição de domínios ordenados da membrana plasmática, indicando uma possível desestruturação das balsas de membrana induzida pelo tratamento com oxLDL (Shentu *et al.*, 2010). Em macrófagos, o efeito da oxLDL em balsas de membrana não é claro e pouco se sabe sobre as possíveis consequências da desestruturação destes domínios para a funcionalidade dessas células. Uma vez que receptores CD36 são frequentemente encontrados nessas balsas, a possível capacidade da oxLDL em alterar esses domínios, pode influenciar na atividade deste receptor e portanto ter um papel importante na deficiente migração celular e retenção dos macrófagos na placa de ateroma (Zeng *et al.*, 2003; Rios *et al.*, 2013).

1.2. Balsas de membrana

As balsas de membrana são domínios enriquecidos em colesterol e esfingolípídios, formando regiões ordenadas de lipídeos (lo - *lipid ordered*) na membrana plasmática de animais (Brown & London, 1998). Esses domínios são heterogêneos e muito dinâmicos tanto na sua disposição quanto na sua associação e dissociação (Pike, 2006). O tamanho e a distribuição destes domínios variam muito, podendo se apresentar isolados ou até como domínios contínuos que cobrem a maioria da membrana plasmática (Honigmann *et al.*, 2014). Essas estruturas funcionam como plataformas de interação lipídio-proteína, recrutando, organizando ou excluindo certas proteínas de membrana. Várias dessas proteínas podem se associar a esses domínios, podendo chegar a 35% do total de proteínas da membrana, sendo que a maioria destas são palmitoiladas ou ancoradas a glicosilfosfatidilinositol (Levental *et al.*, 2010, Sezgin *et al.*, 2017). A integridade das balsas são essenciais para a função das proteínas residentes destes domínios, podendo influenciar em sua conformação, bem como na cascata de sinalização desencadeada por elas (Lingwood *et al.*, 2011; Laganowsky *et al.*, 2014). Desta forma, uma vez que as balsas influenciam na atividade de várias proteínas que por sua vez possuem diversas funções, esses domínios também são importante para vários processos celulares como a transdução de sinais, tráfego de vesículas e organização do citoesqueleto (Lafont & Van Der Goot, 2005; Shi *et al.*, 2013;).

As regiões de balsas são muito importantes para cascatas de sinalizações, uma vez que vários receptores e proteínas sinalizadoras, como receptores acoplados à proteínas G, residem em balsas (Ostrom & Paul, 2004). Neste contexto, as balsas criam um microambiente que propicia a progressão da cascata, isolando componentes enzimáticos indesejados que atrapalhariam o processo de transdução de sinais (Simons & Toomre, 2000). Dentre as cascatas de sinalização influenciadas pelas balsas de membrana, podemos destacar as sinalizações relacionadas à dinâmica do citoesqueleto de actina e a sinapses imunológicas de linfócitos (Hiltbold *et al.*, 2003; Mañes *et al.*, 2003) .

Há, também, outros microdomínios de membrana ricos em colesterol conhecidos como cavéolas. Estes domínios possuem várias características em

comum com as balsas de membrana, como a resistência a dissolução por detergentes e a grande concentração de colesterol e esfingolípídios, sendo muitas vezes consideradas um tipo especial de balsas de membrana (Harder & Simon, 1997). Diferentemente das balsas, que recrutam e organizam várias proteínas de membrana, as cavéolas possuem 2 proteínas específicas: caveolina e cavina. Essas duas proteínas se associam e formam pequenas invaginações na membrana, responsáveis pela endocitose independente de clatrina. Esse processo ainda é controverso e pouco compreendido, mas sabe-se que é dependente de fibras de estresse de actina e microtúbulos. A endocitose de cavéolas é importante para o reparo de membrana, regulação de lipídeos e sinalização celular (Corrotte *et al.*, 2013; Parton & Del Pozo, 2013).

Devido a sua grande influência em processos celulares importantes, as balsas de membrana têm sido alvo de vários estudos (Sezgin *et al.*, 2017). Nesses, é muito frequente a manipulação do conteúdo de colesterol da membrana plasmática para verificar indiretamente a importância desses domínios. O método que se destaca é o tratamento de células com metil- β -ciclodextrinas (M β CD) para o sequestro do colesterol e consequente desorganização das balsas (Fig. 2).

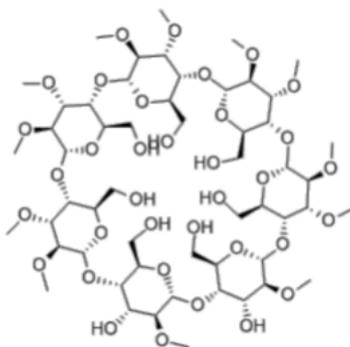


Fig. 2: Molécula de β -ciclodextrina.

β CD, um oligossacarídeo cíclico com 7 glicídios formando um domínio hidrofóbico central capaz de sequestrar colesterol de membrana.

Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos derivados da degradação do amido, e podem ser usadas como carreadores de fármacos, por serem solúveis em água e possuírem uma cavidade hidrofóbica. O tamanho do anel das β CDs

permite sua interação com o colesterol, tornando-as eficientes agentes sequestradores de colesterol de membranas.

A eficiência da M β CD já é bem descrita, podendo sequestrar, quando em altas concentrações (5-10mM), até 90% do colesterol de membrana de certos tipos celulares. Nessas condições as células sofrem mudanças morfológicas e podem perder a viabilidade (Kilsdonk *et al.*, 1995). Entretanto, com baixos tempos de tratamento (<1h) a viabilidade da célula pode ser mantida próxima a 100% (Zidovetzky & Levitan, 2007), sendo possível observar vários efeitos consequentes da desorganização das balsas, como por exemplo a reorganização do citoesqueleto de actina e a exocitose de vesículas (Wickstrom *et al.*, 2010; Echarri *et al.*, 2012; Hissa *et al.*, 2012).

O citoesqueleto de actina é altamente dinâmico e composto de filamentos de actina F, os quais são formados por monômeros de actina G. Esta última, quando ligada à uma molécula de ATP, é capaz de se ligar à extremidade da actina F (denominada de extremidade +). Após a sua incorporação no filamento crescente de actina, a molécula de ATP de cada monômero é hidrolisada a ADP, reduzindo sua resistência de ligação e favorecendo a despolimerização na extremidade oposta do filamento (denominada extremidade -). Esse processo é dinâmico e controlado por várias proteínas de ligação a actina, que regulam o comportamento dos filamentos, moldando-os para diferentes funções, como migração, adesão e determinação da conformação celular (Hohmann & Dehghani 2019). Algumas dessas proteínas, como Rho-GTPases, residem em balsas e dependem desses domínios para o desencadeamento de suas cascatas de sinalização (del-Pozo *et al.*, 2004; Palazzo *et al.*, 2004). Essas cascatas de sinalização recrutam determinadas proteínas de ligação a actina, como forminas e ARP2/3 que, por sua vez, regulam a polimerização e estruturação das fibras de actina, determinando a dinâmica deste citoesqueleto (Lee & Dominguez, 2010). A ativação de RhoA e subsequente ativação de seu substrato ROCK, estão relacionadas por exemplo com a formação de fibras de estresse e pontos de adesão focal, influenciando mudanças conformacionais na célula (Sit & Ed., 2011; de Curtis & Meldolesi, 2012). Lipídeos recrutados para balsas como PIP2, também são importantes na dinâmica do citoesqueleto,

induzindo a polimerização de actina e estabelecendo ligações entre o citoesqueleto e a membrana plasmática (Yin & Janmey, 2003).

A importância das balsas de membrana na dinâmica do citoesqueleto já foi observada em vários estudos que utilizaram o tratamento com M β CD em células fagocíticas não-profissionais. O principal efeito observado foi a formação de fibras de estresse, que são filamentos contrateis de actina presentes em células não musculares. Esse efeito foi relacionado com a ativação de proteínas Rho, residentes em balsas (Klausen *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2009; Hissa *et al.*, 2013). Essa reorganização do citoesqueleto de actina deixa a membrana mais rígida e com menor capacidade de deformação, como foi observado por Byfield (2004) em células endoteliais de aorta bovina (Byfield *et al.*, 2004). Da mesma forma que as balsas de membrana influenciam e regulam a polimerização do citoesqueleto de actina, há uma regulação recíproca por parte do citoesqueleto na formação e manutenção dos domínios de membrana (Chichili, & Rodgers, 2007.). Os filamentos de actina podem se ligar a balsas por meio de proteínas como ERM (ezrin, radixin, moesin) e, dessa forma, estabilizar ou direcionar a formação desses domínios (Viola & Gupta, 2007; Chichili & Rodgers, 2009). A regulação do citoesqueleto de actina e das balsas de membrana é portanto fina e dependente de um feedback em loop.

A desorganização de balsas e consequente alteração do citoesqueleto de actina podem afetar ainda outros processos celulares que dependem diretamente da dinâmica do citoesqueleto, como por exemplo a migração celular (Samstag, *et al.*, 2003; Mañes & Viola, 2006). Para a migração são necessários: a polarização celular com a formação de protrusões na frente de migração, a adesão das protrusões no substrato adiante, translocação do corpo celular, desmontagens dos pontos de adesão e retração da traseira da célula. A formação de protrusões depende da polimerização e organização dos feixes de actina na frente de migração, que podem formar estruturas laminares, denominadas de lamelipódios, ou estruturas filiformes, denominadas de filopódios (Ridley, 2011). Em seguida, as protrusões são aderidas ao substrato, através de receptores na membrana plasmática, como integrinas, que são importantes, juntamente com a actina, para a formação de pontos de adesão.

Esses pontos de adesão vão estabilizar as protrusões de membrana e proporcionar sítios de tração para o movimento do corpo celular. A força transmitida para os pontos de adesão, necessária para a movimentação do corpo celular, advém da interação da actina com a miosina que formam filamentos contráteis. Após o deslocamento de quase todo o citoplasma para a frente de migração, os pontos de adesão da traseira da célula precisam ser desfeitos. Esse processo não é totalmente compreendido, mas o mecanismo proposto é a simples retração da membrana que ocasionaria em um “rasgo” da traseira celular. Desta forma, parte da membrana é deixada para trás formando um rastro de migração (Ridley *et al.* 2003). Entretanto, também há outros mecanismos que podem ajudar na desconstrução dos pontos de adesão focais, como por exemplo a secreção de proteinases (Kirfel *et al.*, 2004). Em macrófagos, a participação de proteinases advinda de lisossomos parece exercer importante papel neste processo (Vérollet *et al.*, 2011).

As balsas estão relacionadas a migração principalmente no processo de polarização e formação dos pontos de adesão focal. Em linfócitos polarizados é observado dois subsets diferentes de balsas localizados nos dois pólos celulares. Na frente de migração é observado domínios enriquecidos em GM1 e na traseira de migração domínios de GM3 (Gómez-Moutón *et al.*, 2001). Acredita-se que essa polarização dos domínios de membrana seja responsável pela assimetria de receptores e enzimas residentes de balsa, as quais atuarão de forma diferencial nessas duas regiões celulares (Mañes *et al.*, 2001; Sorice *et al.*, 2001). A introdução de modificações estruturais nessas proteínas que impeçam sua associação com balsas, acarretarão em perda de polaridade celular (Gómez-Moutón *et al.*, 2001). Além disso, o tratamento com M β CD foi capaz de afetar a localização de alguns desses receptores como CD44 e CCR5 afetando a migração celular (Mañes *et al.*, 1999, Murai *et al.*, 2011). Esses resultados reforçam o papel das balsas de membrana na segregação de receptores, promoção da assimetria celular e conseqüentemente na migração.

Dentre as proteínas residentes de balsas que têm um papel na migração podemos destacar as integrinas (Pozo, 2004). As integrinas são glicoproteínas compostas por uma sub-unidade α e uma sub-unidade β . Existem 18 sub-

unidades α e 8 sub-unidades β que podem se combinar em 24 heterodímeros diferentes, apresentando combinações que são célula-específicas (Barczyk, et al., 2010). Integrinas $\beta 1$ e $\beta 2$ são os maiores grupos de integrinas, sendo que as $\beta 2$ são específicas de leucócitos. As integrinas são ativadas quando se ligam ao seu ligante, que muitas vezes são componentes da matriz como colágeno, fibronectina ou laminina, no caso das $\beta 1$, ou receptores I-CAM ou V-CAM no caso das $\beta 2$ (Humphries *et al.*, 2006). Quando ativas, as integrinas se organizam em regiões de balsas, desencadeando uma série de sinalizações que culminarão na formação de pontos de adesão focal (Pande, 2000; Leitinger & Hogg, 2002; Colognato, 2004). Como mencionado anteriormente, os pontos de adesão focal são estruturas importantes para a adesão e tração da célula durante migração celular. Os pontos de adesão focal são estruturas complexas que se formam a partir da ligação de integrinas com o substrato. Essa ligação desencadeia uma cascata de sinalização que recruta e ativa FAK (*focal adhesion kinase*), paxilina, talina, vinculina, e α -actinina que irá se ligar ao citoesqueleto de actina (Fig. 3.). A mesma ativação de FAK e proteínas Src irão ativar Rac, que induzirá a polimerização de actina, e RhoA/ROCK que irá fosforilar a cadeia leve da miosina, ativando-a. A miosina, juntamente com os nascentes filamentos de actina formarão as fibras de estresse, que garantirão contractibilidade e tensão para a migração, mas também para a adesão e mecanotransdução da célula (Wu *et al.*, 2007; Jansen et al., 2017 novembro; Martino *et al.*, 2018;). A importância da integridade das balsas para o bom funcionamento das integrinas e conseqüentemente para a adesão e migração celular já foram demonstrados na literatura (Colognato, 2004). Leitinger e Hogg demonstraram que quando ativas, integrinas $\alpha 4\beta 1$ co-localizam com domínios ricos em GM1 em linfócitos e que o tratamento com M β CD desfaz as nucleações de integrinas, que provavelmente situavam em pontos de adesão focal (Leitinger & Hogg, 2002). Ramprasad, em 2007, observou que o sequestro do colesterol com M β CD também diminui a migração celular por diminuir a formação de novos pontos de adesão focal (Ramprasad *et al.*, 2007). Mais recentemente, Bi e colaboradores observaram que o tratamento com M β CD também alterou a localização de integrinas $\beta 1$ e $\beta 3$ na membrana, comprometendo a formação de lamelipódios e conseqüentemente a migração celular (Bi et al., 2018).

Da mesma forma que há uma regulação recíproca entre o citoesqueleto de actina e as balsas de membrana, esses domínios podem tanto influenciar como serem influenciados pelas integrinas. A inativação de integrinas devido a desadesão das células ao substrato, induz a internalização de domínios de membrana (del Pozo et., al, 2004). Recentemente, Kalappurakkal e colaboradores demonstraram que a ativação de integrinas e a sinalização dependente de tensão gerada por elas, resulta na formação de domínios de membrana que são essenciais para o espalhamento celular (Kalappurakkal *et al.*, 2019).

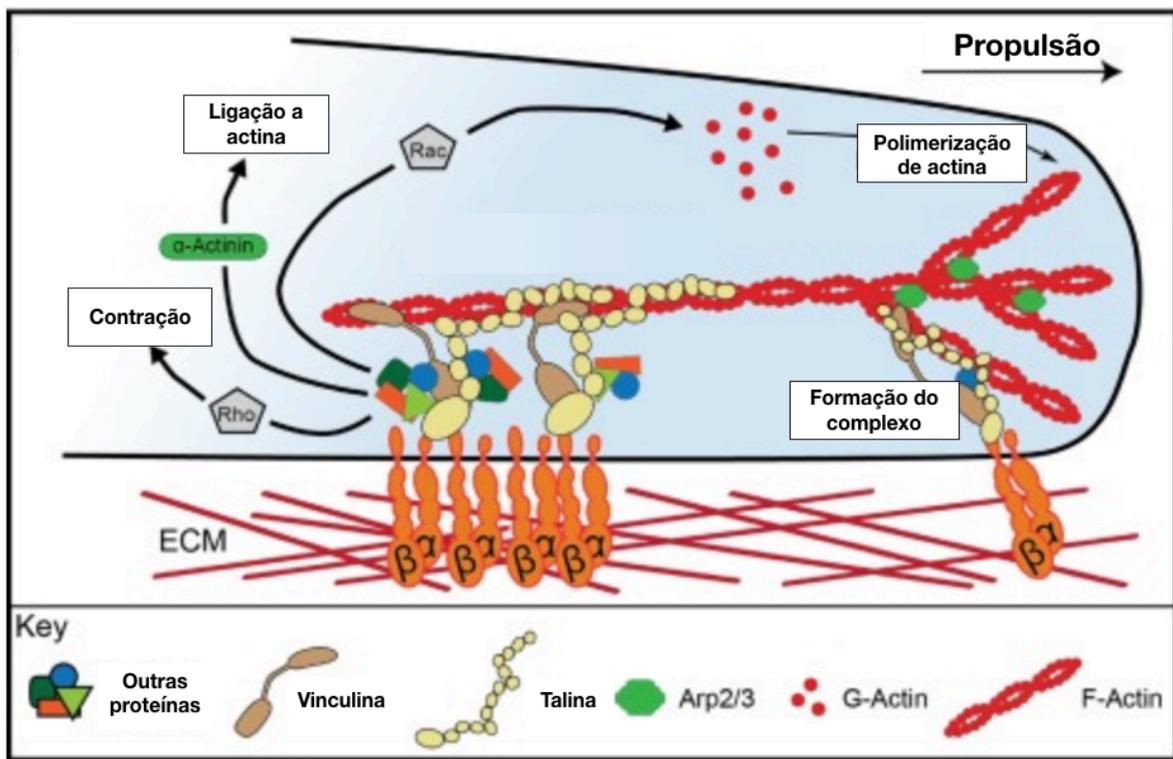


Fig. 3: Organização dos pontos de adesão focal para propulsão e migração celular.

Os pontos de adesão focal fazem a ligação entre a matriz extracelular (ECM) e o meio intracelular por meio da ligação de integrinas (subunidade α e β) ao substrato. A ligação e ativação de integrinas ativará kinases como FAK e Src's que culminam na ativação de RhoGTPases como Rac e RhoA. Rac promoverá a polimerização de actina na frente de migração e RhoA ativará a miosina, que ao se associar a actina permitirá a contração dessas fibras. Concomitantemente a ativação de quinases recrutam o complexo de proteínas que compõem os pontos de adesão focal, incluindo vinculina, talina e α -actinina. Esse complexo

se ligará a filamentos de actina, permitindo que a contração das fibras produza a tração necessária para propulsão do citoplasma e migração celular. (Adaptado de Jansen *et al.*, 2017 novembro).

Além da formação do citoesqueleto de actina e dos pontos de adesão focal as balsas de membrana são importantes para o tráfego de vesículas entre a superfície e o interior celular (Ikonen, 2001). O tráfego de vesículas depende do direcionamento, docagem e fusão ou exocitose da vesícula. Esses processos são controlados por proteínas presentes tanto na vesícula quanto na membrana alvo. O direcionamento é ditado por proteínas Rab que são específicas para cada tipo de vesícula. As Rabs são reconhecidas por proteínas de aprisionamento específicas da membrana alvo e dessa forma o tráfego é direcionado. Na docagem e fusão das vesículas há a participação das sinaptotagminas e do complexo de proteínas SNARES. Proteínas SNARES estão presentes na vesícula (v-SNARES) e na membrana alvo (t-SNARES). Essas SNARES se reconhecem e se complexam uma a outra, deixando as membranas bem próximas e promovendo a força necessária para a fusão ou exocitose da vesícula. As sinaptotagminas são proteínas que se ligam as SNARES e também a ions cálcio (Ca^{2+}). Acredita-se que o Ca^{2+} se ligando a sinaptotagmina seja o responsável pelo funcionamento adequado do complexo SNARE, promovendo a fusão regulada da vesícula (Jahn & Fasshauer, 2012). Se a membrana alvo for a membrana plasmática ocorre a exocitose. O processo de exocitose é melhor estudado para vesículas sinápticas, mas observa-se grande semelhança entre este e outros tipos de exocitose, como é o caso da secreção de vesículas lisossomais (Rao *et al.*, 2014). Proteínas SNARES, sinaptotagminas e rabs são enriquecidas em balsas, podendo indicar que esses domínios são pontos preferenciais para a exocitose (Chamberlain *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Puri & Roche, 2006; Kay *et al.*, 2006). De fato, a integridade das balsas de membrana é importante para que a exocitose de vesículas ocorra de forma controlada. Zamir e Charlton, em 2006, demonstraram em junções neuromusculares de lagostim que o tratamento com M β CD inibe exocitose de vesículas sinápticas evocadas, mas em contrapartida aumenta eventos espontâneos independentes de Ca^{2+} (Zamir & Charlton, 2006). Isto também foi observado em outros estudos tanto com vesículas sinápticas em neurônios quanto com lisossomos (Wasser *et al.* 2007; Chen *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012;

Hissa *et al.*, 2012). Em 2013, nosso grupo também demonstrou, em fibroblastos, um pico de exocitose de lisossomos independente de Ca^{2+} que sucede a reorganização do citoesqueleto de actina e formação de fibras de estresse (Hissa *et al.*, 2013).

A deficiência de exocitose controlada após o tratamento com M β CD pode ser devido a desorganização do complexo SNARE, proteínas residentes de balsas de membrana e importante para a exocitose direcionada de vesículas (Salaün *et al.*, 2004). Quanto ao aumento de eventos exocíticos espontâneos após o tratamento com M β CD, uma possível explicação é que a própria reorganização do citoesqueleto pode exercer uma força mecânica que aproxima as vesículas da periferia da célula, promovendo a exocitose de vesículas de forma independente de Ca^{2+} (Hissa *et al.*, 2013). Em contrapartida, este citoesqueleto reorganizado também poderia funcionar posteriormente como uma barreira que impede subsequentes eventos exocíticos evocados.

A desregulação dos eventos exocíticos gerada pela desorganização das balsas de membrana, podem ter consequências para diversos processos celulares como o reparo de membrana, o metabolismo endocítico, degradação da matriz e inclusive a migração celular (Couto *et al.*, 2020; Vérollet *et al.*, 2011; Tu *et al.*, 2008; Andrews, 2000).

1.3. oxLDL e balsas

A primeira evidência que a molécula de oxLDL poderia alterar a dinâmica de domínios enriquecidos em colesterol na membrana plasmática veio em 1994, quando Smart e colaboradores observaram que o tratamento com oxLDL induzia a translocação de caveolina da membrana para o golgi em fibroblastos, efeito também observado posteriormente em células endoteliais (Smart *et al.*, 1994; Blair *et al.*, 1999). Interessantemente, também foi observado que o efeito do tratamento com oxLDL era semelhante ao efeito da depleção de colesterol e consequente ruptura de cavéolas, na inibição de eNOS (Blair *et al.*, 1999). Outras semelhanças foram observadas entre a depleção do colesterol com M β CD e o tratamento com subprodutos da oxidação de LDL, como oxPAC (*palmitoyl- arachidonyl-phosphatidyl choline*) (Yeh *et al.*, 2004). Neste estudo

tanto a depleção do colesterol quanto o tratamento com oxPAC ocasionou a translocação de caveolina para o golgi e induziu a produção de IL-8 em células endoteliais. Esses efeitos foram revertidos pela doação de colesterol para a membrana (Yeh *et al.*, 2004).

Por isso, começou-se a considerar a hipótese de que a molécula de oxLDL poderia ser um sequestrador de colesterol, capaz de alterar os domínios de membrana e gerar disfunção endotelial em consequência da inibição de eNOS. Entretanto, não é observado diferenças substanciais nos níveis de colesterol da membrana plasmática de células endoteliais tratadas com oxLDL (Shentu *et al.*, 2010).

Apesar do mecanismo pelo qual a oxLDL alteraria as balsas ainda ser controverso, o número de evidências que demonstram o papel da oxLDL na organização desses domínios vem crescendo na literatura. Mais recentemente em 2010, Shentu e colaboradores observaram pela técnica de laurdan, uma diminuição nos domínios ordenados ricos em colesterol de células endoteliais após o tratamento com oxLDL (Shentu *et al.*, 2010).

Além disso, as semelhanças entre o tratamento com oxLDL e com M β CD também são notáveis. Além da produção de IL-8, o tratamento com oxLDL se assemelha ao tratamento com M β CD em alterações do citoesqueleto de actina. Ambos os tratamentos induzem a polimerização de actina em células endoteliais, conseqüentemente alterando suas propriedades mecânicas (Miller *et al.*, 2003; Kowalsky *et al.*, 2008; Chouinard *et al.*, 2008). Shentu e colaboradores observaram o alinhamento de células endoteliais e aumento do módulo elástico de suas membranas, indicando uma maior rigidez em consequência de ambos os tratamentos (Shentu *et al.*, 2010). Em outro estudo do mesmo grupo, também foi demonstrado que a polimerização de actina e rigidez de membrana induzida por oxLDL é dependente da ativação de rho A, da mesma forma como foi observado no tratamento com M β CD (Oh *et al.*, 2016; Hissa *et al.*, 2013). Recentemente, nosso grupo também demonstrou semelhanças entre o tratamento com oxLDL e M β CD em células endoteliais. Nesse estudo demonstramos que o tratamento com oxLDL, bem como com M β CD, é capaz de induzir a polimerização *de novo* do citoesqueleto de actina e aumentar a rigidez

de membrana. Além disso, o tratamento com oxLDL também induziu a exocitose de lisossomos, de forma semelhante ao tratamento com M β CD (Couto *et al.*, 2020).

A maioria dos estudos que mostram o papel da oxLDL em balsas de membrana, porém, foram realizados em células fagocíticas não-profissionais, principalmente células endoteliais. Desta forma, pouco se sabe sobre o papel da oxLDL em balsas de membrana de macrófagos. Entretanto, alguns estudos já indicaram que o tratamento de macrófagos com oxLDL pode alterar a dinâmica das balsas. Grandl e colaboradores observaram que o tratamento com oxLDL pode induzir hidrólise de esfingomielina em ceramida e formação de domínios desse lipídio na membrana de macrófagos (Grandl *et al.*, 2006). A hidrólise de esfingomielina pode impactar na organização de balsas de membrana, uma vez que esses esfingolipídios são os componentes mais abundantes das balsas, depois de colesterol (Pike, 2006). Além disso, Gaus e colaboradores, observaram que o tratamento com oxisterois, subproduto da oxidação de LDL, pode retirar colesterol especificamente da região de balsas em macrófagos, da mesma forma que o tratamento com M β CD (Gaus *et al.*, 2004).

Portanto há indícios que a oxLDL é capaz de induzir a desorganização das balsas em macrófagos. Entretanto pouco se sabe sobre as possíveis consequências da desorganização desses domínios para a funcionalidade dos macrófagos e como esses efeitos poderiam ter alguma implicação para o desenvolvimento da aterosclerose.

No presente estudo, buscamos elucidar alterações no funcionamento de macrófagos que sejam consequências da possível ação da oxLDL na desorganização das balsas de membrana. Desta forma, analisamos processos que em outros tipos celulares são regulados pelas balsas de membrana, como a organização do citoesqueleto de actina, distribuição de integrinas e migração celular. Elucidar essas alterações causadas pela oxLDL em macrófagos tem um grande impacto no entendimento sobre a complexidade dos fatores envolvidos na aterosclerose, algo essencial para o desenvolvimento de estratégias de prevenção e tratamento da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Investigar e comparar os efeitos morfofuncionais decorrentes da exposição de macrófagos à oxLDL com aqueles observados para macrófagos submetidos ao tratamento com M β CD, a fim de elucidar a contribuição da desestruturação de balsas de membrana e seus efeitos biomecânicos no desenvolvimento da placa de ateroma.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a organização das balsas de membrana de macrófagos após sua exposição à oxLDL;
2. Avaliar os efeitos biomecânicos da exposição de macrófagos à oxLDL ou M β CD (droga sequestradora de colesterol), através do uso de microscopia de desfocalização;
3. Correlacionar os efeitos biomecânicos da exposição de macrófagos à oxLDL ou M β CD com a organização do citoesqueleto de actina e distribuição de integrinas;
4. Avaliar os efeitos da exposição de macrófagos à oxLDL ou M β CD no tráfego e secreção de vesículas intracelulares, principalmente lisossomos, através de análise em microscopia;
5. Avaliar os efeitos da exposição de macrófagos à oxLDL ou M β CD na migração celular.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células e tratamentos

Para o presente estudo foram utilizados macrófagos murinos primários derivados de medula óssea (BMDM). As células foram obtidas de camundongos C57BL/6 fêmeas de 8 a 12 semanas, descartes de projetos de colaboradores aprovados pela Comissão de Ética de Experimentação Animal da UFMG (certificados n°47/2017 e 284/2016).

Os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. O fêmur e a tíbia foram extraídos e limpos para posterior excisão das epífises e coleta da medula óssea. A medula foi obtida por meio da lavagem do canal medular com 5ml de solução salina tamponada com fosfato (PBS) com o auxílio de seringas. O lavado foi centrifugado a 200g por 10 min e o *pellet* contendo as células foi ressuspensionado em meio de diferenciação (RPMI, suplementado com 20% soro fetal bovino -SFB, 10% de sobrenadante de célula L-929, 2mM glutamina, 50µM de β-mercaptoetanol e 100 U/ml de unidades de Penicilina/Estreptomicina). As células foram então contadas e semeadas em placas de petri de 10 cm de diâmetro na densidade de 7x10⁶ células por placa. O meio foi trocado a cada 2 dias por 7 dias, quando as células, já diferenciadas, foram semeadas em placas de 24 poços para os diferentes ensaios. Para isso, as placas de petri contendo as células diferenciadas foram lavadas com PBS e colocadas sobre o gelo. PBS/EDTA 10 mM foi adicionado e com o auxílio de uma pipeta de transferência as células foram removidos da placa. Os BMDMs foram então contados e semeados em meio de manutenção (RPMI, suplementado com 10% SFB, 5% de sobrenadante de célula L-929, 2mM glutamina, 50µM de β-mercaptoetanol e 100 U/ml de unidades de Penicilina/Estreptomicina). As células foram mantidas em estufa úmida à 37°C e atmosfera de 5% de CO₂.

Após plaqueamento nas placas de 24 poços, as células foram tratadas com LDL oxidada (oxLDL) a 50µg/ml por 24h, LDL nativa (nLDL) 50µg/ml por 24h ou Metil-beta-ciclodextrina (MβCD) (Sigma-Aldrich) 5mM por 40 minutos em meio de manutenção sem SFB. Células controle, não tratadas, foram incubadas por 24h em meio de manutenção sem SFB. Para os ensaios de inibição de ROCK (Rho quinase), após o tratamento com oxLDL as células foram tratadas por 30 min com 10µM de Y-27632 (Sigma-Aldrich), inibidor seletivo de ROCK.

3.2 Obtenção e oxidação de LDL

Para obtenção da LDL, sangue humano foi coletado de doadores voluntários e o plasma separado por centrifugação (500 x g por 15 min a 4°C). Os tubos com soro foram calibrados com solução de KBr de densidade 1,019g/ml e ultracentrifugados a 236.500 x g, a 4°C por 7h. Após a retirada do sobrenadante contendo VLDL, a densidade do plasma foi novamente calibrada a 1,063g/ml com solução de KBr e em seguida, submetido a ultracentrifugação a 236.500 x g, a 4°C por 6 horas. O halo amarelo que consiste na camada de LDL nativa (nLDL), foi retirado e submetido a dois ciclos de diálise. A diálise, foi realizada utilizando uma membrana de 0,22 µm contendo a amostra, inserida em um béquer contendo tampão TRIS 20mM/ pH 7,4, sob agitação a 4°C, sendo o volume de TRIS pelo menos 20x maior que o volume da amostra. A nLDL foi posteriormente filtrada e armazenada a -80°C. A concentração de LDL foi determinada pela dosagem de proteínas presente na preparação, usando o método de Lowry. A uma parte da LDL foi adicionada um coquetel de inibidores de proteases e antioxidantes, composto por PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride) 5 µmol por litro de plasma, benzamidina 10 µmol por litro de plasma, BHT (butylated hydroxy toluene) 100 µmol por litro de plasma e aprotinina 10 µmol por litro de plasma. A outra parte de nLDL foi submetida a oxidação com CuSO₄. Para isso a solução contendo nLDL foi incubada com 20 µM de CuSO₄ por mg de proteína por 18h a 37°C. A reação de oxidação foi finalizada pela adição de coquetel de inibidores de proteases e antioxidantes. Após a oxidação, as amostras foram filtradas e armazenadas a -80°C, protegidas da luz. O nível de oxidação foi determinado por TBARS, como descrito anteriormente (Shintani, 2013). Neste ensaio determina-se a quantidade de malondialdeído (MDA), substancias reativas de acido tiobarbiturico, o qual é o principal produto da oxidação lipidica. As amostras preparadas apresentaram os seguintes valores: nLDL = 0.602 nmol de MDA/mg de proteína; oxLDL = 24,401 nmol de MDA/mg de proteína que caracteriza LDL extensivamente oxidada.

3.3. Marcação com toxina colérica fluorescente (CTXB) para avaliação das balsas de membrana

Para a visualização da estruturação de balsas de membrana foi realizada a marcação de gangliosídeos residentes de balsas, GM1, reconhecidos pela subunidade B da toxina colérica (CTXb). 1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e após os diferentes tratamentos, as lamínulas contendo as células foram lavadas e colocadas na presença de CTXb conjugada com Alexa Fluor 488® (Invitrogen) 1 µg/mL por 5 minutos a 4°C e fixadas com formaldeído 3,7% em PBS à temperatura ambiente (TA) por 20 minutos. As amostras foram, então, lavadas, marcadas com DAPI 1:1000 em PBS para visualização do núcleo celular e montadas sobre lâminas de vidro para posterior observação ao microscópio de fluorescência Axio Vert.A1, Zeiss.

A análise da intensidade de fluorescência média e variância da intensidade de fluorescência, foi realizada no software ZEN blue, circulando pelo menos 50 células em 3 campos diferentes de 2 experimentos independentes.

3.4. Microscopia eletrônica de varredura e transmissão

1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M por 2h em temperatura ambiente. As lamínulas contendo as células foram, então, lavadas 3 vezes com tampão fosfato 0,1M e desidratadas em série de álcool com as seguintes concentrações crescentes: 35%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% e 100%. As amostras foram incubadas 2 vezes por 15 minutos com cada concentração de álcool. Posteriormente, as amostras foram secas a ponto crítico de CO₂ no aparelho Balzers, modelo CPD-020. Em seguida, as amostras foram montadas em *stubs* e metalizadas com uma camada de 3nm de ouro. Os *stubs* contendo as amostras foram analisados em microscópio eletrônico de varredura JOEL JSM - 6360LV com de 10kV. A secagem a ponto crítico, metalização montagem e análise em microscópio de varredura foi feita no centro de microscopia da UFMG.

Para microscopia eletrônica de transmissão, células foram semeadas em placa de 24 poços sobre lamínula de vidro na densidade de 5×10^5 células por poço e submetidas aos diferentes tratamentos. Após os tratamentos, a fixação primária foi

realizada com glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M por 2h em TA e a fixação secundária com tetróxido de ósmio (OsO₄) 2% em tampão fosfato 0,1M . Logo em seguida foi realizada a contrastação com acetato de uranila 2% em água destilada por 20 minutos. Posteriormente, as amostras foram desidratadas em série de álcool (50, 70, 95 e 100%), 5 min em cada solução e infiltradas com solução acetona:resina (1:3) por 30 min. Para a inclusão foi realizada a técnica de *flat embedding*. Para isso, tubos de resina foram vertidos sobre a lâmina e colados a 60°C para solidificação. Foi utilizado nitrogênio líquido sobre a lâmina de vidro para que os blocos se soltem e seguissem para microtomia em corte ultra fino e análise em microscópio eletrônico de transmissão. A preparação e análise das amostras de microscopia eletrônica de transmissão também foram realizadas no centro de microscopia da UFMG.

3.5. Microscopia de desfocalização

Para medir possíveis mudanças na rigidez da membrana das células mediante o tratamento com nLDL, oxLDL ou MβCD foi utilizada a microscopia de desfocalização. Essa metodologia permite quantificar alterações na curvatura da membrana celular por meio da análise do contraste produzido por um objeto de fase levemente desfocalizado em microscópio de luz transmitida. A expressão para o contraste dado pela desfocalização é dado por:

$$C_I(x, y) = \frac{I - I_0}{I_0} = \Delta n \Delta f \nabla^2 h(x, y) \quad (1)$$

Onde I é a intensidade luminosa do objeto na posição (x, y) , I_0 é a intensidade luminosa média fora do objeto, Δn é a diferença entre os índices de refração do objeto observado e do meio em que ele está imerso, Δf é a desfocalização, em μm , introduzida e $h(x, y)$ é a espessura do objeto. Desta forma, o laplaciano da função $h(x, y)$ ($\nabla^2 h(x, y)$) representa a curvatura local do objeto analisado, dada em μm^{-1} . Sendo assim, informações obtidas pelo contraste na microscopia de desfocalização estão diretamente relacionadas a informações de curvatura do objeto.

Com os dados da curvatura das células, é possível calcular uma correlação temporal das imagens obtidas durante os tratamentos, segundo a seguinte fórmula:

$$F_t(t) = \langle \langle k(\rho, t_0) \cdot k(\rho, t_0 + t) \rangle \rangle_{t_0} \rho \quad (2)$$

Onde $k(\rho, t_0)$ é a curvatura observada na posição ρ no instante t_0 . O valor da função de autocorrelação temporal $F_t(t)$ em cada instante t é uma medida estatística do quanto a curvatura em um ponto da membrana, num instante qualquer está relacionada ao mesmo ponto num intervalo de tempo t . Essa função apresenta um decaimento que pode ser ajustado por uma exponencial simples:

$$F_t(t) = A e^{\frac{-t}{\tau}} \quad (3)$$

Onde A é a amplitude (valor de curvatura) e τ é o tempo de decaimento (ou tempo de relaxação).

Com o tempo de relaxação pode se inferir a rigidez da membrana, sendo que quanto maior o tempo de relaxação maior a rigidez do objeto.

Para a obtenção dos vídeos em microscópio de luz, 2×10^5 células em meio de manutenção sem SFB, foram semeadas em placas de 3cm de diâmetro com fundo de vidro e gravadas em microscópio invertido com sistema de correção automática de foco (PFS), ao qual encontra-se acoplado um filtro verde capaz de absorver comprimentos de onda da luz na faixa de 530nm. A distância focal foi mantida fixa, com uma desfocalização de $1 \mu\text{m}$ e a calibração dos níveis de cinza da câmera foi realizada conforme descrito por Agero *et al.*, 2004. Em seguida M β CD foi adicionado às células e a aquisição de imagens continuou por mais 40 minutos. Para análise a longo prazo do tratamento com nLDL e oxLDL, células foram previamente tratadas e filmadas por 60 minutos e, posteriormente, comparadas com células não tratadas. Para a análise das imagens, foi usado um Plugin do ImageJ desenvolvido pelos membros do Laboratório de Física Biológica da Universidade Federal de Minas Gerais que calcula a correlação temporal dos pixels em quadrantes selecionados, ao redor da borda celular. Os valores obtidos foram ajustados no programa Kaleidagraph e os tempos de relaxação foram obtidos para a inferência da rigidez da membrana. Foram analisados 5 pontos na membrana de 3 células para cada condição em dois experimentos independentes.

3.6. Marcação do citoesqueleto de actina

Para a visualização do citoesqueleto de actina em células fixadas foi realizada a marcação com faloidina. Para isso, 1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24 poços com lamínula de vidro, tratadas conforme já descrito e fixadas com formaldeído 3,7% por 20 min a TA. Após lavagem com PBS e permeabilização com triton x-100 0,1% em PBS por 15 min, as lamínulas contendo as células foram incubadas com faloidina conjugada com Alexa Fluor 546® (Invitrogen) 1:20 em PBS e coradas também com DAPI 1:1000 em PBS para visualização do núcleo celular. As lamínulas foram então montadas em lâminas de vidro e visualizadas em microscópio de fluorescência Axio Vert.A1.

Para a quantificação da intensidade de fluorescência média, foram analisadas aproximadamente 50 células de 3 experimentos diferentes para cada condição. As células foram circuladas e a intensidade de fluorescência média de cada célula foi medida utilizando o software Image J.

Para os experimentos de co-marcção com faloidina e CTXb, células foram primeiramente marcadas com CTXb como descrito anteriormente, fixadas e em seguida marcadas com faloidina como descrito acima. As imagens foram obtidas em microscópio Axio Imager com módulo Apotome.2 Zeiss e o cálculo do coeficiente de Pearson foi feito pelo plug-in *co-localization* do image J.

3.7. Marcação de integrinas

Para a visualização de integrinas, foram realizados ensaios de imunofluorescência, utilizando-se anticorpos específicos, policlonais, anti- $\beta 1$ (coelho) e anti- $\beta 2$ (cabra), ambos da Santa Cruz. 1×10^5 células foram semeadas sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços, tratadas e fixadas com formaldeído 3,7% por 20 min a TA. Posteriormente, as lamínulas contendo as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas com triton X-100 0,01 % por 3 min, incubadas com PBS/BSA 2% por 30 min para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação aos anticorpos e incubadas com anticorpos primários anti $\beta 1$ ou $\beta 2$ 1:50 em PBS/BSA 2% por uma hora a TA. Após lavagem com PBS, as lamínulas contendo as células foram incubadas com solução de anticorpos secundários de cabra anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488® para $\beta 1$ e anticorpo de macaco anti-IgG de cabra Alexa Fluor 488® para

β 2, na concentração de 1:250 em PBS/BSA 2% por uma hora a TA. Por fim as lamínulas contendo as células foram lavadas, com PBS/BSA 2%, marcadas com DAPI 1:1000 em PBS e montadas em lâminas de vidro para visualização em microscópio de fluorescência.

3.8. Filmagem de células vivas e avaliação morfológica dos macrófagos em microscopia de luz transmitida.

Para avaliar a mobilidade celular frente aos tratamentos utilizados, foi realizado a filmagem dos macrófagos vivos durante todo o tempo de tratamento. Para isso, células foram semeadas em placas de 24 poços na confluência de 5×10^4 e filmadas em microscopia de luz por 24h, à 37°C, 5% de CO₂ em aparelho Cytation 5 Cell Imaging- Biotek. Células foram filmadas por até 24h na presença ou na ausência dos tratamentos. O vídeo foi feito com sequências de fotos capturadas a cada 5 min.

A medida da área celular foi obtida utilizando o software ImageJ, onde foram circulares 50 células de cada condição.

3.9 Ensaios de migração em fenda.

Para análise da migração celular foi utilizado ensaio de fechamento de fenda. Para isso, 5×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24 poços para obtenção de uma confluência de 100%. Células foram então submetidas aos tratamentos e em seguida foi aberta uma fenda na monocamada de células utilizando-se uma ponteira de 10 μ l. Os poços foram lavados e o meio substituído por meio de manutenção com 1% de SFB. As células foram então deixadas a 37°C e 5% de CO₂ por 18 h para a migração das células, sendo que fotos eram tiradas a cada 6 horas para análise do número de células que migraram para a fenda. A quantificação da migração foi feita pela contagem manual do número de células que migraram para a fenda em 3 experimentos independentes.

3.10. Marcação de lisossomos e membrana plasmática.

Para a visualização da distribuição dos lisossomos em relação a membrana plasmática, 1×10^5 células por poço foram semeadas em placas de 24

poços com lamínula de vidro. Após o tratamento com M β CD, células foram fixadas com 3.7% de formaldeído por 20 minutos à temperatura ambiente. As células foram lavadas com HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) e incubadas com WGA (Wheat Germ Agglutinin) conjugado com Alexa Fluor 488[®] por 20 minutos para a marcação da membrana. Após lavagem com PBS suplementado com 2 mM de CaCl₂ e 1,0 mM de MgCl₂ (PBS+/+), as células foram permeabilizadas por 20 minutos com uma solução 0.5% saponina e 2% albumina sérica bovina (BSA) em PBS+/+ (PBS/BSA/Saponina) e posteriormente incubada com anticorpo primário anti-LAMP-1 de camundongo, feito em rato (Hybridoma Bank - 1D4B) na diluição de 1:50 em PBS/BSA/Saponina, por 45 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS/BSA/Saponina e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de rato feito em cabra e conjugado com Alexa-Fluor546[®] na diluição de 1:250 em PBS/BSA/Saponina por 30 minutos. Por fim, as células foram lavadas 3 vezes com PBS/BSA/Saponina e 2 vezes com PBS e montadas em lâminas de vidro com meio de montagem ProLong Gold[™] contendo DAPI, para a marcação dos núcleos. As imagens foram feitas em microscópio Axio Imager com módulo Apotome.2 Zeiss.

4. RESULTADOS

4.1. Tratamento com oxLDL ou M β CD alteram a disposição das balsas de membrana.

A oxLDL é capaz de alterar balsas de membrana diminuindo esse domínios ordenados em células endoteliais (Levitan, & Shentu, 2011). Nesse estudo, inicialmente investigamos se o tratamento com oxLDL poderia induzir essas alterações em balsas também em macrófagos. Para isso macrófagos derivados de medula óssea de camundongos (BMDM), foram semeados em placas de 24 poços sobre lamínula de vidro, tratados com 50 μ g/ml oxLDL por 24h e comparados com macrófagos tratados com 5mM de M β CD por 40 min, uma vez que essa droga sabidamente altera as balsas de membrana e portanto atua como um controle positivo. O tratamento com 50 μ g/ml de nLDL por 24h também foi utilizado como controle negativo. Para a visualização das balsas, foi utilizado a marcação dos domínios de GM1, um gangliosídeo que reside em balsas de membrana, pela subunidade b da colerotoxina fluorescente (CTXb-Alexa fluor 488[®]).

Observamos que células controle e tratadas com nLDL apresentaram vários domínios visíveis como agregados fluorescentes de GM1, localizados principalmente na região central da célula, próxima ao núcleo. Por outro lado, células tratadas com M β CD e oxLDL, apresentaram pontuações e/ ou regiões com grande intensidade de fluorescência localizadas principalmente nas bordas celulares (Fig.4A). Foi possível também observar que as células tratadas com M β CD e oxLDL sofreram mudanças na sua forma, apresentando fibras de retração (setas Fig. 4A) e/ou encolhimento celular. Ao avaliarmos apenas a intensidade média de fluorescência da marcação com CTXb, um aumento foi observado somente para a condição tratada com oxLDL (Fig 4B). No entanto, ao avaliarmos a variância da intensidade de fluorescência observamos tanto um aumento na condição tratada com oxLDL quanto na condição tratada com M β CD (Fig.4C). Isso indica que esses dois tratamentos induzem uma distribuição mais heterogênea de GM1, com alguns pontos mais intensamente corados, enquanto a condição controle e tratada com nLDL apresentou pontos com níveis de fluorescência semelhantes.

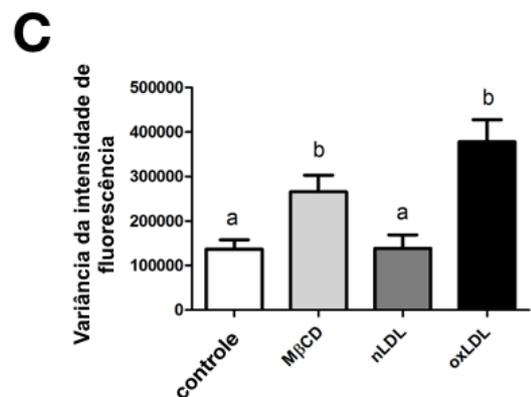
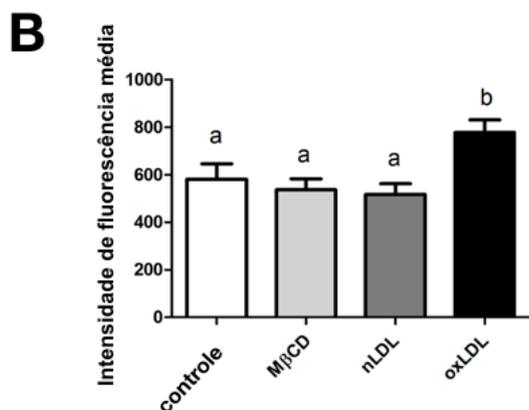
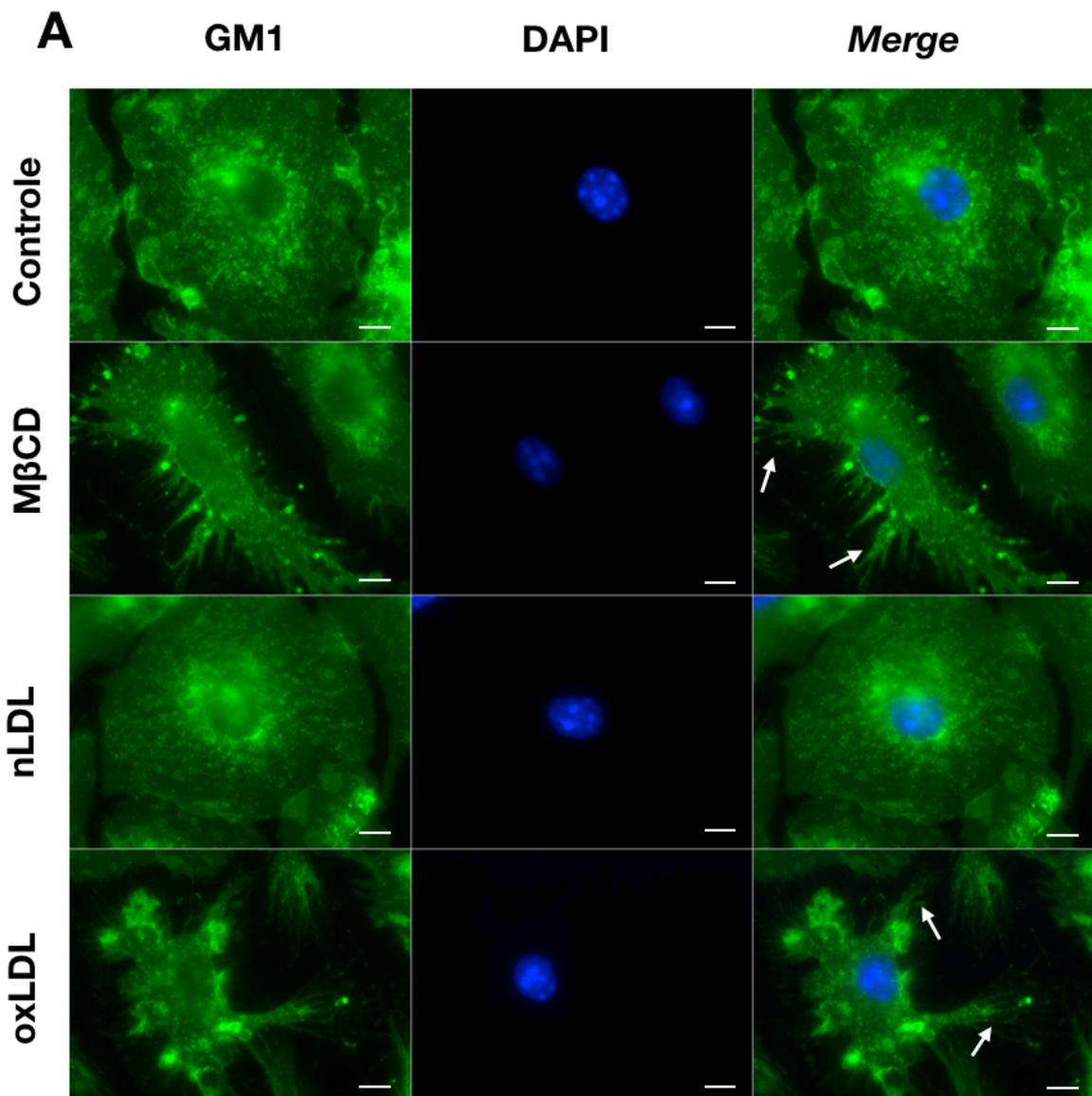


Fig. 4: Visualização das balsas de membrana em macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e MβCD.

BMDMs foram tratados com 50µg/ml de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de MβCD por 40min, e marcados com CTXb por 5min antes de serem fixados. (A) Imagens

representativa de microscopia de fluorescência mostrando GM1 marcado por CTXb em verde e núcleo celular por DAPI em azul com fibras de retração evidenciadas por setas. (B) Quantificação da intensidade de fluorescência média e (C) variância da intensidade de fluorescência de células marcadas com CTXb. Nos gráficos, letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0.05$ usando One-way ANOVA e Tukey's post-test). Barra de escala indicam $5\mu\text{m}$.

4.2. Tratamento com oxLDL ou M β CD alteram a morfologia celular promovendo encolhimento celular e desaparecimento de ondulações de membrana.

Além da alteração na distribuição das balsas de membrana, foi observado que tanto o tratamento com oxLDL quanto com M β CD induziu alterações na morfologia celular. Em microscopia de luz transmitida com contraste de fase, observou-se que as células não tratadas ou tratadas com nLDL se mostraram espalhadas e com estruturas em lamelipódios, semelhantes a *ruffles* de membrana (setas Fig. 5A), enquanto as células tratadas com oxLDL ou M β CD se mostraram encolhidas (Fig. 5A e B). Após o tratamento com M β CD, foi possível observar fibras de retração e, da mesma forma que no tratamento com oxLDL, não foi possível observar estruturas semelhante a lamelipódios nestas células.

Também foi possível observar gotículas lipídicas no citoplasma de células tratadas com nLDL, consequência do acúmulo de colesterol (cabeças de setas Fig. 2A). Interessantemente, não é possível observar essas estruturas em células tratadas com oxLDL. Entretanto, nessas células o citoplasma se apresentou com estruturas escuras que podem ser decorrentes de uma possível fosfolipidose já descrito para o tratamento de macrófagos com oxLDL (Orsó et al., 2011). Para melhor investigarmos essas estruturas intercelulares, realizamos uma microscopia eletrônica de transmissão em macrófagos tratados ou não com oxLDL. Observamos que células controles apresentaram muitas vesículas intracelulares com conteúdo eletrôn-lúcido. Células tratados com oxLDL entretanto, apresentaram grandes vesículas intracelulares com conteúdo eletrôn-denso, e grandes vacúolos contendo estruturas que se assemelham a cristais de colesterol (Fig.6).

Para melhor avaliarmos as alterações nas membranas dos macrófagos, realizamos uma microscopia eletrônica de varredura. Células controle e tratadas

com nLDL apresentaram uma superfície sem muitas projeções, apenas com a presença de alguns ruffles de membrana na superfície. Por outro lado, células tratadas com oxLDL ou M β CD apresentaram inúmeras projeções de membrana em sua superfície celular.

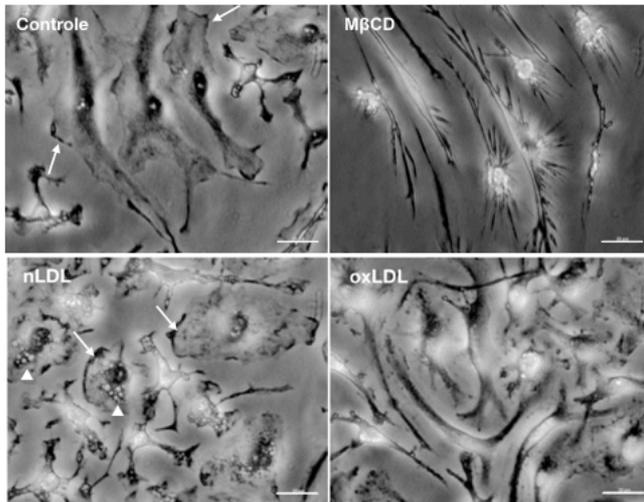
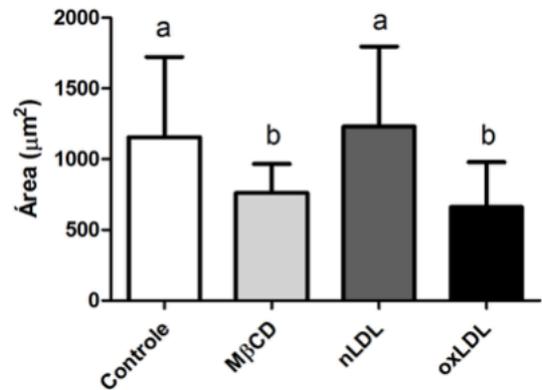
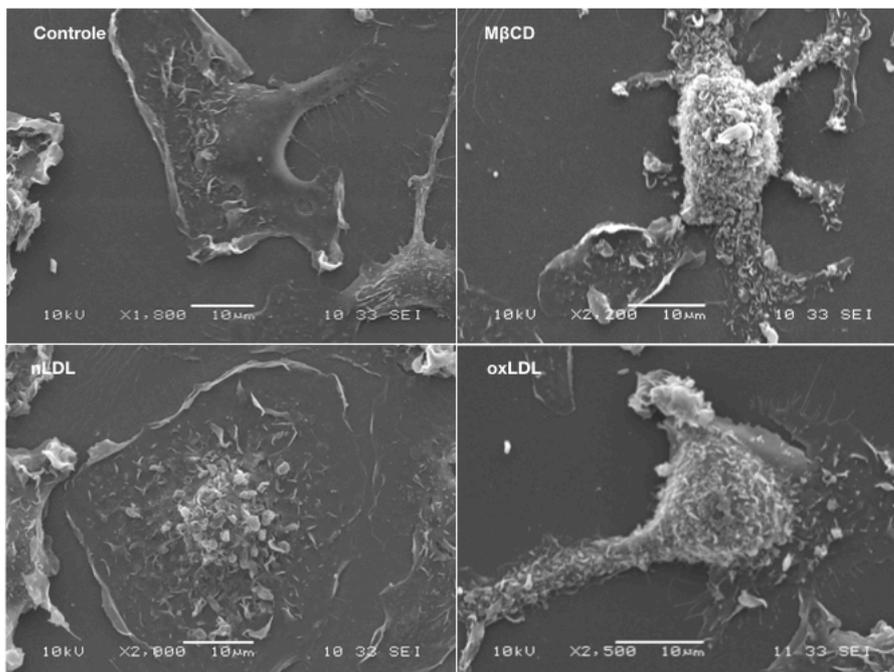
A**B****C**

Fig. 5: Análise da morfologia de macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD por microscopia de luz transmitida e microscopia eletrônica de varredura.

BMDMs foram tratados com 50 $\mu\text{g/ml}$ de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de M β CD por 40min, fixados e observados em microscopia de luz transmitida com contraste de fase ou preparados para microscopia eletrônica de varredura. (A) Imagens representativas de macrófagos, sob as diferentes condições de tratamento, em microscopia de luz transmitida com contraste de fase. Setas apontam estruturas

semelhantes a *ruffles* de membrana e cabeças de setas apontam gotículas lipídicas. Barras de escala indicam 20 μ m. (B) Quantificação da área celular em μ m². Diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas. (p<0.05 usando One-way ANOVA e Tukey`s post- test). (C) Imagens representativas de microscopia eletrônica de varredura para as diferentes condições de tratamento.

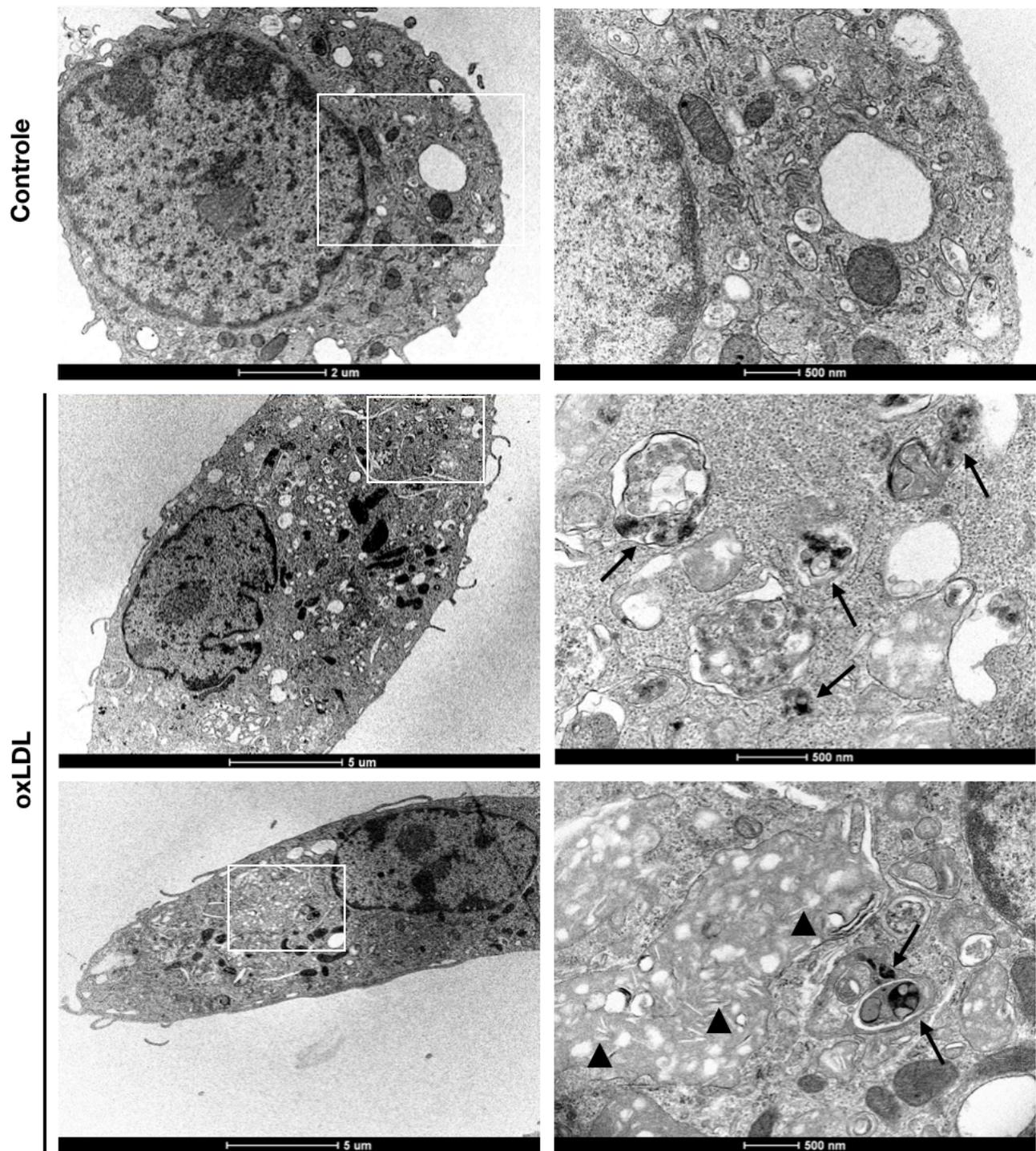


Fig. 6: Visualização de estruturas intracelulares de macrófagos tratados ou não com oxLDL.

Imagens representativas de microscopia eletrônica de transmissão. Os painéis à direita mostram detalhes, em maior aumento, de regiões específicas das células (indicadas por retângulos) vistas nos painéis à esquerda. Setas representam vacúolos com conteúdo eletrôn-denso e cabeça de setas apontam estruturas semelhantes a cristais de colesterol.

4.3. Tratamento com oxLDL ou M β CD induz alteração no citoesqueleto de actina.

Em células fagocíticas não profissionais como fibroblastos, já é descrito o efeito da desestruturação das balsas na polimerização do citoesqueleto de actina, e formação de fibras de estresse (Klausen *et al.*, 2006; Qi *et al.*, 2009, Hissa *et al.*, 2013). Entretanto pouco se sabe sobre o papel das balsas no citoesqueleto de actina de células fagocíticas profissionais, como os macrófagos. Uma vez que essas células possuem um dinâmico citoesqueleto de actina, especializado para a migração e fagocitose, diferentemente de células fagocíticas não profissionais, a investigação do papel das balsas de membrana no citoesqueleto de macrófagos se mostra relevante. Adicionalmente, como observado no resultado anterior, a alteração das balsas pelo tratamento com oxLDL ou M β CD induziu mudanças morfológicas nos macrófagos, indicando mudanças no citoesqueleto de actina.

Desta forma, avaliamos o citoesqueleto de macrófagos pela marcação com faloidina. Para isso, BMDMs foram semeados em lamínula de vidro, tratados ou não com oxLDL, M β CD e nLDL, fixadas e marcadas com faloidina fluorescente (Alexa Fluor 546[®]), para a análise do citoesqueleto e DAPI para a visualização do núcleo, em microscopia de fluorescência. A faloidina é uma droga que possui afinidade por filamentos de actina F, mas não se ligam à actina G, portanto marcam actina polimerizada.

Observamos que células controle, assim como células tratadas com nLDL apresentaram uma marcação menos intensa e mais heterogênea, com algumas regiões de *ruffling*, onde há maior marcação de f-actina (Fig. 7A). Como já observado, nessas condições as células se apresentaram espalhadas. Por outro lado, nas condições tratadas com M β CD e oxLDL a marcação se mostrou aproximadamente 3 e 4 vezes mais intensa respectivamente (Fig. 7B). A distribuição dos filamentos de actina também se mostrou distinta daquela observada para células controle ou tratadas com nLDL, não sendo possível identificar regiões de *ruffling*. Após tratamento com M β CD ou oxLDL, foi observada uma forte marcação de actina na periferia celular ou em pequenas nucleações espalhadas pela célula. Novamente, observamos a diminuição do perímetro celular induzido por esses tratamentos.

É interessante ressaltar que apesar do tratamento com M β CD induzir uma aparente polimerização de actina como demonstrado para outros tipos celulares, no caso dos BMDMs não houve a formação de fibras de estresse.

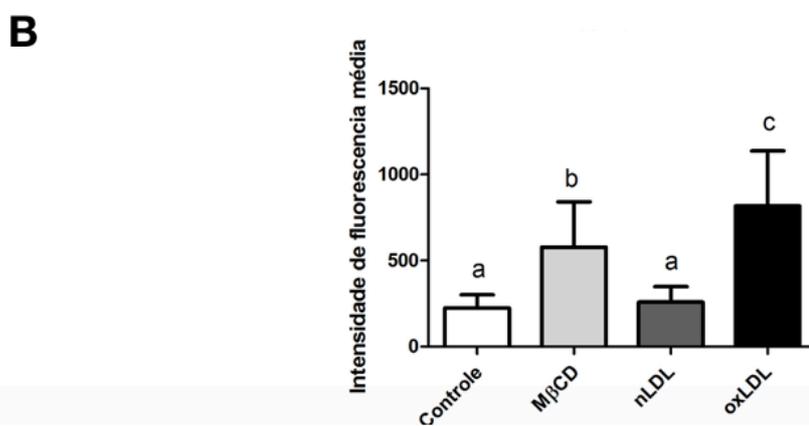
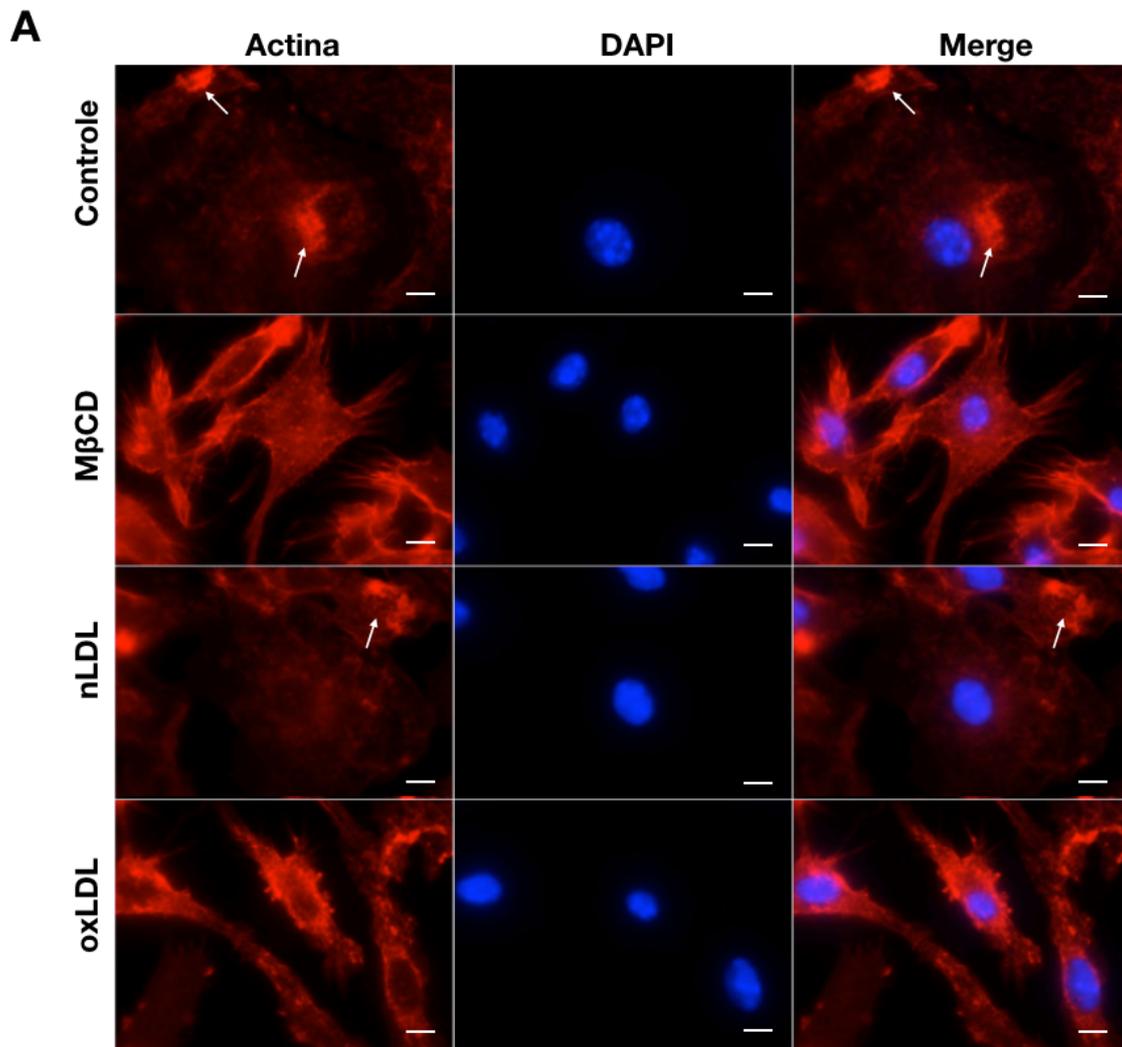


Fig. 7: Avaliação da organização do citoesqueleto de actina de macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e MβCD.

BMDMs foram tratados com 50µg/ml de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de MβCD por 40min, fixados e marcados com faloidina para a visualização do citoesqueleto de actina. (A) Imagens representativa de microscopia de fluorescência mostrando o citoesqueleto marcado com faloidina em vermelho e núcleo celular marcado com DAPI em azul. Setas representam aglomerados de actina decorrentes de *ruffling* de membrana. Barras de escala indicam 5µm. (B) Quantificação da intensidade média de fluorescência de faloidina. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0.05$ usando One-way ANOVA e Tukey's post-test).

4.4. A inibição de ROCK reverte o encolhimento celular e a polimerização de actina induzidos por oxLDL.

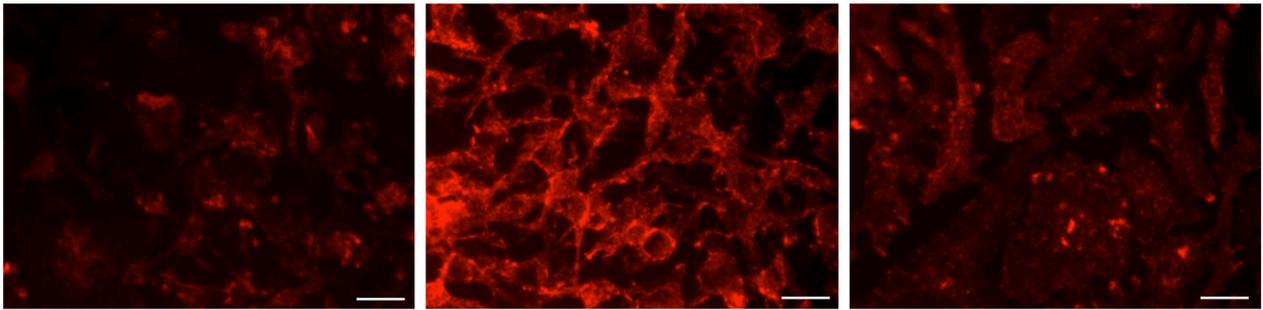
Um dos mecanismos mais importantes para a polimerização de actina é a ativação de RhoGTPases. A ativação de RhoA e consequente ativação de seu substrato ROCK, por exemplo, é importante para induzir a polimerização de actina na traseira de migração para a formação de estruturas contráteis que se associam a miosina, como as fibras de estresse (Sit & Manser, 2011). Essas estruturas são importantes para a retração da traseira de migração, permitindo o deslocamento celular.

Também foi demonstrado em fibroblastos que a polimerização de actina decorrente da desorganização das balsas de membrana, induzida pelo tratamento com MβCD ou oxLDL, está relacionada a ativação de RhoA/ROCK (Hissa *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2016). Desta forma, decidimos avaliar se a inibição de ROCK poderia reverter as alterações no citoesqueleto de actina induzidas pelo tratamento com oxLDL.

Para isso BMDMs foram semeados em placa de 24 poços, sobre lamínulas de vidro e tratados ou não com oxLDL, MβCD ou nLDL. Para a inibição de ROCK, utilizou-se o seu inibidor específico, Y-27632, logo após o tratamento com oxLDL. As células foram então fixadas e marcadas com faloidina para visualização do citoesqueleto, e WGA para a visualização da membrana plasmática. Observamos,

como esperado, que oxLDL foi capaz de induzir uma retração celular com a diminuição do perímetro celular e a polimerização de actina (Fig. 8A). Este efeito foi revertido após a inibição de ROCK por Y-27632. Após tratamento com Y-27632, células tratadas com oxLDL mostraram valores semelhantes da intensidade média de fluorescência do citoesqueleto de actina àqueles observados para células controle não tratadas (Fig. 8A e C). Adicionalmente, células tratadas com oxLDL e Y-27632 se mostraram ainda mais espalhadas que células controle, demonstrando que a inibição de ROCK foi capaz de reverter a redução do perímetro celular induzido por oxLDL (Fig. 8B e D). Entretanto o tratamento com Y-27632 não conseguiu restabelecer a formação de *ruffling*, que são estruturas comumente observadas na condição controle (setas Fig. 8A).

A Controle oxLDL oxLDL+ Y-27632



B Membrana Actina Merge

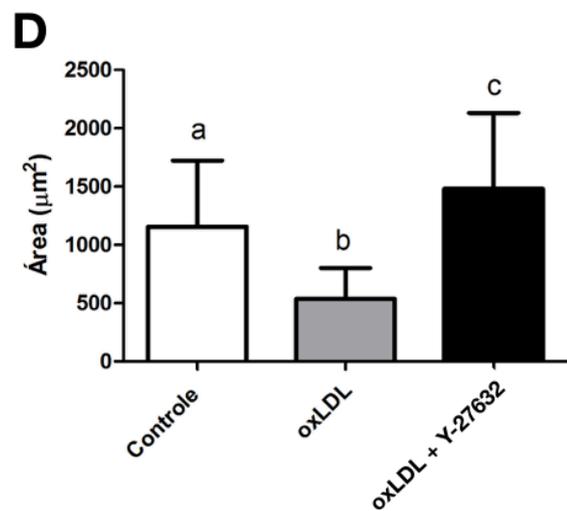
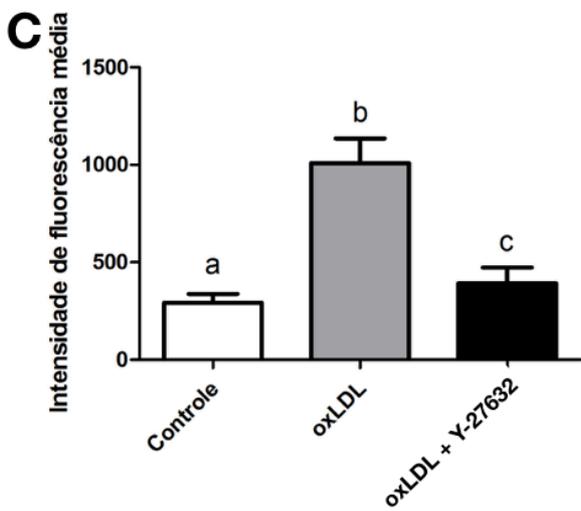
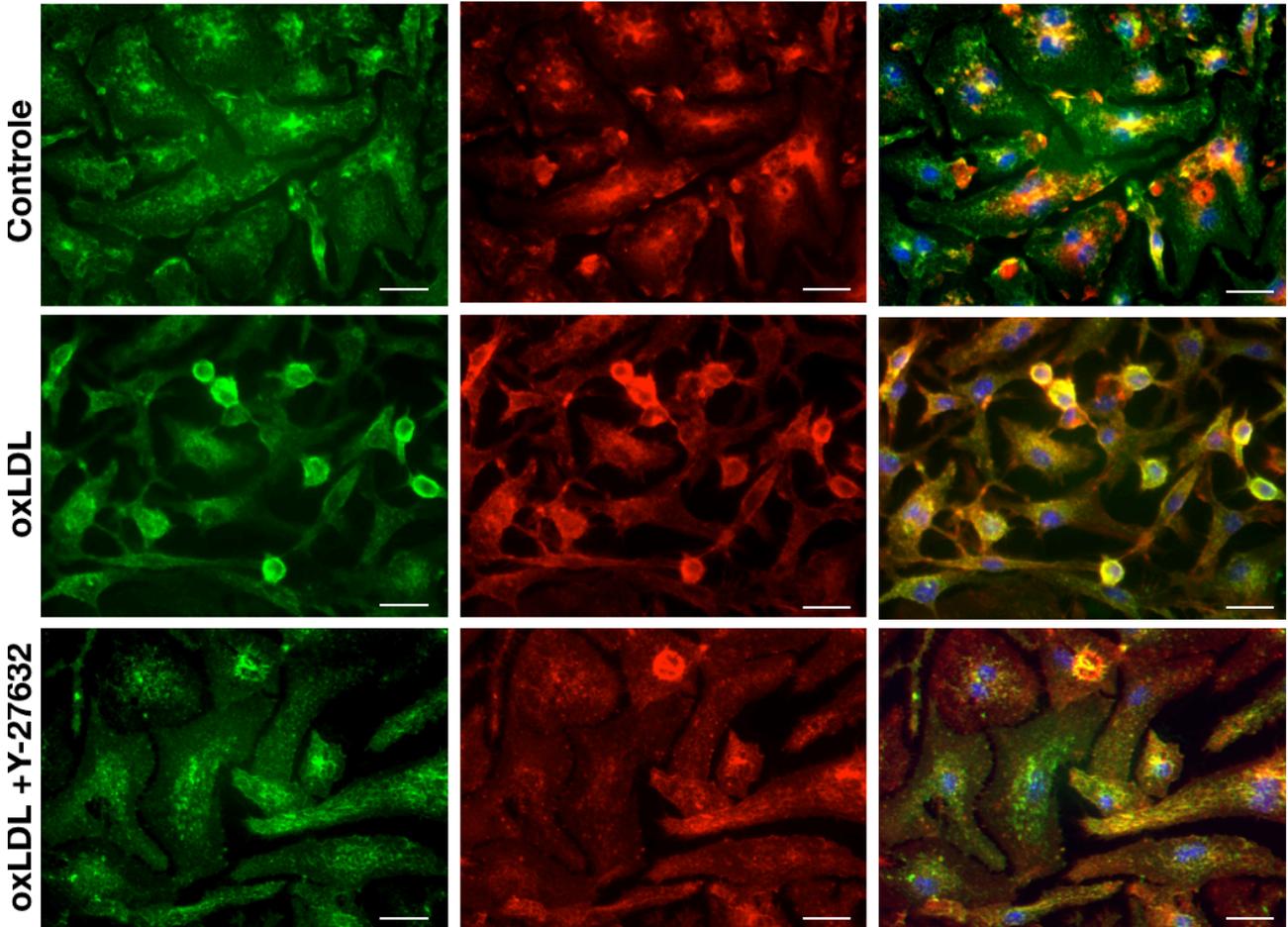


Fig. 8: Avaliação do efeito da inibição de ROCK no citoesqueleto de actina e morfologia celular de macrófagos tratados com oxLDL.

Macrófagos foram tratados ou não com 50µg/ml de oxLDL por 24h e posteriormente colocados na presença do inibidor seletivo de ROCK (Y-27632) por 30 minutos antes de serem fixadas. (A) Imagens representativas do citoesqueleto de actina marcado com faloidina em vermelho e visualizado por microscopia de fluorescência. Nas três condições foram usados o mesmo tempo de exposição a fluorescência para a quantificação da intensidade de fluorescência média do citoesqueleto (C). (B) Imagens representativas do citoesqueleto de actina marcado com faloidina em vermelho, membrana plasmática marcada com WGA em verde e núcleo marcado com DAPI em azul. Neste painel o tempo de exposição foi ajustado para cada condição para melhor visualização das estruturas e dos limites das células, para a quantificação da área celular em µm² (D). Barras de escala indicam 20 µm. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. (p<0.05 usando One-way ANOVA e Tukey`s post- test).

4.5. O tratamento com M β CD ou oxLDL alteram a rigidez da membrana.

O citoesqueleto de actina, além de ser importante em processos como migração celular e fagocitose, também exerce um papel na determinação das propriedades mecânicas da membrana. A trama terminal, que se situa logo abaixo a membrana plasmática é importante para determinar as flutuações da membrana e sua rigidez. Assim, alterações no citoesqueleto de actina podem influenciar nas propriedades físicas da membrana. De fato, já foi demonstrado que a desorganização das balsas pelo tratamento com M β CD, alteram a rigidez da membrana plasmática em consequência da alteração do citoesqueleto de actina (Byfield *et al.* 2004, Hissa *et al.* 2012). Alterações na rigidez da membrana também já foram observadas em células endoteliais tratadas com oxLDL (Byfield *et al.*, 2006, Chouinard, *et al.*, 2008, Kowalsky *et al.*, 2008). Decidimos então avaliar como as alterações no citoesqueleto de actina, induzidas pelo tratamento com oxLDL ou M β CD, poderiam afetar a rigidez da membrana de macrófagos.

Para isso, utilizamos a técnica de microscopia de desfocalização, que permite a quantificação de mudanças na curvatura da membrana plasmática em tempo real, para a inferência da rigidez de membrana. Na condição tratada com M β CD, células foram filmadas em meio sem soro por 10 min sem nenhum tratamento para obtenção do controle, e posteriormente foi adicionado a droga e as células foram filmadas durante todo o período do tratamento (40 minutos). Para as condições tratadas com oxLDL ou nLDL, células foram previamente tratadas por 24 horas e filmadas por mais 10 min.

Através da equação $y = Ae^{(-t/\tau)}$, onde A é amplitude, τ é o tempo de relaxação e t é o tempo, foi possível ajustar as curvas de decaimento da curvatura da membrana obtida pela análise dos contrastes gerados pela membrana da célula filmada (Fig. 9A). Essa análise foi feita pelo *plug in* de correlação temporal do softwer imageJ, desenvolvido pelo departamento de física da UFMG. Dessa forma, foi possível obter o tempo de relaxação τ , que é uma grandeza diretamente relacionada com a rigidez de membrana. A análise foi feita em pequenas regiões de membrana livre das células.

Observamos que o tratamento com M β CD, aumentou drasticamente (cerca de 4x) o tempo de relaxação em relação a condição não tratada, indicando uma

maior rigidez de membrana (Fig. 9B). Entretanto, BMDMs tratados com nLDL ou oxLDL mostraram uma diminuição de aproximadamente 25s em relação ao controle (50s). Portanto esses tratamentos parecem induzem uma menor rigidez de membrana na região da membrana analisada.

É importante ressaltar que nas condições tratada com oxLDL as regiões de membrana livre, e portanto, as regiões passíveis de análise eram escassas. Dessa forma, este resultado não necessariamente representa a rigidez da membrana total dos macrófagos tratados com oxLDL.

Esse resultado também indica um possível efeito do tratamento com nLDL de diminuição da rigidez da membrana.

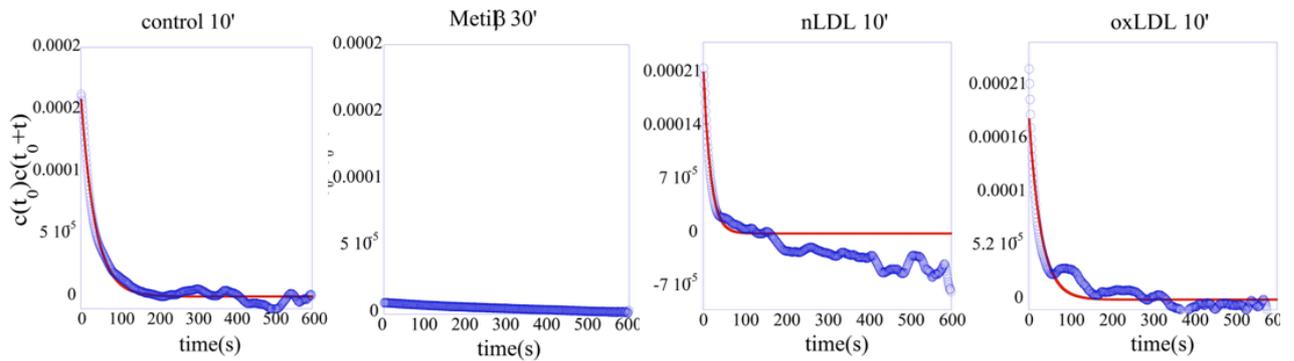
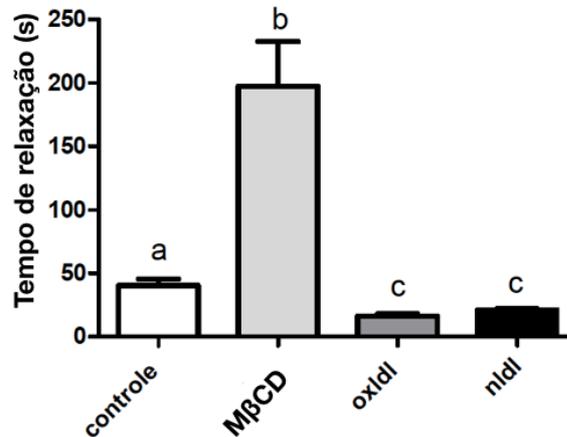
A**B**

Fig. 9: Microscopia de desfocalização de macrófagos tratados ou não com com nLDL, oxLDL e MβCD.

BMDMs tratados com 50μg/ml de oxLDL ou nLDL por 24h foram filmados por 10 minutos após tratamento e macrófagos tratados com 5mM de MβCD foram filmados por 30min durante o tratamento. Células controles foram filmadas por 10 minutos antes da adição de MβCD. (A) Ajuste da função de correlação temporal do decaimento das membranas analisadas, para obtenção do tempo de relaxação. (B) Média dos tempos de relaxação de 5 pontos na membrana de 3 células analisadas para cada condição. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ usando One-way ANOVA e Newman-Keuls post-test).

4.6. O tratamento com M β CD ou oxLDL diminui a mobilidade e migração celular.

O citoesqueleto de actina exerce uma função chave no processo de migração celular. A protrusão da frente de migração, deslocamento do corpo celular ou retração da traseira de migração são dependentes da dinâmica e regulação do citoesqueleto de actina. Portanto, alterações no citoesqueleto de actina podem afetar drasticamente a migração celular. Avaliamos, então, se as alterações no citoesqueleto de actina induzidas pelo tratamento com M β CD ou oxLDL afetam a mobilidade dos macrófagos.

Inicialmente avaliamos a mobilidade e o movimento randômico efetuados por macrófagos vivos durante o tratamento com nLDL, M β CD ou oxLDL. Para isso, BMDMs foram semeados em placas de 24 e filmados por 24h pelo aparelho Cytation que manteve a temperatura em 37°C e 5% de CO₂.

Células controle e tratadas com nLDL apresentaram alta movimentação, com células mudando de forma e se deslocando em várias direções. Como é característico do movimento celular randômico, as células não possuíam nenhuma direcionalidade, mas apenas exploraram a superfície emitindo projeções e eventualmente se deslocando em curtas distâncias. Células tratadas com M β CD e oxLDL, entretanto, se mostraram estáticas desde a primeira hora de tratamento (Fig. 10A). As células tratadas com M β CD mudaram rapidamente de forma, encolhendo nos primeiros 5 minutos de tratamento (Fig. 10B) e após 6h de tratamento as células se soltaram da placa. As células tratadas com oxLDL começaram a retração após 4h de tratamento, porém se mantiveram na mesma posição todo o tempo de filmagem (24h). Isso indica que os tratamentos com M β CD ou oxLDL induzem uma deficiência na mobilidade dos macrófagos.

Para confirmar a deficiência na migração celular de BMDMs tratados com M β CD ou oxLDL, realizamos um ensaio de migração de fenda. Neste ensaio abrimos numa monocamada confluyente de células uma fenda e analisamos a migração das células remanescentes para o espaço deixado pela fenda.

Portanto, diferentemente do ensaio de mobilidade ou migração randômica, avaliamos a migração das células após o tratamento e não durante. Observamos que após 18h de experimento, na condição controle ou tratadas com nLDL um

número grande de células migraram para a fenda após 18h (médias de 101 e 81 respectivamente). O número de células que migraram na condição tratadas com oxLDL, entretanto, se manteve baixo por todo o experimento, indicando uma grande deficiência na migração dessas células (Fig. 11). Na condição tratada com M β CD, houve um número considerável de células que migraram para fenda (média de 66) e apesar desse número ser significativamente menor em relação ao controle ou ao tratamento com nLDL, não foi tão pequeno quanto o observado no tratamento com oxLDL. Vale a pena lembrar, porém, que o efeito do M β CD é reversível, na presença de SFB e ausência da droga. Apesar da quantidade de SFB estar reduzida (1%) é possível que as células tenham se recuperado internalizando colesterol do meio. Isso pode explicar porque a deficiência na migração de células tratadas com M β CD não foi tão dramática como observado no tratamento com oxLDL.

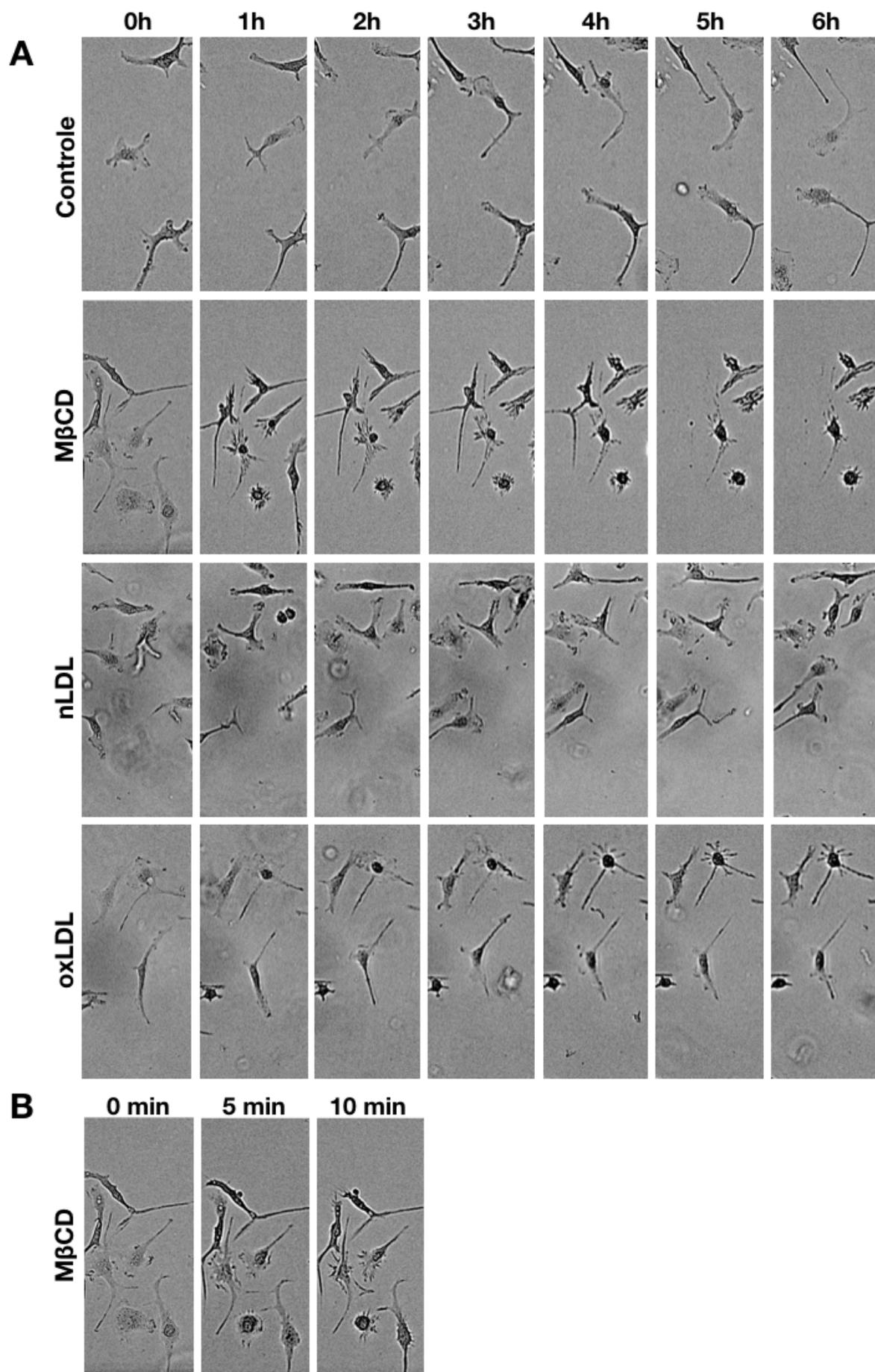


Fig. 10: Visualização da movimentação randômica de BMDMs tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD por microscopia de luz transmitida.

(A) Imagens representativas de *time lapse* da macrófagos vivos se movimentando em campo claro, durante o tratamento com nLDL, oxLDL e M β CD. As imagens mostram o mesmo campo em intervalos de 1h. (B) Imagens representativas de macrófagos em campo claro nos primeiros 10 min de tratamento com M β CD.

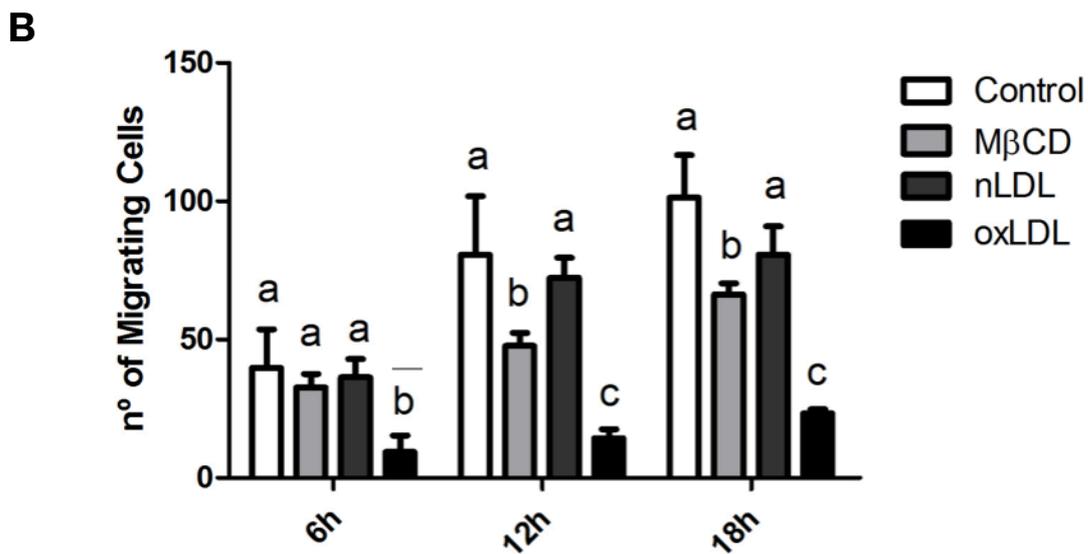
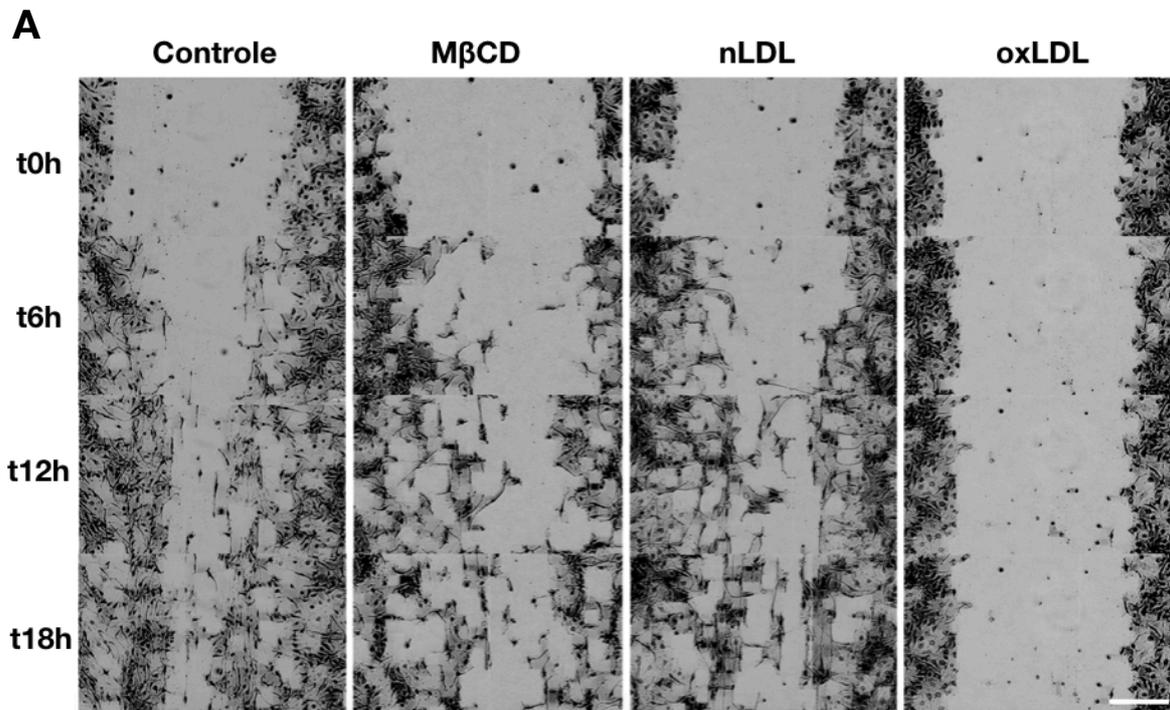


Fig. 11: Avaliação da migração de macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e MβCD.

Uma monocamada confluyente de BMDMs foi tratada com 50µg/ml de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de MβCD por 40min. Após o tratamento uma fenda foi aberta na monocamada e a migração das células para esse espaço foi monitorada por 18h em microscopia de luz. (A) imagens representativas da fenda em intervalos de 6h. Barra de escala indica 100µm. (B) Quantificação do número de células que migraram para o espaço da fenda em diferentes tempos. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0.05$ usando two-way ANOVA).

4.7. O tratamento com M β CD ou oxLDL altera a distribuição de integrinas β 2, mas não de β 1.

Além do citoesqueleto de actina, o processo de migração também é dependente de integrinas. As integrinas compõem pontos de adesão focal que são importantes para a fixação e montagem do citoesqueleto de actina na frente de migração. Muitas integrinas quando ativas são encontradas em balsas e dependem dessa estrutura para seu correto funcionamento e disposição (Pande, 2000; Leitinger & Hogg, 2002; Colognato, 2004). Por isso, uma vez que a oxLDL se mostrou capaz de alterar as balsas de membrana de macrófagos, decidimos avaliar, se a deficiência na migração observada nas células tratadas com oxLDL, da mesma forma que com M β CD, pode ter se dado também por alterações na disposição das integrinas.

A distribuição da subunidade β 1 de integrinas, que formam grupos de integrinas importantes para a adesão celular em vários tipos celulares, foi analisada por imunofluorescência em BMDMs (Fig. 12). Nas condições controle e tratadas com nLDL, observamos nucleações de integrinas indicando possíveis pontos de adesão focal. Já nas condições tratadas com oxLDL e M β CD, as integrinas se apresentaram dispersas, apresentando um padrão difuso e diferindo do padrão de domínios apresentado nas condições controle e tratadas com nLDL. Uma vez que há a permeabilização para a marcação de integrinas, essas proteínas podem estar na região intracelular indicando sua internalização.

Interessantemente, a distribuição de subunidades β 2 de integrinas, que formam integrinas importantes para a transmigração e diapedese de leucócitos, não diferiu entre as condições experimentais, de forma que as células tratadas com oxLDL e M β CD apresentaram o mesmo padrão de nucleações de integrinas observado na condição controle e tratada com nLDL (Fig. 13).

Esse resultado indica que a alteração das balsas induzida pelo tratamento com oxLDL ou M β CD, induz a redistribuição de integrinas β 1, o que pode se relacionar com a deficiência na migração observada nesses tratamentos.

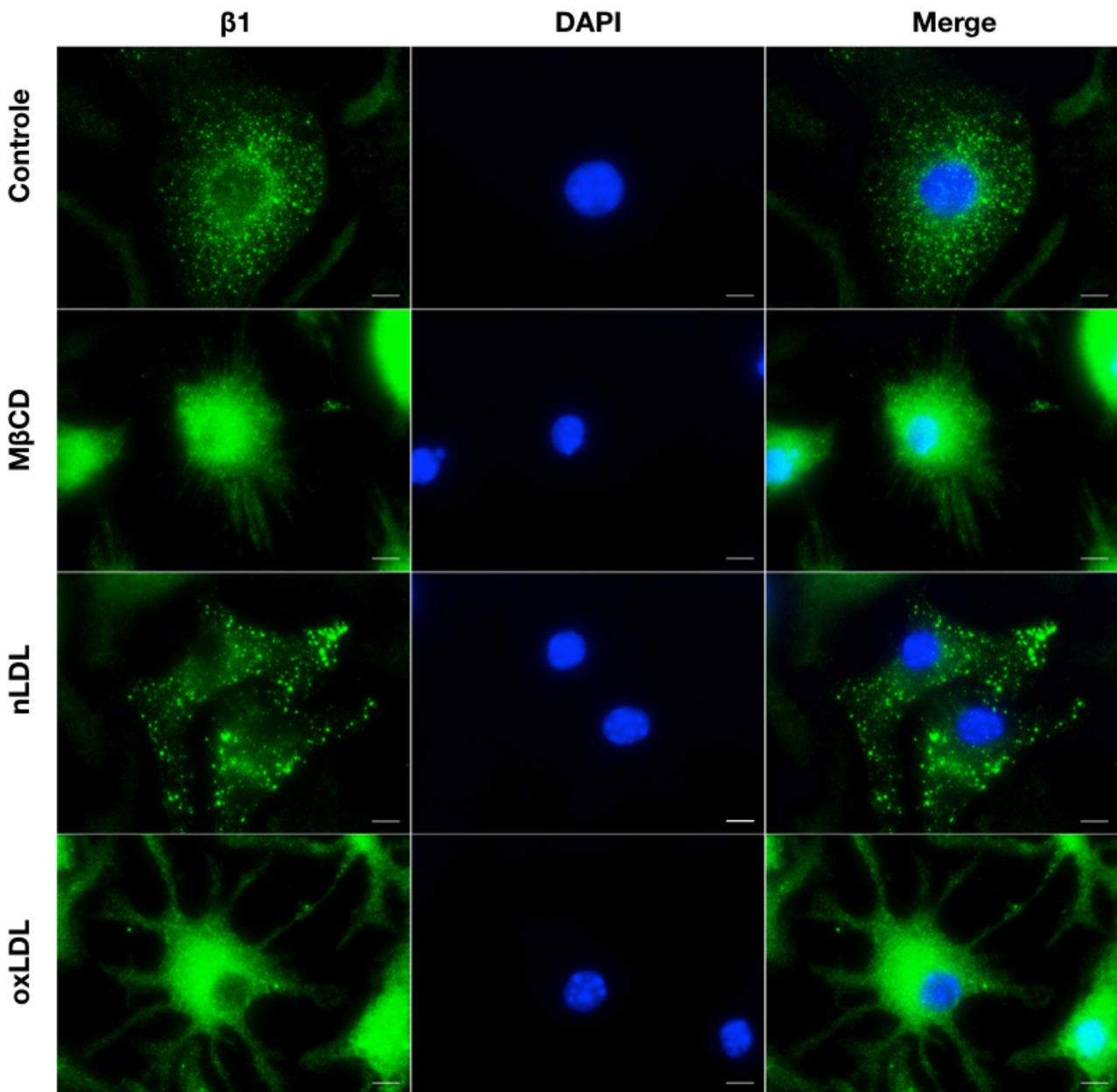


Fig. 12: Visualização de interinas $\beta 1$ por imunofluorescência em macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD.

BMDM's foram tratados com 50 μ g/ml de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de M β CD por 40min, fixados e preparados para imonofluorescência. Painel mostra imagens representativas de imunofluorescência da sub-unidade $\beta 1$ de integrinas em verde e núcleo celular marcado por DAPI em azul. Barra de escala indicam 5 μ m.

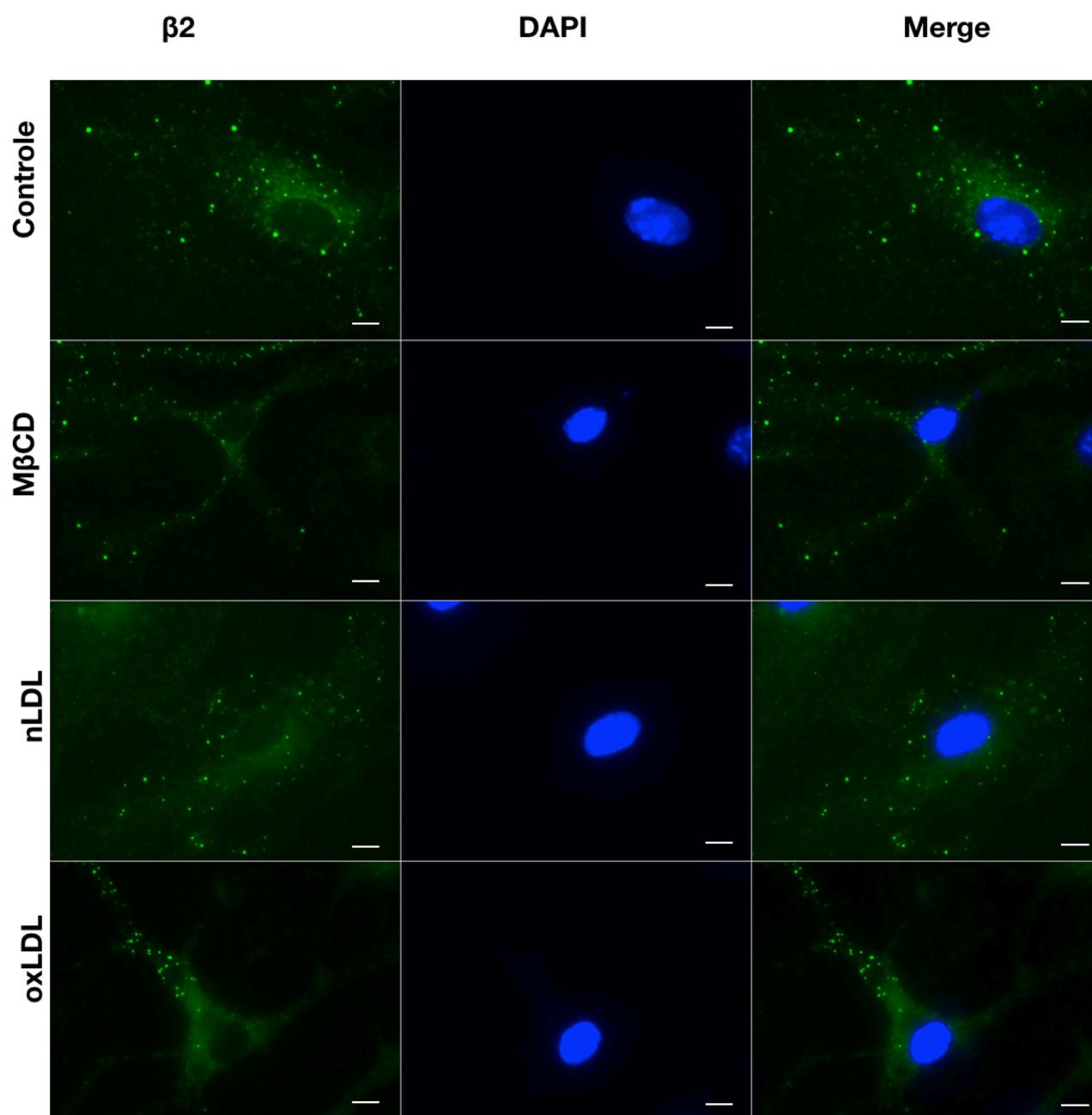


Fig. 13: Visualização de interinas $\beta 2$ por imunofluorescência em macrófagos tratados ou não com nLDL, oxLDL e M β CD.

BMDM's foram tratados com 50 μ g/ml de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de M β CD por 40min, fixados e preparados para imonofluorescência. Painel mostra imagens representativas de imunofluorescência da sub-unidade $\beta 2$ de integrinas em verde e núcleo celular marcado por DAPI em azul. Barra de escala indicam 5 μ m.

4.8. O tratamento com M β CD ou oxLDL aumentam a co-localização entre balsas de membrana e actina.

Alterações na balsas de membrana induzem alterações na polimerização do citoesqueleto de actina. Entretanto, alterações no citoesqueleto de actina, por sua vez também influenciam na organização das balsas de membrana, uma vez que o citoesqueleto de actina interage fisicamente com proteínas residentes em balsas (Viola & Gupta, 2007; Chichili & Rodgers, 2009). Portanto, há um fino *cross-talk* entre essas duas estruturas, que permite sua recíproca regulação. Decidimos, portanto, avaliar se há alguma interação entre esses componentes em macrófagos tratados com oxLDL ou M β CD que poderiam evidenciar a participação das balsas nos efeitos observados.

Para isso, BMDMs foram semeados sobre lamínulas de vidro, tratado ou não com nLDL, oxLDL ou M β CD, marcados com CTXB, para visualização das balsas, fixados e marcados com faloidina, para a visualização do citoesqueleto de actina. Foi observado que células controle e tratadas com nLDL apresentaram actina concentrada em *ruffles* e domínios de GM1 espalhados pela células, não apresentando grande co-localização aparente (Fig. 14 A). Células tratadas com oxLDL, entretanto, apresentaram os domínios de GM1 e o citoesqueleto de actina principalmente concentrados na periferia da célula e mostrando uma significativa co-localização aparente, que foi confirmada pelo maior coeficiente de Pearson (0.8) em relação às células controle e ou tratadas com nLDL (0.6 e 0.65 respectivamente) (Fig. 14 A e B). Interessantemente, o tratamento com M β CD, também induziu a co-localização entre as balsas e o citoesqueleto de actina, de maneira semelhante ao observado para o tratamento com oxLDL. Esse resultado evidencia que há uma interação entre o citoesqueleto e as balsas de membrana induzida pelo tratamento com oxLDL da mesma forma que com o tratamento com M β CD, indicando uma correspondência do efeito desses dois tratamentos sobre as balsas.

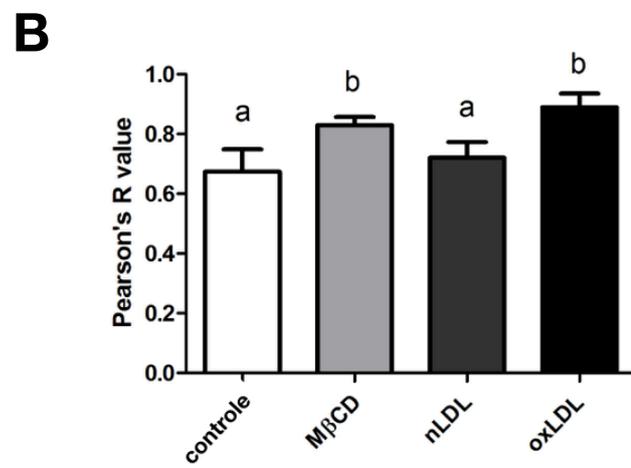
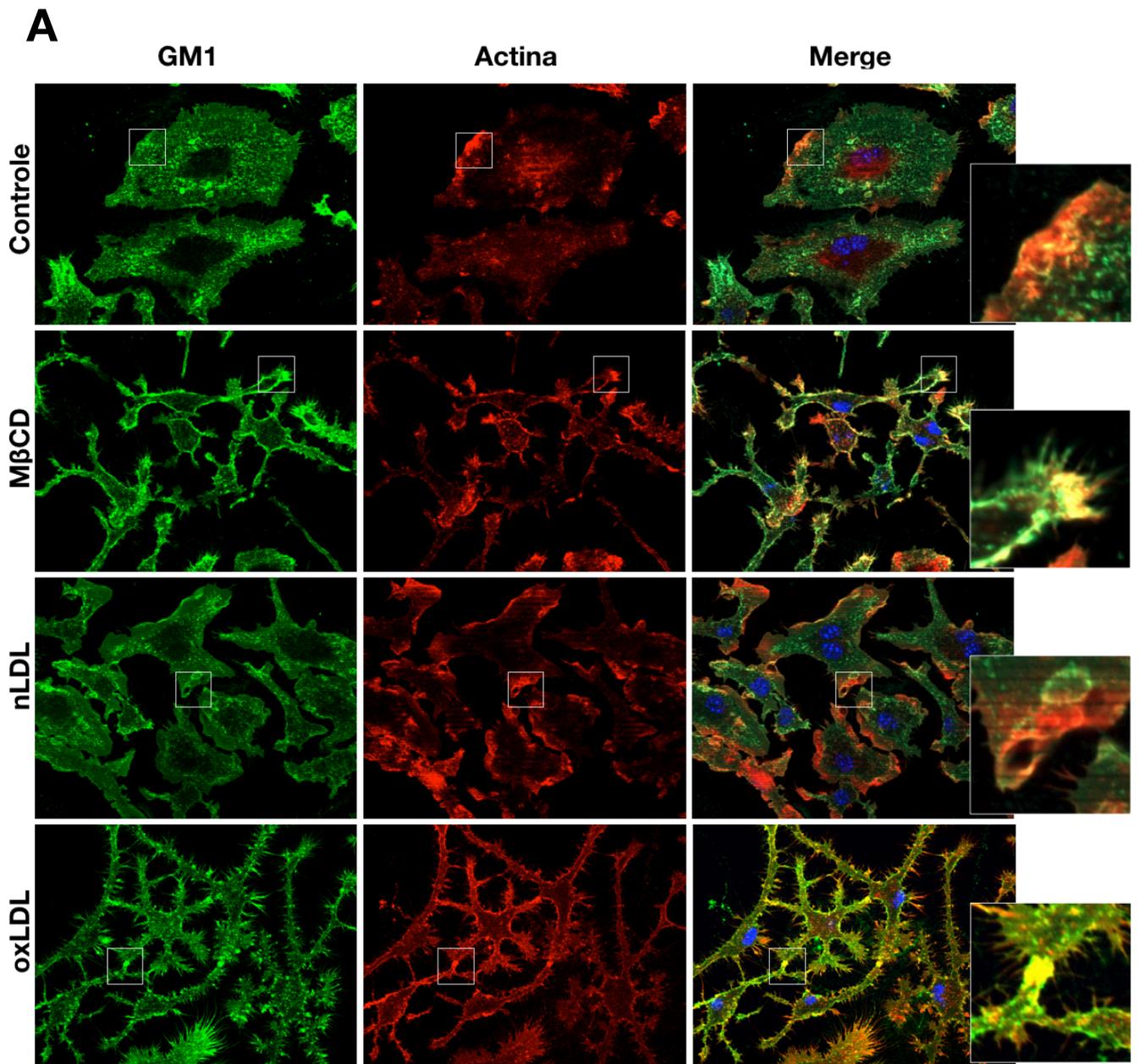


Fig. 14: Avaliação da co-localização do citoesqueleto de actina com balsas de membrana de macrófagos tratados ou não com com nLDL, oxLDL e M β CD.

BMDM's foram tratados com 50 μ g/ml de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de M β CD por 40min e colocados na presença de CTXb para a visualização de domínios de GM1, fixados e marcados com faloidina para a visualização do citoesqueleto de actina. (A) Imagens representativas de fluorescência mostrando o citoesqueleto em vermelho, GM1 em verde e núcleo celular em azul. Painéis a direita mostram detalhe de regiões de co-localização. (B) Quantificação da co-localização entre o citoesqueleto e balsas de membrana, pelo coeficiente R de Pearson. Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas. ($p < 0.05$ usando One-way ANOVA e Tukey's post- test).

4.9. O tratamento com M β CD ou oxLDL causa espalhamento de lisossomos.

Já foi demonstrado na literatura o papel das balsas de membrana no tráfego de vesículas. A desorganização das balsas por exemplo induz a exocitose de vesículas, entre elas lisossomos. Estudos do nosso grupo, também demonstraram em fibroblastos uma redistribuição dos lisossomos após tratamento com M β CD, que se encontravam primeiramente espalhados pela célula, e se concentraram na região perinuclear após o tratamento (Hissa et al., 2013). Isso provavelmente se deve a exocitose de um pool mais periférico de lisossomos, que foi induzido pela reorganização do citoesqueleto de actina decorrente do tratamento com M β CD. Uma vez que no presente estudo também observamos a reorganização do citoesqueleto de actina em macrófagos tratados com M β CD ou oxLDL, decidimos avaliar se houve alteração na disposição dos lisossomos, que pudesse indicar possíveis eventos exocíticos. Para isso, BMDMs foram semeados, submetidos ou não ao tratamento com nLDL, oxLDL ou M β CD, fixados e marcados com WGA, para a visualização da membrana plasmática, bem como com anticorpo anti-LAMP-1, um marcador lisossomal, para visualização dos lisossomos.

Ao contrário de fibroblastos, macrófagos controle apresentaram lisossomos distribuídos pela região perinuclear, com poucos lisossomos próximos à periferia celular, sendo visível um espaço entre essas vesículas e a membrana plasmática. Essa mesma disposição de lisossomos foi observada no tratamento com nLDL. Por outro lado, células tratadas com M β CD e oxLDL apresentaram uma distribuição mais dispersa dos lisossomos ao longo de toda a célula, apresentando um grande número

destas vesículas mais próximas à membrana plasmática (Fig. 15). Esse resultado indica que o tratamento com M β CD ou oxLDL induz uma alteração na regulação do tráfego de lisossomos.

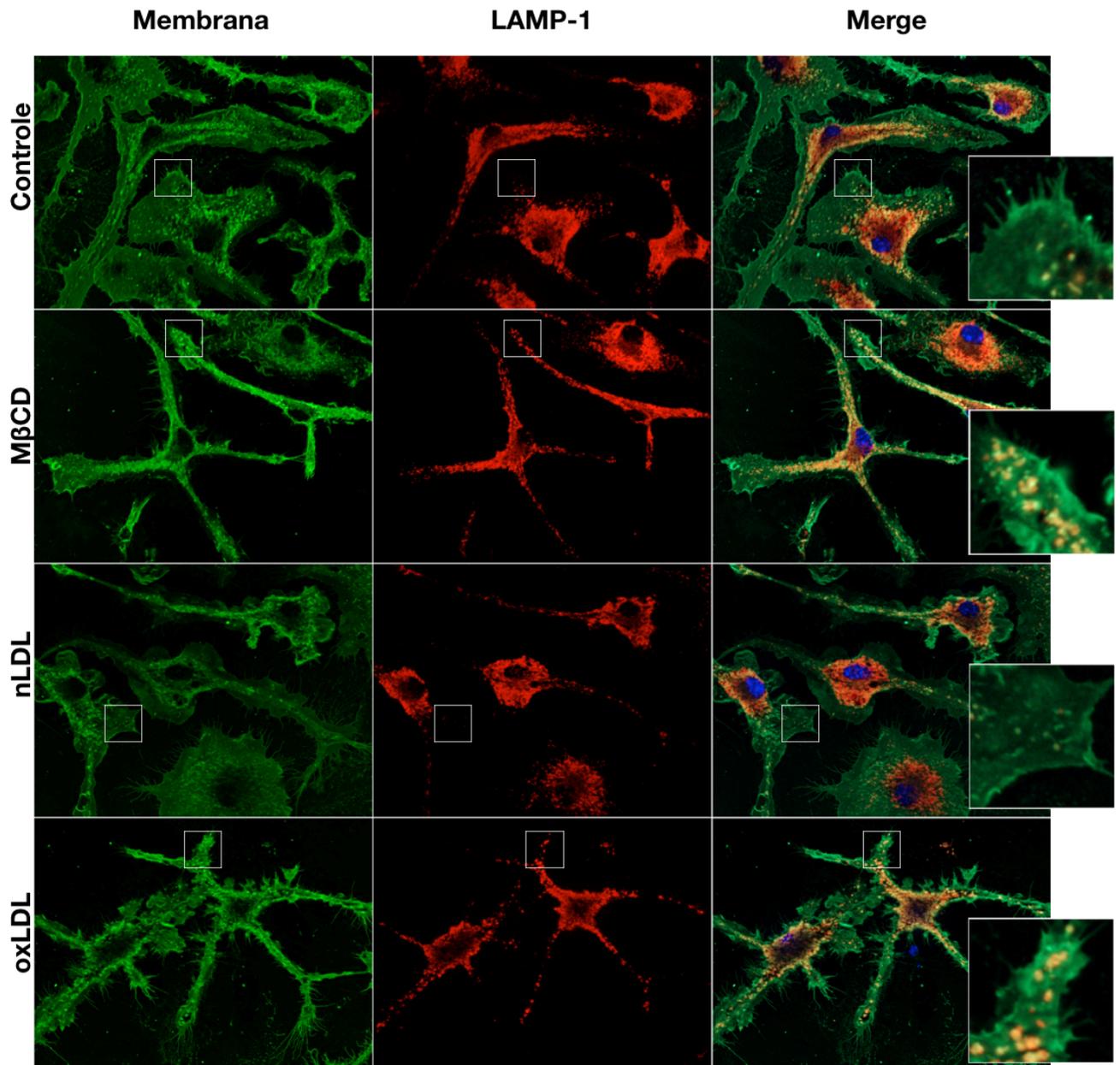


Fig. 15: Visualização da distribuição de lisossomos em macrófagos tratados ou não com com nLDL, oxLDL e MβCD.

BMDMs foram tratados com 50µg/ml de oxLDL ou nLDL por 24h, e 5mM de MβCD por 40min, fixadas e marcadas com WGA para a visualização da membrana celular, DAPI para a visualização do núcleo e submetidas a imunofluorescência para LAMP-1, para a visualização dos lisossomos. Painel mostra imagens representativas da membrana celular em verde, lisossomos em vermelho e núcleo em azul de macrófagos submetidos aos tratamentos indicados. Painéis à direita indicam detalhes da periferia celular para visualização da proximidade de lisossomos com a membrana.

5. DISCUSSÃO

Macrófagos são células do sistema imune importantes para processos inflamatórios, mas também para a resolução da inflamação e para a homeostase dos tecidos (Fujiwara & Kobayashi, 2005; Davies *et al.*, 2013). Essas células são especializadas na fagocitose e migração celular para o desempenho de suas funções e por isso, apresentam um intenso fluxo de vesículas, e um dinâmico citoesqueleto de actina. Macrófagos exercem um papel chave no desenvolvimento de várias doenças incluindo a aterosclerose.

O desenvolvimento da aterosclerose é caracterizado pela formação da placa de ateroma em vasos sanguíneos, que interrompe o fluxo sanguíneo gerando complicações como derrames e infartos (Tabas *et al.*, 2007). Os principais componentes celulares da placa são os macrófagos, células essenciais para o desencadeamento do processo inflamatório dessa doença (Libby & Clinton, 1993).

Além da participação dos macrófagos, a presença de oxLDL na placa de ateroma vem sendo cada vez mais apontada como um fator importante para o desenvolvimento da doença. A oxLDL induz alterações na fisiologia das células endoteliais, induzindo disfunção endotelial pela inibição de eNOS e indução de iNOS, e levando a permeabilidade vascular (Pirillo *et al.*, 2013; Gliozzi *et al.*, 2019). Além disso, outras alterações causadas pela oxLDL em células endoteliais vem sendo estudadas recentemente pela sua influencia nas balsas de membrana.

Vários estudos, utilizando o tratamento com M β CD, uma droga que sequestra colesterol e conseqüentemente desorganiza as balsas, já demonstraram a importância desses domínios para vários processos celulares. A desorganização das balsas de membrana pelo tratamento com M β CD, por exemplo, induz a polimerização do citoesqueleto de actina dependente da ativação de RhoA/ROCK e aumento da rigidez de membrana (Hissa *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2016). Também já foram observados, eventos exocíticos não regulado decorrentes do tratamento com M β CD (Wasser *et al.* 2007; Chen *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Hissa *et al.*, 2012).

Interessantemente, há uma semelhança entre os efeitos do tratamento com M β CD em células endoteliais, e o tratamento com oxLDL, indicando o papel desta última na organização das balsas. O tratamento de células endoteliais com oxLDL,

também induz a polimerização do citoesqueleto e exocitose de lisossomos, induzindo uma maior rigidez de membrana e alteração do tráfego de vesículas (Couto *et al.*, 2020). Além disso, já foi demonstrado nessas células que o tratamento com oxLDL diminui domínios ordenados de membrana causando espalhamento de marcadores como GM1 (Byfield *et al.*, 2006).

Em células endoteliais essas alterações podem exercer um papel importante na patogenicidade da aterosclerose. Nosso grupo demonstrou recentemente que a maior rigidez de membrana induzida pelo tratamento com oxLDL, deixam essas células mais suscetíveis a injúria (Couto *et al.*, 2020). Essa alteração portanto pode ter implicações no desenvolvimento do processo inflamatório e na permeabilidade do endotélio, induzindo o recrutamento de macrófagos e culminando no crescimento da placa de ateroma.

O papel da oxLDL nas balsas de membrana de macrófagos, por outro lado, não é muito bem elucidado. Apesar de haver indícios de que a oxLDL interfira na dinâmica das balsas dessas células, não sabemos quais os possíveis efeitos decorrentes dessa interferência. Uma vez que macrófagos são células muito especializadas e com uma fisiologia diferente de células endoteliais, é necessário um estudo direcionado a essas células para melhor entender o papel das balsas no seu funcionamento. Esse estudo se torna ainda mais relevante uma vez que as possíveis alterações funcionais de macrófagos decorrentes da desorganização das balsas induzida por oxLDL pode ter implicações no desenvolvimento da aterosclerose.

No presente estudo buscamos entender se a oxLDL pode interferir na organização das balsas de membrana de macrófagos, e quais os efeitos do tratamento com oxLDL podem ser consequentes dessa interferência.

Inicialmente, observamos que o tratamento com oxLDL induziu uma redistribuição das balsas de membrana na superfície de macrófagos. Após tratamento com oxLDL, as células mostraram a presença de grandes domínios, intensamente marcados com GM1, os quais não foram observados para os grupos controle. Interessantemente, o tratamento com M β CD também induziu pontos mais intensamente marcados, indicando maior aglomeração de GM1 em pequenas regiões. Esses dados foram corroborados pela maior variância na distribuição da marcação com GM1 para esses grupos em relação aos controles. Adicionalmente,

observamos que na condição tratada com oxLDL foi possível identificar, em geral, uma maior intensidade de fluorescência. Esse dado corrobora com a literatura que indica que o tratamento com oxLDL aumenta a expressão de GM1 na superfície celular de macrófagos (Wallner *et al.*, 2016).

Os dados apresentados acima, no entanto, contrastam com o observado para células endoteliais. Nessas células o tratamento com oxLDL induz o espalhamento de domínios de GM1, indicando uma desestruturação das balsas. Da mesma forma, em células endoteliais tratadas com M β CD, se observa menos domínios de GM1 na membrana. No caso do tratamento com M β CD, sabe-se que há a desestruturação das balsas pelo sequestro do colesterol de membrana. Essa ciclodextrina age sequestrando o colesterol da membrana de forma não discriminatória em relação a região onde ele se encontra. Entretanto, é previsível que as regiões de balsas sejam mais afetadas pelo tratamento, uma vez que nelas há uma maior concentração de colesterol. Dessa forma, a ciclodextrina vai atuar em regiões onde há uma maior probabilidade da retirada de colesterol. Além da quantidade, outros fatores podem ser relevantes para ação da M β CD, como a estabilidade do colesterol inserido na membrana. Balsas muito organizadas e com a presença de várias proteínas podem oferecer um obstáculo para o sequestro do colesterol pela ciclodextrina. Sendo assim, há uma maior probabilidade dessa molécula sequestrar colesterol de regiões não organizadas. Isso pode ajudar a explicar o resultado obtido com macrófagos tratados com M β CD. A retirada de colesterol de regiões fora das balsas pode ocasionar a uma maior aglutinação de regiões de balsas na membrana plasmática de macrófagos. Esse efeito já foi observado em linfócitos tratados com M β CD, e que demonstraram depleção parcial do colesterol (em torno de 30%) (Mahammad *et al.*, 2010). Outro estudo mostra a mesma agregação de GM1 em linfócitos tratados com 5mM de M β CD, mesma concentração utilizada no presente estudo (Laliberte *et al.*, 2006). Interessantemente, observamos o mesmo efeito de agregação dos domínios de GM1 em macrófagos tratados com oxLDL. Isso indica que a oxLDL pode agir sequestrando o colesterol de forma mais moderada, como pode ser observado no tratamento com M β CD em concentrações mais baixas. Apesar do efeito do tratamento com M β CD e oxLDL ter diferenças em relação à organização das balsas (principalmente quanto a forma dos domínios, que no primeiro se apresenta como pontos e no último como regiões menos definidas), o efeito sobre a redistribuição de

GM1, mais heterogênea, se assemelha entre essas condições. Isso indica que o tratamento com a oxLDL pode interferir na organização das balsas de membrana, de forma semelhante ao tratamento com M β CD.

Além da alteração nas balsas, o tratamento com oxLDL se assemelhou ao tratamento com M β CD nas alterações morfológicas induzidas nos macrófagos. Tanto o tratamento com M β CD quanto com oxLDL induziu o encolhimento celular, e desaparecimento de lamelipódios. Essas alterações já foram observadas em células de melanoma tratadas com M β CD (Bi *et al.*, 2018). Também já foi observado na literatura que o tratamento com oxLDL induz a formação deficiente de lamelipódios e, conseqüentemente, perda da polaridade celular em macrófagos (Park *et al.*, 2012). Além da retração celular, macrófagos tratados com M β CD e oxLDL apresentaram muitas projeções de membrana, observadas por microscopia eletrônica de varredura. A semelhança entre os tratamentos com oxLDL e M β CD evidencia mais uma vez que ambos podem ter um mecanismo de ação em comum e que portanto a oxLDL pode ter um papel nas balsas de membrana.

Também observamos no presente estudo que em ambos os tratamentos (M β CD e oxLDL) houve uma reorganização do citoesqueleto de actina, com maior polimerização desse. Esse resultado corrobora dados da literatura que reportam a polimerização do citoesqueleto de actina induzido por ambos os tratamentos em células endoteliais e fibroblastos (Hissa *et al.*, 2013, Couto *et al.*, 2020). Porém é a primeira vez que o efeito desses dois tratamentos no citoesqueleto de actina é demonstrado comparativamente em macrófagos. Apesar da polimerização de actina induzida pelos tratamentos já ter sido descrita em outros tipos celulares, algumas diferenças são relevantes. Em células endoteliais e fibroblastos o tratamento com oxLDL ou M β CD induz a formação de fibras de estresse. Entretanto, em macrófagos, não observamos a formação dessas estruturas. Para essas células os tratamentos parecem induzir aglomerados ou nucleações de actina, além da intensificação do citoesqueleto cortical. Essas diferenças no efeito do tratamento com oxLDL ou M β CD, em macrófagos e células endoteliais ou fibroblastos, evidenciam diferenças no funcionamento e regulação do citoesqueleto de actina de células fagocíticas profissionais e células fagocíticas não- profissionais, respectivamente.

Para melhor entendermos as semelhanças entre os efeitos do tratamento com M β CD e oxLDL, avaliamos também a interação entre as balsas e o

citoesqueleto de actina nas diferentes condições estudadas. No presente estudo, observamos que a alteração das balsas pelos tratamentos com M β CD e oxLDL altera o citoesqueleto de actina de macrófagos. Entretanto a alteração do citoesqueleto de actina também pode regular a localização das balsas, uma vez que o primeiro pode se ligar no segundo por meio de proteínas adaptadoras (Viola & Gupta, 2007; Chichili & Rodgers, 2009). Semelhanças na interação desses componentes em decorrência de ambos os tratamentos (oxLDL ou M β CD) poderia indicar similaridades em seus mecanismos de ação. Observamos que em células controles e tratadas com nLDL, não há grande co-localização entre o citoesqueleto de actina e domínios de GM1. Entretanto, células tratadas com oxLDL ou M β CD apresentam maior co-localização dessas estruturas. Além de indicar que ambos os tratamentos agem por mecanismos semelhantes, essa co-localização entre o citoesqueleto de actina e as balsas também podem ajudar a explicar a peculiar forma dos domínios de GM1 após o tratamento com oxLDL ou M β CD. É possível, que o citoesqueleto tenha influenciado na disposição das balsas na membrana plasmática, promovendo a maior aglomeração de domínios de GM1 observada em macrófagos tratados com oxLDL ou M β CD.

A polimerização de actina induzida pelo tratamento com M β CD ou oxLDL é apontada pela literatura como sendo dependente da ativação de RhoA/ROCK. Avaliamos portanto se a inibição de ROCK com Y-27632 poderia reverter a polimerização de actina induzida por oxLDL. Em macrófagos, a inibição de ROCK reverteu tanto a polimerização de actina induzida por oxLDL quanto o encolhimento celular. Isso indica que o encolhimento celular observado em macrófagos também pode ser mediado pela ativação de RhoA/ROCK. Interessantemente, a literatura mostra que o tratamento de macrófagos com Y-27632 não induz o espalhamento celular, mas, pelo contrário, induz o fenótipo de “beija-flor” (*hummingbird phenotype*) em longos tempos de exposição à droga (24h)(Liu *et al.*, 2016). Esse fenótipo é caracterizado por longas projeções semelhante a caudas, devido a deficiência na retração da traseira de migração (Liu *et al.*, 2016). O fato dessa droga não induzir espalhamento celular em macrófagos controle, inviabiliza a hipótese de que a reversão do encolhimento celular induzido por oxLDL seja um efeito intrínseco do tratamento com Y-27632 em qualquer circunstância, mas indica o retorno a condições controle pela inibição de ROCK que se apresentava super ativada pelo

tratamento com oxLDL. Entretanto, a inibição de ROCK por Y-27632 não foi capaz de restaurar a formação dos ruffles. Isso indica que há outros mecanismos envolvidos no efeito do tratamento de macrófagos com oxLDL quanto a polaridade e organização do citoesqueleto de actina.

A reorganização do citoesqueleto de actina induzida pelo tratamento com M β CD e oxLDL é implicada na maior rigidez de membrana observada em células endoteliais tratadas com essas drogas (Byfield *et al.*, 2006; Hissa *et al.*, 2013). No presente estudo observamos se essas alterações na biomecânica de membranas podem ser reproduzidas em macrófagos. Usando a técnica de microscopia de desfocalização observamos que o tratamento com M β CD aumenta a rigidez de membrana drasticamente em macrófagos. O tratamento com oxLDL por sua vez, induziu uma menor rigidez de membrana nessas células. Entretanto, nas células tratadas com oxLDL apenas uma pequena região de membrana foi passível de análise por essa técnica e, portanto, pode não ser representativa do restante da membrana.

Além do citoesqueleto de actina, as balsas são conhecidas por regular a distribuição de integrinas na membrana plasmática. Quando ativas, as integrinas são recrutadas e se encontram preferencialmente em regiões de balsas. No nosso estudo, observamos que a alteração das balsas de membrana, pelo tratamento com M β CD ou oxLDL de fato alterou a distribuição da subunidade β 1 de integrinas em macrófagos. Em células tratadas com M β CD ou oxLDL, essas subunidades se mostraram espalhadas pela superfície celular e citoplasma, de forma difusa, enquanto em células controle (não tratadas ou tratadas com nLDL) elas se apresentaram organizadas em pequenos núcleos na superfície celular. As subunidades β 1 estão normalmente associadas com a ligação da célula à moléculas da matriz extracelular. Portanto, as nucleações de integrinas β 1 observadas nas células controle provavelmente indicam pontos de adesão focal, possivelmente perdidos nas células tratadas com M β CD ou oxLDL. Para a subunidade β 2 de integrinas, não houve grande alteração em seu padrão de distribuição em nenhuma das condições estudadas. Uma vez que integrinas β 2 são ativadas pela ligação a I-CAM, uma proteína presente na superfície de outras células, é provável que essas integrinas se encontrem inativas nos macrófagos em cultura e, portanto, fora de balsas de membrana. Dessa forma, a alteração das balsas pelo tratamento com M β CD ou

oxLDL não afetariam sua distribuição. Além disso, na literatura há indícios de domínios ordenados de membrana enriquecidos em marcadores diferentes e que portanto possuem estrutura, função e regulação diferenciados (Wilson *et al.*, 2004; Röper *et al.*, 2000). O papel diferencial desses domínios tem sido implicado no mecanismo de assimetria e polarização celular durante a migração de linfócitos T (Gómez-Moutón *et al.*, 2001). Portanto, diferentes integrinas podem ser governadas por diferentes balsas de membrana. A ação diferencial da oxLDL na distribuição de integrinas pode também indicar, seu papel na organização de um set específico de balsas.

Uma vez que integrinas, em especial integrinas com subunidade $\beta 1$, são importantes componentes de pontos de adesão focal, a desorganização dessas pode ter consequências para a adesão célula-substrato. Assim, a redistribuição de sub-unidades $\beta 1$, induzida pelo tratamento com oxLDL ou M β CD, também pode justificar o encolhimento celular observado após esses tratamentos. Além disso, as integrinas também são importantes para outros processos como migração celular. Essas alterações, juntamente com aquelas observadas para o citoesqueleto de actina poderiam também gerar consequências para a migração celular. De fato, enquanto células não tratadas ou tratadas com nLDL foram capazes de se mover pela placa de cultura (mesmo sem a adição de estímulos quimioatraentes), observamos que macrófagos tratados com oxLDL ou M β CD apresentaram uma deficiência na sua migração. Após o tratamento com M β CD, os macrófagos permaneceram estáticos na placa, não apresentando nenhum movimento randômico, apenas se contraindo nos primeiros 5 minutos de exposição à droga. Da mesma forma, macrófagos tratados com oxLDL não se moveram e se contraíram após as primeiras 4 horas de exposição à essa molécula. Vale ressaltar que, mesmo após 18 horas de tratamento com oxLDL, os macrófagos não recuperaram sua capacidade migratória, observada pelo experimento de migração em fenda. Isso difere do encontrado para células tratadas com M β CD que recuperam sua capacidade migratória nas primeiras 6 horas após a retirada da droga e incubação em meio contendo 1% de SFB. A restauração do funcionamento celular e anulação dos efeitos de M β CD pela adição de colesterol na membrana já é bem descrita na literatura (Rodal *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2008; Hissa *et al.*, 2012). Dessa forma, a produção *de novo* de colesterol, bem como a reposição através do soro presente no

meio, mesmo que em baixa concentração, pode ter fornecido quantidade suficiente de colesterol para as células tratadas com M β CD, recuperando o fenótipo induzido pela exposição à esta droga. A não recuperação da migração das células tratadas com oxLDL, pode ter se dado pelo fato da duração deste tratamento (24h) em relação ao tratamento com M β CD (40min) e/ou de outras alterações que a oxLDL pode induzir e que não são reproduzidas pelo tratamento com M β CD. Isso evidencia que, apesar de serem semelhantes em alguns aspectos, o tratamento com M β CD e oxLDL não são completamente correspondentes, indicando que a oxLDL pode alterar as balsas de membrana por mecanismos semelhantes, porém não necessariamente idênticos aos da M β CD.

A deficiência da migração de macrófagos tratados com oxLDL tem implicações importantes para o desenvolvimento da aterosclerose. O aparecimento e crescimento da placa é relacionado a estagnação de macrófagos nessas regiões, da mesma forma que a regressão de placas tem sido relacionada com a migração e evasão de macrófagos. Dessa forma, a deficiência na migração dos macrófagos expostos à oxLDL pode contribuir para sua permanência na íntima do vaso, bem como para a sua contínua exposição à essa molécula. Isso, por sua vez, pode acarretar na internalização desregulada de LDL, acúmulo de colesterol no citoplasma e formação de células espumosas. O fato da deficiência na migração dos macrófagos tratados com oxLDL ser reproduzida pelo tratamento com M β CD, indica que este efeito está vinculado muito provavelmente à alteração nas balsas de membrana e não ao acúmulo de colesterol no citoplasma e formação da célula espumosa. Essa hipótese é ainda corroborada pelo fato de o o tratamento com nLDL, apesar de induzir um acúmulo de colesterol, não induzir uma deficiência significativa na migração celular.

Park e colaboradores demonstraram que a deficiência na migração de macrófagos tratados com oxLDL é, na verdade, dependente de CD36, uma vez que macrófagos knockouts para CD36 não apresentaram migração deficiente em ensaio de fenda (Park *et al.*, 2012) . É importante ressaltar, que esse resultado não exclui a possibilidade da participação das balsas nesse processo, principalmente quando se leva em consideração a localização preferencial de CD36 em regiões de balsas. O papel da oxLDL na alteração das balsas pode ter ação moduladora na atuação de CD36, contribuindo para a deficiência na migração. Outra possibilidade é de que a

presença de CD36 seja importante para a interação da oxLDL com a balsa e não necessariamente que a sinalização desencadeada por esse receptor ao se ligar a oxLDL seja o único fator responsável pelos efeitos observados. Portanto, a participação concomitante de ambos os elementos (balsa e CD36) pode ser necessária para a observação da deficiência na migração. Apesar de ser possível a exclusão do fator “receptor CD36” neste modelo, por meio de knockouts, a exclusão do fator “balsa” é impossível, uma vez que isso já é suficiente para causar a deficiência na migração.

Além da deficiência na migração, também observamos indícios da alteração do tráfego de lisossomos em macrófagos tratados com oxLDL e M β CD. Em macrófagos não tratados ou tratados com nLDL, os lisossomos se apresentaram na região perinuclear, com poucas dessas organelas próximas a membrana plasmática. Células tratadas com M β CD e oxLDL, entretanto, apresentaram lisossomos na periferia das células, próximos a membrana plasmática. Um aumento na exocitose de lisossomos induzido pelo tratamento com M β CD e oxLDL já foi demonstrado em fibroblastos e recentemente em células endoteliais pelo nosso grupo (Hissa *et al.*, 2013; Couto *et al.*, 2020). Entretanto, fibroblastos tratados com M β CD apresentaram lisossomos apenas na região perinuclear, ao contrario do observado em macrófagos. É interessante ressaltar, que a disposição dos lisossomos anteriormente ao tratamento com M β CD também é diferente nessas duas células. Enquanto, macrófagos não tratados apresentaram lisossomos concentrados na região perinuclear, fibroblastos não tratados apresentaram lisossomos espalhados pela célula (Hissa *et al.*, 2013). Acredita se, portanto, que em fibroblastos, o tratamento com M β CD induz a exocitose de um pool periférico de lisossomos, desencadeada pela reorganização do citoesqueleto de actina, de forma que apenas o pool mais interno, próximo ao núcleo, permanece nas células (Couto *et al.*, 2020). Em células endoteliais, também foi demonstrado que o tratamento com oxLDL, induz a exocitose de lisossomos, que pode ser consequência da polimerização do citoesqueleto de actina observado nessas células, mas posteriormente impede a endocitose constitutiva. Isso indica que a polimerização do citoesqueleto de actina pode funcionar como um propulsor da exocitose de vesículas, mas posteriormente se comporta como uma barreira que impede o fluxo de vesículas.

Em macrófagos há um intenso fluxo de vesículas que participam da alta mobilidade celular, processos fagocíticos e grande turn-over da membrana observados nessas células. É possível portanto, que o pool periférico de lisossomos nos macrófagos seja muito dinâmico, de forma que poucas vesículas permaneçam estáticas na periferia celular. Entretanto quando há a polimerização do citoesqueleto de actina, induzida pelo tratamento com oxLDL ou M β CD, há a formação de uma barreira que bloqueia o tráfego dessas vesículas para a membrana plasmática, ocasionando na permanência dos lisossomos na periferia da célula. É possível ainda que o tratamento induza uma redistribuição de lisossomos, dependente de microtúbulos. Apesar de não ser muito claro o efeito da desorganização das balsas na dinâmica de microtúbulos, sabe-se que estes se ligam a balsas de membrana, sendo inclusive importantes para a distribuição desses domínios na membrana (Balasubramanian *et al.*, 2007). Dessa forma, a redistribuição dos lisossomos pode estar relacionada também as alterações no citoesqueleto de microtúbulos decorrente da desorganização das balsas.

A deficiência no tráfego de lisossomos podem ter implicações em vários processos relevantes para aterosclerose, inclusive na migração celular. Os lisossomos são importantes para a migração direcional, uma vez que exocita proteinases para que os pontos de adesão sejam desfeitos na traseira da célula em migração (Kirfel *et al.*, 2004; Vérollet *et al.*, 2011). Para que isso ocorra é necessário o correto direcionamento desses lisossomos. Além disso, a exocitose de lisossomos para a degradação de matriz também é importante na migração dos macrófagos no tecido (Linder, 2007). Desta forma, alterações no tráfego de lisossomos pode ter um papel na deficiente migração observada em macrófagos tratados com oxLDL e M β CD.

As possíveis alterações no tráfego de lisossomos, também pode influenciar na dinâmica da via endocítica. Sabe-se que macrófagos tratados com oxLDL apresentam fosfolipidose, e comprometimento da digestão lisossomal induzida pelo aprisionamento de colesterol em endossomos tardios (Orsó *et al.*, 2011). De fato, observamos indícios de digestão deficiente nos macrófagos tratados com oxLDL através da presença de grandes vesículas com conteúdo eletrôn-denso em microscopia eletrônica de transmissão. Essas vesículas já foram observadas em osteoclastos tratados com oxLDL e provavelmente indicam vesículas com acúmulo

de proteínas não digeridas em endossomos, bem como tráfego de vesículas deficiente, o que nessas células leva a um comprometimento na diferenciação (Dawodu *et al.*, 2018). Dessa forma, se a desorganização das balsas pode levar a uma possível deficiência no tráfego de lisossomos para a membrana plasmática em macrófagos tratados com oxLDL, esses domínios também podem ter um papel no comprometimento da fusão dessas organelas a endossomos, levando ao comprometimento da via endocítica. Alterações na via endocítica, principalmente em relação ao metabolismo do colesterol, podem ter implicações, por sua vez, na formação de células espumosas.

Por fim, é importante ressaltar que apesar das alterações discutidas no presente estudo possuem implicações no contexto da aterosclerose, sua relevância não se restringe a ele. O conhecimento do papel das balsas de membrana em macrófagos também pode ser de extrema importância em outros processos patológicos que possam envolver a dinâmica das balsas como Niemann-pick, doença caracterizada pelo acúmulo de colesterol intracelular (Vainio *et al.*, 2005). Além disso, esses conhecimentos são importante para a compreensão das complexidades envolvidas no funcionamento normal dos macrófagos, e dessa forma garante um maior entendimento de todos os processos de que eles participam.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo indicam um papel importante de oxLDL em balsas de membrana de macrófagos, que, semelhante ao tratamento com M β CD, induz a formação de grandes domínios de GM1.

Foi demonstrado também que alterações físicas decorrentes do tratamento de macrófagos com oxLDL, como por exemplo a polimerização de actina, encolhimento celular, redistribuição de integrinas e deficiente migração celular podem ser reproduzidos, pelo menos parcialmente, pelo tratamento com M β CD. Isso indica que essas alterações induzidas por oxLDL podem ser consequência da reorganização das balsas.

Desta forma, este estudo apresenta considerações relevantes para o entendimento do papel das balsas de membrana em macrófagos e suas implicações para o desenvolvimento da aterosclerose.

6. REFERÊNCIAS

Agero, U., Mesquita, L. G., Neves, B. R. A., Gazzinelli, R. T., & Mesquita, O. N. (2004). Defocusing microscopy. *Microscopy research and technique*, 65(3), 159-165.

Andrews, N. W. (2000). Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends in cell biology*, 10(8), 316-321.

Bae, Y. S., Lee, J. H., Choi, S. H., Kim, S., Almazan, F., Witztum, J. L., & Miller, Y. I. (2009). Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: toll-like receptor 4–and spleen tyrosine kinase–dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circulation research*, 104(2), 210-218.

Balasubramanian, N., Scott, D. W., Castle, J. D., Casanova, J. E., & Schwartz, M. A. (2007). Arf6 and microtubules in adhesion-dependent trafficking of lipid rafts. *Nature cell biology*, 9(12), 1381-1391.

Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and tissue research*, 339(1), 269.

Barquera, S., Pedroza-Tobías, A., Medina, C., Hernández-Barrera, L., Bibbins-Domingo, K., Lozano, R., & Moran, A. E. (2015). Global overview of the epidemiology of atherosclerotic cardiovascular disease. *Archives of medical research*, 46(5), 328-338.

Bi, J., Wang, R., & Zeng, X. (2018). Lipid rafts regulate the lamellipodia formation of melanoma A375 cells via actin cytoskeleton–mediated recruitment of β 1 and β 3 integrin. *Oncology letters*, 16(5), 6540-6546.

Blair, A., Shaul, P. W., Yuhanna, I. S., Conrad, P. A., & Smart, E. J. (1999). Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32512-32519.

Brown, D. A., & London, E. (1997). Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes?. *Biochemical and biophysical research communications*, 240(1), 1-7.

Byfield, F. J., Aranda-Espinoza, H., Romanenko, V. G., Rothblat, G. H., & Levitan, I. (2004). Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophysical journal*, 87(5), 3336-3343.

Byfield, F. J., Tikku, S., Rothblat, G. H., Gooch, K. J., & Levitan, I. (2006). OxLDL increases endothelial stiffness, force generation, and network formation. *Journal of lipid research*, 47(4), 715-723.

Chamberlain, L. H., Burgoyne, R. D., & Gould, G. W. (2001). SNARE proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5619-5624.

Chávez-Sánchez, L., Garza-Reyes, M. G., Espinosa-Luna, J. E., Chávez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M. V., & Blanco-Favela, F. (2014). The role of TLR2, TLR4 and CD36 in macrophage activation and foam cell formation in response to oxLDL in humans. *Human immunology*, 75(4), 322-329.

Chen, F. W., Li, C., & Ioannou, Y. A. (2010). Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One*, 5(11), e15054.

Chichili, G. R., & Rodgers, W. (2007). Clustering of membrane raft proteins by the actin cytoskeleton. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36682-36691.

Chichili, G. R., & Rodgers, W. (2009). Cytoskeleton–membrane interactions in membrane raft structure. *Cellular and molecular life sciences*, 66(14), 2319-2328.

Chouinard, J. A., Grenier, G., Khalil, A., & Vermette, P. (2008). Oxidized-LDL induce morphological changes and increase stiffness of endothelial cells. *Experimental cell research*, 314(16), 3007-3016.

Colognato, H. (2004). Integrins: versatile integrators of extracellular signals. *Trends in cell biology*, 14(12), 678-686.

Combadière, C., Potteaux, S., Rodero, M., Simon, T., Pezard, A., Esposito, B., ... & Mallat, Z. (2008). Combined inhibition of CCL2, CX3CR1, and CCR5 abrogates Ly6Chi and Ly6Clo monocytosis and almost abolishes atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *Circulation*, 117(13), 1649-1657.

Corrotte, M., Almeida, P. E., Tam, C., Castro-Gomes, T., Fernandes, M. C., Millis, B. A., ... & Andrews, N. W. (2013). Caveolae internalization repairs wounded cells and muscle fibers. *Elife*, 2, e00926.

Couto, N. F., Rezende, L., Fernandes-Braga, W., Alves, A. P., Agero, U., Alvarez-Leite, J., ... & Andrade, L. O. (2019). OxLDL alterations in endothelial cell membrane dynamics leads to changes in vesicle trafficking and increases cell susceptibility to injury. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 183139.

Davies, L. C., Jenkins, S. J., Allen, J. E., & Taylor, P. R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nature immunology*, 14(10), 986.

Dawodu, D., Patecki, M., Hegermann, J., Dumler, I., Haller, H., & Kiyani, Y. (2018). oxLDL inhibits differentiation and functional activity of osteoclasts via scavenger receptor-A mediated autophagy and cathepsin K secretion. *Scientific reports*, 8(1), 1-15.

de Curtis, I., & Meldolesi, J. (2012). Cell surface dynamics—how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. *J Cell Sci*, 125(19), 4435-4444.

de Souza MF, Alencar AP, Malta DC, Moura L, Mansur AP. (2006) Serial temporal analysis of ischemic heart disease and stroke death risk in five regions of Brazil from 1981 to 2001 *Arq Bras Cardiol.*, 87, 735-40.

del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G., & Schwartz, M. A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science*, 303(5659), 839-842.

Echarri, A., Muriel, O., Pavón, D. M., Azegrouz, H., Escolar, F., Terrón, M. C., ... & Del Pozo, M. A. (2012). Caveolar domain organization and trafficking is regulated by Abl kinases and mDia1. *J Cell Sci*, 125(13), 3097-3113.

Feng, B., Yao, P. M., Li, Y., Devlin, C. M., Zhang, D., Harding, H. P., ... & Marks, A. R. (2003). The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nature cell biology*, 5(9), 781.

Frank, C., Rufini, S., Tancredi, V., Forcina, R., Grossi, D., & D'arcangelo, G. (2008). Cholesterol depletion inhibits synaptic transmission and synaptic plasticity in rat hippocampus. *Experimental neurology*, 212(2), 407-414.

Fujiwara, N., & Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, 4(3), 281-286.

Gaus, K., Kritharides, L., Schmitz, G., Boettcher, A., Drobnik, W., Langmann, T., ... & Jessup, W. (2004). Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages. *The FASEB journal*, 18(3), 574-576.

Gelissen, I. C., Brown, A. J., Mander, E. L., Kritharides, L., Dean, R. T., & Jessup, W. (1996). Sterol efflux is impaired from macrophage foam cells selectively enriched with 7-ketocholesterol. *Journal of Biological Chemistry*, 271(30), 17852-17860.

Gliozzi, M., Scicchitano, M., Bosco, F., Musolino, V., Carresi, C., Scarano, F., ... & Mollace, R. (2019). Modulation of nitric oxide synthases by oxidized LDLs: role in vascular inflammation and atherosclerosis development. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3294.

Gómez-Moutón, C., Abad, J. L., Mira, E., Lacalle, R. A., Gallardo, E., Jiménez-Baranda, S., ... & Martínez-A, C. (2001). Segregation of leading-edge and uropod components into specific lipid rafts during T cell polarization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9642-9647.

Grandl, M., Bared, S. M., Liebisch, G., Werner, T., Barlage, S., & Schmitz, G. (2006). E-LDL and Ox-LDL differentially regulate ceramide and cholesterol raft microdomains in human Macrophages. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(3), 189-191.

Hansson, G. K., & Hermansson, A. (2011). The immune system in atherosclerosis. *Nature immunology*, 12(3), 204.

Harder, T., & Simons, K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid—cholesterol microdomains. *Current opinion in cell biology*, 9(4), 534-542

Hiltbold, E. M., Poloso, N. J., & Roche, P. A. (2003). MHC class II-peptide complexes and APC lipid rafts accumulate at the immunological synapse. *The Journal of Immunology*, 170(3), 1329-1338.

Hissa, B., Duarte, J. G., Kelles, L. F., Santos, F. P., Helen, L., Gazzinelli-Guimarães, P. H., ... & Chiari, E. (2012). Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(3), e1583.

Hissa, B., Pontes, B., Roma, P. M. S., Alves, A. P., Rocha, C. D., Valverde, T. M., ... & Silva, A. M. (2013). Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes. *PloS one*, 8(12), e82988.

Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton—A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4), 362.

Honigmann, A., Mueller, V., Ta, H., Schoenle, A., Sezgin, E., Hell, S. W., & Eggeling, C. (2014). Scanning STED-FCS reveals spatiotemporal heterogeneity of lipid interaction in the plasma membrane of living cells. *Nature communications*, 5(1), 1-12.

Humphries, J. D., Byron, A., & Humphries, M. J. (2006). Integrin ligands at a glance. *Journal of cell science*, 119(19), 3901-3903.

Ikonen, E. (2001). Roles of lipid rafts in membrane transport. *Current opinion in cell biology*, 13(4), 470-477.

Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201-207.

Janabi, M., Yamashita, S., Hirano, K. I., Sakai, N., Hiraoka, H., Matsumoto, K., ... & Matsuzawa, Y. (2000). Oxidized LDL-induced NF- κ B activation and subsequent expression of proinflammatory genes are defective in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(8), 1953-1960.

Jansen, K. A., Atherton, P., & Ballestrem, C. (2017, November). Mechanotransduction at the cell-matrix interface. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 71, pp. 75-83). Academic Press.

Kalappurakkal, J. M., Anilkumar, A. A., Patra, C., van Zanten, T. S., Sheetz, M. P., & Mayor, S. (2019). Integrin Mechano-chemical Signaling Generates Plasma Membrane Nanodomains that Promote Cell Spreading. *Cell*, 177(7), 1738-1756.

- Kay, J. G., Murray, R. Z., Pagan, J. K., & Stow, J. L. (2006). Cytokine secretion via cholesterol-rich lipid raft-associated SNAREs at the phagocytic cup. *Journal of Biological Chemistry*, 281(17), 11949-11954.
- Kilsdonk, E. P., Yancey, P. G., Stoudt, G. W., Bangerter, F. W., Johnson, W. J., Phillips, M. C., & Rothblat, G. H. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(29), 17250-17256.
- Kirfel, G., Rigort, A., Borm, B., & Herzog, V. (2004). Cell migration: mechanisms of rear detachment and the formation of migration tracks. *European journal of cell biology*, 83(11-12), 717-724.
- Klausen, T. K., Hougaard, C., Hoffmann, E. K., & Pedersen, S. F. (2006). Cholesterol modulates the volume-regulated anion current in Ehrlich-Lette ascites cells via effects on Rho and F-actin. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(4), C757-C771.
- Kowalsky, G. B., Byfield, F. J., & Levitan, I. (2008). oxLDL facilitates flow-induced realignment of aortic endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 295(2), C332-C340.
- Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., ... & Freeman, M. W. (2002). Scavenger receptors class AI/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49982-49988
- Lafont, F., & Van Der Goot, F. G. (2005). Bacterial invasion via lipid rafts. *Cellular microbiology*, 7(5), 613-620.
- Laganowsky, A., Reading, E., Allison, T. M., Ulmschneider, M. B., Degiacomi, M. T., Baldwin, A. J., & Robinson, C. V. (2014). Membrane proteins bind lipids selectively to modulate their structure and function. *Nature*, 510(7503), 172-175.
- Laliberte, J. P., McGinnes, L. W., Peeples, M. E., & Morrison, T. G. (2006). Integrity of membrane lipid rafts is necessary for the ordered assembly and release of infectious Newcastle disease virus particles. *Journal of virology*, 80(21), 10652-10662.
- Lee, S. H., & Dominguez, R. (2010). Regulation of actin cytoskeleton dynamics in cells. *Molecules and cells*, 29(4), 311-325.
- Leitinger, B., & Hogg, N. (2002). The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *Journal of cell science*, 115(5), 963-972.
- Levental, I., Lingwood, D., Grzybek, M., Coskun, Ü., & Simons, K. (2010). Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22050-22054.

Li, N., Mak, A., Richards, D. P., Naber, C., Keller, B. O., Li, L., & Shaw, A. R. (2003). Monocyte lipid rafts contain proteins implicated in vesicular trafficking and phagosome formation. *Proteomics*, 3(4), 536-548.

Libby, P., & Clinton, S. K. (1993). The role of macrophages in atherogenesis. *Current Opinion in Lipidology*, 4(5), 355-363.

Libby, P., Ridker, P. M., & Hansson, G. K. (2011). Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473(7347), 317.

Linder, S. (2007). The matrix corroded: podosomes and invadopodia in extracellular matrix degradation. *Trends in cell biology*, 17(3), 107-117.

Lingwood, D., Binnington, B., Róg, T., Vattulainen, I., Grzybek, M., Coskun, Ü., ... & Simons, K. (2011). Cholesterol modulates glycolipid conformation and receptor activity. *Nature chemical biology*, 7(5), 260-262.

Liu, Y., Tejpal, N., You, J., Li, X. C., Ghobrial, R. M., & Kloc, M. (2016). ROCK inhibition impedes macrophage polarity and functions. *Cellular immunology*, 300, 54-62.

Llodrá, J., Angeli, V., Liu, J., Trogan, E., Fisher, E. A., & Randolph, G. J. (2004). Emigration of monocyte-derived cells from atherosclerotic lesions characterizes regressive, but not progressive, plaques. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(32), 11779-11784.

Mahammad, S., Dinic, J., Adler, J., & Parmryd, I. (2010). Limited cholesterol depletion causes aggregation of plasma membrane lipid rafts inducing T cell activation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(6), 625-634.

Maiolino, G., Rossitto, G., Caielli, P., Bisogni, V., Rossi, G. P., & Calò, L. A. (2013). The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediators of inflammation*, 2013.

Mañes, S., & Viola, A. (2006). Lipid rafts in lymphocyte activation and migration. *Molecular membrane biology*, 23(1), 59-69.

Mañes, S., Lacalle, R. A., Gómez-Moutón, C., & Martínez-A, C. (2003). From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends in immunology*, 24(6), 319-325.

Mañes, S., Lacalle, R. A., Gómez-Moutón, C., del Real, G., Mira, E., & Martínez-A, C. (2001, April). Membrane raft microdomains in chemokine receptor function. In *Seminars in immunology* (Vol. 13, No. 2, pp. 147-157). Academic Press.

Mañes, S., Mira, E., Gómez-Moutón, C., Lacalle, R. A., Keller, P., Labrador, J. P., & Martínez-A, C. (1999). Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *The EMBO journal*, 18(22), 6211-6220

- Martino, F., Perestrelo, A. R., Vinarský, V., Pagliari, S., & Forte, G. (2018). Cellular mechanotransduction: from tension to function. *Frontiers in physiology*, 9.
- Miller, Y. I. (2005). Toll-like receptors and atherosclerosis: oxidized LDL as an endogenous Toll-like receptor ligand. *Future cardiology*, 6(1), 785-792.
- Miller, Y. I., Worrall, D. S., Funk, C. D., Feramisco, J. R., & Witztum, J. L. (2003). Actin polymerization in macrophages in response to oxidized LDL and apoptotic cells: role of 12/15-lipoxygenase and phosphoinositide 3-kinase. *Molecular biology of the cell*, 14(10), 4196-4206.
- Moore, K. J., & Freeman, M. W. (2006). Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(8), 1702-1711.
- Moore, K. J., Sheedy, F. J., & Fisher, E. A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology*, 13(10), 709-721.
- Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M., & Sato, C. (2011). Low cholesterol triggers membrane microdomain-dependent CD44 shedding and suppresses tumor cell migration. *Journal of Biological Chemistry*, 286(3), 1999-2007.
- Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H., & Evans, R. M. (1998). Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ . *Cell*, 93(2), 229-240.
- Oh, M. J., Zhang, C., LeMaster, E., Adamos, C., Berdyshev, E., Bogachkov, Y., ... & Wary, K. K. (2016). Oxidized LDL signals through Rho-GTPase to induce endothelial cell stiffening and promote capillary formation. *Journal of lipid research*, 57(5), 791-808.
- Orsó, E., Grandl, M., & Schmitz, G. (2011). Oxidized LDL-induced endolysosomal phospholipidosis and enzymatically modified LDL-induced foam cell formation determine specific lipid species modulation in human macrophages. *Chemistry and physics of lipids*, 164(6), 479-487.
- Ostrom, R. S., & Insel, P. A. (2004). The evolving role of lipid rafts and caveolae in G protein-coupled receptor signaling: Implications for molecular pharmacology. *British journal of pharmacology*, 143(2), 235-245.
- Palazzo, A. F., Eng, C. H., Schlaepfer, D. D., Marcantonio, E. E., & Gundersen, G. G. (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin-and FAK-facilitated Rho signaling. *Science*, 303(5659), 836-839.
- Pande, G. (2000). The role of membrane lipids in regulation of integrin functions. *Current opinion in cell biology*, 12(5), 569-574.

Park, Y. M., Drazba, J. A., VasANJI, A., Egelhoff, T., Febbraio, M., & Silverstein, R. L. (2012). Oxidized LDL/CD36 interaction induces loss of cell polarity and inhibits macrophage locomotion. *Molecular biology of the cell*, 23(16), 3057-3068.

Park, Y. M., Febbraio, M., & Silverstein, R. L. (2009). CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *The Journal of clinical investigation*, 119(1), 136-145.

Parton, R. G., & Del Pozo, M. A. (2013). Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(2), 98-112.

Pataki, M., Lusztig, G., & Robenek, H. (1992). Endocytosis of oxidized LDL and reversibility of migration inhibition in macrophage-derived foam cells in vitro. A mechanism for atherosclerosis regression?. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 12(8), 936-944.

Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *Journal of lipid research*, 47(7), 1597-1598.

Pirillo, A., Norata, G. D., & Catapano, A. L. (2013). LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*, 2013.

Pozo, M. A. D. (2004). Integrin signaling and lipid rafts. *Cell cycle*, 3(6), 723-726.

Puri, N., & Roche, P. A. (2006). Ternary SNARE complexes are enriched in lipid rafts during mast cell exocytosis. *Traffic*, 7(11), 1482-1494.

Qi, M., Liu, Y., Freeman, M. R., & Solomon, K. R. (2009). Cholesterol-regulated stress fiber formation. *Journal of cellular biochemistry*, 106(6), 1031-1040.

Qiao, J. H., Tripathi, J., Mishra, N. K., Cai, Y., Tripathi, S., Wang, X. P., ... & Lusis, A. J. (1997). Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *The American journal of pathology*, 150(5), 1687.

Ramprasad, O. G., Srinivas, G., Rao, K. S., Joshi, P., Thiery, J. P., Dufour, S., & Pande, G. (2007). Changes in cholesterol levels in the plasma membrane modulate cell signaling and regulate cell adhesion and migration on fibronectin. *Cell motility and the cytoskeleton*, 64(3), 199-216.

Rao, S. K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., & Andrews, N. W. (2004). Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 20471-20479.

Ridley, A. J. (2011). Life at the leading edge. *Cell*, 145(7), 1012-1022.

Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., ... & Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*, 302(5651), 1704-1709

- Rios, F. J., Ferracini, M., Pecenin, M., Koga, M. M., Wang, Y., Ketelhuth, D. F., & Jancar, S. (2013). Uptake of oxLDL and IL-10 production by macrophages requires PAFR and CD36 recruitment into the same lipid rafts. *PLoS One*, 8(10), e76893.
- Rodal, S. K., Skretting, G., Garred, Ø., Vilhardt, F., Van Deurs, B., & Sandvig, K. (1999). Extraction of cholesterol with methyl- β -cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Molecular biology of the cell*, 10(4), 961-974.
- Röper, K., Corbeil, D., & Huttner, W. B. (2000). Retention of prominin in microvilli reveals distinct cholesterol-based lipid micro-domains in the apical plasma membrane. *Nature cell biology*, 2(9), 582-592.
- Salaün, C., James, D. J., & Chamberlain, L. H. (2004). Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, 5(4), 255-264.
- Samstag, Y., Eibert, S. M., Klemke, M., & Wabnitz, G. H. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *Journal of leukocyte biology*, 73(1), 30-48.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nature reviews Molecular cell biology*, 18(6), 361.
- Shentu, T. P., Titushkin, I., Singh, D. K., Gooch, K. J., Subbaiah, P. V., Cho, M., & Levitan, I. (2010). oxLDL-induced decrease in lipid order of membrane domains is inversely correlated with endothelial stiffness and network formation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 299(2), C218-C229.
- Shi, D., Lv, X., Zhang, Z., Yang, X., Zhou, Z., Zhang, L., & Zhao, Y. (2013). Smoothened oligomerization/higher order clustering in lipid rafts is essential for high Hedgehog activity transduction. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12605-12614.
- Shintani, H. (2013). LDL isolation and copper-catalysed oxidation. *Pharm Anal Acta*, 4, 247.
- Simons, K., & Toomre, D. (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature reviews Molecular cell biology*, 1(1), 31-39
- Sit, S. T., & Manser, E. (2011). Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci*, 124(5), 679-683.
- Smart, E. J., Ying, Y. S., Conrad, P. A., & Anderson, R. G. (1994). Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *The Journal of Cell Biology*, 127(5), 1185-1197.
- Smith, J. D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., & Miyata, M. (1995). Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating

factor (op) and apolipoprotein E. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(18), 8264-8268.

Sorice, M., Garofalo, T., Misasi, R., Longo, A., Mattei, V., Sale, P., ... & Pavan, A. (2001). Evidence for cell surface association between CXCR4 and ganglioside GM3 after gp120 binding in SupT1 lymphoblastoid cells. *FEBS letters*, 506(1), 55-60.

Steffensen, L. B., Mortensen, M. B., Kjolby, M., Hagensen, M. K., Oxvig, C., & Bentzon, J. F. (2015). Disturbed laminar blood flow vastly augments lipoprotein retention in the artery wall: a key mechanism distinguishing susceptible from resistant sites. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 35(9), 1928-1935.

Stone, N. J., Robinson, J. G., Lichtenstein, A. H., Merz, C. N. B., Blum, C. B., Eckel, R. H., ... & McBride, P. (2014). 2013 ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 63(25 Part B), 2889-2934.

Tabas, I. (1997). Free cholesterol-induced cytotoxicity: a possible contributing factor to macrophage foam cell necrosis in advanced atherosclerotic lesions. *Trends in cardiovascular medicine*, 7(7), 256-263.

Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 10(1), 36.

Tabas, I., Williams, K. J., & Borén, J. (2007). Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*, 116(16), 1832-1844.

Tu, C., Ortega-Cava, C. F., Chen, G., Fernandes, N. D., Cavallo-Medved, D., Sloane, B. F., ... & Band, H. (2008). Lysosomal cathepsin B participates in the podosome-mediated extracellular matrix degradation and invasion via secreted lysosomes in v-Src fibroblasts. *Cancer research*, 68(22), 9147-9156.

Vainio, S., Bykov, I., Hermansson, M., Jokitalo, E., Somerharju, P., & Ikonen, E. (2005). Defective insulin receptor activation and altered lipid rafts in Niemann–Pick type C disease hepatocytes. *Biochemical Journal*, 391(3), 465-472.

Vérollet, C., Charriere, G. M., Labrousse, A., Cougoule, C., Le Cabec, V., & Maridonneau–Parini, I. (2011). Extracellular proteolysis in macrophage migration: losing grip for a breakthrough. *European journal of immunology*, 41(10), 2805-2813.

Viola, A., & Gupta, N. (2007). Tether and trap: regulation of membrane-raft dynamics by actin-binding proteins. *Nature Reviews Immunology*, 7(11), 889.

Wallner, S., Grandl, M., Liebisch, G., Peer, M., Orso, E., Sigrüner, A., ... & Schmitz, G. (2016). oxLDL and eLDL induced membrane microdomains in human macrophages. *PloS one*, 11(11).

Wang, R., Bi, J., Ampah, K. K., Ba, X., Liu, W., & Zeng, X. (2013). Lipid rafts control human melanoma cell migration by regulating focal adhesion disassembly. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1833(12), 3195-3205.

Wasser, C. R., Ertunc, M., Liu, X., & Kavalali, E. T. (2007). Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling. *The Journal of physiology*, 579(2), 413-429.

Wickström, S. A., Lange, A., Hess, M. W., Polleux, J., Spatz, J. P., Krüger, M., ... & Huber, L. A. (2010). Integrin-linked kinase controls microtubule dynamics required for plasma membrane targeting of caveolae. *Developmental cell*, 19(4), 574-588.

Wilson, B. S., Steinberg, S. L., Liederman, K., Pfeiffer, J. R., Surviladze, Z., Zhang, J., ... & Oliver, J. M. (2004). Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Molecular biology of the cell*, 15(6), 2580-2592.

Wu, C. (2007). Focal adhesion: a focal point in current cell biology and molecular medicine. *Cell adhesion & migration*, 1(1), 13-18.

Xu, J., Toops, K. A., Diaz, F., Carvajal-Gonzalez, J. M., Gravotta, D., Mazzoni, F., ... & Lakkaraju, A. (2012). Mechanism of polarized lysosome exocytosis in epithelial cells. *J Cell Sci*, 125(24), 5937-5943.

Yeh, M., Cole, A. L., Choi, J., Liu, Y., Tulchinsky, D., Qiao, J. H., ... & Vora, D. K. (2004). Role for sterol regulatory element-binding protein in activation of endothelial cells by phospholipid oxidation products. *Circulation research*, 95(8), 780-788.

Yin, H. L., & Janmey, P. A. (2003). Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annual review of physiology*, 65(1), 761-789.

Yoshida, H., & Kisugi, R. (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta*, 411(23-24), 1875-1882.

Zamir, O., & Charlton, M. P. (2006). Cholesterol and synaptic transmitter release at crayfish neuromuscular junctions. *The Journal of physiology*, 571(1), 83-99.

Zeng, Y., Tao, N., Chung, K. N., Heuser, J. E., & Lublin, D. M. (2003). Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), 45931-45936.

Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2003). Unfolding the toxicity of cholesterol. *Nature cell biology*, 5(9), 769.

Zidovetzki, R., & Levitan, I. (2007). Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1768(6), 1311-1324.

