

NATÁLIA FERNANDA DO COUTO

**EFEITOS DA MODULAÇÃO MECÂNICA INDUZIDA PELA DEPLEÇÃO DO
COLESTEROL DE MEMBRANA NOS MECANISMOS DE REPARO CELULAR**

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Abril/2016

NATÁLIA FERNANDA DO COUTO

**EFEITOS DA MODULAÇÃO MECÂNICA INDUZIDA PELA DEPLEÇÃO DE
COLESTEROL DE MEMBRANA NOS MECANISMOS DE REPARO CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador (a): Prof. Dra. Luciana de Oliveira Andrade

Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Abril/2016

Natália Fernanda do Couto

**EFEITOS DA MODULAÇÃO MECÂNICA INDUZIDA PELA DEPLEÇÃO DE
COLESTEROL DE MEMBRANA NOS MECANISMOS DE REPARO CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Dra. Luciana de Oliveira Andrade (Orientadora) – UFMG

Dr. Kenneth J. Gollob

Dr. Thiago Castro Gomes

Belo Horizonte, 19 de abril de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Deus por cada novo amanhecer, por todas as bênçãos concedidas, por iluminar meus caminhos e guiar meus passos.

Aos meus pais, Vademir e Socorro, os grandes responsáveis pelo que me tornei, pelo apoio e pelas palavras de conforto nos momentos que mais precisei. Por caminharem comigo, por abrirem todas as portas para que meus sonhos se tornassem realidade. À eles, que me deram todo o amor do mundo, que são meu porto-seguro e meus melhores amigos, que depositaram em mim toda sua confiança e à quem devo minha vida, meu muito obrigada.

Ao meu irmão Bruno, por todo o companheirismo e amizade de sempre. Pelas palavras de incentivo e carinho, pela confiança e pelo amor incondicional.

Ao meu namorado Marcel, que mesmo à distância esteve comigo, me apoiando, acreditando em mim e no que eu era capaz. Por todo amor e alegria que trouxe para a minha vida e pelo futuro que construiremos juntos.

À minha família que me ajudou em tantos momentos, pela felicidade transmitida, pela união em todos os momentos. Minha avó, tios e tias, primos e primas, agregados, obrigada por estarem presentes em minha vida.

À todos os meus amigos, em especial Lívia, Alyne e Helena, por cada momento em que estiveram comigo, pelas confissões, sorrisos, choros, por comemorarem comigo cada vitória e por me incentivarem a continuar mesmo nos momentos de desânimo e cansaço. À Ana Flávia pelos momentos de entusiasmo, de diversão e pela ótima convivência.

À Prof. Dr. Luciana Andrade, pela orientação, pela paciência e pelo exemplo de profissionalismo, que tornaram possível a conclusão desta dissertação.

À família LBCM por me receberem com tanto carinho e por me apoiarem durante esta jornada. Um agradecimento especial à Rhyanne e Luisa pela paciência de me ensinar cada uma das técnicas usadas no laboratório, por me ajudarem com as metodologias utilizadas neste trabalho, por fazerem meus dias mais alegres com suas loucuras. À Patrícia pela amizade, apoio, companhia, pelos conselhos dados, pela parceria na organização do laboratório e por contribuir com a elaboração deste trabalho. Não haveria como expressar minha gratidão pela imensa ajuda que vocês

me deram. Aos queridos Thalita, Victor, Anny, Livia, Maissa, Hennan, Heliana e Thaísa pela ótima convivência, pelo apoio, pelas conversas e por tornar o laboratório um ambiente tão agradável.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Oscar Nassif Mesquita, Prof. Ubirajara Agero e a doutoranda Ana Paula Alves, do Laboratório de Física Biológica da UFMG, pela disponibilidade e auxílio nos experimentos de microscopia de desfocalização.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular que colaboraram para meu enriquecimento profissional. Aos laboratórios LGI e LBIC que gentilmente cederam seu espaço e equipamentos que tornaram viáveis a execução deste trabalho.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído, meus sinceros agradecimentos.

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

(José de Alencar)

RESUMO

O reparo de membrana após injúria é um importante processo de manutenção celular especialmente para aquelas células que estão sob constante estresse mecânico, como a célula endotelial. No entanto, alterações nas propriedades biomecânicas destas células, como as decorrentes da depleção de colesterol, poderiam comprometer a capacidade de reparo de membrana destas células e, dessa forma, contribuir para a fragilidade endotelial. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar a influência da modulação mecânica induzida pela depleção de colesterol da membrana plasmática, mediada pelo tratamento com M β CD, no reparo de membrana plasmática. Para isto, foi utilizada uma linhagem de células endoteliais de cordão umbilical humano (EAhY926). Como em dados anteriores do grupo, nossos resultados mostraram que há uma reorganização e polimerização “de novo” das fibras de actina, com conseqüente aumento da rigidez celular, o qual é acompanhado de um pico de exocitose lisossomal logo nos 10 minutos iniciais de tratamento com a droga. Adicionalmente, foi mostrado que durante a depleção de colesterol, as células apresentaram um aumento de eventos endocíticos entre 10 e 20 minutos, o que coincide com o pico de exocitose observado, indicando que estes são provavelmente eventos de endocitose compensatória, decorrentes da exocitose lisossomal. Paralelamente, foi observado que a endocitose constitutiva, proveniente de processos de pinocitose, comuns em células endoteliais, é bloqueado com o aumento do tempo de exposição à droga. Estes dados sugerem que o citoesqueleto reorganizado funcione como uma barreira mecânica para novos eventos de endocitose constitutiva. Ainda, células tratadas com M β CD apresentaram um maior nível de injúria, coincidente ao pico de aumento de rigidez celular, em relação às células controle. Estes dados em conjunto mostram que alterações na mecânica celular, induzidas por tratamento com M β CD, não só interferem com eventos de tráfego de membrana como tornam as células mais propensas a sofrerem uma injúria mecânica.

Palavras-chave: colesterol, reparo de membrana, célula endotelial.

ABSTRACT

Membrane repair after injury is an important process in retaining cell integrity, especially for cells which are under constant physical stress, such as endothelial cells. However, changes in the mechanical properties of membranes, such as those observed after cholesterol depletion, could impair the ability of cells in repairing injured membrane, and so contribute to endothelial fragility. The goal of this work was to evaluate the influence of the mechanical modulation induced by cholesterol depletion, upon M β CD treatment, on membrane repair mechanisms. All the experiments were performed using a cell lineage of a human umbilical vein endothelial cell (EAhY926). As previously observed by our group, the absence of cholesterol leads to a reorganization of cellular actin and *de novo* polymerization, an increase in cell rigidity, as well as an induction of a rapid event of lysosomal exocytosis as early as 10 minutes after M β CD exposure. Additionally, during cholesterol sequestration, we observed an increase in endocytic events between 10-20 minutes which coincided with the peak of exocytosis, indicating that these are most likely compensatory endocytic events triggered by lysosomal exocytosis. In parallel, we observed that constitutive endocytic events, arising from pinocytic processes which are common in these cells, is blocked upon cell treatment with M β CD, suggesting that the reorganized cytoskeleton could function as a mechanical barrier to pinocytic events. Also, coinciding with the peak of cell rigidity induced by M β CD treatment, cells become more prone to mechanical membrane injury in relation to non-treated cells. Together, these data show that mechanical modulation induced by cholesterol depletion not only alters membrane traffic in cells, but also makes cells more susceptible to mechanical injury.

Key-words: cholesterol, membrane repair, endothelial cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo adaptado do mecanismo de reparo de membrana mediado pela secreção lisossomal de ASM proposto por Tam e colaboradores (2010).	25
Figura 2: Organização do citoesqueleto de actina de células endoteliais controle ou tratadas com as diferentes drogas..	39
Figura 3: Organização do citoesqueleto de actina de células endoteliais controle ou expostas à M β CD em diferentes tempos.	40
Figura 4: Visualização do citoesqueleto de actina de células endoteliais previamente tratadas com Latrunculina-A, seguidas ou não por tratamento com M β CD ou H γ CD.	42
Figura 5: Visualização do citoesqueleto de actina de células endoteliais controle não tratadas ou expostas à oxLDL previamente tratadas ou não com Latrunculina-A.....	44
Figura 6: Microscopia de desfocalização de células endoteliais durante tratamento com M β CD..	47
Figura 7: Microscopia de desfocalização de células endoteliais durante tratamento com H γ CD..	48
Figura 8: Análise da exocitose lisossomal através da atividade da enzima β -hexosaminidase no sobrenadante de células em cultura.....	50
Figura 9: Ensaio de viabilidade celular por exclusão do corante Iodeto de Propídio.....	52
Figura 10: Análise quantitativa de eventos endocíticos induzidos pelo tratamento com M β CD.....	54
Figura 11: Análise quantitativa de eventos de endocitose compensatória após injúria mecânica em células expostas à M β CD em diferentes tempos.....	57
Figura 12: Nível de injúria mecânica causado pela raspagem das células endoteliais controle não-tratadas..	58
Figura 13: Nível de injúria mecânica causado pela raspagem das células endoteliais tratadas com M β CD..	59

Figura 14: Nível de injúria mecânica causado pela raspagem das células endoteliais tratadas com H γ CD..60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1.	Colesterol e microdomínios de membrana.....	15
1.2.	Microdomínios ricos em colesterol nas interações membrana-citoesqueleto e no controle da biomecânica celular	18
1.3.	Microdomínios ricos em colesterol, citoesqueleto e exocitose de vesículas	21
1.4.	Mecanismos de reparo de membrana.....	23
1.5.	Colesterol, disfunção endotelial e seu papel na aterogênese	25
2	JUSTIFICATIVA.....	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1.	Objetivo geral	31
3.2.	Objetivos específicos	31
4	METODOLOGIA	32
4.1.	Cultura celular	32
4.2.	Depleção de colesterol.....	32
4.3.	Avaliação do citoesqueleto de actina	32
4.4.	Análise das mudanças estruturais no conjunto membrana/citoesqueleto através da microscopia de desfocalização	33
4.5.	Ensaio de viabilidade celular.....	34
4.6.	Ensaio de exocitose de lisossomos por espectrofluorimetria para ensaio de atividade de β –hexosaminidase.....	34
4.7.	Ensaio de endocitose compensatória para avaliação de reparo de membrana	35
4.8.	Ensaio com Iodeto de Propídio para avaliação da capacidade de reparo da membrana celular e controle do nível de injúria mecânica	36
5	RESULTADOS	38

5.1.	A depleção de colesterol induz reorganização e polimerização “de novo” do citoesqueleto de actina	38
5.2.	Tratamento com oxLDL também induz reorganização e polimerização “de novo” do citoesqueleto de actina	43
5.3.	O sequestro de colesterol induzido por M β CD altera propriedades mecânicas da célula aumentando sua rigidez	45
5.4.	Tratamento com M β CD induz excitose desregulada de lisossomos	49
5.5.	As alterações induzidas pelo tratamento com M β CD não afetam a viabilidade das células endoteliais.....	51
5.6.	A remoção do colesterol parece bloquear a ocorrência de novos eventos endocíticos naturais da célula endotelial	53
5.7.	Células tratadas com M β CD se tornam mais sensíveis à injúria mecânica e esta maior sensibilidade parece estar relacionada ao aumento de rigidez.....	55
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1 INTRODUÇÃO

A membrana plasmática é uma estrutura complexa formada por uma bicamada lipídica que confere fluidez a membrana e que atua como uma barreira entre o ambiente extracelular e o citosol, impermeável a muitas moléculas. Os lipídeos são os principais componentes da membrana plasmática constituindo cerca de 50% da estrutura da bicamada (Alberts, 2002). O restante desta estrutura é constituído por proteínas e carboidratos que modificam os lipídeos e proteínas da membrana. Dentre os lipídeos que compõem a membrana, os fosfolipídeos são os mais abundantes, dos quais os principais são os fosfoglicerídeos (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e fosfatidilcolina) e a esfingomiélnina. Outras duas classes de lipídeos também possuem funções importantes que conferem as características estruturais e funcionais da bicamada lipídica, são elas os glicolipídeos e o colesterol (Alberts, 2002; Head *et al.*, 2014). A quantidade e disposição de cada um destes lipídeos vão depender do tipo de membrana (plasmática ou intracelular) e do tipo celular (Alberts, 2002; Pomorski *et al.*, 2001).

A membrana plasmática apresenta uma distribuição heterogênea de lipídios ao longo de sua bicamada, formando um arranjo assimétrico com a esfingomiélnina e glicolipídios, abundantes na face externa, e os fosfoglicerídeos na face citosólica, resultante de um contínuo movimento de lipídios entre as duas camadas da membrana (Van Meer *et al.*, 2009; Pomorski *et al.*, 2001). Esta distribuição é mantida por um transporte ativo de lipídeos através da bicamada lipídica. No entanto, o mesmo não é aplicado para o colesterol. O movimento do colesterol através da membrana parece não estar relacionado com a sua concentração em cada uma das camadas, mas sim com sua alta afinidade por esfingolipídios, estando, portanto, enriquecido na face não-citosólica da membrana plasmática, onde podem ainda se associar formando microdomínios ordenados de membrana (Van Meer *et al.*, 2009; Lange e Steck, 2016).

A manutenção deste arranjo assimétrico dos lipídios é importante para as funções da membrana plasmática. Além de funcionar como uma barreira, os lipídios que compõem a membrana fornecem a ela outras importantes características, como o potencial de brotamento, tubulação, fissão e fusão de vesículas, que são

fundamentais para a divisão celular, para a reprodução e para o tráfego intracelular de membranas (Van Meer *et al.*, 2009). Adicionalmente, os lipídios podem ainda atuar diretamente nos processos de transdução de sinais ou ainda recrutarem e organizarem as proteínas de membrana em seus microdomínios, que vão participar dos processos de sinalização celular ou como mecanismos efetores (Van Meer *et al.*, 2009). Deste modo, alterações na distribuição dos lipídios geralmente levam a uma resposta fisiológica (Pomorski *et al.*, 2001).

1.1. Colesterol e microdomínios de membrana

As moléculas lipídicas da membrana plasmática podem naturalmente se agregar formando regiões especializadas na forma de microdomínios, responsáveis por importantes funções na membrana. Os domínios de membrana ricos em colesterol, também denominados balsas de membrana, são pequenos domínios (10-200nm), ricos em esteróis e esfingolipídios, que recobrem grande parte da superfície celular e são responsáveis por diversas funções celulares (Ikonen, 2008; Pike, 2006).

Acredita-se que as balsas de membrana sejam formadas por lipídios em um estado líquido ordenado, no qual os esfingolipídios se associam lateralmente entre si por interações fracas entre as cabeças de carboidratos dos glicosfingolipídios e por uma interação hidrofóbica entre suas cadeias laterais saturadas. Os espaços vazios entre estas associações laterais são preenchidos por colesterol, que também interage com a porção hidrofóbica dos esfingolipídios, formando interações justas que os segregam dos demais fosfolipídios da membrana plasmática (Cremesti *et al.*, 2002). O colesterol é uma molécula essencial para a organização e estruturação destas balsas de membrana, conferindo propriedades biofísicas especiais à membrana das células, através do aumento da coesão e empacotamento dos lipídios que as compõem, formando plataformas com proteínas com as quais têm afinidade (Ikonen, 2008).

Dois tipos comuns de balsas de membrana são conhecidos: as balsas planas ou não-caveolares e as cavéolas. Ambos os tipos de balsas apresentam basicamente as mesmas características (ricas em colesterol e esfingolipídios, ricas em proteínas ancoradoras de glicosilfosfatidilinositol - GPI, ricas em gangliosídeos, especialmente

GM1, associação com o citoesqueleto e resistência à extração com detergentes), mas se diferenciam no formato. As cavéolas formam pequenas invaginações da membrana e são ricas em proteínas caveolinas, enquanto as balsas planas não são invaginadas e são ricas em proteínas flotilina 1 e 2 (Allen *et al.*, 2007).

A desorganização destes microdomínios de membrana, através de seu isolamento ou da utilização de drogas para a depleção de colesterol, tem sido utilizada para estudar a importância destas regiões especializadas e de seus componentes em diversos processos fisiológicos (Allen *et al.*, 2007). Foi demonstrado que as balsas de membrana, devido à sua composição e associação de proteínas, possuem diferentes funções e são requeridas em diversos processos celulares, que vão desde a sinalização celular até a entrada de patógenos e o tráfego de membranas (Hanzal-Bayer e Hancock, 2007; Kwik *et al.*, 2003; Lafont e Van der Goot, 2005; Van Meer *et al.*, 2009).

Um número cada vez mais crescente de proteínas sinalizadoras que residem ou que são direcionadas para dentro e fora das balsas de membrana tem sido conhecido. Entre elas estão o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF), receptor de insulina, proteínas G, receptores ionotrópicos e acoplados a proteína G, Ras, adenilato ciclase, PI3 cinase, óxido nítrico sintase (NOS) e receptor do fator de necrose tumoral- α (TNF), demonstrando a importância destas regiões de balsas de membrana na ativação de receptores e na regulação da sinalização para diferentes funções celulares (Cremesti *et al.* 2002).

Além de participar dos processos de sinalização celular, as balsas de membrana também têm sido estudadas como regiões de invasão de patógenos. Existem diversas vias de entrada na célula, como a endocitose mediada por vesículas revestidas por clatrina, endocitose de cavéolas e a fagocitose. São pelos processos de endocitose, em especial a mediada por cavéolas, que as toxinas e vírus invadem as células. No entanto, elas só podem acomodar e engolfar patógenos que não excedam o seu próprio tamanho. Contudo, foi demonstrado o papel dos compartimentos caveolares na invasão de bactérias, que são organismos muito maiores que as toxinas e vírus. Neste caso, as cavéolas parecem não ser a rota de entrada em si, mas sim uma plataforma de sinalização para o citoesqueleto de actina,

ativada pelo patógeno, para induzir sua internalização na célula (Lafont e Van der Goot, 2005).

O processo de fusão de membranas é um mecanismo-chave nas vias endocíticas e exocíticas que garantem a manutenção de diversas funções celulares e que também é dependente do conteúdo de colesterol e, em especial, dos microdomínios de membrana (Gil *et al.*, 2005; Murray e Tamm, 2010). A fusão de membranas é um processo mediado por proteínas do complexo SNARE, proteínas transmembrânicas em forma de hélices, encontradas tanto na membrana da vesícula (vSNARE), quanto na membrana-alvo (tSNARE). Estas proteínas se pareiam, levando a aproximação das membranas a serem fundidas, e se interagem fortemente formando um feixe de quatro hélices que catalisa a fusão dessas membranas (Alberts, 2002; Murray e Tamm, 2010). O papel das balsas lipídicas nos processos de fusão de membranas foi evidenciado após a observação de que a exocitose de vesículas era comprometida em células depletadas para colesterol. Adicionalmente, porque várias proteínas do complexo SNARE foram encontradas associadas a estes microdomínios ou sua aglomeração na membrana era sensível a variações do conteúdo de colesterol (Salaün *et al.*, 2008; Hanzal-Bayer e Hancock, 2007).

As balsas de membrana, além de apresentarem importantes papéis nos processos celulares citados acima, funcionam como um ponto de ancoragem do citoesqueleto, através da ligação direta ou indireta dessas proteínas do citoesqueleto à componentes balsas de membrana, e como uma plataforma de comunicação com a matriz extracelular via integrinas, caderinas e outras moléculas de adesão celular (Byfield *et al.*, 2004; Head *et al.*, 2014). Tanto os microtúbulos quanto os filamentos de actina apresentam interações com as balsas de membrana. O papel dos microdomínios no controle da dinâmica dos microtúbulos ainda não está bem esclarecido, mas evidências mostraram a presença de tubulinas, proteínas constituintes dos microtúbulos, nas balsas de membrana, as quais podem se associar a caveolinas, ajudando em sua estabilização (Allen *et al.*, 2007).

A interação entre as balsas e o citoesqueleto de actina parece ter diferentes papéis. Primeiramente, estes microdomínios parecem modular a dinâmica dos filamentos de actina. Lipídios como o fosfatidilinositol (4,5) bifosfato e fosfatidilinositol (3,4) bifosfato (PIP2) são encontrados enriquecidos nas balsas de membrana e são

conhecidos por sua ligação à actina e por conduzir a montagem de filamentos de actina, funcionando como sítios de ancoragem desses filamentos à membrana plasmática (Allen *et al.*, 2007). Por outro lado, a actina também parece ter um papel importante no agrupamento de moléculas de sinalização, como as proteínas G (Rho-GTPases, por exemplo), nas balsas de membrana. Estas proteínas controlam o formato da célula em resposta a sinais externos alterando sua posição dentro das balsas e consequentemente modificando o citoesqueleto de actina. Também controlam cascatas de sinalização para o desenvolvimento e sobrevivência da célula (Allen *et al.*, 2007).

1.2. Microdomínios ricos em colesterol nas interações membrana-citoesqueleto e no controle da biomecânica celular

Como mencionado no item anterior, esses microdomínios de membrana ricos em colesterol possuem componentes lipídicos, como PIP2, e proteicos, como Rho-GTPases e integrinas, que são moléculas reguladoras da associação entre a membrana plasmática e o citoesqueleto e que conferem a esses domínios de membrana a característica de ponto de adesão e controle da dinâmica do citoesqueleto (Allen *et al.*, 2007; Head *et al.*, 2014; Hong *et al.*, 2012; Levitan e Gooch, 2007). Estudos mostraram que o colesterol tem função regulatória sobre estes componentes.

PIP2 é um dos componentes lipídicos da membrana plasmática conhecido por sua função de regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e por ser um ponto de ancoragem do citoesqueleto à membrana (Levitan e Gooch, 2007). Estudos demonstraram que a desorganização das balsas de membrana pela depleção de colesterol leva a uma redução dos níveis de PIP2, o qual leva a mudanças no citoesqueleto cortical de actina (Pike e Miller, 1998).

Hong e cols. (2012) observaram que a depleção de colesterol por M β CD em células endoteliais da aorta bovina (BAECS) seguida da adição de PIP2 exógeno alterava a distribuição de PIP2 na membrana para um padrão mais uniforme ao longo da membrana das células e aumentava a força de adesão entre membrana e citoesqueleto. A alteração direta dos níveis de PIP2 não resultou em nenhum efeito

na adesão membrana-citoesqueleto, indicando que o papel de PIP2 nesta interação é regulada pelo colesterol da membrana plasmática.

Kwik e cols. (2003) mostraram que, em função da redução de PIP2, a depleção de colesterol leva à diminuição da movimentação de proteínas pela membrana. Os autores avaliaram a difusão lateral de moléculas HLA em fibroblastos após a depleção de colesterol induzida pelo tratamento com M β CD. Além disso, eles observaram uma redução da fração móvel das moléculas HLA em relação ao controle, observada também quando o PIP2 foi depletado pela ação de neomicina. A combinação dos tratamentos não ocasionou nenhum aumento dos efeitos de redução da difusão lateral das proteínas em comparação com os tratamentos isolados, sugerindo a importância do colesterol na regulação dos componentes das balsas de membrana.

Não apenas o papel do colesterol sobre a regulação de PIP2 e da movimentação de proteínas da membrana plasmática foi evidenciado. Membros da família Rho-GTPases também participam da organização do citoesqueleto cortical de actina através da indução de fibras de estresse (Levitan e Gooch, 2007). Qi e cols. (2009) avaliaram o efeito do tratamento de células MC3T3 com M β CD na ativação de Rho A. Os autores observaram que a depleção de colesterol decorrente do tratamento levava a um aumento substancial da ativação de Rho-A após 30 minutos de tratamento e esta ativação continuava a aumentar até 60 minutos de incubação com M β CD. O efector *downstream* de Rho-A, Rho-cinase também foi ativado pelo tratamento e sua inibição previne a formação de fibras de estresse nas células tratadas.

Uma vez que os microdomínios de colesterol concentram lipídeos e proteínas envolvidos com a organização, modulação e metabolismo do citoesqueleto de actina, vários autores investigaram a participação destas regiões na dinâmica da mecânica celular. Estes estudos mostraram os efeitos do sequestro de colesterol da membrana plasmática sobre a modulação mecânica de diferentes tipos celulares através do tratamento destas células com M β CD.

Kwik e cols. (2003) observaram que o tratamento agudo com M β CD em fibroblastos causava mudanças na organização e atividade de actina e em proteínas modificadoras de actina. Os autores encontraram uma maior instabilidade na actina citoplasmática em comparação com as células controle não tratadas e um aumento

de fibras na região cortical das células. Também foram observados numerosos pontos de polimerização de actina nas células tratadas e o desenvolvimento de microprojeções do citoesqueleto. Corroborando com estes achados, Hissa e cols. (2013) demonstraram que o sequestro de colesterol alterava a organização do citoesqueleto de actina de fibroblastos via ativação de Rho-A, caracterizado pelo aumento de fibras de estresse em comparação à células não tratadas. Este aumento do número de fibras de estresse induzido pela depleção de colesterol foi justificado tanto pela reorganização dos filamentos pré-existentes quanto pela polimerização de novos filamentos de actina (Hissa *et al.*, 2013).

Juntamente com a reorganização do citoesqueleto, a depleção de colesterol também é capaz de alterar as propriedades mecânicas de diferentes tipos celulares através de modificações na interação membrana-citoesqueleto. Byfield e cols. (2004) observaram que a diminuição do conteúdo de colesterol da membrana de células endoteliais da aorta bovina, pela ação de M β CD, resultava no aumento da rigidez da membrana. Quando o colesterol foi repostado, as propriedades elásticas da membrana foram completamente recuperadas. Os autores ainda mostraram que o tratamento destas células com Latrunculina-A (Lat-A), uma droga que rompe o citoesqueleto de actina, suprimiu os efeitos da depleção de colesterol, sugerindo que o efeito sobre a rigidez celular é dependente da integridade das fibras de actina. Estes resultados indicavam que o aumento da rigidez celular observado era decorrente de mudanças nas propriedades do citoesqueleto e de sua interação com a membrana.

O mesmo efeito do sequestro de colesterol sobre a rigidez da membrana foi observado em fibroblastos. O tratamento com M β CD alterou a tensão superficial e o módulo elástico destas células. A avaliação da modulação mecânica durante o tratamento com a droga mostrou um aumento no tempo de relaxação e na amplitude de flutuação da membrana entre 10-30 minutos após a adição da droga. Estes resultados indicaram que a extração de colesterol da membrana destas células as torna mais rígidas em relação às células controle não tratadas (Hissa *et al.*, 2013).

Como a interação membrana-citoesqueleto tem um papel essencial no desempenho de diversas funções, é importante entender o papel do conteúdo de colesterol da membrana e, principalmente, das balsas de membrana na dinâmica desta interação e como estes efeitos podem interferir em outros processos celulares.

1.3. *Microdomínios ricos em colesterol, citoesqueleto e exocitose de vesículas*

Já havia sido demonstrado na literatura que o citoesqueleto cortical de actina poderia funcionar como uma barreira para a exocitose de vesículas ou facilitar a exocitose de lisossomos pré-existentes próximos à membrana plasmática (Aunis e Bader, 1988; Muallen *et al.*, 1995; Nakata e Hirokawa, 1992; Pendleton e Koffer, 2001; Miklavc *et al.* 2009).

Em 1988, Aunis e Bader já evidenciavam a existência de dois pools de vesículas de secreção em células secretórias. Um primeiro pool de vesículas localizado logo abaixo da membrana plasmática, no qual sua secreção não era regulada pelo citoesqueleto, mas mesmo assim se mantinha na membrana plasmática pela ligação com elementos do citoesqueleto; e um segundo pool ligado aos filamentos de actina, um pouco mais afastado da membrana, mas que poderia ser mobilizado quando o primeiro pool fosse esgotado. Este segundo pool de vesículas secretórias era exocitado após uma despolarização da membrana, fazendo com que estas vesículas se desprendessem dos citoesqueleto. Ao mesmo tempo, os filamentos de actina se reorganizavam, levando a dissolução da barreira do citoesqueleto, e estas vesículas tinham então acesso aos sítios de exocitose.

Koseoglu e cols. (2011) também demonstraram a existência de diferentes pools de vesículas secretórias e a influência do conteúdo de colesterol da membrana na exocitose destas vesículas. Os autores observaram que não houve diferença na cinética e na quantidade da liberação do primeiro pool de vesículas, que já se encontrava pré-ancorado à membrana plasmática, em células cromafins da medula suprarrenal após depleção de colesterol. No entanto, a liberação subsequente das demais vesículas, pertencentes ao pool de liberação lenta ou ao pool de reserva, foi comprometida pela alteração nos níveis de colesterol da membrana.

Considerando a existência de diferentes pools de vesículas e o efeito da organização do citoesqueleto nos processos de fusão de membranas e na secreção celular, pode se inferir que os microdomínios de membrana ricos em colesterol tenham um papel importante na regulação destes processos, em especial na exocitose de lisossomos.

Chen e cols. (2010) observaram um aumento significativo da secreção lisossomal, através da medida da atividade de β -hexosaminidase no sobrenadante de células após 30 minutos de tratamento com M β CD. A secreção observada não foi decorrente de lise celular já que não houve alteração nos níveis de lactato desidrogenase. Os autores ainda demonstraram que o tratamento com β -ciclodextrina também estimulou a secreção de flotilina 2 dependente de cálcio, proteína associada às balsas de membrana e aos endolisossomos, indicando que a depleção de colesterol induz, de maneira dependente de cálcio intracelular, uma rápida secreção de lisossomos.

Nosso grupo também demonstrou um efeito semelhante em outros tipos celulares. Hissa e cols. (2012) observaram que o tratamento de cardiomiócitos com M β CD induziu um aumento de 3,5 vezes na frequência de exocitose de lisossomos logo nos primeiros 10 minutos de sequestro de colesterol em relação às células não tratadas. Além disso, o tratamento com a droga altera a dispersão lisossomal de modo que as células tratadas com M β CD apresentavam uma distribuição mais restrita de lisossomos mais próxima ao núcleo celular em comparação com o grupo controle ou tratados com H γ CD, um análogo inativo de M β CD. A reposição de colesterol foi capaz de reverter esta redistribuição, mostrando que este é mesmo um efeito da remoção do colesterol da membrana plasmática (Hissa *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudando o efeito do sequestro de colesterol em fibroblastos, foi observado que as alterações no citoesqueleto parecem ser responsáveis pela exocitose do pool periférico de lisossomos, induzida pela depleção de colesterol (Hissa *et al.*, 2013). Ainda, a análise da secreção e distribuição de lisossomos após tratamento com Lat-A, M β CD ou com a combinação destas duas drogas, indicou que há, provavelmente, pelo menos dois diferentes pools de lisossomos. Neste estudo, fibroblastos tratados com M β CD apresentavam um aumento na secreção lisossomal e uma distribuição de lisossomos mais próxima ao núcleo em relação às células não tratadas, assim como já havia sido mostrado em cardiomiócitos (Hissa *et al.*, 2012). Entretanto, quando estas células foram tratadas com Lat-A previamente ao sequestro de colesterol, foi observado não só um aumento da exocitose lisossomal, superior àquele observado para o tratamento apenas com M β CD, mas também uma distribuição de lisossomos ainda mais próxima ao núcleo (Hissa *et al.*, 2013).

Como mencionado nos itens anteriores, além das moléculas reguladoras da interação membrana-citoesqueleto, as balsas de membrana também concentram as proteínas do complexo SNARE, responsáveis pela regulação da exocitose de vesículas. Desta forma, alterações no conteúdo de colesterol da membrana plasmática ou na organização das balsas poderiam também estar interferindo no processo de fusão de vesículas exocíticas com a membrana plasmática (Murray e Tamm, 2010).

Koseoglu e cols. (2011) sugerem que o pool de vesículas pré-ancorados à membrana sofra menos influência das alterações dos níveis de colesterol já que a função das proteínas SNARE já foi efetuada, enquanto que as demais vesículas, que ainda precisam ser mobilizadas e ancoradas aos sítios de exocitose, tem sua cinética e quantidade de exocitose comprometidas pela diminuição dos níveis de colesterol na membrana. Os autores sugerem ainda que a mudança na polimerização dos filamentos de actina induzida pela depleção de colesterol poderia estar comprometendo a mobilização das vesículas de liberação lenta ou de reserva.

De fato, ambas as evidências sobre a participação do citoesqueleto cortical de actina e das proteínas SNARE parecem ser válidas, já que o pool de vesículas lisossomais pré-ancorados à membrana plasmática é excitado à medida que o citoesqueleto de actina é reorganizado e os eventos de exocitose seguintes são diminuídos, provavelmente porque o citoesqueleto reorganizado e a polimerização de novos filamentos de actina possam funcionar como uma barreira para que novos tráfegos aconteçam a partir do pool de vesículas distribuído na região perinuclear.

Juntos, estes resultados demonstram que a modulação mecânica induzida pela depleção de colesterol pode exercer algum efeito sobre o tráfego de vesículas exocíticas e, possivelmente endocíticas, tendo um papel importante na regulação dos mecanismos envolvidos no reparo da membrana celular.

1.4. Mecanismos de reparo de membrana

O reparo de membrana é um evento rápido que acontece dentro de poucos segundos após uma injúria e, portanto, é um processo essencial para a sobrevivência da célula.

Estudos anteriores mostraram que, quando uma célula sofre uma injúria, um importante evento de exocitose de lisossomos é desencadeado para que o reparo da membrana aconteça. Este é um evento dependente de Ca^{2+} extracelular, de modo que o seu influxo pelo sítio da lesão induz a exocitose local de lisossomos (Reddy *et al.*, 2001; McNeil, 2002; McNeil *et al.*, 2003). No entanto, não se sabia qual o exato mecanismo pelo qual esta exocitose de lisossomos promovia o reparo da membrana celular.

Idone e cols. (2008) observaram um evento subsequente à exocitose, induzida pelo influxo de Ca^{2+} , capaz de internalizar poros transmembrana. Foi observado um evento de endocitose compensatória segundos após a realização da injúria por Streptolisina O (SLO), uma toxina formadora de poro. A mesma sequência de eventos foi observada após uma injúria mecânica. Em seguida, foi sugerido um papel importante dos domínios de membrana ricos em colesterol neste mecanismo de endocitose. Para isto, foi avaliado o efeito agudo da depleção de colesterol nos eventos de endocitose compensatória e observou-se um efeito inibitório, dose dependente, da depleção de colesterol nos eventos de endocitose compensatória, mostrando a ligação entre estes eventos e o reparo de membrana. Além disso, os autores demonstraram que a endocitose compensatória era facilitada após o tratamento com drogas que interferiam negativamente na organização do citoesqueleto de actina, como a Citocalasina D e a Latrunculina-A.

Para mostrar a relação entre os eventos de exocitose lisossomal e a endocitose compensatória, Tam e cols. (2010) avaliaram o número de novos endossomos formados após a formação de poro com SLO, em células previamente tratadas com Bromoenol Lactane, uma droga capaz de bloquear a exocitose de lisossomos. Foi observada uma diminuição de 10 vezes no número de novos endossomos e uma redução na capacidade dessas células tratadas em reparar sua membrana. Adicionalmente, demonstrou-se que células injuriadas secretam no meio extracelular a enzima esfingomielinase ácida (ASM), que cliva a esfingomielina, presente na membrana plasmática, transformando-a em ceramida e gerando domínios ricos em ceramida. Esses domínios, por sua vez, parecem ser capazes de promover uma invaginação da membrana e em seguida a formação de vesículas, num processo denominado de endocitose compensatória. O importante papel desta enzima no

reparo de membrana foi confirmado através de ensaios de inibição de sua atividade, os quais levaram ao comprometimento da endocitose compensatória e, conseqüentemente, do reparo de células após injúria, sem comprometer a capacidade exocítica da célula (Tam *et al.*, 2010).

De acordo com os achados descritos acima, um modelo de reparo da membrana plasmática mediado pela secreção lisossomal de ASM foi elaborado. Neste modelo, quando uma célula sofre uma injúria, ocorre um influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o citoplasma através dos sítios de lesão. O aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular induz a exocitose de lisossomos. A enzima lisossomal ASM é então liberada na camada externa da membrana plasmática, onde converte a esfingomielina em ceramida. A ceramida tende a se associar em microdomínios que brotam para o citoplasma da célula, gerando endossomos que internalizam as lesões e reparam a membrana (Tam *et al.*, 2010).

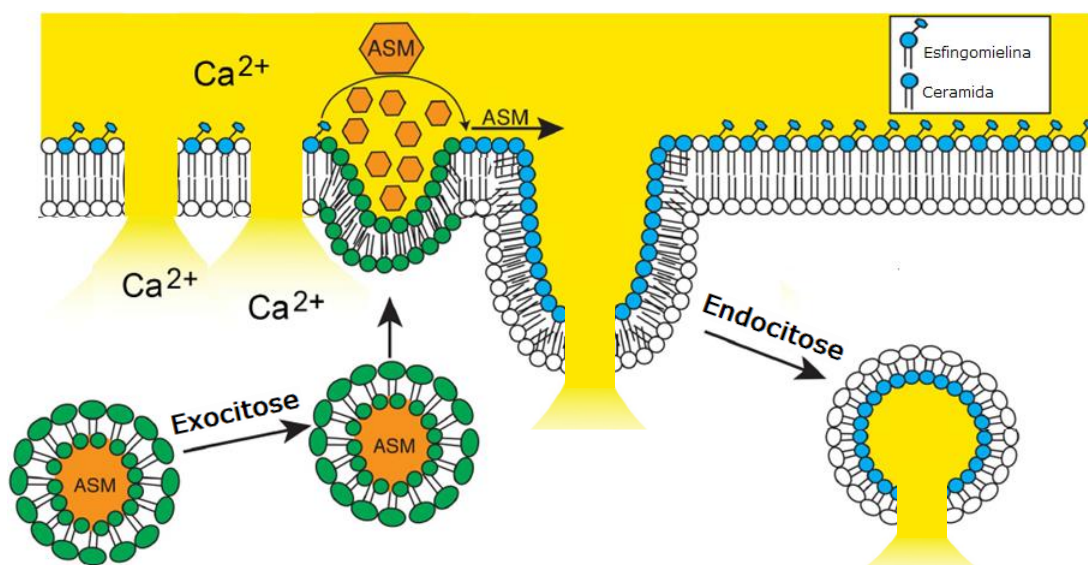


Figura 1: Modelo adaptado do mecanismo de reparo de membrana mediado pela secreção lisossomal de ASM proposto por Tam e colaboradores (2010).

1.5. Colesterol, disfunção endotelial e seu papel na aterogênese

A aterogênese é um processo degenerativo que envolve diversas lesões na parede arterial. A parede das artérias é composta por três diferentes camadas ou túnicas. A camada mais externa do vaso sanguíneo, a túnica adventícia, é composta

por tecido conjuntivo. A camada média, ou túnica média, é composta por células musculares lisas dispostas circularmente e quantidades variáveis de fibras elásticas. Mais internamente está a túnica íntima, constituída pelo endotélio, pela camada subendotelial formada por tecido conjuntivo frouxo e pela lâmina elástica (Alberts, 2002; Van de Graaff, 2001). Este endotélio que recobre a parede interna é responsável por regular a troca de substâncias, assim como de células do sangue, entre a corrente sanguínea e os tecidos circundantes. Em condições normais, as células endoteliais impedem a transmigração de células do sangue para o interior dos tecidos. No entanto, em condições de estresse, como dislipidemia, hipertensão ou fatores pró-inflamatórios, estas células aumentam sua permeabilidade, promovendo a transmigração de células inflamatórias e o acúmulo de lipídeos na parede vascular (Libby *et al.* 2011). Este processo inflamatório progressivo gera então a formação da placa aterosclerótica, caracterizada pelo espessamento da íntima vascular, com acúmulo de componentes extracelulares, infiltrado de células inflamatórias e proliferação descontrolada das células musculares lisas (De Flora *et al.*, 1997). A placa pode gerar ainda a formação de trombos, os quais estão envolvidos com o comprometimento do fluxo sanguíneo e geração de acidentes vasculares ou trombozes. Dessa forma, modificações na superfície interna do vaso, ou seja, no endotélio, são o ponto chave para o desenvolvimento da aterosclerose.

Alta concentração de colesterol e gorduras no sangue, obesidade, hipertensão e tabagismo são quatro dos principais fatores de risco ligados ao desenvolvimento da aterosclerose (Criqui, 1986; Rodriguez-Flores *et al.*, 2013). No Brasil, a aterosclerose é a principal responsável pela ocorrência de doenças cardiovasculares e, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares são a principal causa de morte no mundo, sendo que três quartos dessas mortes acontecem em países subdesenvolvidos ou naqueles países em desenvolvimento (WHO, 2015).

A manutenção de um endotélio sadio tem, portanto, uma importância fundamental na homeostase, principalmente em relação à alteração da permeabilidade da camada endotelial (Carvalho, 2001). Sabe-se que o acúmulo subendotelial de lipoproteínas de baixa densidade em seu estado nativo (LDL) e sua posterior modificação oxidativa (oxLDL) tem papel crítico nas fases iniciais do

desenvolvimento da aterosclerose através da indução da disfunção endotelial (Pirillo *et al.* 2013; Berliner e Watson 2005, Steinberg 2009, Steinberg e Witztum 2010).

As partículas de lipoproteínas são formadas por uma porção central apolar, constituída principalmente por colesterol éster e triglicerídeos, circundada por uma camada contendo fosfolipídeos, uma pequena quantidade de colesterol não esterificado e apoproteínas (Walker *et al.*, 1990). Foi demonstrado que a LDL pode ser modificada e sua aterogenicidade parece ser atribuída a estas modificações. As modificações parecem ocorrer através das interações entre a lipoproteína e as células da parede dos vasos sanguíneos, células sanguíneas, constituintes do plasma e componentes da matriz da parede dos vasos. Essas modificações encontradas nas partículas de LDL envolvem desde a mudança na composição de lipídios até mudanças na sua conformação e na agregação das partículas (Aviram, 1993). A modificação oxidativa de LDL (oxLDL) é acompanhada por diversas alterações estruturais e em sua composição que resultam em numerosas mudanças em suas propriedades físicas, as quais tem importância patogênica, incluindo o recrutamento acelerado de macrófagos, citotoxicidade e atividade quimiotática para monócitos (Steinbrecher, Zhang, & Lougheed, 1990).

Foi demonstrado que culturas de células endoteliais expostas à oxLDL e submetidas à injúria eram menos eficientes na recomposição em comparação com células controle não tratadas (Liao e Granger, 1995) o que também contribuiria para uma maior permeabilidade dos vasos e para a formação da placa do ateroma. A razão para esta alteração na viabilidade e recomposição celular, no entanto, ainda não é totalmente conhecida.

Além do aumento da permeabilidade vascular, estudos mais recentes tem demonstrado que a exposição de células endoteliais à oxLDL em cultura altera substancialmente propriedades biomecânicas destas células. Sabe-se que células tratadas com oxLDL modificam a organização de seu citoesqueleto e se tornam mais rígidas (Byfield *et al.*, 2006; Chouinard *et al.*, 2008; Kowalsky *et al.*, 2008). Este processo ocorre à semelhança do que acontece quando o conteúdo de colesterol de membrana é depletado pela ação de M β CD (Byfield *et al.* 2004, Hissa *et al.* 2012). Apesar de a exposição à oxLDL não promover mudanças significativas no conteúdo de colesterol da membrana, parece que as pequenas alterações no conteúdo de

colesterol das balsas lipídicas, ocasionadas por esta exposição, podem estar afetando a organização dos lipídios nestes domínios e, conseqüentemente, as propriedades biofísicas da célula endotelial (Shentu *et al.*, 2010).

Sabe-se que o endotélio dos vasos tem a propriedade de se realinhar, reorganizando seu citoesqueleto de actina, para se adaptar ao fluxo sanguíneo, distribuindo as forças hemodinâmicas e conseqüentemente facilitando a integridade do endotélio (Liao e Granger, 1995). Dessa forma, acreditava-se que a maior rigidez das células, ocasionadas pela presença de uma maior quantidade de fibras de estresse, em resposta a exposição à oxLDL, poderia significar uma maior resistência em relação ao fluxo sanguíneo e conseqüentemente uma maior propensão à injúria. No entanto, foi demonstrado que células endoteliais expostas à oxLDL são mais responsivas ao realinhamento em relação ao fluxo do que células não tratadas, o que seria a princípio favorável à sua manutenção (Kowalsky *et al.*, 2008). O mecanismo pelo qual oxLDL afeta a reorganização do citoesqueleto destas células, em relação ao fluxo, ainda não é conhecido, mas já se sabe que o efeito advém dos oxisteróis presentes nestas moléculas. Dependendo da quantidade e do tipo destes oxisteróis, os efeitos podem ser mais ou menos acentuados (Shentu *et al.*, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

A célula endotelial está sob constante estresse mecânico devido ao ambiente hemodinâmico ao qual está inserida. Para isso, diversos mecanismos são necessários para a manutenção da integridade do endotélio como o realinhamento em relação ao fluxo e mecanismos de reparo de membrana celular pós-injúria.

O reparo de membrana envolve uma sequência de mecanismos dependentes de Ca^{2+} , incluindo a exocitose de lisossomos e subsequente endocitose compensatória. No entanto, os mecanismos reguladores deste processo ainda não estão totalmente esclarecidos. Quando uma célula sofre uma micro injúria, sua membrana deve ser selada, caso contrário pode comprometer a viabilidade celular. Com a injúria, ocorre um influxo de Ca^{2+} que induz a fusão de vesículas lisossomais com a membrana plasmática da célula (Reddy et al. 2001). Este processo acarreta a adição de membrana à superfície celular, que é acompanhado da hidrólise da esfingomielina, o principal esfingolípido presente na membrana celular (Idone *et al.* 2008). A hidrólise de esfingomielina, por sua vez, gera a produção de ceramida que se agregam formando microdomínios ricos em ceramida e levam à invaginação desta porção da membrana e conseqüente formação de novas vesículas intracelulares. As vesículas endocíticas recém-formadas carregam com elas a porção da membrana contendo a injúria e promovem a recuperação da membrana original (Andrews *et al.*, 2014; Idone *et al.* 2008).

Foi demonstrado que o processo de endocitose compensatória pós-injúria pode ser afetado pela depleção de colesterol através da diminuição da formação de novas vesículas intracelulares e inibição do reparo de membrana, sugerindo a ligação direta entre a endocitose induzida por injúria e o reparo de membrana e ainda o papel do colesterol e das balsas lipídicas nos mecanismos de endocitose compensatória (Idone *et al.*, 2008).

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que o sequestro do colesterol de membrana celular por tratamento com M β CD leva à uma exocitose desregulada de lisossomos localizados na periferia celular (Hissa *et al.*, 2012). Posteriormente, foi demonstrado que esta exocitose lisossomal é decorrente das alterações na polimerização e reorganização do citoesqueleto celular de actina, as quais se refletem

em alterações nas propriedades biomecânicas da célula (Hissa *et al.*, 2013). Esta nova adição de membrana durante o processo de reorganização do citoesqueleto certamente reflete uma resposta celular ao meio externo e pode explicar a observação prévia de maior alinhamento das células endoteliais em relação ao fluxo.

Por outro lado, é possível que a formação de um citoesqueleto mais rígido e organizado próximo à superfície celular funcione como uma barreira para novos tráfegos de membranas entre a superfície celular e vesículas intracelulares, interferindo na manutenção da integridade celular. Células estão continuamente expostas à microinjúrias, principalmente aquelas sujeitas à estresse mecânico, como é o caso de células endoteliais. Dessa forma, o tráfego de vesículas entre a membrana plasmática e o interior celular é imprescindível para a manutenção da integridade celular em situações de estresse mecânico. Alterações nas propriedades biomecânicas poderiam comprometer a capacidade de reparo de membrana destas células e, dessa forma, contribuir para a fragilidade do endotélio vascular.

As alterações biomecânicas decorrentes da depleção de colesterol são semelhantes às aquelas observadas após o tratamento de células endoteliais com oxLDL. Estudos sugerem que esta similaridade dos efeitos de oxLDL e de M β CD não ocorra devido à depleção do conteúdo de colesterol da membrana, mas sim devido à diminuição da organização de lipídeos nos domínios de membrana ricos em colesterol (Shentu *et al.*, 2010). Neste sentido, buscamos primeiramente investigar, em um ambiente de depleção de colesterol, como a modulação mecânica pode interferir nos mecanismos de reparo de membrana, e posteriormente correlacionar com o modelo de aterosclerose, através do tratamento das células com oxLDL, para compreender os efeitos dessas alterações biomecânicas em células endoteliais no processo de formação da placa aterosclerótica.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Estudo da modulação mecânica induzida pelo tratamento de células endoteliais com M β CD nos processos de exocitose lisossomal e de endocitose compensatória, visando compreender o efeito da depleção do conteúdo de colesterol da membrana plasmática nos mecanismos de reparo celular.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Avaliar a resposta ao tratamento com M β CD na organização estrutural do citoesqueleto de células endoteliais;
- 3.2.2. Avaliar as mudanças nas propriedades mecânicas de células endoteliais durante o tratamento com M β CD;
- 3.2.3. Avaliar o efeito da depleção de colesterol induzida por M β CD na exocitose de vesículas lisossomais;
- 3.2.4. Avaliar o efeito da depleção de colesterol sobre os processos de endocitose constitutiva e endocitose compensatória pós-injúria;
- 3.2.5. Avaliar o efeito deste tratamento na capacidade de reparo dessas células submetidas à injúria mecânica, e seu conseqüente comprometimento da viabilidade celular.

4 METODOLOGIA

4.1. *Cultura celular*

Todos os experimentos foram realizados utilizando a linhagem de células (EAhY926) derivadas de células endoteliais do cordão umbilical humano (HUVEC).

As células foram mantidas em cultura em *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM; Gibco) contendo 10% soro fetal bovino (SFB; Gibco) e 1% penicilina-estreptomicina (Gibco) (DMEM 10%) em uma incubadora a 37°C, com 5% CO₂, e repicadas a cada 2-3 dias, após atingirem uma confluência de 80 a 90%.

4.2. *Depleção de colesterol*

Para a depleção de colesterol, as células endoteliais (ECs) foram lavadas 3 vezes com DMEM sem SFB e incubadas com uma conhecida droga sequestradora de colesterol, *methyl-beta cyclodextrin* (M β CD; Sigma-Aldrich) 5mM, diluída em DMEM sem soro por 40 minutos à 37°C. O plaqueamento e a proporção de células variaram de acordo com o ensaio desejado e será descrito nos respectivos itens. Em alguns ensaios, como controle negativo, as células foram incubadas com o análogo inativo, *hydroxypropyl-gamma cyclodextrin* (H γ CD; Sigma-Aldrich) 5mM, nas mesmas condições.

4.3. *Avaliação do citoesqueleto de actina*

As células endoteliais foram plaqueadas 24 horas antes do experimento sobre lamínulas de vidro de 13mm, na proporção de 5x10⁴ células por poço, em placa de 24 poços, mantidas em DMEM 10% em estufa à 37°C e 5% CO₂. As células foram então lavadas com DMEM sem SFB antes de realizar o tratamento. O tratamento foi realizado através da incubação das células com 5mM de M β CD ou H γ CD diluído em DMEM sem SFB durante 40 minutos em estufa ou com 25 μ g/mL de oxLDL diluído em DMEM sem SFB durante 60 minutos. Após a incubação, o tratamento foi retirado e as células fixadas em paraformaldeído (PFA) 4% a 4°C por pelo menos 1 hora.

Nos experimentos de análise da polimerização *de novo*, as células foram tratada com 95 μ M de Latrunculina-A (LAT-A; Sigma-Aldrich) por 1 hora, seguido pelos diferentes tratamentos.

Após fixadas, as células foram lavadas em *Phosphate Buffered Saline* (PBS) +/+ (com adição de Ca²⁺ e Mg²⁺) e permeabilizadas com Triton x-100 0,1% (Sigma-Aldrich) em PBS +/+ por 5 minutos, seguido por incubação com PBS/BSA 1% por 30 minutos. Para marcação do citoesqueleto de actina, as células foram incubadas com Faloidina-Alexa 546 (Invitrogen) (1:40) em solução de *Bovine Serum Albumin* (BSA) a 1% em PBS+/+ por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas com PBS +/+ em seguida. Para marcação do núcleo, as células foram incubadas com DAPI (4',6'-diamino-2-phenylindole; Invitrogen) (1:1000) em PBS +/+ por 1 minuto e lavadas. As lamínulas foram montadas com solução *anti-fading* (PPD-phenyldiamine) em glicerol e analisadas no microscópio Zeiss Axio Observer com um sistema de iluminação estruturada (ApoTome.2) ou no microscópio confocal Zeiss 510 Meta.

4.4. Análise das mudanças estruturais no conjunto membrana/citoesqueleto através da microscopia de desfocalização

Para medir possíveis mudanças nas curvaturas das células (membrana-citoesqueleto), mediante o tratamento com M β CD, foi utilizada a microscopia de desfocalização (Agero *et al.*, 2004).

Nos experimentos de desfocalização, as células endoteliais foram plaqueadas 24 horas antes, na proporção de 8x10⁴ células por placa em placas de 35mm, contendo fundo de lamínula. 24 horas depois, o meio foi retirado, as células foram lavadas e mantidas em meio DMEM sem SFB. As células foram gravadas por 10 minutos e em seguida, sem parar a gravação, M β CD ou H γ CD foi adicionado às células e a aquisição de imagens foi mantida por mais 40 minutos.

Para a análise das imagens, foram selecionados 4 quadrados, de 50 pixels de lado, ao redor de toda a borda celular. Foram analisadas as imagens a cada 10 minutos, sendo um total de 5 análises por região. Todos os experimentos foram analisados usando um *Plugin* do ImageJ desenvolvido pelos membros do Laboratório de Física Biológica da Universidade Federal de Minas Gerais. Este *Plugin* calcula a correlação temporal dos pixels nos quadrados selecionados. Os valores obtidos foram

levados para o programa KaleidaGraph (Synergy Software, Essex Junction, VT) onde ajustamos os pontos utilizando um função exponencial simples e obtivemos os valores dos tempos de relaxação.

Os experimentos de desfocalização foram realizados em microscópio invertido Nikon Eclipse TI (Nikon), ao qual encontra-se acoplado um filtro verde capaz de absorver comprimentos de onda da luz na faixa de 530nm. Durante os 50 minutos do procedimento, as células ficaram no interior de uma câmara (modelo Chamlide IC-CU:109) (Live Cell Instrument) a qual fornece 5% de CO₂, aquecido à 37°C, e uma umidade de 50%. As imagens foram coletadas com o uso de uma câmera Uniq (modelo 1800 CL) (Epix Inc) com um ganho de 11.04db e uma taxa de captura de 1 frame por segundo. A distância focal foi mantida fixa, com uma desfocalização de 1µm, pelo aparato *Perfect Focus System* (PFS; Nikon), e a calibração dos níveis de cinza da câmera foi feita conforme descrito anteriormente por Agero e cols. (2014).

4.5. *Ensaio de viabilidade celular*

Com as células previamente plaqueadas em placas de 6 poços, foi realizado o tratamento com MβCD ou HγCD (5mM) por 40 minutos. As amostras foram lavadas 2 vezes com PBS -/- (sem adição de Ca²⁺ e Mg²⁺), tripsinizadas por 3 minutos e, em seguida, a tripsina foi inativada. Recolhemos a suspensão de células, centrifugamos e ressuspendemos em uma solução de iodeto de propídio (10µg/mL) diluído em HBSS. As amostras foram mantidas no gelo até serem lidas no citômetro de fluxo. Foi quantificada a fluorescência de iodeto de propídio em 30000 células no citômetro de fluxo FACS Scan (Becton Dickinson), e as análises foram feitas no programa FlowJo (Tree Star).

4.6. *Ensaio de exocitose de lisossomos por espectrofluorimetria para ensaio de atividade de β –hexosaminidase*

A análise da secreção lisossomal foi feita para avaliar o efeito do tratamento de células endoteliais com MβCD, uma droga capaz de sequestrar o colesterol de membrana celular. Para tal experimento, as células endoteliais foram expostas ao tratamento com as ciclodextrinas MβCD e HγCD. Após o tratamento, o sobrenadante

da cultura foi coletado e as células lisadas com 500µl de solução contendo Triton x-100 1% em PBS. Tanto o meio extracelular coletado quanto o lisado celular foram incubados com o substrato modificado da enzima β-hexosaminidase (6 mM de 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide - Sigma- Aldrich), dissolvido em tampão citrato (pH 4.5), por 15 minutos. As reações foram paralisadas com a adição de solução contendo 2,0M de Na₂CO₃-H₂O e 1,1M de glicina. Os produtos da reação foram então lidos em espectrofluorímetro Synergy 2 (365nm/450nm- comprimentos de onda de excitação e de emissão, respectivamente). Os resultados foram expressos como sendo a porcentagem de enzima detectada no sobrenadante com relação à quantidade total de enzima.

4.7. Ensaio de endocitose compensatória para avaliação de reparo de membrana

Para avaliar se o tratamento era capaz de induzir eventos de endocitose compensatória, 2x10⁶ células endoteliais foram mantidas em suspensão. À 4°C, as membranas celulares foram marcadas com um composto fluorescente (aglutinina de germe de trigo conjugada com Alexa Fluor 488 – WGA-Alexa Fluor 488, que se liga à superfície celular) e as células foram lavadas 2 vezes em *Hanks' Balanced Salts Solution* (HBSS; Sigma-Aldrich). Após as lavagens, as células foram expostas ou não ao tratamento com MβCD (5mM) por 10, 20, 30 e 40 minutos à 37°C. Ao fim do tratamento, as células foram ressuspensas em solução de azul de tripan 0,2% (AT; Sigma-Aldrich), um composto incapaz de atravessar a membrana celular e que interage e bloqueia o fluoróforo, lavadas em HBSS e fixadas em formaldeído 4%, seguido da análise por citometria de fluxo.

Para medir o efeito da depleção de colesterol na capacidade de reparo de membrana, as células endoteliais foram plaqueadas em placas de 10cm, na proporção de 2x10⁶ células, 24 horas antes do ensaio. As células foram expostas ao tratamento com MβCD (5mM) em DMEM sem SFB e foram incubados por 10, 20, 30 e 40 minutos em estufa à 37°C e 5% CO₂. Após o tratamento, as membranas celulares foram marcadas com WGA-Alexa Fluor 488 e lavadas em HBSS, à 4°C. Posteriormente, à 37°C, as células foram raspadas da superfície onde estavam aderidas. Esta raspagem das células promove pequenas rupturas na membrana celular. Após a injúria, as

células foram tratadas com solução de AT 0,2%, lavadas em HBSS e fixadas com formaldeído 4%, antes da avaliação por citometria de fluxo.

Como controles, células endoteliais foram incubadas com DMEM sem SFB, contendo H_γCD ou o veículo de diluição das drogas, pelos mesmos tempos de exposição. Para cada tipo de tratamento ou para o controle, o ensaio de endocitose compensatória foi realizado na presença e na ausência de cálcio extracelular, já que este processo envolve mecanismos dependentes de Ca²⁺. Após a passagem pelo citômetro de fluxo, foi avaliado o número de células totais e, dentre elas, o número de células que apresentavam marcação fluorescente, as quais representam células que sofreram injúria e realizaram o reparo. Foi avaliada também a intensidade média de fluorescência referente a cada amostra. A aquisição de células marcadas com WGA-Alexa 488 foi realizada através do citômetro de fluxo FACSScan (Becton Dickinson), e as análises foram feitas no programa FlowJo (Tree Star).

4.8. Ensaio com Iodeto de Propídio para avaliação da capacidade de reparo da membrana celular e controle do nível de injúria mecânica

Para avaliar a capacidade de reparo da membrana celular, usando o Iodeto de Propídio (IP; Sigma-Aldrich), as células EAhy926 foram plaqueadas em placas de 35mm, na proporção de 3x10⁵ células por placa em DMEM 10%, 24 horas antes do ensaio. Após as 24 horas, as células foram lavadas com DMEM sem SFB e submetidas ao tratamento com M β CD (5mM) por 40 minutos. Como controle, as células foram incubadas com DMEM sem SFB contendo ou H_γCD (5mM) ou o veículo da droga.

Posteriormente, as placas foram mantidas a 4°C e lavadas 3 vezes com PBS. Depois da lavagem, 1mL de HBSS contendo Ca²⁺ gelado foi adicionado. Ainda a 4°C, as células foram raspadas da superfície onde estavam aderidas utilizando o *scraper*, ressuspensas gentilmente com uma pipeta e transferidas para o tubo FACS. Os tubos foram então levados para o banho a 37°C por 5 minutos para que as células reparassem, e em seguida foram novamente transferidas para o banho frio e o IP, na concentração de 10 μ g/mL, foi adicionado e incubado por 5 minutos.

Para o controle do nível de injúria causado pelo processo de raspagem das células, as mesmas condições de tratamento foram realizadas, no entanto o IP foi adicionado durante a raspagem. As células foram então ressuspendidas, transferidas para os tubos e levadas para o banho a 37°C por 5 minutos.

As células permaneceram no gelo até que a leitura no citômetro de fluxo fosse efetuada. Foram adquiridos 10000 eventos e toda a população de células foi analisada.

5 RESULTADOS

5.1. A depleção de colesterol induz reorganização e polimerização “de novo” do citoesqueleto de actina

Para analisar se a depleção de colesterol induzida por M β CD ocasionava mudanças na organização estrutural do citoesqueleto de actina das células endoteliais (ECs), células EAhY926 foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro, tratadas com M β CD ou H γ CD por 40 minutos e fixadas em PFA 4% por 1 hora a 4°C. Após a fixação, as células foram permeabilizadas, marcadas com Faloidina-Alexa 546, para visualização do citoesqueleto de actina, e com DAPI, para visualização do núcleo celular. Em seguida, as amostras foram analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss ApoTome ou no microscópio confocal Zeiss 510 Meta utilizando a objetiva de 40x.

Em concordância com os dados encontrados na literatura (Hissa *et al.* 2012), foram observadas modificações significativas na organização estrutural do citoesqueleto de actina, com aumento de fibras de estresse após tratamento com M β CD, demonstrado pelas fibras mais aparentes, principalmente na periferia da célula, quando comparado ao grupo controle que apresenta uma coloração mais uniforme do citoesqueleto (Fig. 2).

Os efeitos da depleção de colesterol sobre o citoesqueleto de actina já são percebidos logo nos primeiros 10 minutos de exposição à M β CD (Fig. 3) e perdura por todo o período de tratamento. Além do aumento de fibras de estresse, com o aumento do tempo de exposição à droga, foi percebida uma alteração no tamanho e no formato das células endoteliais submetidas ao tratamento que passam a apresentar uma redução do seu tamanho e um aspecto mais arredondado quando comparadas às células não tratadas.

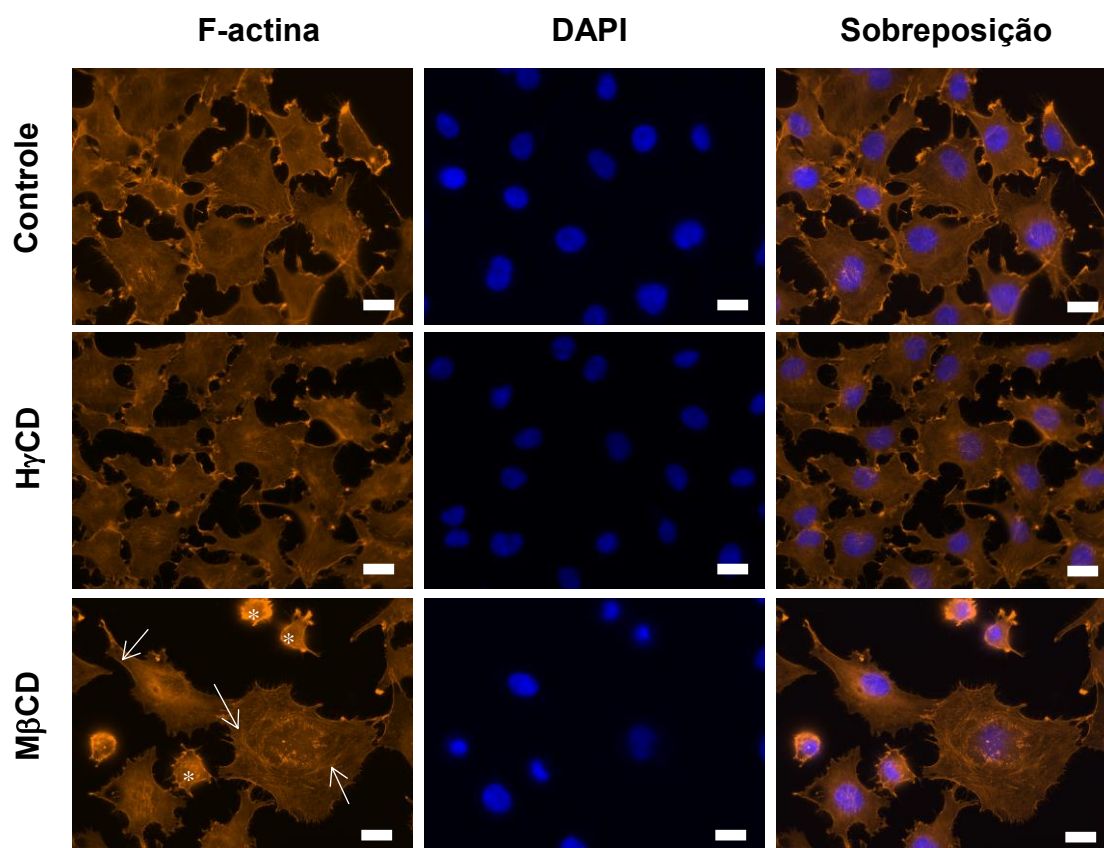


Figura 2: Organização do citoesqueleto de actina de células endoteliais controle ou tratadas com as diferentes drogas. O painel mostra imagens representativas da organização do citoesqueleto de actina de células endoteliais não tratadas ou tratadas com HyCD 5mM ou MβCD 5 mM por 40 minutos à 37°C, fixadas e marcadas com Faloidina-Alexa 546 e DAPI (núcleo celular). As imagens foram analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss ApoTome utilizando a objetiva de 40x e foram selecionados os campos que representassem a morfologia do citoesqueleto de actina mais predominante em cada condição experimental. As setas indicam a presença de fibras de estresse e asteriscos indicam a mudança na morfologia das células. Barra de escala: 20μm.

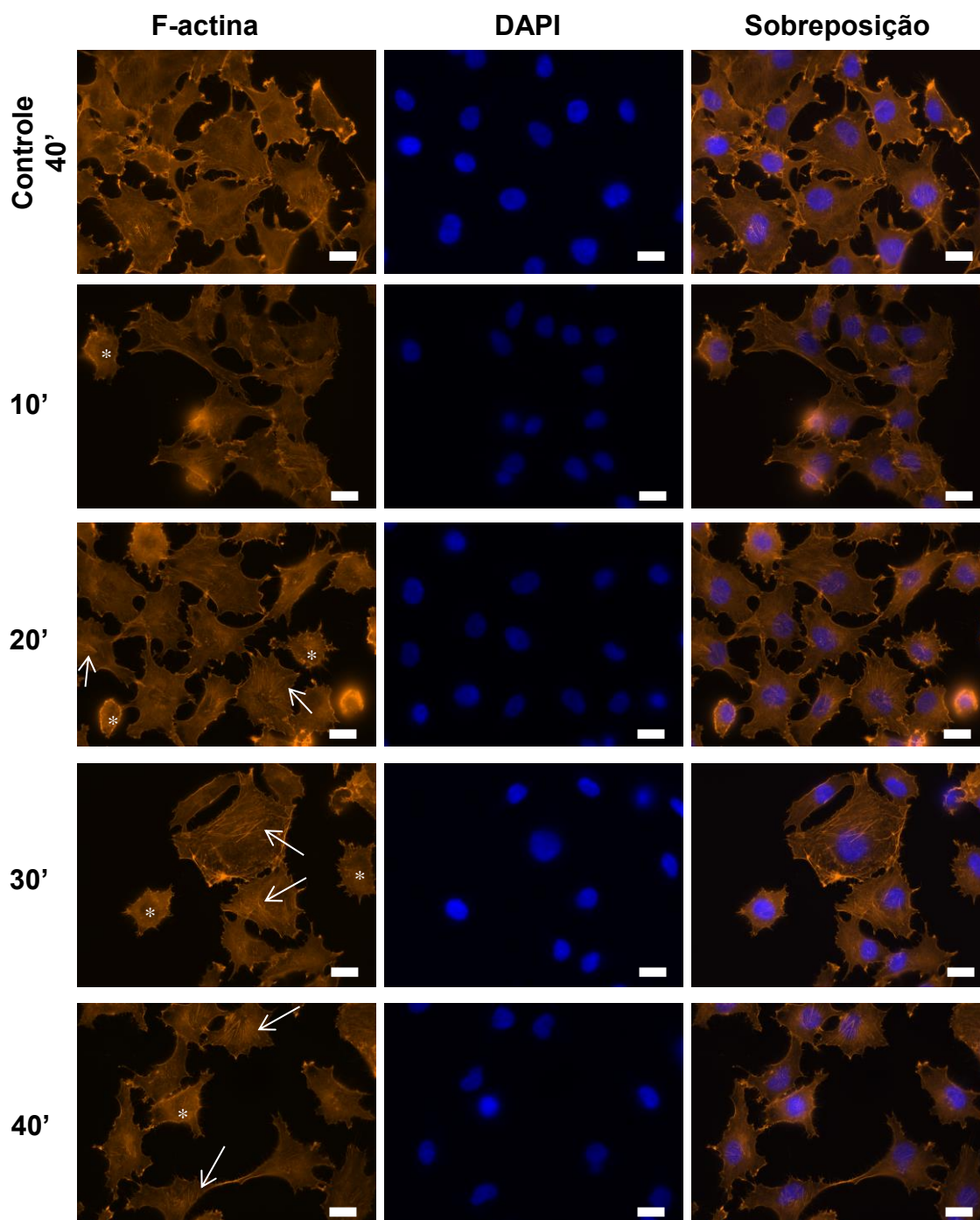


Figura 3: Organização do citoesqueleto de actina de células endoteliais controle ou expostas à M β CD em diferentes tempos. O painel mostra imagens representativas do citoesqueleto de actina de células endoteliais não tratadas ou tratadas com M β CD 5mM por 10, 20, 30 e 40 minutos à 37°C, fixadas e marcadas com Faloidina-Alexa 546 e DAPI (núcleo celular). As imagens foram analisadas no microscópio de fluorescência Zeiss ApoTome utilizando a objetiva de 40x e foram selecionados os campos que representassem a morfologia do citoesqueleto de actina mais predominante em cada condição experimental. As setas indicam a presença de fibras de estresse e asteriscos indicam a mudança na morfologia das células. Barra de escala: 20 μ m.

Além da reorganização estrutural do citoesqueleto resultante da depleção de colesterol, foi avaliada a capacidade destas células em polimerizar novas fibras de actina. Para verificar esta polimerização *de novo*, as células endoteliais foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro e incubadas por 30 minutos com Lat-A, uma toxina que rompe o citoesqueleto de actina através de sua ligação aos monômeros de actina, impedindo que esses se associem aos microfilamentos. Após o rompimento do citoesqueleto, as células foram lavadas com PBS e incubadas com M β CD ou H γ CD diluído em DMEM sem SFB por 40 minutos. Como controle sem tratamento, as células endoteliais, após serem tratadas com Lat-A e lavadas, foram incubadas apenas em DMEM sem SFB por 40 minutos. Posteriormente aos tratamentos, as células foram fixadas em PFA 4%, coradas com Faloidina-Alexa Fluor 546 e DAPI e analisadas no microscópio Zeiss Axio Observer (ApoTome) utilizando a objetiva de 40x.

A figura 4 mostra imagens adquiridas antes e após a depleção de colesterol. É possível notar que após o sequestro de colesterol, houve indução de nova polimerização de fibras de actina, demonstrado pela reconstrução do citoesqueleto após a ação de Lat-A. O mesmo não foi observado para as células que foram incubadas apenas com DMEM sem soro ou para aquelas tratadas com H γ CD.

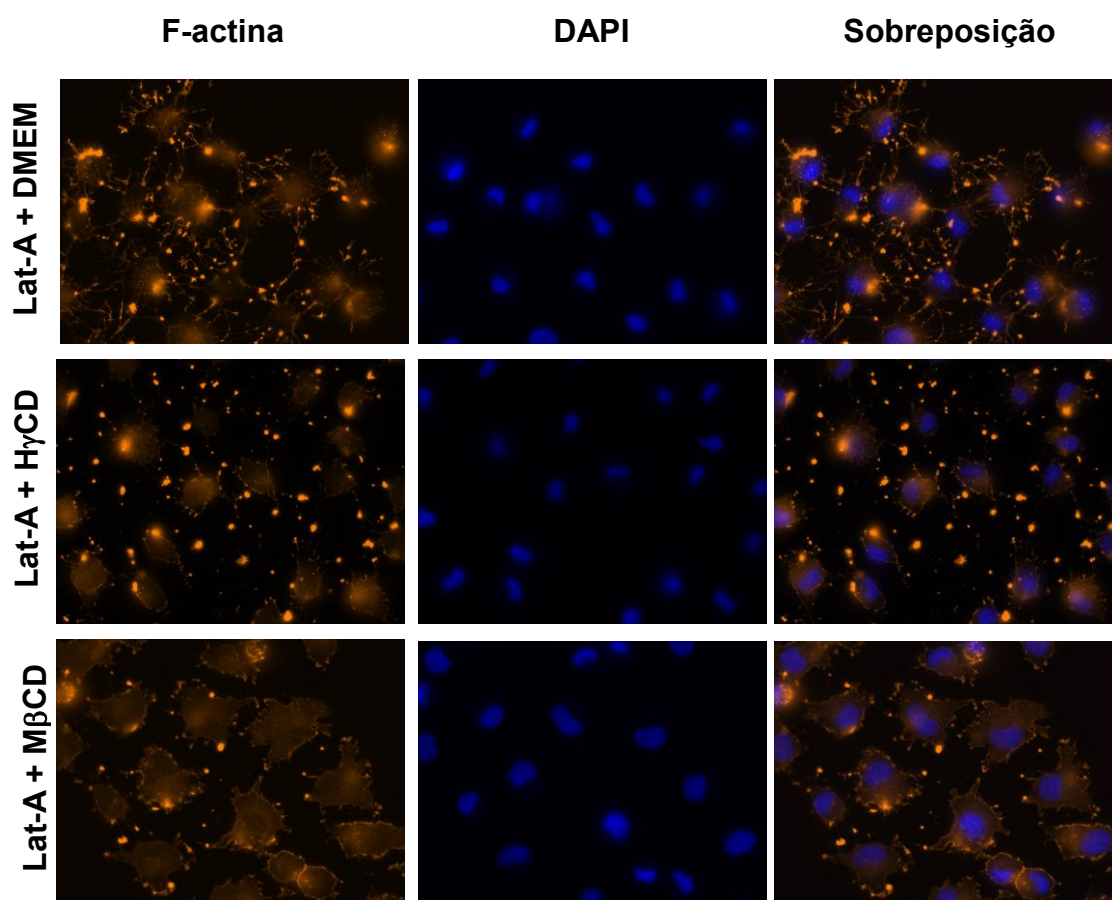


Figura 4: Visualização do citoesqueleto de actina de células endoteliais previamente tratadas com Latrunculina-A, seguidas ou não por tratamento com M β CD ou HyCD. O painel mostra imagens representativas do citoesqueleto de actina de células endoteliais após tratamento com Latrunculina-A seguida da exposição ao meio de cultura sem soro (DMEM), à HyCD ou à M β CD 5mM por 40 minutos à 37°C. As células foram fixadas e marcadas com Faloidina-Alexa 546 e DAPI (núcleo celular). Foram selecionados os campos que representassem a morfologia do citoesqueleto de actina mais predominante em cada condição experimental. As setas indicam o aparecimento de fibras de actina após tratamento com Lat-A. Barra de escala: 20 μ m.

5.2. *Tratamento com oxLDL também induz reorganização e polimerização “de novo” do citoesqueleto de actina*

Como já demonstrado pela literatura (Byfield *et al.* 2004), a exposição das células endoteliais EAhY926 à oxLDL, por 1 hora à 37°C, também induziu a reorganização dos filamentos de actina. A figura 5 mostra a presença de um maior número de fibras de estresse no grupo de células tratadas com oxLDL. Além disso, decidimos averiguar se, também neste caso, o tratamento das células com oxLDL era capaz de reverter o efeito do tratamento prévio com Lat-A. O tratamento com oxLDL (25µg/mL em DMEM sem SFB), por 1 hora, promoveu a reconstrução do citoesqueleto após a ação de Lat-A. Células tratadas com Lat-A e posteriormente incubadas apenas com meio DMEM sem SFB apresentam menor tamanho e encontram-se mais arredondadas. Por outro lado, células tratadas com Lat-A e posteriormente com oxLDL retornam ao tamanho de células não tratadas com Lat-A e é possível perceber uma marcação mais forte do citoesqueleto de actina na periferia celular. Esses resultados mostram um efeito similar entre o tratamento com MβCD e oxLDL.

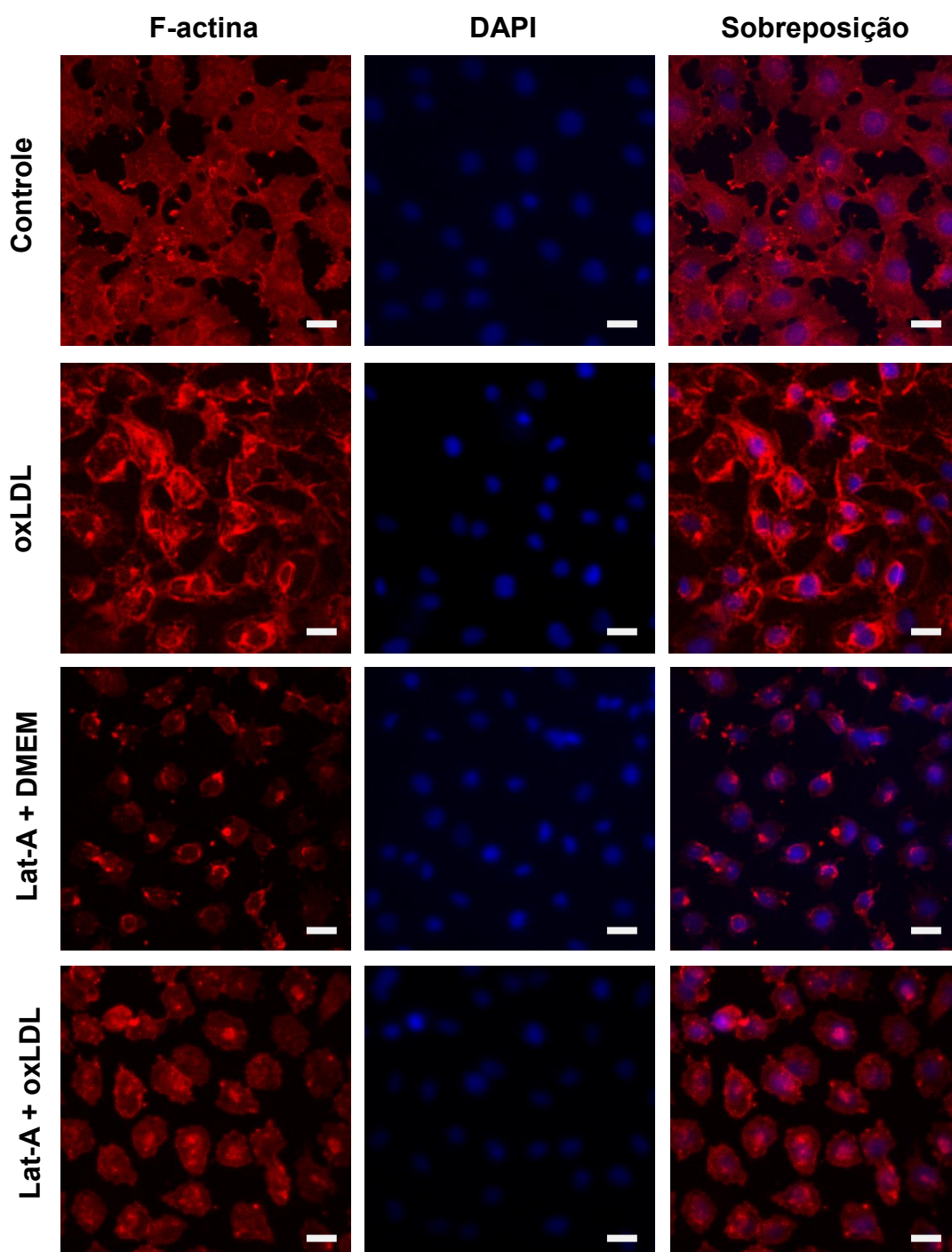


Figura 5: Visualização do citoesqueleto de actina de células endoteliais controle não tratadas ou expostas à oxLDL previamente tratadas ou não com Latrunculina-A. O painel mostra imagens representativas do citoesqueleto de actina de células endoteliais não tratadas (controle) ou tratadas com oxLDL 25µg/mL por 60 minutos à 37°C e de células expostas à oxLDL após o tratamento com Lat-A. As células foram fixadas, marcadas com Faloidina-Alexa 546 e DAPI (núcleo celular) e posteriormente analisadas no microscópio confocal Zeiss 510 Meta utilizando a objetiva de 40x. Foram selecionados os campos que representassem a morfologia do citoesqueleto de actina mais predominante em cada condição experimental. Barra de escala: 20µm.

5.3. O sequestro de colesterol induzido por M β CD altera propriedades mecânicas da célula aumentando sua rigidez

Estudos anteriores demonstraram que a depleção do conteúdo de colesterol da membrana plasmática pela ação de M β CD, uma ciclodextrina com alta afinidade pelo colesterol, altera substancialmente propriedades biomecânicas de diferentes tipos celulares (Byfield *et al.* 2004, Hissa *et al.* 2012). Foi mostrado também que essas modificações ocorrem à semelhança do que acontece com exposição de células endoteliais à LDL oxidada (oxLDL) em cultura (Byfield *et al.*, 2006, Chouinard, *et al.*, 2008, Kowalsky *et al.*, 2008).

Na maioria destes estudos foi avaliado o efeito após o tratamento com esses compostos. Neste trabalho, decidimos avaliar o efeito na biomecânica de células endoteliais durante o tratamento com estes compostos. Para isso, utilizamos a técnica de microscopia de desfocalização (MD). A MD permite a mensuração de mudanças nas curvaturas da membrana celular em tempo real, considerando a interação entre a membrana celular e o citoesqueleto. Para isso, células endoteliais foram tratadas com M β CD, bem como com o análogo inativo desta droga, H γ CD.

Neste experimento, as células endoteliais EAhY926 foram plaqueadas em placas de cultura com fundo de lamínula, 24 horas antes do início do experimento. Para o ensaio de MD, as células foram incubadas em meio DMEM sem SFB, e colocada sobre um microscópio de luz invertido, contendo uma platina acoplada a uma câmara de CO₂, para serem gravadas durante 50 minutos. Após os primeiros 10 minutos de gravação (controle sem tratamento), as células foram submetidas ao tratamento com as diferentes drogas e avaliadas por mais 40 minutos.

A análise das células tratadas com M β CD confirmou os dados da literatura, mostrando que o sequestro de colesterol da membrana plasmática, através do tratamento com M β CD, altera as propriedades mecânicas das células endoteliais aumentando sua rigidez. Este dado pode ser observado pela análise da função de correlação temporal e aumento do tempo de relaxação da membrana (Fig. 6 A-F). Adicionalmente, pudemos observar que, como já demonstrado para cardiomiócitos e fibroblastos (Hissa *et al.*, 2013), o aumento do tempo de relaxação da membrana já pode ser visto nos primeiros 10 minutos (Fig. 6 C) após a adição da droga, sendo

mantido até os 30 minutos pós-droga. Entre 30 e 40 minutos, no entanto, foi observado uma diminuição deste tempo de relaxação, sugerindo que a célula se recupera, ao menos parcialmente, dos efeitos do tratamento (Fig. 6 F).

Quanto ao tratamento com a droga controle, H_γCD (Fig. 7), foi observada uma diminuição do tempo de relaxação nos primeiros 10 minutos e nos demais tempos se manteve semelhante ao controle. A ausência de um aumento da rigidez após tratamento com H_γCD, corrobora os resultados previamente apresentados, onde o tratamento com esta droga não foi capaz de induzir a formação de mais fibras de estresse. Adicionalmente estes dados reforçam que o efeito observado por tratamento com M β CD sobre estas células, realmente se deve ao sequestro do colesterol, como já descrito para outros tipos celulares (Hissa *et al.*, 2013).

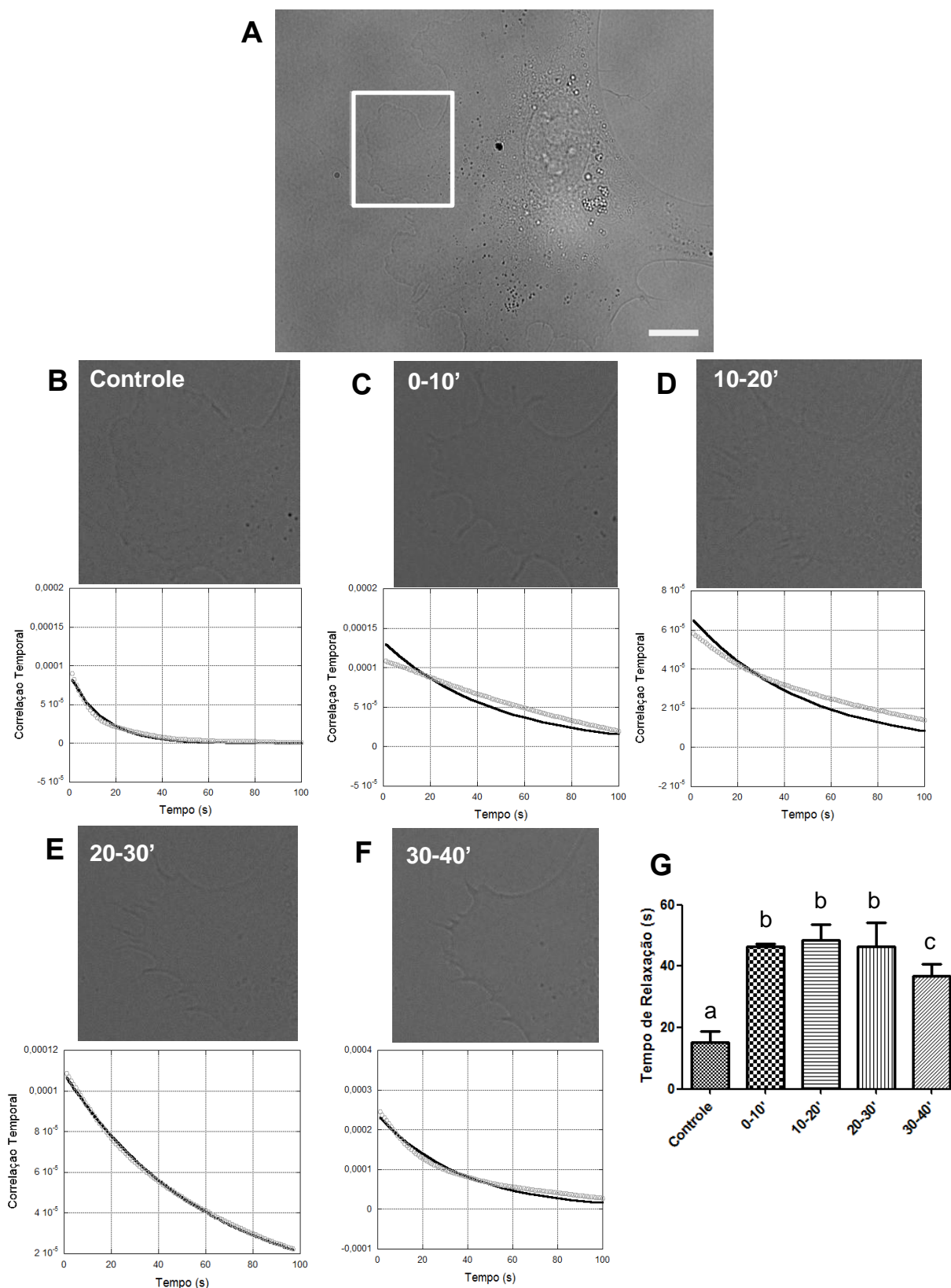


Figura 6: Microscopia de desfocalização de células endoteliais durante tratamento com MβCD. Imagens e gráficos correspondentes à função de correlação temporal de células endoteliais controle não tratadas (B) ou para cada intervalo de tempo após do tratamento com MβCD (C-F). (G) Medida do tempo de relaxação de células controle não tratadas, bem como dos 40 minutos seguidos à adição da droga. Barra de escala: 10μm Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$ usando One-way ANOVA e Newman-Keuls post-test).

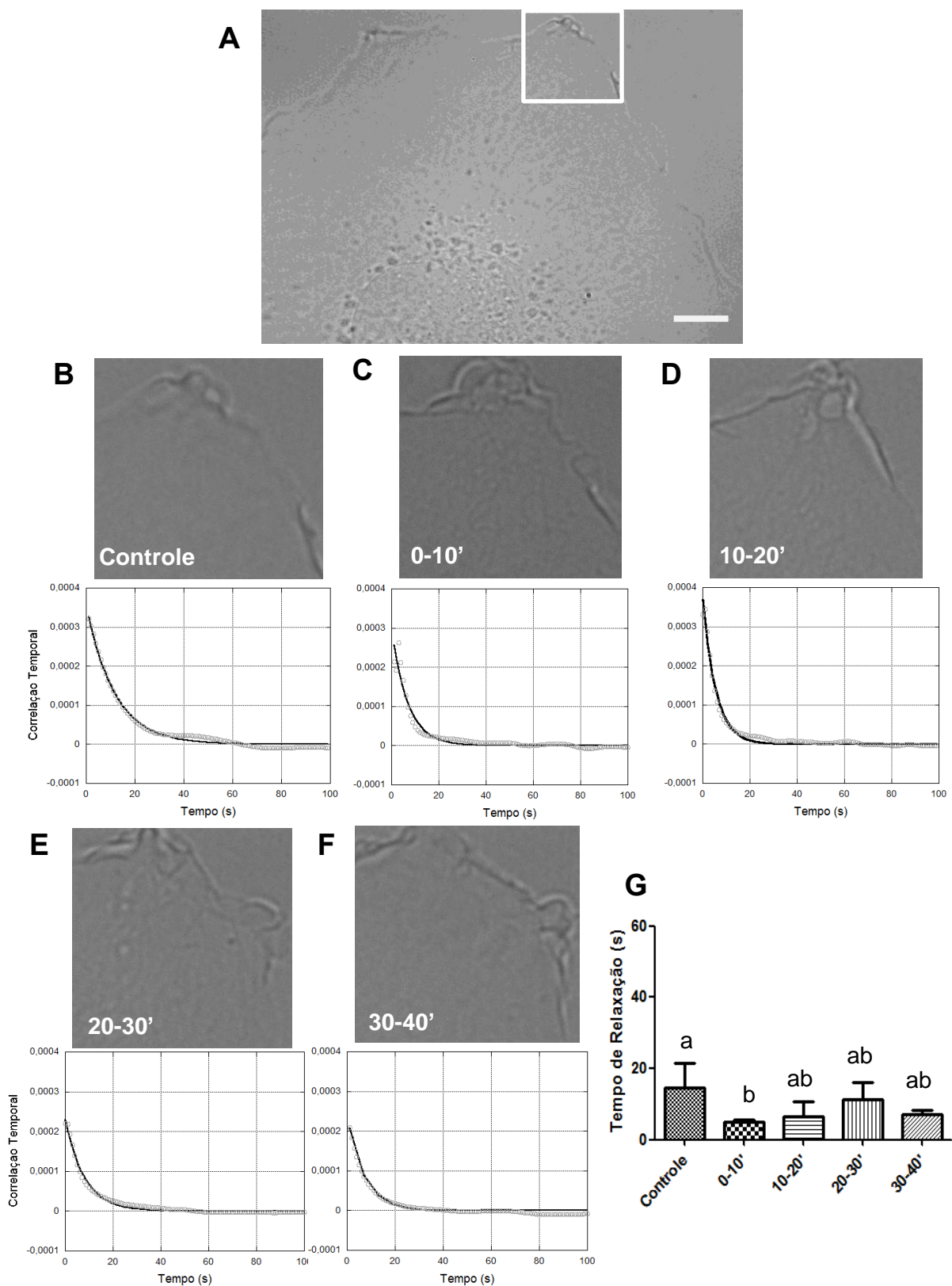


Figura 7: Microscopia de desfocalização de células endoteliais durante tratamento com H₇CD. Imagens e gráficos correspondentes à função de correlação temporal de células endoteliais controle não tratadas (B) ou para cada intervalo de tempo após do tratamento com H₇CD (C-F). (G) Gráfico mostrando a medida do tempo de relaxação do controle, bem como dos 40 minutos seguidos à adição da droga. Barra de escala: 10µm Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas (p<0,05 usando One-way ANOVA e Newman-Keuls post-test).

5.4. Tratamento com M β CD induz exocitose desregulada de lisossomos

De acordo com os resultados apresentados por Hissa e cols. (2012), o sequestro de colesterol pela ação de M β CD promove a exocitose desregulada de um pool periférico de lisossomos. Esta exocitose desregulada, que acontece espontaneamente e sem a regulação de Ca²⁺, parece ser estimulada pela reorganização do citoesqueleto, o que faria com que estes lisossomos fossem comprimidos contra a camada interna da membrana plasmática e se fusionassem a ela, fazendo com que seu conteúdo fosse exocitado. Este efeito foi observado logo nos primeiros 10 minutos de tratamento com a droga e, nos minutos seguintes, os eventos exocíticos diminuíram consideravelmente.

Para verificar se as alterações mecânicas decorrentes do tratamento com M β CD em ECs poderiam também induzir a exocitose de lisossomos observadas por Hissa e cols. (2012) em outros tipos celulares, quantificamos a exocitose dessa organela durante o sequestro de colesterol através do percentual de atividade da enzima β -hexosaminidase no sobrenadante de células tratadas com a droga.

Neste ensaio, as ECs foram expostas ao tratamento com M β CD por 10, 20, 30 e 40 minutos. Após o tratamento foi coletado o sobrenadante e as células foram então lisadas com Triton x-100 1%. Tanto o sobrenadante quanto o lisado foram então incubados com o substrato modificado da enzima β -hexosaminidase, que libera um produto fluorescente quando reage com a enzima. Os resultados foram expressos como sendo a porcentagem de enzima detectada no sobrenadante com relação à quantidade total de enzima.

O sequestro de colesterol induzido por M β CD em células endoteliais promoveu um pico de exocitose nos primeiros 10 minutos de tratamento, assim como já havia sido observado em fibroblastos (Hissa *et al.*, 2012). Não foi observada nenhuma diferença estatística entre os tempos seguintes de exposição à droga. As células tratadas com o análogo inativo de M β CD, o H γ CD, mantiveram sua secreção lisossomal semelhantes ao grupo controle e aos tempos 20, 30 e 40 de exposição à M β CD (Fig. 8).

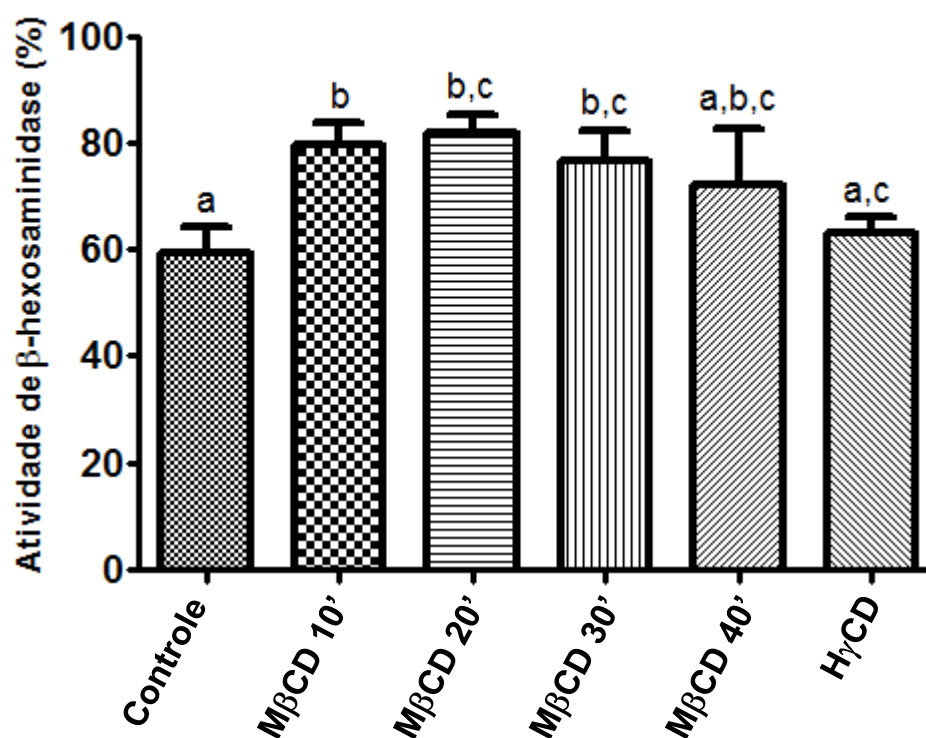


Figura 8: Análise da exocitose lisossomal através da atividade da enzima β -hexosaminidase no sobrenadante de células em cultura. Células endoteliais foram tratadas com M β CD e a atividade da enzima β -hexosaminidase foi avaliada por fluorimetria. O gráfico mostra o percentual de atividade da enzima em células não tratadas (controle), tratadas com H γ CD por 40 minutos ou com M β CD por 10, 20, 30 e 40 minutos. Os resultados foram expressos como sendo a porcentagem de enzima detectada no sobrenadante com relação à quantidade total de enzima. Letras diferentes sobre as barras indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$ usando One-way ANOVA e Newman-Keuls post-test).

5.5. *As alterações induzidas pelo tratamento com M β CD não afetam a viabilidade das células endoteliais*

Para saber se as modificações estruturais e mecânicas da célula decorrentes da depleção de colesterol, e não uma morte celular induzida pelo tratamento com a droga, eram as responsáveis pela secreção lisossomal observada em células tratadas com M β CD, um ensaio de viabilidade celular foi realizado. Neste experimento, as células, previamente plaqueadas, foram submetidas ao tratamento com M β CD por 40 minutos, lavadas com PBS -/-, tripsinizadas e ressuspensas em solução de IP (10 μ g/mL) em HBSS. Toda população de células foi então adquirida em citômetro de fluxo e o número de células positiva para IP (células não viáveis) foi considerado.

Os histogramas apresentados na figura 9 demonstram, no primeiro pico, o percentual de células que excluíram a marcação com o IP, ou seja, o percentual de células viáveis, assim como o de células não viáveis marcadas com o corante, visto no segundo pico do histograma. Não foram observadas diferenças na viabilidade das células endoteliais tratadas com as ciclodextrinas H γ CD (Fig. 9 B) e M β CD (Fig. 9 C) em relação às células controle não tratadas (Fig. 9 A), indicando que o tratamento com M β CD não induz a morte destas células e que a quantidade de β -hexosaminidase encontrada no sobrenadante de células tratadas com M β CD foi realmente decorrente da excitose de lisossomos induzido pelo sequestro de colesterol mediado pelo tratamento com esta droga.

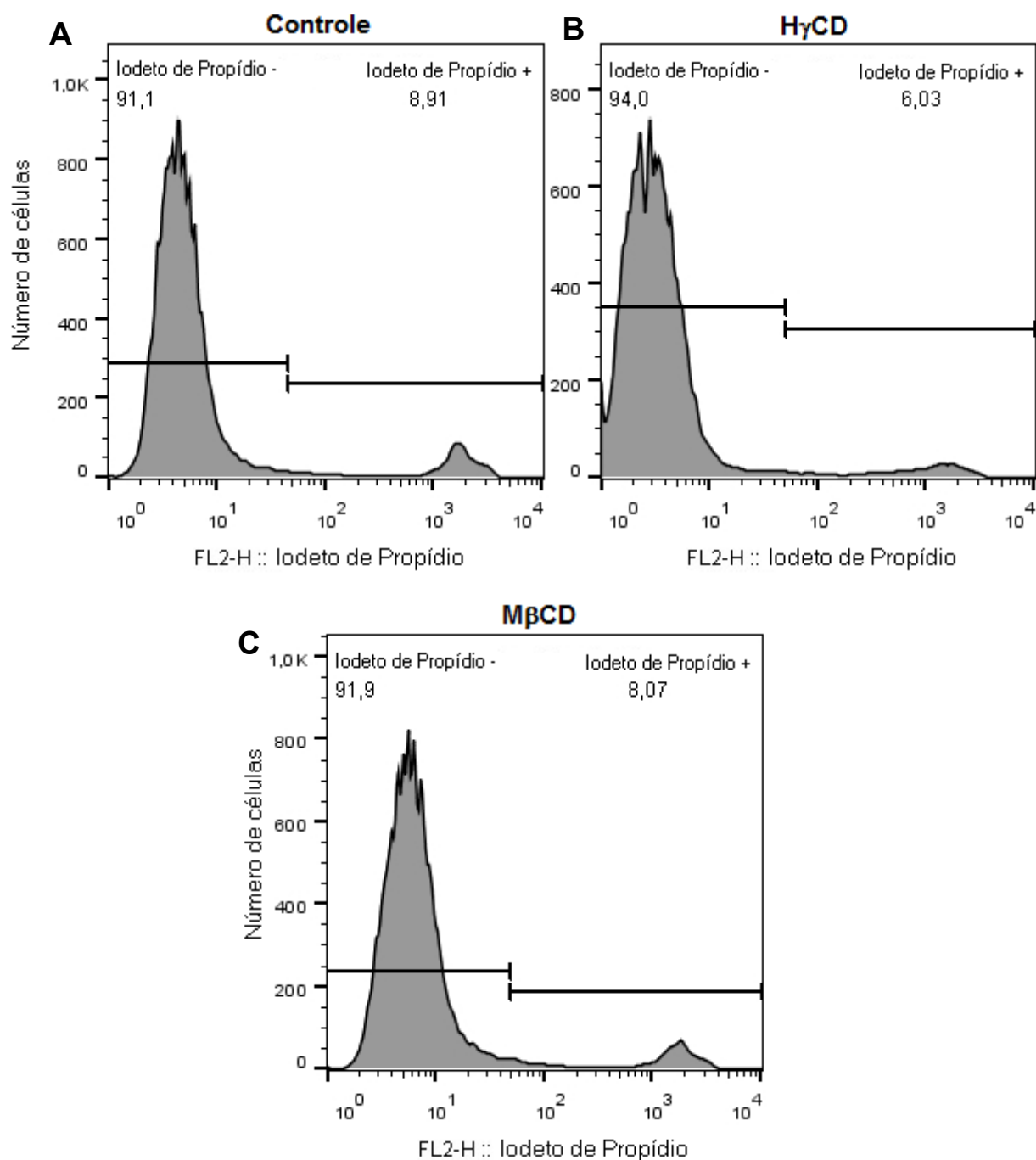


Figura 9: Ensaio de viabilidade celular por exclusão do corante Iodeto de Propídio. Células endoteliais foram tratadas com M β CD e H γ CD 5mM por 40 minutos, coradas com iodeto de propídio (10 μ g/mL) e avaliadas por citometria de fluxo. Os histogramas mostram o número de células negativas para IP ou células viáveis (Iodeto de propídio -) e as células positivas para IP ou células não viáveis (Iodeto de propídio +). Células controle foram incubadas por 40 minutos em DMEM sem soro.

5.6. *A remoção do colesterol parece bloquear a ocorrência de novos eventos endocíticos naturais da célula endotelial*

Uma vez que o tratamento com M β CD induz eventos de exocitose de lisossomos e todo evento de exocitose é acompanhado de uma endocitose compensatória, decidimos verificar se processos de endocitose compensatória seriam gerados por tratamento das células endoteliais com M β CD a despeito das alterações do citoesqueleto, decorrentes deste tratamento. Para isso, foi realizado um ensaio de endocitose compensatória, no qual células endoteliais foram mantidas em suspensão e sua membrana plasmática foi marcada com WGA-Alexa Fluor 488. Posteriormente, as células foram tratadas com M β CD durante 10, 20, 30 ou 40 minutos. Após esse tratamento, as células foram tratadas com solução de azul de tripan (0,2%), a qual é capaz de bloquear toda fluorescência presente na superfície celular, deixando somente aquela presente em vesículas endocitadas pela célula, durante o tratamento com a droga. A solução contendo as células foi então avaliada para a presença de fluorescência usando análise em citometria de fluxo. A incubação de células endoteliais com DMEM sem SFB e sem droga, nos respectivos tempos de tratamento, foi utilizada como controle.

Os resultados obtidos neste experimento mostraram um aumento dos eventos de endocitose compensatória entre 10 e 20 minutos de tratamento com M β CD (Fig. 10 B), o qual pode ser observado pelo aumento da intensidade de fluorescência de WGA-Alexa Fluor 488 em relação ao controle. Este aumento dos eventos endocíticos ocorre logo após o pico de exocitose de lisossomos visto aos 10 minutos de tratamento destas células com M β CD (Fig. 8) e também em outros tipos celulares (Hissa *et al.*, 2012). Paralelamente, foi observada uma diminuição no número desses eventos com o tempo de exposição à droga (Fig. 10 C-D), indicando que estes eventos são comprometidos à medida que a rigidez celular aumenta.

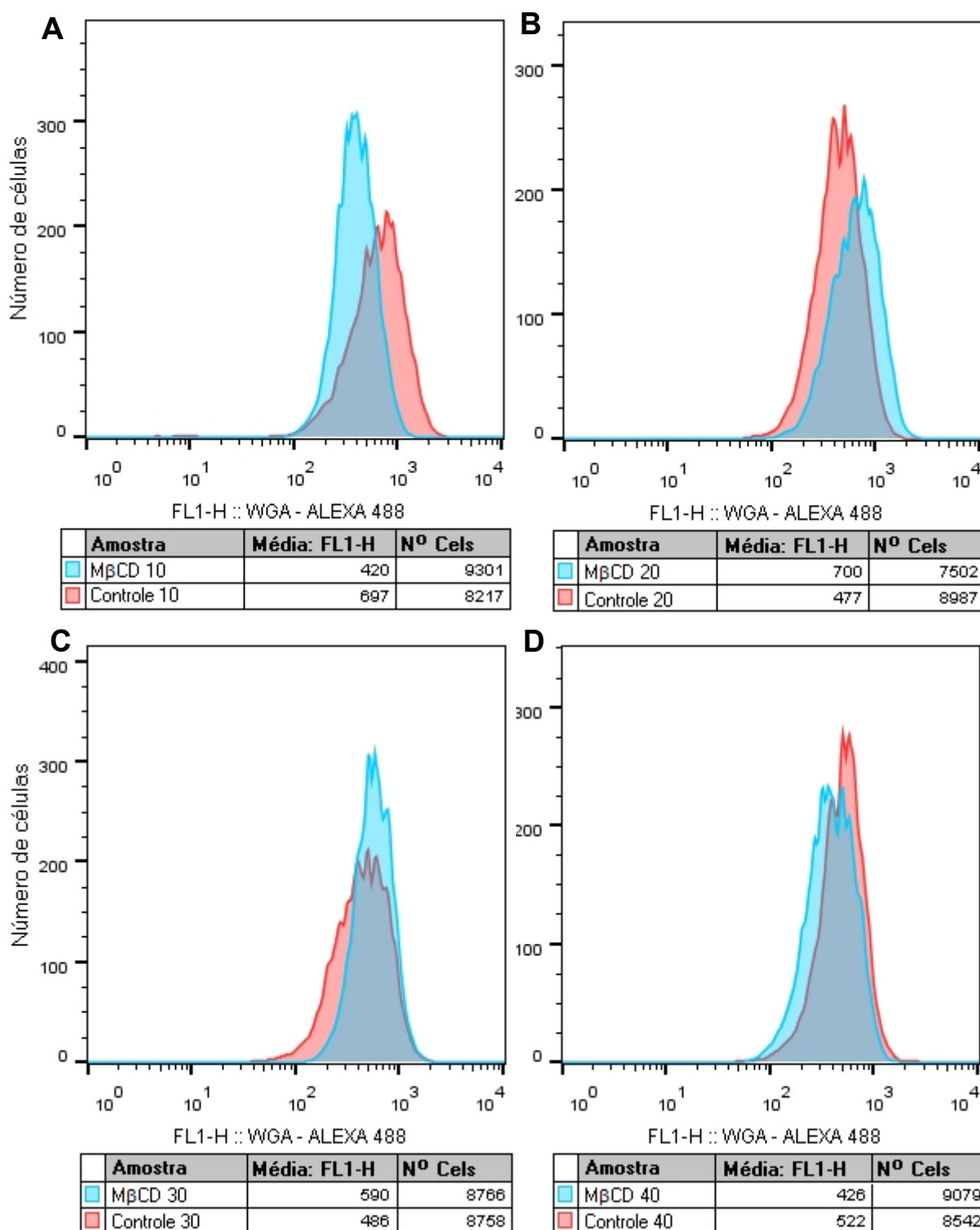


Figura 10: Análise quantitativa de eventos endocíticos induzidos pelo tratamento com MβCD. Células endoteliais foram tratadas com MβCD e avaliadas por citometria de fluxo. Os histogramas mostram o número de células, tratadas (azul) ou não (vermelho) com MβCD, bem como a intensidade de fluorescência para WGA-ALEXA 488. Quanto maior a fluorescência, maior o número de eventos endocíticos. Células tratadas foram incubadas por 10 (A), 20 (B), 30 (C) ou 40 (D) minutos com MβCD.

5.7. Células tratadas com M β CD se tornam mais sensíveis à injúria mecânica e esta maior sensibilidade parece estar relacionada ao aumento de rigidez

Como mostrado por Hissa e cols. (2012), o tratamento com M β CD induz a exocitose de um pool periférico de lisossomos, o qual parece ser uma população pré-existente de lisossomos localizada na região mais próxima à membrana plasmática que é recrutada durante os eventos de reparo de membrana. Como este pool é excitado logo no início do sequestro de colesterol, o reparo de membrana poderia estar então comprometido.

Para compreender se as alterações mecânicas decorrentes do tratamento com M β CD poderiam de alguma forma comprometer a sequência de eventos envolvida no reparo de membrana, passamos então para a investigação da capacidade de reparo de membrana em células previamente tratadas com M β CD e submetidas à injúria mecânica. Neste ensaio, as células foram plaqueadas 24 horas antes e submetidas ao tratamento com M β CD por 10, 20, 30 e 40 minutos. Como controle, células foram incubadas com DMEM sem SFB ou com H γ CD. Após o tratamento, as membranas celulares foram marcadas com WGA-Alexa Fluor 488 e lavadas com HBSS à 4°C. Posteriormente, as células foram incubadas à 37°C e raspadas da superfície onde estavam aderidas. Esta raspagem das células promove pequenas rupturas na membrana celular. Após a injúria, as células foram tratadas com azul de tripan 0,2%, lavadas com HBSS e fixadas com formaldeído 4%, antes da avaliação no citômetro de fluxo. Como a sequência de mecanismos envolvidos no reparo de membrana depende de cálcio, este ensaio foi realizado na presença de Ca²⁺ extracelular.

Nossos resultados mostraram um aumento progressivo da ocorrência de endocitose compensatória após injúria mecânica nas células endoteliais tratadas com M β CD, quando comparada com células controle não tratadas (Fig. 11 A-B) à medida que o aumento de rigidez destas células acontece (Fig. 6 C-D), indicando uma maior sensibilidade dessas células à injúria mecânica. As células expostas à M β CD por 30 e 40 minutos mostram uma diminuição também progressiva dos eventos de endocitose compensatória até o seu nível basal (Fig. 11 C-D). É também durante este período que a célula esboça uma recuperação no seu tempo de relaxação da membrana e tende a, de alguma forma, se adaptar à privação de colesterol e diminuir

a sua rigidez (Fig. 6 E-F). As células tratadas com H γ CD tiveram um comportamento semelhante ao controle.

Para confirmar se as alterações mecânicas decorrentes da depleção de colesterol tornavam as células mais susceptíveis à injúria mecânica, as células foram plaqueadas, lavadas com DMEM sem SFB e submetidas ao tratamento com M β CD ou H γ CD (5mM) por 10, 20, 30 e 40 minutos. Posteriormente, as placas foram mantidas a 4°C e as células foram raspadas da superfície onde estavam aderidas na presença de IP (10 μ g/mL) e transferidas para o tubo FACS. Os tubos foram então levados para o banho a 37°C por 5 minutos para que as células reparassem.

Neste modelo, como a célula é impermeável ao IP, a ausência de alguma ruptura na membrana plasmática da célula impediria a internalização do corante, caracterizando o pico IP negativo do histograma. Ao mesmo tempo, células que sofreram alguma injúria, se tornariam permeáveis ao IP presente no meio extracelular e, portanto, seriam representadas no pico IP positivo.

Células endoteliais controle não-tratadas não apresentaram nenhuma alteração no nível de injúria entre os diferentes tempos de incubação com DMEM sem SFB. Para representação, foi mostrado um gráfico médio do nível de injúria nestas células. O procedimento de raspagem nas células controle promoveu a injúria de 52,1% das células, representadas pelo pico IP positivo no histograma da figura 12.

No entanto, as células tratadas com M β CD apresentaram um alto nível de injúria após 10 e 20 minutos de tratamento em comparação ao controle (Fig.13 A e B, respectivamente). O aumento do nível de injúria de células depletadas de colesterol poderia justificar o aumento observado nos eventos de endocitose compensatória após injúria no mesmo período de exposição à droga (Fig. 11). Nos demais tempos de exposição, 30 e 40 minutos, o nível de injúria causado pela raspagem das células volta a valores mais próximos aos observados no grupo controle (Fig.13 C e D, respectivamente), coincidindo com o período em que a célula tende a se recuperar do aumento de rigidez induzido pela depleção de colesterol.

Não foram observadas diferenças entre as células controle não tratadas e as células tratadas com o análogo inativo H γ CD. O percentual de células IP positivas foi semelhante ao controle em todos os tempos de exposição analisados (Fig. 14).

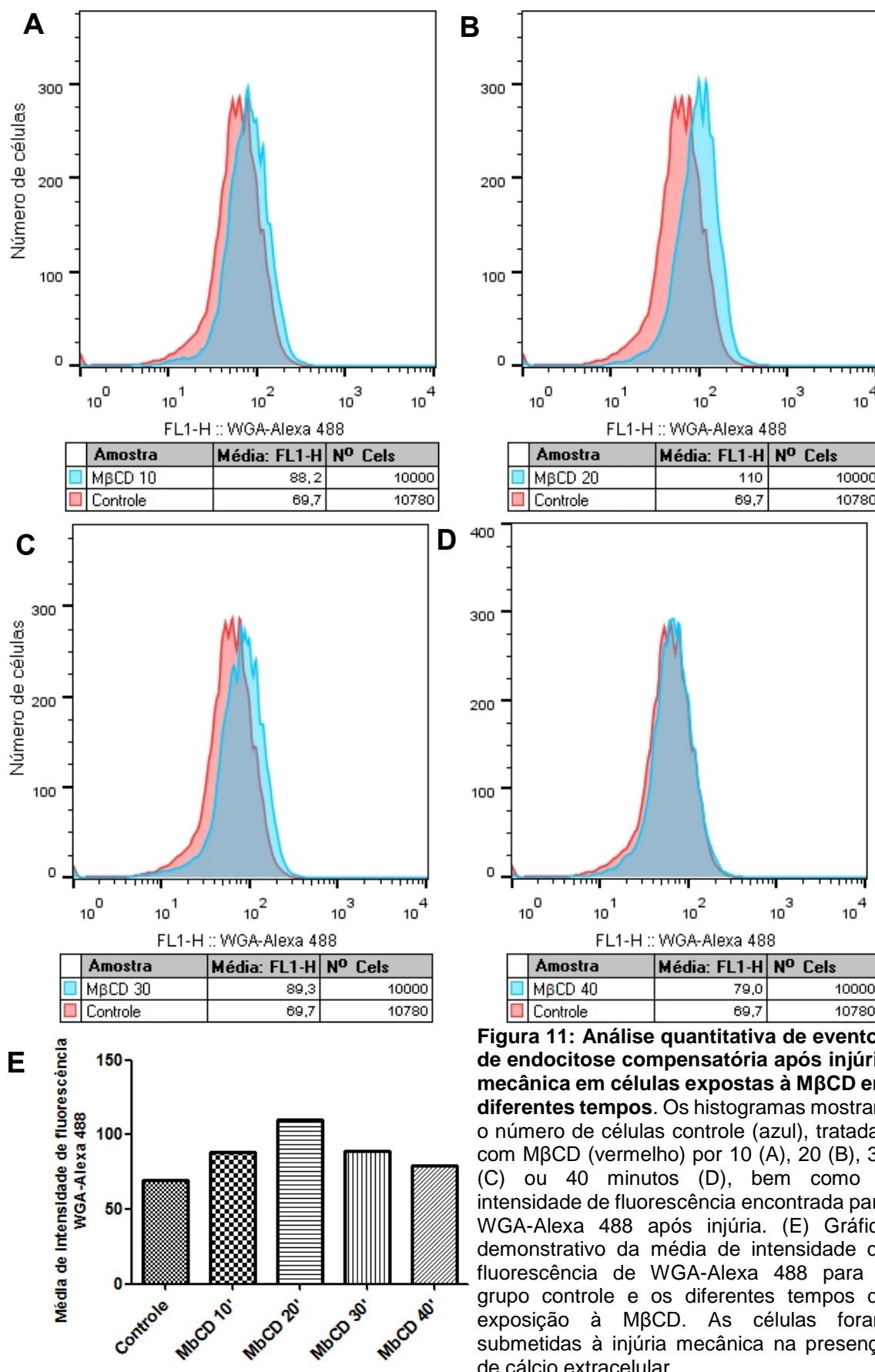


Figura 11: Análise quantitativa de eventos de endocitose compensatória após injúria mecânica em células expostas à MβCD em diferentes tempos. Os histogramas mostram o número de células controle (azul), tratadas com MβCD (vermelho) por 10 (A), 20 (B), 30 (C) ou 40 minutos (D), bem como a intensidade de fluorescência encontrada para WGA-Alexa 488 após injúria. (E) Gráfico demonstrativo da média de intensidade de fluorescência de WGA-Alexa 488 para o grupo controle e os diferentes tempos de exposição à MβCD. As células foram submetidas à injúria mecânica na presença de cálcio extracelular.

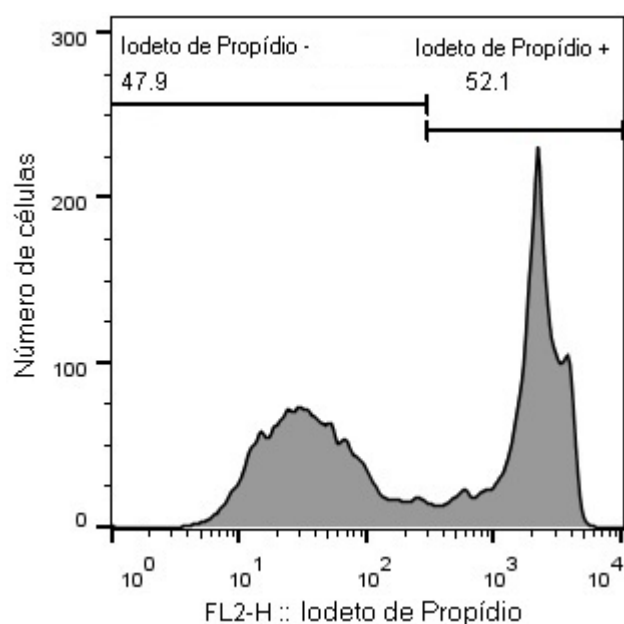


Figura 12: Nível de injúria mecânica causado pela raspagem das células endoteliais controle não-tratadas. Células endoteliais controle foram incubadas com DMEM sem SFB, raspadas na presença do iodeto de propídio para avaliar o nível de injúria causado pelo procedimento. Os histogramas mostram o número de células controle com marcação para iodeto de propídio após injúria. O primeiro pico mostrado nos histogramas (Iodeto de Propídio -) representam as células que excluíram o iodeto de propídio, ou seja, células que não sofreram injúria, enquanto o segundo pico (Iodeto de Propídio +) representa as células que sofreram injúria e as células não viáveis.

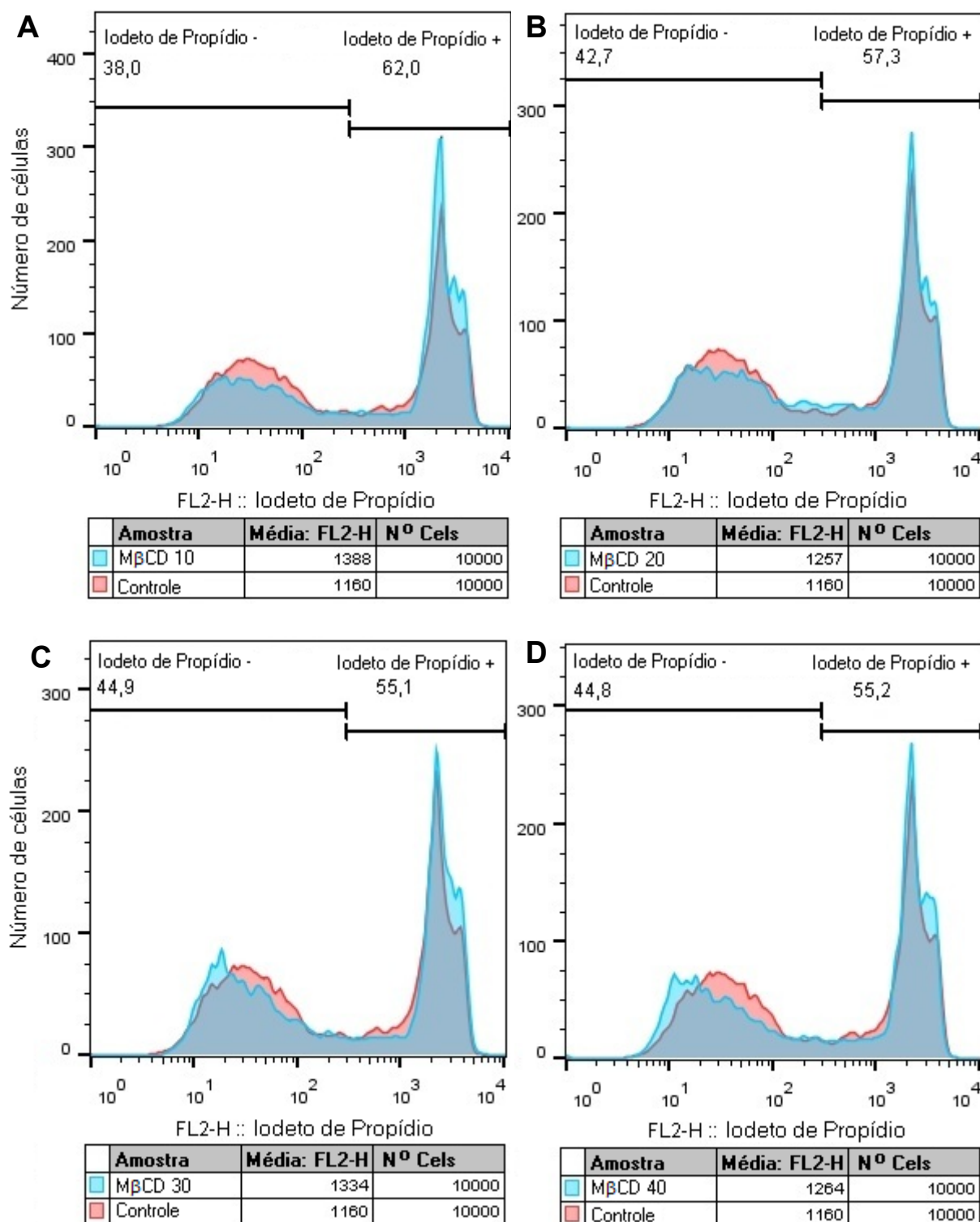


Figura 13: Nível de injúria mecânica causado pela raspagem das células endoteliais tratadas com MβCD. Células endoteliais foram tratadas com a ciclodextrina e raspadas na presença do iodeto de propídio para avaliar o nível de injúria causado pelo procedimento. Os histogramas mostram o número de células controle (vermelho) ou com MβCD (azul) por 10 (A), 20 (B), 30 (C) e 40 (D) minutos com marcação para iodeto de propídio após injúria. O primeiro pico mostrado nos histogramas (Iodeto de Propídio -) representam as células que excluíram o iodeto de propídio, ou seja, células que não sofreram injúria, enquanto o segundo pico (Iodeto de Propídio +) representa as células que sofreram injúria e as células não viáveis.

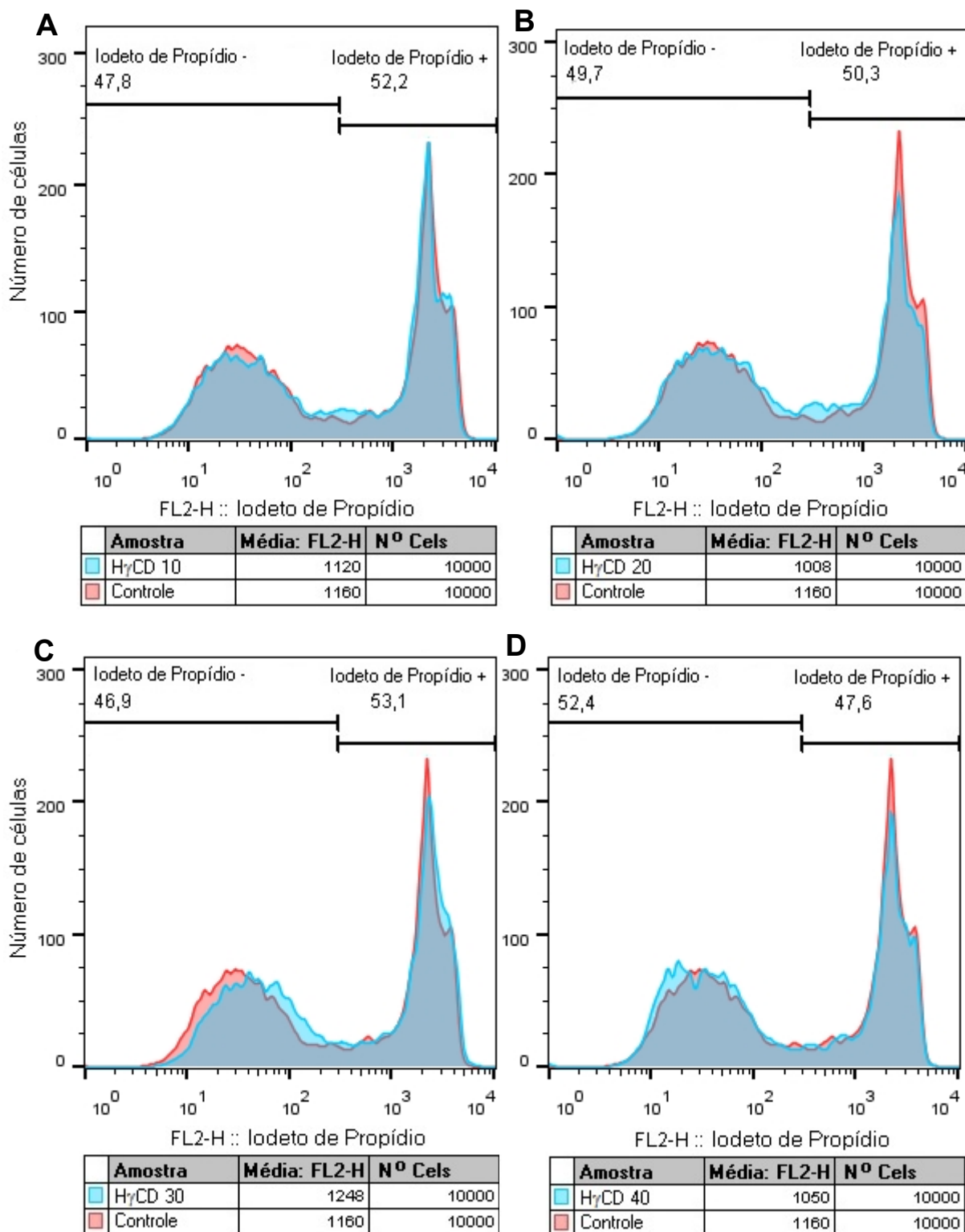


Figura 14: Nível de injúria mecânica causado pela raspagem das células endoteliais tratadas com H₇CD. Células endoteliais foram tratadas com a ciclodextrina e raspadas na presença do iodeto de propídio para avaliar o nível de injúria causado pelo procedimento. Os histogramas mostram o número de células controle (vermelho) ou tratadas com H₇CD (azul) por 10 (A), 20 (B), 30 (C) e 40 (D) minutos com marcação para iodeto de propídio após injúria. O primeiro pico mostrado nos histogramas (Iodeto de Propídio -) representam as células que excluíram o iodeto de propídio, ou seja, células que não sofreram injúria, enquanto o segundo pico (Iodeto de Propídio +) representa as células que sofreram injúria e as células não viáveis.

6 DISCUSSÃO

Estudos anteriores de outros grupos e, mais recentemente, do nosso grupo demonstraram os efeitos da depleção de colesterol de membrana celular, por tratamento com M β CD, sobre as propriedades mecânicas de diferentes tipos celulares. Foi mostrado que o tratamento com esta ciclodextrina induz a reorganização do citoesqueleto de actina e também a repolimerização destas fibras via ativação de Rho-A, caracterizado por um aumento de fibras de estresse (Kwik *et al.*, 2003; Hissa *et al.*, 2013). Juntamente à reorganização do citoesqueleto, foi observado que os efeitos do tratamento afetam as propriedades de membrana, conjunto membrana-citoesqueleto, aumentando a rigidez destas células em relação ao seu controle não tratado (Hissa *et al.*, 2013). Adicionalmente, nosso grupo mostrou que a depleção do colesterol é acompanhada de um pico de exocitose de lisossomos, independente de Ca²⁺, logo nos primeiros 10 minutos de tratamento de cardiomiócitos e fibroblastos, o qual diminui consideravelmente nos tempos seguintes do tratamento (Hissa *et al.*, 2012; Hissa *et al.*, 2013). De acordo com estes dados, o rearranjo do citoesqueleto, com consequente aumento da rigidez celular, parece ser o responsável por desencadear a exocitose de um pool periférico de lisossomos, mediada pela depleção de colesterol (Hissa *et al.*, 2013; Hissa e Andrade, 2015). De fato, já havia sido demonstrado na literatura que a reorganização do citoesqueleto de actina pode tanto funcionar como um estímulo para a fusão e exocitose de vesículas, quanto como uma barreira para novos tráfegos de vesículas localizadas mais internamente na célula (Aunis & Bader, 1988; Muallen *et al.*, 1995; Nakata & Hirokawa, 1992; Pendleton & Koffer, 2001; Miklavc *et al.* 2009).

Sabe-se que a exocitose de vesículas lisossomais é passo inicial e primordial para eventos de reparo de membrana celular pós injúria. Como mencionado no início dessa dissertação, o influxo de cálcio através do sítio de lesão na membrana plasmática estimula a fusão local e exocitose de lisossomos. A ASM proveniente desta exocitose cliva a esfingomielina da MP em ceramida, induzindo a formação de microdomínios ricos em ceramida que induzem uma invaginação da membrana, levando a eventos de endocitose compensatória que carregam consigo a porção da membrana contendo a injúria e promovem a recuperação da membrana original

(Andrews *et al.*, 2014; Tam *et al.*, 2010; Idone *et al.*, 2008). Dessa forma, o reparo de membrana é dependente do tráfego de vesículas, o qual pode ser alterado também pelo citoesqueleto de actina.

Uma vez que a célula endotelial está constantemente submetida ao estresse mecânico decorrente do fluxo sanguíneo, é esperado que processos de reparo de membrana após a injúria sejam de fundamental importância para a manutenção celular. Por outro lado, como mencionado acima, a exposição de células endoteliais à drogas que sequestram o colesterol, levam à reorganização do citoesqueleto de actina. O mesmo acontece após a exposição dessas células à oxLDL, a forma oxidada de LDL, encontrada nos estágios iniciais da aterogênese e conhecida por induzir a disfunção endotelial (Pirillo *et al.* 2013; Berliner & Watson 2005; Steinberg 2009, Steinberg and Witztum 2010; Byfield *et al.* 2004). Neste sentido a alteração do citoesqueleto poderia influenciar o tráfego de vesículas e, conseqüentemente, o reparo de membrana. Dessa forma, neste estudo, buscamos investigar se a modulação mecânica induzida pela depleção de colesterol poderia afetar algum dos mecanismos envolvidos no reparo de membrana, comprometendo assim a viabilidade celular.

Primeiramente, decidimos avaliar a resposta ao tratamento com M β CD ou oxLDL na organização estrutural do citoesqueleto das células endoteliais em estudo. Como esperado, nossos resultados mostraram efeitos semelhantes aos encontrados na literatura, nos quais observamos a reorganização e polimerização “de novo” de fibras de actina. Paralelamente, observamos um aumento da rigidez celular através de estudos de microscopia de desfocalização logo nos primeiros 10 minutos de incubação com a droga. Esses dados corroboram com dados anteriores que mostraram o aumento da rigidez endotelial, dependente da integridade do citoesqueleto de actina, através da técnica de microaspiração, na qual a deformabilidade da membrana foi avaliada (Byfield *et al.*, 2004). No entanto, também observamos que nos 10 minutos finais de exposição à M β CD, ou seja, 30 minutos após o tratamento, as células tratadas tendem a se recuperar deste aumento de rigidez diminuindo o seu tempo de relaxação para valores mais próximos aos encontrados no controle. Nossos resultados são semelhantes aos encontrados anteriormente por Hissa e cols. (2013). Nesse último, o sequestro de colesterol de

membrana em fibroblastos também levou à reorganização do citoesqueleto de actina, com o consequente aumento da rigidez celular nos primeiros minutos do sequestro de colesterol. Porém, 30 minutos após o tratamento, essas células também tendem a diminuir a tensão superficial, avaliada pela diminuição do tempo de relaxação da membrana medida pela técnica de microscopia de desfocalização. Quais os mecanismos usados por estas células para se adaptarem à depleção de colesterol e diminuir sua tensão superficial ao final do tratamento ainda não estão bem esclarecidos. No trabalho de Hissa e cols. (2013), a exocitose desregulada observada nos primeiros minutos de tratamento com a ciclodextrina acontece para um pool periférico de lisossomos, os quais parecem ser mais importantes no processo de reparo de membrana. Como os eventos de exocitose tem um pico aos dez minutos e posteriormente diminuem com o tempo, foi sugerido que a remodelação do citoesqueleto formasse uma barreira mecânica para novos eventos de exocitose de lisossomos localizados mais internamente à célula, justificando a diminuição de novos eventos de exocitose. Paralelamente, a fusão dessas vesículas, doando membrana para a membrana plasmática, decorrente do remodelamento do citoesqueleto, poderia ser responsável pela posterior diminuição do tempo de relaxação e tensão superficial nos tempos mais tardios de tratamento. Assim o mesmo poderia ser o caso para as células endoteliais.

Por outro lado, de acordo com os mecanismos descritos para o reparo de membrana mediado pela exocitose de lisossomos, esta última é sempre acompanhada de eventos de endocitose compensatória. Considerando que o colesterol é responsável pela regulação da exocitose de lisossomos, onde a diminuição do conteúdo colestérico da membrana plasmática leva a um rápido evento de exocitose lisossomal, seria esperado que após o pico de exocitose de lisossomos ocorresse também um rápido evento de endocitose compensatória. Para responder a esta pergunta, nós analisamos se o tratamento com M β CD era capaz de induzir a endocitose compensatória, mesmo com a reorganização do citoesqueleto cortical de actina. Os resultados encontrados neste trabalho demonstram que, durante a depleção de colesterol, as células apresentam um aumento dos eventos endocíticos entre 10 e 20 minutos de tratamento, o que poderia ser considerado como sendo um mecanismo compensatório para a exocitose desregulada observada no mesmo

período de tempo. Como essa endocitose compensatória acontece imediatamente após o evento exocítico, é possível que ela ocorra enquanto o citoesqueleto esteja em processo de remodelamento e apenas eventos posteriores de tráfego de membranas sejam bloqueados. Nesse sentido, nossos dados mostram que o aumento da rigidez celular associado à reorganização e polimerização de novos filamentos de actina, parece comprometer novos eventos de endocitose. Em células controle não tratadas observamos a ocorrência de endocitose constitutiva, ao longo do tempo, proveniente de processos de pinocitose, comuns em células endoteliais. No entanto, em células tratadas com M β CD, após o primeiro pico de endocitose decorrente da exocitose lisossomal, à medida que o tempo de exposição à droga foi aumentando, a ocorrência de novos eventos endocíticos foi comprometida.

De acordo com os resultados até então obtidos, seria esperado que a capacidade de reparo destas células depletadas de colesterol fosse afetada, já que a sequência de eventos envolvidos no mecanismo de reparo estava comprometida. Já havia sido observado o efeito da depleção de colesterol na capacidade de reparação de membrana de uma linhagem de células tumorais, HeLa (Idone *et al.*, 2008). Neste estudo, células HeLa foram tratadas com M β CD nas doses 5mM, 7,5mM e 10 mM por 45 minutos, raspadas da superfície onde estavam aderidas e após 4 minutos o IP foi adicionado. Foi observada a inibição da endocitose induzida por injúria mecânica e o comprometimento dose-dependente da capacidade destas células de se recuperarem da injúria.

Devido à diminuição dos eventos endocíticos de células endoteliais tratadas com a ciclodextrina, observado no presente trabalho, buscamos investigar se a capacidade destas células em reparar sua membrana após uma injúria mecânica, ao longo do tempo de exposição à droga, poderia também estar comprometida. Surpreendentemente, foi visto um aumento progressivo nos eventos de endocitose compensatória, após injúria mecânica, para células tratadas por 10 e 20 minutos com M β CD, correspondendo aos tempos de maior rigidez celular. Duas hipóteses poderiam explicar esse resultado. Primeiramente, o sequestro de colesterol poderia estar mostrando um efeito positivo na capacidade de reparo das células ou ele estaria tornando-as mais propensas à injúria, de modo que, quanto maior a injúria, maior a ocorrência de endocitose compensatória. Como foi observado um bloqueio na

ocorrência de eventos endocíticos pela ação de M β CD, não seria possível justificar o aumento na endocitose compensatória pós-injúria como uma melhora na capacidade de reparo de membrana destas células. Todavia, nossos dados sugerem que o aumento na endocitose compensatória após injúria mecânica em células tratadas com M β CD pode estar relacionado a uma maior propensão dessas células à injúria mecânica durante o seu pico de rigidez. É possível que o aumento da rigidez torne as células mais sensíveis à esse tipo de injúria e que esta seja capaz de romper a barreira do citoesqueleto, permitindo a exocitose lisossomal seguida da endocitose compensatória.

Kowalsky e cols. (2008) sugeriram que o aumento da rigidez celular e da tensão do citoesqueleto decorrente de alterações no conteúdo de colesterol da membrana plasmática de células endoteliais resultam em um aumento da sensibilidade destas células à estímulos mecânicos, como os gerados pelo fluxo sanguíneo. Os pesquisadores mostraram que em ambientes de fluxo ativo, as células mais rígidas sofrem alterações em sua morfologia e são capazes de se realinharem em direção ao fluxo como um mecanismo de manutenção da integridade endotelial.

Para confirmar a hipótese de que as células endoteliais em cultura se tornam mais propensas à sofrerem injúria mecânica, foi analisado o nível de injúria sofrido por essas células durante o processo de raspagem. Como esperado, as células endoteliais apresentaram um maior nível de injúria durante o seu pico de rigidez em relação às células controle não tratadas ou tratadas com H γ CD. Estes resultados sugerem que a modulação mecânica induzida pela depleção de colesterol, decorrente da reorganização do citoesqueleto e que leva ao aumento do tempo de relaxação da membrana, interfere com a exocitose de lisossomos e a endocitose constitutiva e torna as células mais propensas a sofrerem uma injúria mecânica quando comparadas às células controle.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A célula endotelial está sob constante estresse mecânico devido ao ambiente hemodinâmico ao qual está inserida. Por isso, o estudo dos mecanismos de reparo de membrana após injúria é essencial para a manutenção da viabilidade celular. O reparo de membrana envolve uma sequência de mecanismos dependentes de cálcio extracelular, incluindo a exocitose de lisossomos e subseqüente eventos de endocitose compensatória.

Este trabalho foi realizado com o intuito de entender o efeito da modulação mecânica induzida pela depleção de colesterol através do tratamento com M β CD nos mecanismos de reparo de membrana após injúria mecânica. Observamos que o tratamento induziu a reorganização do citoesqueleto e polimerização *de novo*, associado a um aumento de rigidez celular.

Após as análises das alterações biomecânicas, avaliamos o efeito do tratamento nos mecanismos de reparo de membrana. Observamos que o tratamento induziu um aumento na exocitose de lisossomos nos primeiros 10 minutos de tratamento e não compromete a viabilidade celular. Além disso, o tratamento com a ciclodextrina induz um evento de endocitose nos primeiros 10 a 20 minutos de exposição, provavelmente como um mecanismo compensatório para a exocitose observada no mesmo período. Contudo, os eventos endocíticos subseqüentes, originários de possíveis endocitoses constitutivas realizadas por células endoteliais, são comprometidos. Enquanto a célula controle apresenta um aumento contínuo de eventos endocíticos ao longo do tempo de avaliação da célula, células tratadas com a ciclodextrina apresentam apenas um pico único de endocitose, provavelmente vinculado à secreção lisossomal. Estes dados sugerem que a reorganização do citoesqueleto, induzida pela depleção de colesterol, esteja possivelmente formando uma barreira para novos tráfegos de vesículas.

Paralelamente, após uma injúria mecânica, foi observado um aumento no mecanismo de endocitose compensatória e um aumento no nível de injúria sofrido por células endoteliais tratadas com M β CD à medida que a rigidez celular aumenta. Estes dados indicam que o aumento da rigidez torna as células mais sensíveis a esse tipo de injúria, a qual seria capaz de romper a barreira do citoesqueleto permitindo que a

exocitose lisossomal e a endocitose compensatória aconteçam.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a modulação mecânica induzida pela depleção de colesterol, além de comprometer a exocitose de lisossomos e a endocitose compensatória, ainda torna as células mais propensas a sofrerem uma injúria mecânica quando comparadas às células controle.

Devido às semelhanças entre as alterações biomecânicas decorrentes da depleção de colesterol e do tratamento de células endoteliais com oxLDL é possível que a exposição de células endoteliais à este último, também possa ocasionar os mesmos resultados. Uma vez que o aumento da exposição de células endoteliais à oxLDL é importante para o desenvolvimento da aterosclerose, é importante que sejam realizados novos estudos na tentativa de correlacionar os efeitos da modulação mecânica nos mecanismos de reparo de membrana e, assim, compreender os efeitos dessas alterações biomecânicas em células endoteliais no processo de formação da placa aterosclerótica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agero, U.; Mesquita L.G.; Neves, B.R.; Gazzinelli, R.T.; Mesquita, O.N. Defocusing microscopy. **Microsc Res Tech.** v.65, n.3, p. 159-165, 2004.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. **Molecular Biology of the Cell.** 5ª Edição. New York: Garland Science; 2002.
- Allen, J.A; Halverson-Tamboli, R.A; Rasenick, M.M. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signaling. **Nature Reviews Neuroscience.** v.8, 2007.
- Andrews, N.W.; Almeida, P.E.; Corotte, M. Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. **Trends in Cell Biology.** p.1–9, 2014.
- Aunis, D.; Bader, M.F. The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells. **J. Exp Biol.** v.139, p.253–266, 1988.
- Aviram, M. Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis. **Atherosclerosis,** 98, p. 1-9, 1993.
- Berliner, J. A.; Watson, A.D. A role for oxidized phospholipids in atherosclerosis. **N Engl J Med.** v.353, n.1, p.9-11, 2005.
- Byfield, F. J., Aranda-Espinoza, H.; Romanenko, V. G.; Rothblat, G. H.; Levitan, I. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. **Biophys J.** v.87, n.5, p.3336-3343, 2004.
- Byfield, F. J., S. Tikku, G. H. Rothblat, K. J. Gooch and I. Levitan. OxLDL increases endothelial stiffness, force generation, and network formation. **J Lipid Res.** v.47, n.4, p. 715-723, 2006.
- Carvalho, M.H.C.; Nigro, D.; Lemos, V.S.; Tostes, R.C.A.; Fortes, Z.B. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens,** v. 8, n.1, 2001.
- Chen, F.W.; Li, C.; Ioannou, Y.A. Cyclodextrin Induces Calcium-Dependent Lysosomal Exocytosis. **PLoS ONE.** v.5, n.11, p.15054, 2010.
- Chouinard, J.A., Grenier, G.; Khalil, A.; Vermette, P. Oxidized-LDL induce morphological changes and increase stiffness of endothelial cells. **Exp Cell Res** v.314, n.16., p. 3007-3016, 2008.
- Cremesti, A.E.; Goni, F.M.; Kolesnick, R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? **FEBS Lett.** v.531, p.47–53, 2002.
- Criqui, M.H. Epidemiology of atherosclerosis: an updated overview. **Am J Cardiol,** v. 57 p. 18C-23C, 1988.

De Flora, S.; Izzotti, A.; Walsh, D.; Degan, P.; Petrilli, G.L.; Lewtas, J. Molecular epidemiology of atherosclerosis. **The FASEB Journal**, v.11, 1997.

Gil, C.; Soler-Jover, A.; Blasi, J.; Aguilera, J. Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.329, n.1, p.117–124, 2005.

Hanzal-Bayer, M.F.; Hancock, J.F. Lipid rafts and membrane traffic. **FEBS Letters**. v.581, n.11, p.2098–2104, 2007.

Head, B.P.; Patel, H.H.; Insel, P.A. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: Impact on signaling and function: Membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. **Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes**. v.1838, n.2, p.532–545, 2014.

Hissa, B., Duarte, J.G.; Kelles, L.F.; Santos, F.P.; del Puerto, H.L.; Gazzinelli-Guimaraes, P.H.; de Paula, A.M.; Agero, U.; Mesquita, O.N.; Guatimosim, C.; Chiari, E.; Andrade, L.O. Membrane cholesterol regulates lysosome-plasma membrane fusion events and modulates *Trypanosoma cruzi* invasion of host cells. **PLoS Negl Trop Dis**. v.6, n.3, e1583, 2012.

Hissa, B., Pontes, B.; Roma, P.M.; Alves, A.P.; Rocha, C.D.; Valverde, T.M.; Aguiar, P.H.; Almeida, F.P.; Guimaraes, A. J.; Guatimosim, C.; Silva, A.M.; Fernandes, M.C.; Andrews, N.W.; Viana, N.B.; Mesquita, O.N.; Agero, U.; Andrade, L.O. Membrane cholesterol removal changes mechanical properties of cells and induces secretion of a specific pool of lysosomes. **PLoS One**. v.8, n.12, e82988, 2013.

Hissa, B.; Andrade, L.O. *Trypanosoma cruzi* uses a specific subset of host cell lysosomes for cell invasion. **Parasitology International**. v.64, p.135–138, 2015.

Hong, Z.; Staiculescu, M. C.; Hampel, P.; Levitan, I.; Forgacs, G. How cholesterol regulates endothelial biomechanics. **Frontiers in Physiology**. v.3, 2012.

Idone, V.; Tam, C.; Goss, J.W.; Toomre, D.; Pypaert, M.; Andrews, N.W. Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. **J Cell Biol**. v.180, n.5, p.905-914, 2008.

Ikonen, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v.9, p. 125-138, 2008.

Koseoglu, S.; Love, S.A.; Haynes, C.L. Cholesterol effects on vesicle pools in chromaffin cells revealed by carbon-fiber microelectrode amperometry. **Anal Bioanal Chem**. v.400, p.2963–2971, 2011.

Kowalsky, G. B.; Byfield, F. J.; Levitan, I. (2008). oxLDL facilitates flow-induced realignment of aortic endothelial cells. **Am J Physiol Cell Physiol**. v.295, n.2, p.332-340.

- Kwik, J.; Boyle, S.; Fooksman, D.; Margolis, L. et al. Membrane cholesterol, lateral mobility and the phosphatidylinositol 4,5 biphosphate –dependent organization of cell actin. **PNAS**. v.100,n.24, p.13964- 13969, 2003.
- Lafont, F.; van der Goot, F. G. Bacterial invasion via lipid rafts. **Cellular Microbiology**, v.7, n.5, p.613–620, 2005.
- Lange, Y.; Steck, T.L. Active membrane cholesterol as a physiological effector. **Chem. Phys. Lipids**, 2016.
- Levitan, I.; Gooch, K.J. Lipid rafts in membrane- cytoskeleton interactions and control of cellular biomechanics: actions of oxLDL. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.9, n. 9, p. 1519-1534, 2007.
- Liao, L.; Granger, D. N. Modulation of oxidized low-density lipoprotein-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. **Am J Physiol**. v.268, p.1643-1650, 1995.
- Libby, P.; Ridker, P.M.; Hansson, G.K. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. **Nature**. v.473, n. 7347, p.317-325, 2011.
- Libby, P.; Ridker, P.M.; Maseri, A. Inflammation and Atherosclerosis. **Circulation**, n. 105, p.1135-1143, 2002.
- McNeil , P.L. Repairing a torn cell surface: make way, lysosomes to the rescue. **J. Cell Sci**. v.115, p.873 – 879, 2002.
- McNeil , P.L.; Miyake, K.; Vogel, S.S. The endomembrane requirement for cell surface repair. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** . v.100, p.4592 – 4597, 2003.
- Miklavc, P.; Wittekindt, O.H.; Felder, E.; Dietl, P. Ca²⁺-dependent actin coating of lamellar bodies after exocytotic fusion: a prerequisite for content release or kiss-and-run. **Ann N Y Acad Sci**. v.1152, p.43–52, 2009.
- Muallen, S.; Kwiatkowska, K.; Xu, X.; Yin, H.L. Actin filament disassembly is a sufficient trigger for exocytosis in non-excitabile cells. **J Cell Biol**. v.128, p.589–598, 1995.
- Murray, D.; Tamm, L.K. Clustering of Syntaxin-1A in Model Membranes is Modulated by Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and Cholesterol. **Biochemistry**. v.48, n.21, p. 4617–4625, 2009.
- Nakata, T.; Hirokawa, N. Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deepetching, and double-label immunoelectron microscopy. **J Neurosci**. v.12, p.2186–2197, 1992.
- Pendleton, A.; Koffer, A. Effects of latrunculin reveal requirements for the actin cytoskeleton during secretion from mast cells. **Cell Motil Cytoskeleton**. v.48, p.37–51, 2001.

Pike, L.J. Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. **Journal of Lipid Research**. v.47, n.7, p.1597-1598, 2006.

Pike, L.J.; Miller, J.M. Cholesterol depletion delocalizes phosphatidylinositol bisphosphate and inhibits hormone-stimulated phosphatidylinositol turnover. **J Biol Chem**. v. 273, n. 35, p.22298-304, 1998.

Pirillo, A.; Norata, G.D.; Catapano, A.L. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. **Mediators of Inflammation**, 2013.

Pomorski, T.; Hrafnadóttir, S.; Devaux, P.F.; Van Meer, G. Lipid distribution and transport across cellular membranes. **Cell & Developmental Biology**, v. 12, p. 139–148, 2001.

Qi, M.; Liu, Y.; Freeman, M.R.; Solomon, K.R. Cholesterol-Regulated Stress Fiber run. **Ann N Y Acad Sci**. v.1152, p. 43–52, 2009.

Reddy, A.; Caler, E.; Andrews, N. Plasma membrane repair is mediated by Ca²⁺-regulated exocytosis of lysosomes. **Cell**. v.106, p.157-169, 2001.

Rodriguez-Flores, M.; Rodriguez-Saldaña, J.; Cantú-Brito, C.; Aguirre-Garcia, J.; Alejandro, G.G. Prevalence and severity of atherosclerosis in different arterial territories and its relation with obesity. **Cardiovascular Pathology**. v.22, p. 332–338, 2013.

Salaün, C., Gould, G.W.; Chamberlain, L.H. Lipid Raft Association of SNARE Proteins Regulates Exocytosis. **J Biol Chem**. v.280, n.20, p.19449–19453, 2008.

Shentu, T.P.; Titushkin, I.; Singh, D.K.; Gooch, K.J.; Subbaiah, P.V.; Cho, M.; Levitan, I. oxLDL-induced decrease in lipid order of membrane domains is inversely correlated with endothelial stiffness and network formation. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 299, n.2, C218–C229, 2010.

Shentu, T.P.; Singh, D. K.; Oh, M.J.; Sun, S.; Sadaat, L.; Makino, A.; Mazzone, T.; Suabbaiah, P.V.; Cho, M.; Levitan, I. The role of oxysterols in control of endothelial stiffness. **J Lipid Res.**, v. 53, n. 7, p. 1348–1358, 2012.

Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. **J Biol Chem**. v.272, p.20963-20966, 1997.

Steinberg, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **J Lipid Res**. v.50, p.376-381, 2009.

Steinberg, D.; Witztum, J.L. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**. v.30, n.12, p.2311-2316, 2010.

Steinbrecher, U.P.; Zhang, H.; Loughheed, M. Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 155-168, 1990.

Van De Graaff, K.M. **Human Anatomy**. McGraw-Hill Company, 6^a edição, 2001.

Van Meer, G.; Voelker, D.R.; Feigenson, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 2009.

Walker, H.K.; Hall, W. D.; Hurst, J.W. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations**. Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia. Boston: Butterworths; 3ª edição, 1990.

World Health Organization. Cardiovascular diseases [Internet]. Acesso em janeiro de 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.