

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR
TESE DE DOUTORADO**

Bárbara Hissa de Carvalho Vieira Couto

**IMPORTÂNCIA DO COLESTEROL PARA A MECÂNICA CELULAR E PARA
A ENTRADA DO *Trypanosoma cruzi* NA CÉLULA HOSPEDEIRA**

**Belo Horizonte
2013**

Bárbara Hissa de Carvalho Vieira Couto

**IMPORTÂNCIA DO COLESTEROL PARA A MECÂNICA CELULAR E PARA
A ENTRADA DO *Trypanosoma cruzi* NA CÉLULA HOSPEDEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como pré-requisito para a obtenção do título de doutor em Biologia Celular

Orientadora: Luciana de Oliveira Andrade

Co-orientador: Ubirajara Agero Batista

**Belo Horizonte
2013**

Esta tese foi realizada nos laboratórios de Biologia Celular e Molecular, do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas e de Física Biológica do Departamento de Física do Instituto de Ciências Exatas, ambos da Universidade Federal de Minas Gerais. Parte dos experimentos também foi realizada no Laboratório de Pinças Ópticas e no Laboratório de Morfogênese Celular, ambos localizados no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Esta tese contou com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (INCT- FCx)

À minha mãe, Soraya, e ao Fabinho, meu marido, que dividem o espaço do meu coração com o amor que tenho pela Ciência.

*“Que ninguém se engane, só consigo a simplicidade através de muito trabalho.”
Clarice Lispector em “A hora da Estrela”*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado o gosto inenarrável que tenho pela Ciência;

Ao meu marido, Fábio Pereira Santos, por ser meu exemplo, meu melhor amigo, meu colaborador, meu inteiro (e não metade), meu amor, minha melhor parceria. Obrigada por ter ficado ao meu lado ao longo dos anos de graduação e por ter permanecido quando fui para a Biologia Celular e ainda por ter me incentivado a voltar para a Física no doutorado. Obrigada por ser a minha inspiração, minha casa e a minha vida. Amo você;

Aos meus familiares pela compreensão, pelo carinho, pelo incentivo aos estudos, pela presença, pelos almoços de domingo, pelo apoio. Obrigada por edificarem a minha base;

À minha querida mãe (nãe) Soraya Hissa, por ser meu exemplo, meu rumo, meu porto seguro, minha melhor amiga, meu maior exemplo e meu espelho. Obrigada por me incentivar em tudo. Obrigada pelo carinho e pelos ensinamentos. Obrigada pela vida;

Aos meus filhotes caninos, Max Hissa Santos e Nala Hissa Santos por me mostrarem, dia após dia, o amor puro e desprovido de interesses. Obrigada por lerem comigo os trabalhos científicos e por fazerem meu dia-a-dia mais tranquilo e mais alegre;

À minha orientadora, profa. Luciana de Oliveira Andrade, por ter me acompanhado durante os seis últimos anos. Foi ao lado dela que me tornei mestre e agora doutora. Foram, sem dúvida, muitos momentos que passamos juntas. Momentos bons, momentos de *brainstorming*, momentos de discussões científicas e filosóficas, momentos de planejamento de experimentos. Muito obrigada por ter caminhado não à minha frente, mas ao meu lado nessa jornada;

Ao meu co-orientador, prof. Ubirajara Agero Batista (Bira), por ter aceitado a minha proposta de co-orientação quando ainda estava terminando o mestrado e escrevendo o projeto de doutorado. Obrigada por ser sempre otimista e animado, sobretudo quando os experimentos não davam certo e também por me acolher novamente na Física, minha casa. Obrigada pelas discussões e pelo bate-papo sempre descontraído e pela agradabilíssima orientação;

Ao prof. Oscar Nassif Mesquita, chefe do laboratório de Física Biológica, por ter me dado a oportunidade de integrar ao grupo. Muito obrigada também por ter enviado o meu projeto, juntamente com o Bira, para o INCT de Fluidos Complexos (que me financiou ao longo desses quatro anos) e por ter acreditado na minha capacidade. Obrigada pelas discussões científicas brilhantes. Você é um exemplo para nós, alunos, e para a Ciência brasileira;

À profa. Cristina Guatimosim por ter cedido as ciclodextrinas ao longo do mestrado e doutorado. Obrigada também pelas discussões científicas, pela amizade e pelo apoio constantes;

Ao prof. Nathan Bessa Viana, meu querido amigo. Obrigada pelo convite para fazer os experimentos de pinça óptica no seu laboratório. Obrigada pelas horas de conversas sempre agradáveis, pelos “japas”, pelos momentos ímpares e por ter sido uma parte da minha família aí no Rio de Janeiro. Espero que nossa colaboração e nossa amizade se estendam pelos anos;

Ao meu colaborador e grande amigo Dr. Bruno Pontes. Obrigada, primeiramente, pelos experimentos na pinça e por me receber no Rio de Janeiro de maneira muito cordial e solícita por duas vezes e também por me introduzir ao mundo maravilhoso da pinça óptica. Obrigada pelo divertimento, pelos rodízios, pelas conversas na volta pra casa, pelas aventuras na centrífuga-485, pelos lanches diários, pela amizade e por ser a outra parte da minha família carioca;

Ao prof. Vivaldo Moura Neto, por me receber, de braços abertos, nas duas vezes em que estive em seu laboratório na UFRJ. Obrigada pela oportunidade de partilhar reuniões e discussões científicas e também por aceitar gentilmente participar da minha banca de tese. Foi um prazer enorme trabalhar com o senhor;

Ao prof. Herch Moyses Nussenzweig pelos ensinamentos inúmeros durante o período em que estive no LPO. Obrigada por me ensinar a verdadeira Ciência e por me ensinar a motivação diária que deve ter um cientista nesse trabalho quase artesanal que é a costura de ideias, experimentos e teoria. Agradeço também pela oportunidade que tive de conhecer o Físico mais importante do nosso país, aqui, do mundo;

Ao prof. Antônio Figueiredo por ter concedido o financiamento da minha bolsa de doutorado pelo INCT de Fluidos Complexos e por ter aceitado gentilmente participar da minha banca de tese;

Aos demais professores, alunos e amigos que fiz durante o período em que estive nos laboratórios LMC (Laboratório de Morfogênese Celular) e LPO (Laboratório de Pinças Ópticas) na UFRJ;

Às *roomies* da república em que fiquei no RJ: Thabata Duque, Thaís Vasconcellos, Isadora Ramos e Vívian Pacheco pela acolhida e pelos bons momentos de “Faenza”, pipoca, brigadeiro e futebol;

Aos colegas e professores do Laboratório profa. Conceição Machado, que foi minha “casa” durante o mestrado e até a metade do doutorado. Obrigada pelas discussões e inúmeras contribuições ao longo de todos esses anos;

Ao prof. Gregory Kitten e aos alunos do LBCM (Laboratório de Biologia Celular e Molecular) pelos bons momentos e pelas discussões científicas entre um e outro experimento. Obrigada por suportarem meus momentos ruins de estresse pós ou pré-experimentos e por compartilharem comigo os bons resultados e conquistas;

À profa. Ana Maria de Paula pelos experimentos inúmeros no microscópio 2-fótons. Muito obrigada pela amizade e por ser sempre prestativa mesmo quando os experimentos lhe tomavam dias (e noites) inteiros;

Aos amigos do Laboratório de Física Biológica: Ana Paula Alves, Paula Magda Roma, Lívia Síman Gomes e Ulisses Andrade por me ensinarem muito todos os dias. Obrigada Ana e Paula pelos auxílios inúmeros nos experimentos de desfocalização ao longo desses anos;

Aos professores da Física e da Biologia Celular que edificaram o meu conhecimento nessas duas áreas aparentemente tão díspares e ao mesmo tempo tão comuns. Obrigada pelo apoio e pelos ensinamentos;

Aos bioteristas do centro de bioterismo da UFMG, Elmo e Gilmar, pela disponibilidade e pelos camundongos;

Aos amigos e colegas da Biologia Celular e da Física por traçarem comigo esse árduo caminho e por fazê-lo mais leve de ser percorrido ;

Aos diversos colaboradores tanto da Biologia Celular quanto de outros departamentos (no ICB, na Física e na UFRJ) por também fazerem parte deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Astrofísica pelos bons momentos de confraternização, pelos intervalos de horas na salinha do café, pelas festinhas de Natal, pelos rodízios de japonês, pelo carinho e pela união. Obrigada por me aceitarem como membro extra-oficial desde 2003;

Aos amigos fora-da-ciência, sobretudo, pela compreensão quando estive ausente nos eventos e pelos bons momentos de risadas e relaxamento;

Aos professores Rossana Melo, Christopher Kushmerick, Gregory Kitten e Andrea Teixeira por também terem aceitado gentilmente participar da minha banca de tese. Obrigada pelas contribuições e críticas enriquecedoras ao trabalho;

Às secretárias da pós-graduação em Biologia Celular, Sibebe Abreu, Diana Ávila e Izabela Silvino pelos serviços prestados;

Às agências financiadoras: CNPq, Capes, Fapemig e INCT de Fluidos complexos;

A todas as pessoas (e animais) que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
1) INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	
Introdução	12
1.1) Colesterol de membrana e balsas lipídicas: organização, sinalização e manipulação do colesterol por ciclodextrinas	13
1.2) Balsas de membrana e citoesqueleto	16
1.3) Sinaptotagminas, colesterol e exocitose de vesículas	18
1.4) Microdomínios de membrana e a sua interação com patógenos	20
1.5) O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	23
1.6) <i>Trypanosoma cruzi</i> : sinalização e vias de invasão	25
Justificativa	28
2) OBJETIVOS	
2.1) Objetivo geral	31
2.2) Objetivos específicos	31
3) MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1) Células de linhagem contínua	33
3.2) Cultura primárias de cardiomiócitos murinos neonatos	33
3.3) Sequestro e reposição do colesterol	35
3.4) Marcação com Filipina e Toxina Colérica Fluorescente	36
3.5) Quantificação do colesterol	37
3.6) Estudo da exocitose de lisossomos após sequestro de colesterol	38
3.7) Ensaios de viabilidade celular	39

3.8)	Análise quantitativa da dispersão lisossomal	40
3.9)	Marcação de membrana celular para quantificação de área	40
3.10)	Knockdown para sinaptotagmina- 7	41
3.11)	Marcação do citoesqueleto de actina de cardiomiócitos previamente tratados ou não com M β CD	43
3.12)	Ensaio de pull-down para Rho-GTP	43
3.13)	Estudo de mudanças estruturais na membrana e no citoesqueleto dos fibroblastos após tratamento com M β CD via microscopia de desfocalização	45
3.14)	Estudo das propriedades mecânicas celulares (tensão superficial e rigidez de flexão), após tratamento com M β CD, com o auxílio de pinça óptica e microscopia eletrônica de varredura	47
3.15)	Cultivo dos parasitos	51
3.16)	Ensaio de invasão celular	52
3.17)	Ensaio de adesão	52
3.18)	Imunocitoquímica	53
3.19)	Análise estatística	54
4)	RESULTADOS	
4.1)	O tratamento com M β CD diminui a quantidade de colesterol presente na membrana plasmática de cardiomiócitos e fibroblastos	56
4.2)	A depleção do colesterol altera a organização das balsas de membrana em cardiomiócitos	59
4.3)	A depleção do colesterol gera mudança na organização do citoesqueleto de actina em cardiomiócitos e em fibroblastos	62
4.4)	O sequestro de colesterol promove mudanças na dinâmica de membrana e citoesqueleto dos fibroblastos	69
4.5)	O sequestro de colesterol nos fibroblastos aumenta tanto a rigidez de flexão quanto a tensão superficial dessas células	77
4.6)	A depleção do colesterol provoca exocitose lisossomal nos cardiomiócitos e nos fibroblastos	80
4.7)	A depleção de colesterol modifica a distribuição lisossomal nos cardiomiócitos	90
4.8)	A exocitose lisossomal induzida por tratamento com M β CD parece ser diferente daquela induzida por despolimerização do citoesqueleto	97
4.9)	A depleção de colesterol diminui a entrada do <i>T. cruzi</i> em cardiomiócitos primários murinos	100

4.10) A invasão do <i>T. cruzi</i> é restaurada após a reposição do colesterol	103
4.11) A depleção do colesterol diminui a associação do <i>T. cruzi</i> a lisossomos durante sua invasão em cardiomiócitos	103
4.12) A depleção do colesterol não altera a adesão dos tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> aos cardiomiócitos	104
4.13) Tratamento com latrunculina-A, prévio ao sequestro de colesterol, aparentemente, não interfere na taxa de infecção de cardiomiócitos pelo <i>T. cruzi</i>	106
5) DISCUSSÃO	110
6) CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
8) ARTIGO PUBLICADO SOBRE A TESE	140

RESUMO

RESUMO

No presente trabalho, investigamos a importância do colesterol na modulação das propriedades mecânicas celulares e como isto interfere na entrada do parasito flagelado, *Trypanosoma cruzi*, em sua célula hospedeira. Para isto, realizamos estudos de dinâmica celulares, utilizando experimentos de pinça óptica (OT) e de microscopia de desfocalização (DM), bem como ensaios de excitose lisossomal e invasão celular pelo *T. cruzi* em fibroblastos imortalizados de camundongos (WTCL3) e culturas primárias de cardiomiócitos murinos.

Verificamos, através da extração de amarras celulares em células WTCL3, pela técnica de OT que tanto a rigidez de flexão quanto a tensão superficial eram maiores quanto menor a quantidade de colesterol remanescente nos fibroblastos. Já nos experimentos de DM, verificamos que o tratamento com a ciclodextrina capturadora de colesterol diminuiu a amplitude de oscilação da superfície celular, mostrando um enrijecimento celular. Já o tempo de relaxação da mesma aumentou, nos primeiros estágios do tratamento, retornando para valores semelhantes aos valores controle. Essa mudança na dinâmica de celular mediada pelo sequestro de colesterol foi gerada tanto pela reorganização do citoesqueleto cortical de actina quanto pela sua polimerização *de novo*, com formação de fibras de estresse via ativação de Rho.

Demonstramos, em cardiomiócitos e em fibroblastos, que o tratamento com M β CD, mas não com uma ciclodextrina não-depletora de colesterol, promove a excitose de lisossomos nestas células e que este processo, em cardiomiócitos, era independente do cálcio intra e extracelular. Em células epiteliais imortalizadas, NRK, verificamos que a excitose lisossomal induzida pela diminuição do colesterol ocorria mesmo na ausência da proteína sensora de cálcio presente nesta organela, a sinaptotagmina- VII, mostrando que este evento realmente era não dependente deste íon. A excitose mediada pela diminuição do colesterol de membrana levou à secreção principalmente de lisossomos localizados próximos ao córtex celular, diferente do *pool* recrutado mediante o tratamento com drogas despolimerizadoras do citoesqueleto, como a latrunculina-A. Estes dados sugerem a existência de dois *pools* distintos de lisossomos com diferentes dinâmicas de excitose.

Sabemos que o *T. cruzi* necessita tanto de um citoesqueleto cortical relativamente maleável quanto de lisossomos localizados na região próxima ao córtex celular para que consiga infectar a sua célula hospedeira de forma irreversível. Embora haja estudos que apontem para a importância do colesterol de membrana na infectividade do *T. cruzi* na célula hospedeira, a qual diminui consideravelmente após tratamento com ciclodextrinas, em nenhum deles foi determinado o mecanismo pelo qual estes microdomínios de membrana contribuem para a invasão e estabelecimento da infecção pelo *T. cruzi*. Neste trabalho, utilizando cardiomiócitos, células importantes durante a colonização do hospedeiro por este parasito, mostramos que a depleção de colesterol diminui tanto a entrada dos tripomastigotas quanto a associação desses a lisossomos e sugerimos que essa redução da infectividade do parasito está diretamente relacionada à uma diminuição de uma população de lisossomos corticais e a um aumento da rigidez celular dos cardiomiócitos.

Palavras-chave: Colesterol, balsas de membrana, propriedades mecânicas celulares, *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

ABSTRACT

In the present work we have investigated the importance of cholesterol in controlling mechanical properties of cells and how this modulates *Trypanosoma cruzi* entry in host cells. For this we performed studies of cell membrane dynamics using tether extraction with optical tweezers (OT) and defocusing microscopy (DM), as well as lysosomal exocytosis and *T. cruzi* invasion assays in a mouse fibroblast cell line (WTCL3) and primary cultures of neonatal murine cardiomyocytes.

We observed, by OT, that both bending rigidity and surface tension increased when WTCL3 was treated with M β CD, a drug that sequesters cholesterol from cell membranes. Additionally, by DM, we demonstrated that membrane-cytoskeleton relaxation time increased in the beginning of M β CD treatment and decreased in the end, assuming values similar to control. With this technique we have also proved that the amplitude of oscillation diminished during cholesterol depletion, showing that these cells become stiffer. Together, these changes in membrane dynamics involved not only the actin cytoskeleton rearrangement, but also its polymerization *de novo* and stress fiber formation through Rho activation.

Additionally, for cardiomyocytes and fibroblasts, we have proved that treatment with M β CD, but not with a similar cyclodextrin with less affinity for cholesterol, triggered lysosome secretion and that this phenomenon was independent of extracellular and intracellular calcium, at least for cardiomyocytes. By using NRK cells we have also shown that lysosome exocytosis, in the absence of cholesterol, continued to happen even in the absence of synaptotagmin-VII, the calcium sensor protein present in these organelles. Exocytosis triggered by cholesterol removal led to the secretion of lysosomes located near the cell cortex, different from the pool recruited by actin depolymerizing drugs, such as latrunculin-A. These data suggest the existence of at least two different pools with different exocytosis dynamics.

It is well known that *T. cruzi* needs both a relatively malleable actin cytoskeleton and a reservoir of cortical lysosomes in order to invade cells successfully. Although there are evidences that plasma membrane cholesterol is important for *T. cruzi* invasion, since it diminishes severely after cyclodextrin treatment, in none of them was established a mechanism by which cholesterol interferes with *T. cruzi* entry. In this work we showed that for cardiomyocytes, an important cell during host infection, cholesterol depletion not only diminishes *T. cruzi* invasion, but also its association with lysosomal markers at the initial steps of host cell entry. The membrane dynamics change (increasing cortical energy barrier) and lysosomal exocytic events (depleting the cortical lysosome reservoir), triggered by cholesterol sequestration, are most likely the mechanisms by which cholesterol depletion interferes with parasite host cell invasion.

Key words: Cholesterol, membrane rafts, mechanical properties of cells, *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS:

BAPTA-AM: *1,2-bis(o-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic Acid Tetra(acetoxymethyl) Ester*

BSA: *Bovine Serum Albumin*

CTXb: subunidade B da toxina colérica

DAPI: *4-6-diamidino-2-phenylindole*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DRMs: *Detergent Resistant Membranes*

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

EGTA: *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*

GM1: gangliosídeo presente na membrana plasmática, localizado preferencialmente em *rafts*

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HFS: *Hypotonic Fluorochrome Solution*

HyCD: *Hydroxypropyl-gamma Cyclodextrin*

IDL: *Interactive Data Language*

L-15: Meio Leibovitz 15

LAMP-1: *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*

LPG: Lipofosfoglicanos

MβCD: *Methyl-beta Cyclodextrin*

MOI: *Multiplicity of Infection*

N.A: *Numerical Aperture*

PBS: *Phosphate Buffered Saline*

PBS+/: PBS suplementado com 1,2 mM de CaCl₂ e 1,0 mM de MgCl₂

PI: *Propidium Iodide*

PIP2: fosfatidilinositol 4,5- bifosfato

PPD: *P-phenylenediamine*

SNARE: *Soluble NSF Attachment Protein Receptor*

T. cruzi: *Trypanosoma cruzi*

WSC: *Water Soluble Cholesterol*

WTCL3: linhagem imortalizada de fibroblastos originalmente isolada de camundongo C57Bl6, tipo selvagem

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Marcação com Filipina III mostrando a eficiência do sequestro e da reposição de colesterol nos cardiomiócitos primários murinos	p.58
Figura 2: Alteração da organização dos microdomínios de membrana em decorrência ao sequestro de colesterol dos cardiomiócitos	p.61
Figura 3: Depleção do colesterol modifica o citoesqueleto de actina dos cardiomiócitos	p.65
Figura 4: Depleção do colesterol modifica o citoesqueleto de actina dos fibroblastos	p.66
Figura 5: Depleção do colesterol é capaz de polimerizar o citoesqueleto de actina dos fibroblastos	p.67
Figura 6: O sequestro de colesterol é capaz de ativar a proteína Rho em fibroblastos	p.68
Figura 7: Fibroblasto, visto desfocalizado de 1 µm. Detalhe para área em amarelo escolhida para análise	p.71
Figura 8: Imagens do fibroblasto visto, no microscópio de desfocalização, ao longo de 55 minutos de experimento	p.72
Figura 9: Gráficos representativos da correlação temporal dos fibroblastos analisados por microscopia de desfocalização antes e após o sequestro de colesterol	p.73
Figura 10: Gráficos em barra mostrando as médias dos tempos de relaxação medidos para fibroblastos tratados com 5 ou 10 mM de MβCD	p.75
Figura 11: Gráficos em barra mostrando as médias das amplitudes de oscilação celular medidos para fibroblastos tratados com 5 ou 10 mM de MβCD	p.76
Figura 12: Imagens da amarra sendo extraída do fibroblasto e de outros parâmetros importantes determinados pela técnica de pinçamento óptico	p.78
Figura 13: Ensaio enzimático de detecção da enzima lisossomal beta-hexosaminidase em fibroblastos tratados com MβCD	p.84
Figura 14: Ensaio enzimático de detecção da enzima lisossomal beta-hexosaminidase em cardiomiócitos tratados com MβCD na presença e na ausência de Ca ²⁺ extracelular	p.85
Figura 15: Ensaio de viabilidade celular em cardiomiócitos tratados com MβCD na presença e na ausência de Ca ²⁺ extracelular	p.86

Figura 16: Ensaio enzimático de detecção da enzima lisossomal beta-hexosaminidase em cardiomiócitos tratados com MβCD na presença e na ausência de Ca ²⁺ intracelular	p.87
Figura 17: Ensaio enzimático de detecção da enzima lisossomal beta-hexosaminidase em células NRK tratadas com MβCD na presença e na ausência da proteína sinaptotagmina-7	p.88
Figura 18: Imagem qualitativa mostrando a mudança na distribuição dos lisossomos nos cardiomiócitos mediante sequestro e reposição do colesterol	p.92
Figura 19: Análise quantitativa da dispersão lisossomal de cardiomiócitos submetidos ao sequestro e reposição do colesterol	p.94
Figura 20: A média das áreas dos cardiomiócitos tratados com MβCD não é alterada em comparação às células controle	p.96
Figura 21: Depleção do colesterol promove exocitose lisossomal na presença ou na ausência de um citoesqueleto de actina íntegro	p.99
Figura 22: Redução da entrada do <i>T. cruzi</i> e da associação dos mesmos a lisossomos em cardiomiócitos submetidos ao tratamento com MβCD	p.101
Figura 23: Imagem em Giemsa mostrando que a adesão do <i>T. cruzi</i> à membrana dos cardiomiócitos não é alterada pelo tratamento com MβCD	p.105
Figura 24: O tratamento com Iatrunclina-A, prévio à incubação com MβCD, não altera a taxa de infecção dos cardiomiócitos por tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	p.108

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores da quantidade de colesterol por miligrama de proteína presente nos fibroblastos antes e após o sequestro de colesterol com 5 ou 10 mM de M β CDp.59

Tabela 2: Valores da tensão superficial e rigidez de flexão, obtidos a partir da extração de amarras por pinçamento óptico, dos fibroblastos controle ou tratados com 5 ou 10mM de M β CDp.79

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1) INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Introdução

1.1) Colesterol de membrana e balsas lipídicas: organização, sinalização e manipulação do colesterol por ciclodextrinas

As membranas celulares são estruturas complexas formadas por uma bicamada lipídica fluida, à qual estão associados diversas proteínas e glicídios que possuem funções biológicas variadas. Sabe-se ainda que estas membranas são altamente organizadas e apresentam microdomínios estruturais e funcionais específicos.

Dentre os lipídios que compõem as membranas celulares, o colesterol é um componente estrutural essencial, presente nas membranas da maioria dos vertebrados. Algumas das funções do colesterol são permitir a formação de uma barreira semipermeável entre os compartimentos celulares e regular a fluidez de membrana (revisto por Ikonen, 2008). O colesterol contém, em sua cadeia, quatro anéis que conferem propriedades biofísicas especiais às membranas, aumentando a organização (coesão e empacotamento) dos lipídios vizinhos. Como a cadeia carbônica do colesterol é rígida, este lipídio é empacotado juntamente com lipídios de cadeia longa, os lipídios saturados, uma vez que as cadeias dos lipídios insaturados são mais flexíveis e encurtadas, em comparação aos lipídios saturados (Simons e Vaz, 2004). Dessa forma, o colesterol acaba formando na membrana, regiões ordenadas com lipídios empacotados conferindo a essas membranas uma menor fluidez e uma menor permeabilidade a moléculas polares (Simons e Vaz, 2004).

Dentre as regiões ordenadas ricas em colesterol pode-se destacar os microdomínios de membrana denominados de balsas lipídicas ou *lipid rafts*. As balsas lipídicas foram primeiramente descritas como pequenas plataformas compostas principalmente por esfingolipídios e colesterol, fortemente associados, formando pequenas plataformas resistentes à dissolução por detergente (revisto por Simons e Ehehalt, 2002 e Simons e Ikonen, 1997) e, por isto, eram também chamadas de membranas resistentes a detergente ou DRMs (*Detergent Resistant Membranes*). Dentro

destas balsas lipídicas foram ainda descritas uma série de proteínas, as quais participam da função destes microdomínios de membrana. Devido à grande variação de resultados e heterogeneidade de conceitos para estas estruturas, após uma convenção de especialistas (*Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function*) as mesmas não mais são caracterizadas por sua resistência a detergentes e uma série de novos critérios foi criada para a sua identificação. Hoje estas estruturas são denominadas de *membrane rafts* ou balsas de membrana, e representam pequenos domínios de membrana de aproximadamente 10–200 nm, heterogêneos, altamente dinâmicos, ricos em esterol e esfingolípídios que compartimentalizam processos celulares específicos (revisto por Pike, 2006). Estas balsas de membrana podem se estabilizar formando estruturas maiores através de interações proteína-proteína ou proteína lipídio (revisto por Pike, 2006).

Dadas as suas características específicas, as balsas lipídicas desempenham variados papéis celulares dentre eles: sinalização celular, organização molecular e tráfego de membranas (Lafont e van der Goot, 2005). Com relação à sinalização celular, estudos mostram que essas regiões concentram plataformas para receptores individuais os quais são ativados mediante associação com um ligante. Acredita-se que a localização de receptores em regiões de balsas de membrana poderia proteger os eventos de sinalização evitando a ação de enzimas não pertencentes a essas regiões (como as fosfatases, por exemplo) e que poderiam interferir no processo. Geralmente a ligação de uma proteína ao seu receptor em um microambiente próprio gera o recrutamento de outras proteínas para este microambiente onde o estado de fosforilação das mesmas pode ser alterado por enzimas locais resultando assim no disparo de uma via de sinalização (revisto por Simons e Toomre, 2000). Algumas proteínas sinalizam via balsas de membrana, como, por exemplo, as proteínas-G (Insel *et al.*, 2005). Existem três modelos principais que explicam a sinalização intracelular via balsas de membrana. No primeiro modelo, os receptores, já associados às balsas no estado estacionário, são ativados por associação do ligante e consequente dimerização. No segundo modelo, no qual os receptores em estado estacionário têm baixa afinidade pelas regiões de balsas, a ligação do ligante ao receptor leva à sua oligomerização e realocação em regiões de balsas. Esta oligomerização é responsável pela ativação da cascata de sinalização. No terceiro e último modelo, receptores ativados, localizados em balsas de membrana distintas, podem recrutar proteínas capazes de se ligar de maneira

cruzada com proteínas presentes em outros microdomínios de membrana. Esta ligação cruzada gera uma coalescência entre as regiões de balsas de membrana, amplificando assim moléculas de sinalização e excluindo moduladores indesejáveis (Simons e Toomre, 2000). Assim, o colesterol também modula funções de proteínas que estão localizadas nestes microdomínios e participa de diversos processos de tráfego de membranas e sinalização (Paila e Chattopadhyay, 2010).

Uma maneira de se estudar indiretamente a importância das balsas de membrana nos eventos celulares é manipulando o conteúdo de colesterol, presente nestes microdomínios, através do uso de ciclodextrinas. As ciclodextrinas são oligômeros cíclicos formados por 6, 7 ou até 8 unidades de glicose. Tais oligossacarídeos apresentam um exterior hidrofílico e um interior hidrofóbico podendo, portanto, veicular substâncias apolares em solventes polares (Davis e Brewster, 2004). As β -ciclodextrinas são as que apresentam maior afinidade pelo colesterol, sendo que a sua forma metilada, a metil-beta ciclodextrina (M β CD) é uma das mais utilizadas. Estudos apontam a membrana plasmática como o maior reservatório de colesterol de toda a célula (Lange, 1991). Sendo assim, a M β CD promove, majoritariamente, o sequestro de colesterol presente na membrana plasmática. Ademais, segundo modelos, a permeabilidade das ciclodextrinas na membrana é pequena e tende a diminuir com o aumento da concentração da ciclodextrina. Sendo assim, a possibilidade de sequestro de colesterol de estoques intracelulares é pequena (Dahan *et al.*, 2009). De acordo com trabalhos publicados, estima-se que a cinética do sequestro de colesterol por ciclodextrinas ocorra, em alguns tipos celulares, em uma dinâmica modulada por dois intervalos temporais: um mais curto, na ordem de 20 segundos, e outro mais lento na ordem de 15-30 minutos (Yancey *et al.*, 1996; Haynes *et al.*, 2000). Yancey e colaboradores propuseram, então, a existência de um *pool* rápido e um *pool* lento do colesterol. Dessa forma, o *pool* rápido seria representado pelo colesterol presente nas balsas ao passo que o *pool* lento seria representado pelos demais reservatórios de colesterol presentes na membrana. Eles sugeriram também que o *pool* lento existia uma vez que o colesterol, localizado nas demais regiões da célula, deveria passar para o *pool* rápido antes de sofrer o sequestro pela ciclodextrina. Assim, alguns pesquisadores propuseram modelos para explicar como a ciclodextrina age no sequestro do colesterol. Um dos modelos mais atuais e mais aceitos é o modelo de ativação-colisão: neste modelo, as moléculas de colesterol são ativadas por protrusão parcial na bicamada e

são, então, capturadas por um acceptor via colisão ou, então, retornam ao seu estado estacionário (Steck *et al.*, 1988). Dessa forma, quando promovemos o sequestro de colesterol por ciclodextrinas podemos estudar a sua importância em eventos celulares que ocorrem via balsas de membrana.

1.2) Balsas de membrana e citoesqueleto

Além de seu papel direto em processos de sinalização celular através da organização de receptores de membrana, outros componentes lipídicos (PIP2) e proteicos (Rho-GTPases e integrinas), que se localizam preferencialmente em balsas, parecem também regular a interação da membrana plasmática com o citoesqueleto (revisto por Levitan & Gooch, 2007). Em 2003, Kwik e colaboradores demonstraram que fibroblastos imortalizados oriundos de pele humana, após tratamento com droga sequestradora de colesterol, apresentaram redução de mobilidade de algumas proteínas na membrana plasmática sendo esta redução uma consequência da reorganização do citoesqueleto após a depleção do colesterol. Ademais, estes pesquisadores demonstraram que a redução na capacidade de difusão de proteínas na membrana estava relacionada a uma diminuição de PIP2 em consequência à redução do conteúdo colestérico, já que quando PIP2 era sequestrado da membrana o quadro de redução da movimentação das proteínas também era observado. Desta maneira foi proposta uma correlação entre microdomínios, PIP2 e citoesqueleto (Kwik *et al.*, 2003). Sabe-se que membros da família de proteínas Rho, tais como Rho, Rac e CDC-42 participam da organização do citoesqueleto cortical conectando este à membrana plasmática.

A pequena guanosina trifosfatase (GTPase) Rho modula o citoesqueleto e controla, portanto, mudanças no formato celular, extensão e/ ou retração da superfície e protruções e invaginações. Sendo assim, a proteína Rho medeia interações entre membrana celular e citoesqueleto (de Curtis e Meldolesi, 2012). A proteína Rho também está envolvida na formação de fibras de estresse e pontos focais de adesão em fibroblastos estimulados por sinais extracelulares, tais como ácido lisofosfatídico (Amano *et al.*, 2007). Este surgimento de fibras de estresse é precedido por fosforilação da cadeia leve de miosina e é acompanhado por um aumento na contractilidade celular (Chrzanowska-Wodnicka e Burridge, 1996). A ativação de Rho, portanto, leva à formação de fibras de estresse. Já Rac induz *ruffling* de membrana e CDC 42 induz

formação de filopodia (revisto por Levitan & Gooch, 2007). Del Pozzo e colaboradores em 2004 demonstraram a localização de Rac1 em regiões de balsas e o papel fundamental desta compartimentalização para a função dessas proteínas. Ao impedir a internalização dos microdomínios pela ligação de gangliosídeos GM1 a *beads* conjugadas com a subunidade B da toxina colérica, impediu-se também a translocação de Rac1 para o citoplasma. Ademais, não foi observada localização em plataformas lipídicas de Rac1 em células cujo conteúdo de colesterol estava reduzido em comparação com células controle (Del Pozzo, 2004). Ainda sobre a influência de regiões ricas em colesterol na regulação do citoesqueleto celular de actina, estudos realizados por Byfield e colaboradores, em 2004, demonstraram que o sequestro de colesterol de células endoteliais da aorta bovina provocou modificações nas propriedades mecânicas destas células quando as mesmas foram submetidas à aplicação de uma pressão negativa por micropipeta. Após a depleção do colesterol, as membranas das células endoteliais apresentaram menor capacidade de deformação e um correspondente aumento do coeficiente elástico (módulo de Young) indicando um aumento da rigidez celular (Byfield *et al.*, 2004).

Estudos posteriores, realizados por Sun e colaboradores (2007), também mostraram que a depleção de colesterol altera a interação da membrana com o citoesqueleto celular, diminuindo o coeficiente de difusão da membrana. Estudando células endoteliais de aorta bovina esses pesquisadores realizaram o sequestro de colesterol dessas células e, simultaneamente, com o auxílio de um microscópio de força atômica puxaram amarras (nanotubos) celulares que continham tanto membrana quanto citoesqueleto. Fazendo isso eles conseguiam medir, diretamente, a rigidez celular, a viscosidade efetiva da membrana e a associação membrana-citoesqueleto. Ademais, eles também conseguiram medir alterações no coeficiente de difusão dos lipídios na membrana através do uso de uma sonda lipídica. Os resultados obtidos demonstram que o sequestro de colesterol aumentou a energia de adesão entre membrana e citoesqueleto e diminuiu a constante de difusão de lipídios. Mais tarde, Qi e colaboradores (2009) demonstraram que a depleção de colesterol levava à formação de fibras de estresse no citoesqueleto de actina. Estes trabalhos em conjunto mostram a importância do colesterol na dinâmica citoesqueleto-membrana e, conseqüentemente, na regulação de processos celulares mediados pelo citoesqueleto.

1.3) Sinaptotagminas, colesterol e exocitose de vesículas

Sinaptotagminas são proteínas transmembranares que possuem um domínio N-terminal curto e um domínio C-terminal formado por uma região citosólica grande contendo dois domínios de ligação ao cálcio: o domínio C2A e o domínio C2B. Esses domínios de ligação ao cálcio também são responsáveis pela interação entre as sinaptotagminas e proteínas do complexo SNARE, mais especificamente as proteínas t-SNARES, que são importantes na regulação de eventos relacionados à exocitose de vesículas (Jahn e Fasshauer, 2012). Existem, aproximadamente, 16 isoformas de sinaptotagminas nos mamíferos e oito delas apresentam afinidades diferenciais pelo cálcio (Pang e Südhof, 2010).

A sinaptotagmina- 7 (syt-7) participa, por exemplo, da exocitose de grânulos em células neuroendócrinas cromaffin. Nessas células, a sinaptotagmina- 7 apresenta grande afinidade pelo Ca^{2+} e é responsável pela cinética lenta de ligação à esse íon e também de exocitose (exocitose não- sincronizada). Já a sinaptotagmina- 1 (syt-1), que é a isoforma canônica da família das sinaptotagminas, apresenta uma cinética mais rápida de liberação de neurotransmissores (exocitose sincronizada) (Schonn *et al.*, 2008). A sinaptotagmina-7 é expressa de forma ubíqua e é encontrada em outros tecidos que não o nervoso. Essa isoforma é encontrada em lisossomos e isso foi demonstrado pela primeira vez em células NRK e, posteriormente, em células humanas HEK293, em fibroblastos de camundongo 3T3 e em células CHO, de hamster. A presença de syt-7 em lisossomos é muito importante uma vez que esta organela está envolvida em diversos eventos exocíticos Ca^{2+} -dependentes tais como, por exemplo, o reparo de membrana (Andrews e Chakrabarti, 2005). Dessa forma, para investigarmos eventos de exocitose de vesículas e se os mesmos são (ou não regulados por Ca^{2+}) é fundamental que estudemos a participação das sinaptotagminas nesses eventos.

Alguns trabalhos foram feitos com o intuito de investigar a participação do colesterol em eventos de exocitose de vesículas sinápticas em células nervosas. Em 2006, Zamir e colaboradores, realizando experimentos em junções neuromusculares de lagostim, verificaram que o sequestro de colesterol promovido pela incubação das pernas destes animais com 10 mM de M β CD gerou diminuição de exocitose evocada e essa diminuição deveu-se a uma hiperpolarização pré-sináptica e falha na propagação do potencial de ação. Por outro lado, a taxa dos eventos de exocitose espontâneos aumentou e estes eventos eram independentes de Ca^{2+} (Zamir e Charlton, 2006). Em

2007, Wasser e colegas fizeram experimentos de exocitose de vesículas sinápticas em culturas de neurônios hipocámpais. Neste trabalho, os pesquisadores verificaram que, ao tratarem as células com M β CD ou com mevastatina, um inibidor da síntese do colesterol, havia um aumento da ocorrência de eventos de exocitose espontâneos e também de eventos de endocitose compensatórios. Em contrapartida, esses pesquisadores também reportaram uma diminuição dos eventos evocados ou por potencial de ação ou por hipertonicidade (Wasser *et al.* 2007). Em 2009, Linetti e colaboradores também estudaram a participação, não apenas do colesterol como também de esfingolipídios, na exocitose de vesículas sinápticas em neurônios. Para isso, eles incubaram as células com fumonisina B (um inibidor da síntese de esfingolipídios) ou com mevastatina ou ácido zaragóxico (ambos inibidores da síntese do colesterol, ou por agirem na hidroxil-3-metil-CoA redutase 3 ou por agirem na esqualeno sintase, respectivamente). Resultados de microscopia eletrônica de transmissão mostraram que tanto o número quanto a morfologia das vesículas sinápticas presentes nos botões pré-sinápticos permaneceram inalterados mesmo quando o colesterol era depletado dos neurônios. O tratamento com ácido zaragóxico (mas não com fumonisina B) inibiram a endocitose do corante FM1-43 e de um anticorpo anti-sinaptotagmina I. Dessa forma, demonstraram que a exocitose evocada de vesículas sinápticas também estava comprometida em células com menor conteúdo colestérico (Linetti *et al.*, 2009).

Em outros sistemas celulares, alguns pesquisadores também registraram eventos de exocitose, porém, de lisossomos, na presença ou ausência de colesterol. Lisossomos são organelas acídicas que participam não somente da digestão intracelular, mas de diversos outros processos celulares, como autofagia, digestão extracelular e reparo de membrana. No reparo de membrana, uma vez que a membrana plasmática sofre alguma injúria, o cálcio presente no meio extracelular consegue penetrar no interior da célula. Os lisossomos, que possuem em sua membrana a sinaptotagmina- VII (syt-VII), são rapidamente deslocados para o local onde houve o rompimento da membrana e são excitados. Dessa forma, os lisossomos doam membrana para o fechamento da injúria presente na membrana plasmática (Tam *et al.*, 2010). Chen e colaboradores, em 2010, verificaram que o tratamento de fibroblastos com hidroxipropil- β ciclodextrina provocou exocitose lisossomal dependente de Ca²⁺ nessas células (Chen *et al.*, 2010). Ademais, em 2012, Xu e colaboradores também verificaram exocitose lisossomal em células epiteliais MDCK mediante sequestro de colesterol (Xu *et al.*, 2012). Entretanto,

tanto nos trabalhos envolvendo vesículas sinápticas quanto nos trabalhos envolvendo lisossomos não há uma explicação satisfatória do motivo da existência de exocitose de vesículas mediante o sequestro de colesterol e, além disso, ainda não havia sido investigada a participação direta da syt-VII nos eventos de exocitose decorrentes do sequestro de colesterol. Dessa forma, mais estudos devem ser feitos a fim de elucidar tal mecanismo no qual organelas intracitoplasmáticas são secretadas mediante depleção do colesterol da membrana plasmática.

1.4) Microdomínios de membrana e a sua interação com patógenos

Além de suas funções celulares fisiológicas, estes microdomínios de membrana podem funcionar como pontos importantes para a entrada de patógenos na célula, dentre eles: vírus, bactérias e também alguns protozoários (Incardona & Eaton, 2000; Lafont & van der Goot, 2005; Mañes *et al.*, 2003, Vieira *et al.*, 2010).

Com relação à infecção viral, o envolvimento de microdomínios de membrana ocorre nos três estágios principais da infecção: entrada, montagem e brotamento (Soumalainen, 2002; Lu *et al.*, 2008). Dentre os vírus não-envelopados, um dos mais estudados quanto à sua entrada via balsas é o vírus SV40 (Vírus Símio 40). A infecção pelo vírus SV40 tem início quando ele se liga a moléculas de MHC do tipo I (Chazal & Gerlier, 2003). Após esta ligação, o SV40 se associa diretamente a cavéolas levando à perda de fibras de estresse de actina e ao aparecimento de caudas de actina emanando da cavéola que envolve o vírus (Pelkmans *et al.*, 2002). Em seguida, a cavéola (contendo o vírus) é direcionada para o retículo endoplasmático onde o vírus é desmontado e o processo infectivo prossegue (Chazal & Gerlier, 2003). Vírus envelopados também dependem dos microdomínios de membrana para o processo de internalização e fusão (Takahashi & Suzuki, 2011). A entrada dos vírus envelopados envolve ancoragem e aproximação entre o patógeno e a membrana da célula hospedeira. Com o aumento desta aproximação ocorre fusão entre as membranas do vírus e da célula permitindo a entrada do material genético viral. Este processo de fusão entre as membranas do envelope viral e da célula hospedeira requer conversão das glicoproteínas do envelope viral da sua forma nativa (Ev1) para a sua forma ativada por fusão (Chazal & Gerlier, 2003). As glicoproteínas de diversos vírus envelopados, dentre eles o HIV, associam-se a microdomínios de membrana durante os estágios iniciais de infecção (revisto por

Vieira *et al.*, 2010). Estágios mais tardios da infecção viral são caracterizados pela organização dos componentes virais em vírions, maturação dos mesmos em partículas virais e a liberação dessas partículas virais através do processo de brotamento (revisto por Vieira *et al.*, 2010). O vírus HIV é empacotado em um envelope lipídico contendo colesterol e esfingolipídios e isso sugere a participação das balsas em processos mais tardios da infecção viral por este patógeno (Campbell *et al.*, 2001). Ao contrário dos vírus não-envelopados, que saem da célula hospedeira por ruptura da membrana plasmática da mesma, os vírus envelopados deixam a célula hospedeira através de um processo conhecido como brotamento. Neste processo, a membrana da célula hospedeira fornece membrana para a formação envelope viral (Chazal & Gerlier, 2003). Estudos demonstram que a composição lipídica deste envelope viral não é aleatória uma vez que glicoproteínas virais redirecionam o vírus para locais determinados onde ocorrerão os processos de montagem e brotamento (Garoff *et al.*, 1998). Evidências demonstram que o processo de brotamento de partículas virais de HIV ocorre em plataformas lipídicas (Campbell *et al.*, 2001). Nesta etapa, o HIV incorpora proteínas regulatórias do complemento residente em balsas as quais permanecem funcionalmente ativas no envelope viral gerando uma regulação para menos da cascata do complemento (Mañes *et al.*, 2003; Riethmüller *et al.*, 2006).

A participação de microdomínios na internalização de bactérias abrange grande diversidade de espécies bacterianas (revisto por Vieira *et al.*, 2010, Riethmüller *et al.*, 2006). Uma das bactérias mais comuns e que causa infecções tanto no trato urinário quanto no digestório é a *Escherichia coli*. A *E. coli* entra nas células epiteliais via uma proteína denominada FimH adesina, um domínio de ligação à manose presente nas fímbrias dessa bactéria (Shin *et al.*, 2000). FimH se liga à CD48 e desencadeia a formação de fagossomos contendo a *E. coli*, as quais conseguem escapar da via endocítica. Desta forma, os fagossomos não se fundem a lisossomos e as bactérias podem sobreviver e replicar no interior de vesículas na célula hospedeira. A internalização de *E. coli* via FimH ocorre através da aglutinação de balsas formando plataformas (Shin *et al.*, 2000). Como *E. coli* se liga a CD48, uma proteína ligada a GPI que reside em balsas, é possível que seja a ligação à CD48 que intensifica o processo de clusterização das mesmas durante o processo de entrada (Shin *et al.*, 2000). Já foi demonstrado que a depleção do colesterol ou da síntese do mesmo em células diminui a entrada de *E. coli* mediada por FimH, o que reforça a dependência dos microdomínios

de membrana na entrada desta bactéria (Shin *et al.*, 2000). Dados semelhantes também foram obtidos durante a interação de *E. coli* com células uro-epiteliais, a qual é mediada pela ligação de FimH à uroplaquina-1a, uma proteína presente na porção luminal de células da bexiga (Duncan *et al.*, 2004). A proteína uroplaquina-1a localiza-se em balsas e promove a internalização da *E. coli* em células uroepiteliais através da modificação e clusterização de microdomínios. O tratamento dessas células uroepiteliais com drogas que interferem no metabolismo do colesterol diminuem consideravelmente a internalização da *E. coli*, reforçando assim a participação das balsas na entrada desta bactérias nas vias urinárias (Duncan *et al.*, 2004).

A entrada de alguns protozoários também ocorre via plataformas de membrana (revisto por Vieira *et al.*, 2010). Dentre eles, podemos citar o tripanossomatídeo *Leishmania* (Pucadyil *et al.*, 2004). Este parasito é capaz de entrar, sobreviver e proliferar em macrófagos (Alexander & Russel, 1992). *Leishmania donovani* é o agente causador da leishmaniose visceral. Os lipofosfoglicanos (LPG) de *L. donovani* constituem os maiores glicoconjugados presentes nos promastigotas de *Leishmania* e são essenciais no estabelecimento da infecção em macrófagos. Os LPG são formados por um polímero de unidades Gal β 1,4Man α -PO₄ repetidas que se liga à membrana por uma âncora de lisofosfatidilinositol. O LPG é transferido do parasito para a membrana do macrófago durante a fagocitose e induz o acúmulo de actina-F perifagossomal, sendo esta etapa correlacionada à inibição da maturação do fagossomo. As propriedades biofísicas dos LPG sugerem que, durante o processo de infecção, eles se intercalem nas balsas presentes nos macrófagos dos hospedeiros. Estudos realizados demonstram que a ruptura dos microdomínios aboliu os efeitos do LPG tanto na polimerização de actina quanto no processo de maturação do fagossomo, indicando, portanto, uma participação importante desses microdomínios de membrana no estabelecimento da infecção pela *L. donovani*. (Winberg *et al.*, 2008, revisto por Vieira *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos mostraram que domínios ricos em colesterol estão, de alguma forma, também envolvidos com a entrada do protozoário *T. cruzi* na célula hospedeira (Barrias, *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2007). De acordo com estes autores, a presença de domínios ricos em colesterol na membrana da célula hospedeira contribui de forma significativa para a infectividade das formas tripomastigota metacíclica e amastigota extracelular em células fagocíticas não-profissionais, do tipo Vero e HeLa (Fernandes *et al.*, 2007), ou da forma tripomastigota de cultura em fagócitos, como o macrófago

(Barrias *et al.*, 2007). Estes autores não só demonstraram que marcadores de balsas se co-localizavam com o parasito nos sítios de invasão, mas também que o tratamento prévio da célula hospedeira com drogas capazes de sequestrar o colesterol de membrana levava a uma diminuição da entrada do parasito na célula. Além disso, Fernandes e colaboradores (2007) mostraram que a prévia incubação da célula hospedeira com a subunidade B da toxina colérica (CTXb), que se liga a gangliosídeos de membrana presentes nos microdomínios, também era capaz de diminuir a entrada do *T. cruzi*, correlacionando estes domínios de membrana com o processo de invasão deste parasito.

1.5) O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi*, parasito intracelular obrigatório e agente etiológico da doença de Chagas, é responsável pelo estabelecimento e desenvolvimento de infecção crônica e debilitante em seres humanos.

Durante seu ciclo de vida, o parasito infecta tanto hospedeiros invertebrados quanto vertebrados e estabelece os ciclos silvestre e doméstico. No ciclo silvestre, durante a fase no hospedeiro invertebrado, o *T. cruzi* passa por diversas modificações morfológicas. Inicialmente, a forma tripomastigota sanguínea ingerida pelo inseto vetor se transforma na forma epimastigota na porção inicial do intestino. Em seguida, no intestino posterior, através do processo de metaciclogênese, ele se transforma em tripomastigota metacíclico. Esta forma é a liberada nas fezes e urina do vetor. Desta maneira, os parasitos presentes nos excrementos do vetor, ao entrarem em contato com a pele lesada ou com a mucosa do hospedeiro vertebrado, são capazes de invadir as células deste tecido e iniciar o processo infectivo. No interior das células, os tripomastigotas se transformam em amastigotas que se replicam via divisão binária por aproximadamente nove gerações. Por fim a célula, repleta de formas tripomastigotas, se rompe e libera os parasitos para continuarem a infecção (Revisto por Tyler & Engman, 2001 e por Brener, 1973). Todo este processo, desde a invasão até multiplicação intracelular e liberação de novos parasitos, pode durar de quatro a cinco dias (Revisto por Burleigh & Andrews, 1995b e Andrade & Andrews, 2005).

O ciclo doméstico do parasito ocorre quando vetor e seres humanos/animais domésticos ocupam uma mesma habitação (Revisto por Prata, 2001). De acordo com

estudos estatísticos apresentados pela Organização Mundial da Saúde (WHO-Technical Report Series, 905 apud Dias, 2007), a doença de Chagas afeta em torno de 15-17 milhões de pessoas na América Latina e estima-se que atualmente em torno de 100 milhões de pessoas compõem a faixa de risco de contração da doença (Coura & Borges-Pereira, 2010). A transmissão vetorial é a forma natural de infecção pelo parasito. O homem ainda pode adquirir o parasito através de outros mecanismos, tais como: transfusão de sangue total ou de derivados sanguíneos (10% dos casos - maior rota de transmissão nas zonas urbanas) (Prata, 2001) e transmissão congênita (mais de 15.000 casos por ano só nas áreas endêmicas) (Carlier, 2011). Existem também microepidemias em regiões não-endêmicas como, por exemplo, contaminação via oral por ingestão de caldo de cana ou suco de açaí contaminados com fezes do triatomíneo (Prata, 2001), além de contaminações acidentais em laboratório e a contaminação via transplante de órgãos (Prata, 2001).

A infecção nos seres humanos é dividida em duas fases: fase aguda e fase crônica. A primeira é caracterizada por alta parasitemia e alto parasitismo tecidual. No entanto, na maioria dos pacientes, a fase aguda estabelece-se despercebida devido à escassez de manifestações clínicas características da doença (revisto por Prata, 2001 e Teixeira *et al.*, 2006). Após um intervalo de dois a quatro meses da fase aguda tem início a fase crônica. Esta é caracterizada por baixa parasitemia e baixo parasitismo tecidual. A fase crônica passa por uma forma assintomática que pode persistir por dez a trinta anos ou ao longo de toda a vida do indivíduo infectado. Entretanto, alguns destes pacientes, podem evoluir para quadros mais graves caracterizados por acometimentos cardíaco, digestivo ou cárdio-digestivo (revisto por Prata, 2001 e Teixeira *et al.*, 2006). A prevalência e severidade das diversas formas clínicas da doença de Chagas podem variar e a causa desta variabilidade ainda não está totalmente elucidada (Prata, 2001). A existência de uma distribuição tecidual diferencial de cepas de *T. cruzi*, tanto em humanos como em infecções experimentais, depende de aspectos tanto do hospedeiro quanto do parasito (Vago *et al.*, 2000; Andrade *et al.* 1999; Andrade *et al.* 2002; Freitas *et al.*, 2009 and Andrade *et al.*, 2010) e certamente contribui para este quadro. Entretanto, os mecanismos que desencadeiam este processo de seleção ainda não são totalmente compreendidos.

Na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na patogenicidade da doença de Chagas uma série de estudos tem sido desenvolvida sob o ponto de vista da biologia celular do parasito.

1.6) *Trypanosoma cruzi*: sinalização e vias de invasão

No início da década de 1990, estudos trouxeram novos e importantes achados acerca da interação entre o *T. cruzi* e células fagocíticas não-profissionais. Utilizando tratamento com citocalasina-D, uma droga que interfere na polimerização da actina, Schenkman e colaboradores (Schenkman *et al.* 1991b) verificaram que a entrada do *T. cruzi* em células fagocíticas não-profissionais era um processo independente do citoesqueleto cortical de actina. Ademais, esses mesmos pesquisadores verificaram que a internalização das formas tripomastigotas era um processo ativo independente da força motriz realizada pelo citoesqueleto cortical da célula hospedeira (Schenkman *et al.* 1991b).

No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores realizou outros experimentos com células HeLa (célula humana derivada de um adenocarcinoma cervical) e verificou a formação de protrusões de membrana plasmática em torno do parasito ancorado mesmo após incubação das células com citocalasina D, sugerindo a associação de actina com outras moléculas presentes na membrana, processo desencadeado pela interação entre o parasito e a superfície celular (Schenkman *et al.*, 1992). Sendo assim, haveria a formação de associações estáveis entre parasito e célula hospedeira nas quais a participação ativa dos tripomastigotas em movimento promoveria a internalização dos mesmos através de um mecanismo conhecido como auto-fechamento (*self-zipping*) (Schenkman *et al.*, 1992).

Também no mesmo ano de 1992, Tardieux e colaboradores demonstraram que o recrutamento e a fusão de lisossomos eram eventos iniciais importantes durante o processo de invasão do parasito na célula hospedeira. Esta era, portanto, uma via nova de invasão, na qual os lisossomos surgiam como peças-chave, doando membrana para a formação do vacúolo parasitóforo, concomitante ao processo de internalização dos tripomastigotas do *T. cruzi*. Mais tarde, estes mesmo autores (Tardieux *et al.*, 1994) demonstraram que o processo de invasão envolvia sinalização de cálcio intracelular

dependente de ativação de receptor acoplado à proteína G, já que o tratamento das células com toxina Pertussis levava à uma diminuição do número de parasitos internalizados. Estudos publicados por Rodriguez e colaboradores (1996) também demonstraram a importância de microtúbulos na movimentação e recrutamento de lisossomos durante o processo de invasão do parasito na célula alvo. Mais tarde foi demonstrado que após mobilização e recrutamento, os lisossomos se fundiam à membrana plasmática em um processo dependente de Ca^{2+} e regulado através da atividade de um sensor de cálcio associado a proteínas de fusão, presente na membrana lisossomal, denominado Sinaptotagmina VII (Syt VII). (Caler *et al.*, 2001).

Em 2003, Woolsey e colaboradores verificaram a existência de uma via alternativa de entrada do parasito na célula hospedeira. Nesta via, o vacúolo parasitóforo era formado primeiramente por membrana plasmática e posteriormente adquiria marcadores lisossomais através de um processo independente da maturação usual do fagolisossomo. As duas vias eram distinguidas através da sensibilidade diferencial a inibidores da PI-3 cinase tal como a wortmanina. O tratamento com a wortmannina impedia a ocorrência da via dependente de lisossomo ao passo que parte da invasão mediada pela invaginação da membrana plasmática ainda permanecia. Estes autores também mostraram que, assim como a entrada por via lisossomal, a entrada via membrana plasmática era independente da polimerização de actina (Woolsey *et al.*, 2003).

Outros estudos ainda mais recentes verificaram que a via de entrada pela membrana plasmática só seria viável com a associação e a fusão de lisossomos ao vacúolo parasitóforo (Andrade *et al.* 2004), sem as quais os tripomastigotas gradualmente escapariam das células hospedeiras. Sob este ponto de vista, a invasão dos parasitos nas células poderia ocorrer através da fusão com lisossomos ou no sítio de adesão do parasito à membrana plasmática ou após a invaginação da mesma.

Mais tarde foi demonstrado, em estudos utilizando camundongos deficientes para Syt VII, que a entrada do *T. cruzi* em fibroblastos primários parecia ser independente da fusão de lisossomos na superfície celular e sim dependente da fusão que ocorre logo após a invaginação da membrana (Chakrabarty *et al.*, 2005). Nestas células não foi observada uma diminuição na taxa de invasão celular após tratamento com wortmannina como era observado para as células tipo selvagem. A taxa de invasão em células Syt VII *knock out* era, por sua vez, compatível com a taxa de entrada nas

células tipo selvagem após tratamento com wortmannina, indicando que a fusão dos lisossomos após a invaginação da membrana ocorria por um processo distinto da fusão na superfície celular. Estes autores, então, postularam que Syt VII poderia ser necessária para ultrapassar a barreira formada pelo citoesqueleto cortical de actina, sendo dispensável quando este obstáculo era quebrado durante a invaginação da membrana plasmática celular (Chakrabarty *et al.*, 2005).

O modelo mais recente de entrada de tripomastigotas de cultura de tecidos (TCTs) em células fagocíticas não-profissionais foi proposto por Fernandes e colaboradores em 2011. De acordo com este estudo, os parasitos não só estimulam receptores presentes na membrana da célula hospedeira, mas também causam pequenas injúrias na membrana plasmática das células hospedeiras em momentos prévios à infecção. Tais injúrias, de acordo com estudos anteriores realizados por Tam e colaboradores (Tam *et al.*, 2010), aumentam a permeabilidade da membrana a íons Ca^{2+} oriundos do meio extracelular que, ao entrarem em contato com o meio intracelular, recrutam lisossomos para o sítio de lesão na membrana plasmática. Os lisossomos recrutados fundem-se com a membrana plasmática e, no processo de exocitose, secretam para o meio extracelular a enzima esfingomielinase ácida, a qual cliva o grupo cabeça fosforilcolina presente na esfingomielina, um lipídio abundante na porção externa da membrana plasmática. Como produto desta clivagem tem-se a ceramida, o qual tende a coalescer e formar regiões de depressão na membrana que se destacam formando vesículas intracelulares, em um mecanismo de endocitose compensatória. Sendo assim, quando o *T. cruzi* entra em contato com a célula ele estimula receptores específicos, levando à liberação de Ca^{2+} de estoques intracelulares, e gera microfissuras na membrana, permitindo o influxo de Ca^{2+} do meio extracelular. O aumento de Ca^{2+} induz a exocitose da esfingomielinase e a endocitose compensatória, através da qual o parasito tem acesso ao interior celular e pode dar continuidade ao processo de infecção. Durante este processo, mais vesículas lisossomais se fundem ao vacúolo parasitóforo recém-formado, até que todo o vacúolo esteja recoberto com marcadores lisossomais. (Fernandes *et al.*, 2011).

Após a entrada na célula, com formação do vacúolo parasitóforo contendo membrana lisossomal, o parasito tem que escapar para o citosol celular a fim de se transformar em amastigota e iniciar seu processo de replicação. O escape do vacúolo ocorre devido à secreção pelo parasito, em pH baixo, de uma proteína capaz de se

polimerizar e formar um poro, denominada Tc-Tox (Ley *et al.*, 1990). Uma vez no citosol da célula hospedeira, os amastigotas se replicarão, se diferenciarão em tripomastigotas e estes, após romperem a célula continuarão o ciclo de infecção invadindo outras células hospedeiras.

Justificativa

Alguns trabalhos vêm mostrando nos últimos anos que a depleção do colesterol de membrana em alguns tipos celulares, tais como células endoteliais, fibroblastos humanos e osteoblastos de linhagem, gera modificações no citoesqueleto de actina dessas células (Byfield *et al.*, 2004; Kwik *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2007 e Qi *et al.*, 2009). As modificações no citoesqueleto estão relacionadas ao aumento de fibras de estresse (Qi *et al.*, 2009), à desorganização de PIP2 na membrana (Kwik *et al.*, 2003) e ao aumento de pontos de adesão focal (Norman *et al.*, 2010).

Em geral, células com menor quantidade de colesterol tendem a apresentar uma maior rigidez. Estudos realizados utilizando-se diferentes metodologias, tais como extração de amarras celulares por microscopia de força atômica (Sun *et al.*, 2007) ou aspiração por micropipeta (Byfield *et al.*, 2004) demonstraram um aumento do módulo de Young dessas células depletadas em comparação com células controle, bem como uma diminuição da deformabilidade das mesmas. Já Sun e colaboradores demonstraram um aumento da adesão entre membrana e citoesqueleto nas células com menor conteúdo Colestérico. Dessa forma, na maioria dos tipos celulares, a redução do colesterol parece aumentar a rigidez celular.

Ademais, alguns trabalhos publicados demonstraram que o aumento da tensão superficial de membranas celulares, ou por espriamento das células em substratos ou por exposição dessas células a soluções hipotônicas, por exemplo (Raucher e Sheetz, 1999; Morris e Homann, 2001) levava a um aumento de exocitose de vesículas intracitoplasmáticas, não determinadas, as quais doavam membrana para a membrana plasmática nesse processo de secreção, diminuindo assim a tensão superficial local.

Sendo assim, neste trabalho, propusemos analisar mudanças tanto estruturais de células fixadas quanto mudanças na mecânica e dinâmica celulares por técnicas inéditas nesta área, tais como extração de amarras celulares por pinçamento óptico seguida por

medida do raio da amarra por microscopia eletrônica de varredura e microscopia de desfocalização (uma técnica desenvolvida por membros do Laboratório de Física Biológica da Universidade de Minas Gerais) em células que tiveram seu conteúdo de colesterol de membrana diminuído. Através dessas técnicas nos propusemos a medir propriedades mecânicas tais como rigidez de flexão, tensão superficial, tempo de relaxação e amplitude de relaxação de oscilações nas bordas celulares. Como alterações na tensão superficial podem gerar exocitose de vesículas, nos propusemos também a investigar detalhadamente a origem de tais vesículas. Sendo assim, nos direcionamos a verificar se tais organelas seriam lisossomos uma vez que tais vesículas acídicas estão envolvidas em diversos eventos exocíticos, dentre eles reparo de membrana (Andrews e Chakrabarti, 2005).

Uma vez que o citoesqueleto de actina e a exocitose de vesículas lisossomais são importantes durante o processo de entrada do *T. cruzi* na célula hospedeira e há evidências na literatura da participação do colesterol nos primeiros estágios da entrada deste parasito (Barrias *et al.*, 2007 e Fernandes *et al.*, 2007), nos propusemos a avaliar a importância do colesterol e dos microdomínios na inter-relação parasito – membrana, avaliando sua influência sobre lisossomos e citoesqueleto durante o processo de invasão pelo parasito

OBJETIVOS

2) OBJETIVOS

2.1) Objetivo geral

Avaliar os efeitos do sequestro de colesterol sobre a dinâmica de membrana celular e sua correlação com a entrada de formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* em sua célula hospedeira.

2.2) Objetivos específicos

2.2.1) Avaliar o efeito do sequestro do colesterol de membrana de células em cultura sobre a distribuição de microdomínios de membrana;

2.2.2) Avaliar o efeito do sequestro do colesterol de células em cultura sobre a organização do citoesqueleto cortical de actina;

2.2.3) Avaliar o efeito do sequestro do colesterol de células em cultura sobre possíveis alterações estruturais (mecânicas e dinâmicas) na membrana e no citoesqueleto;

2.2.4) Avaliar o efeito do sequestro do colesterol de células em cultura sobre os eventos de exocitose lisossomal;

2.2.5) Avaliar o efeito do sequestro do colesterol de membrana de células em cultura na infecção pelo *T. cruzi*;

2.2.6) Avaliar o efeito do sequestro do colesterol de membrana de células em cultura sobre a associação do *T. cruzi* com vesículas lisossomais durante o processo de internalização do parasito;

MATERIAIS E MÉTODOS

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Células de linhagem contínua

Linhagens de fibroblastos WTCL3 originalmente isoladas de embriões de camundongo C57BL/6 e imortalizadas, (gentilmente cedidas pelo Dr. Paul Saftig/Kiel Universitat - Alemanha), foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina e 1% de glutamina.

Para ensaios experimentais, os fibroblastos, 80% confluentes em garrafas de 25 cm², foram quimicamente dissociados por solução de tripsina/ EDTA Gibco™ 0,05% , ressuspensos em meio no qual foram cultivados, contados em câmara de Neubauer e semeados. Para os ensaios com células vivas (microscopia de desfocalização ou extração de amarras) as células foram plaqueadas em placas individuais de 35mm, contendo lamínula de vidro quadrada de 18mm no fundo, em uma densidade de 1,0 x 10⁴/mL. Para os ensaios de marcação do citoesqueleto, os fibroblastos foram plaqueados em placas de 24 poços, com lamínula no fundo, numa densidade de 5,0 x 10⁴ células/poço.

3.2) Cultura primária de cardiomiócitos murinos neonatos

Cada cultura primária de cardiomiócitos foi preparada a partir de aproximadamente 15 camundongos neonatos da linhagem *Swiss* com idades entre 1 e 3 dias, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG). Em todos os procedimentos os animais foram limpos com solução de álcool iodado a 1%, sacrificados por decapitação e seus corações foram removidos através de corte realizado ao longo do osso esterno (Protocolo de aprovação no CETEA/UFMG 45/2009). Os corações removidos foram transferidos imediatamente para uma solução-tampão gelada de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) (Sigma- Aldrich ®) estéril (pH 7.4). Com o objetivo de diminuir a contaminação da cultura primária por outros tipos celulares, as aurículas de

todos os corações foram removidas, em lâmina escavada, com o auxílio de um bisturi e de uma pinça. Após a retirada das aurículas, os corações foram submetidos a seis lavagens consecutivas, em HBSS gelado, a fim de remover hemácias e demais contaminantes. Ao final da sexta lavagem, cada coração foi cortado em pequenos pedaços de aproximadamente 2,0 mm², os quais foram, em seguida, transferidos para uma solução enzimática contendo 7,0 mL de HBSS e 1mL de tripsina/ EDTA (*ethylenediamine tetraacetic acid*) Gibco™ 0,25%. Os corações picotados permaneceram nessa solução enzimática por, no mínimo, 16 horas em geladeira, sob agitação, em homogeneizador de tubos longitudinal.

Após a primeira etapa de digestão enzimática com tripsina, foi adicionado à solução 1 mL de *Soybean Trypsin Inhibitor* (Worthington) a 2mg/ mL possibilitando assim a inativação da tripsina. Após 5 minutos da adição do inibidor de tripsina, acrescentou-se à solução, contendo os corações parcialmente digeridos, 5 mL de colagenase tipo II (Worthington) a 1mg/ mL, diluída em meio Leibovitz 15 (L-15) (Sigma- Aldrich ®). Após a adição da colagenase, a preparação foi incubada por 40 minutos à temperatura ambiente, sob constante agitação, em homogeneizador longitudinal. Finda esta etapa, os tecidos digeridos, após repouso de 5 minutos, sofreram dissociação mecânica por pipetagem em refluxos com velocidade aproximada de 1 mL/s por 10 vezes. Caso ainda existissem grumos de tecido, novos ciclos de dissociação mecânica eram realizados (no máximo dois) respeitando um intervalo mínimo de 5 minutos entre eles. Após o processo de dissociação mecânica, a solução contendo as células foi filtrada em *cell strainer* com abertura de poro de 70 µm. Terminada esta etapa de separação celular, a solução permaneceu em repouso por 40 minutos e, em seguida, foi submetida a uma centrifugação por 4 minutos a 313,32 g. O pellet celular foi ressuspensionado em meio DMEM *High Glucose* (Gibco™) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco™) e 1% de solução penicilina/ estreptomicina contendo 10000 U/mL e 10000 µg/mL, respectivamente (Gibco™). A solução celular foi submetida a pré-plaqueamento, em garrafa de 75 cm², por um período de 2 horas, para permitir a adesão diferencial de fibroblastos e demais células contaminantes permitindo assim a purificação das células musculares cardíacas (Sreejit *et al.*, 2008). Durante o processo de pré-plaqueamento as células foram mantidas em incubadora úmida a 37°C com atmosfera de 5% CO₂.

Ao término do pré-plaqueamento o meio contendo as células não aderidas, em sua maioria cardiomiócitos, foi coletado gentilmente e colocado em estufa, num tubo Falcon de 15 mL, até o momento do plaqueamento. Para determinação do número de cardiomiócitos viáveis, 50 μ L da suspensão de células foi coletado e a este volume foi adicionado 50 μ L de corante vital azul de tripan. As células viáveis não coradas foram contadas nos quadrantes externos de uma câmara de Neubauer (sendo o valor final a média dos quatro quadrantes) e o valor resultante foi multiplicado pelo fator de diluição (dois) e pelo fator de correção da câmara (1×10^4), para obtenção do número de células/ml.

Para o plaqueamento definitivo das células foram usadas placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas redondas de 13 mm (uma por poço), previamente tratadas com fibronectina (0,01 mg/ mL) por no mínimo 2 horas a 37°C. As células foram então retiradas da estufa, homogeneizadas levemente e plaqueadas numa densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço. Após o plaqueamento as células foram mantidas em estufa de CO₂ (5%), a 37°C por três dias até a completa adesão celular. No terceiro dia de cultura, o meio antigo de cada poço foi retirado e cada um deles foi lavado, por duas vezes, com solução de PBS+/- (PBS suplementado com 1,2 mM de CaCl₂ e 1,0 mM de MgCl₂), aquecida a 37°C, para a retirada de restos celulares e hemácias. Novo meio DMEM *High Glucose*, com a mesma suplementação descrita previamente, foi adicionado. As células foram mantidas em estufa úmida climatizada (37°C e CO₂ a 5%) por até seis dias (tempo máximo no qual a cultura foi mantida antes dos ensaios experimentais).

3.3) Sequestro e reposição de colesterol

Para depleção de colesterol, as células plaqueadas (fibroblastos ou cardiomiócitos) foram lavadas duas vezes com PBS +/- (PBS suplementado com cálcio e magnésio), para retirada de vestígios de soro e eventuais metabólitos celulares, e incubadas, a 37°C por 45 minutos, com meio DMEM sem soro contendo M β CD nas concentrações de 5,0; 10 ou 15 mM. Como controle, as células foram tratadas com meio DMEM sem soro contendo H γ CD (uma ciclodextrina semelhante ao M β CD, porém com menor afinidade pelo colesterol) nas mesmas concentrações. Durante todo o tratamento as células foram mantidas em incubadora úmida e climatizada (37°C, 5% CO₂). As concentrações utilizadas e o tempo de incubação com as drogas foram

estabelecidos de acordo com dados prévios disponíveis na literatura (Fernandes *et al.*, 2007; Barrias *et al.*, 2007).

Para reposição do colesterol sequestrado, os cardiomiócitos pré-tratados com 15 mM M β CD (Sigma- Aldrich ®) foram incubados em meio DMEM sem soro contendo 0,05 mM de solução de colesterol solúvel em água (WSC- *Water Soluble Cholesterol*) (Sigma- Aldrich ®) por 30 minutos. Durante a reposição as células foram também mantidas na incubadora. Após os tratamentos as células foram lavadas duas vezes com PBS +/- previamente aos demais experimentos.

3.4) Marcação com Filipina e Toxina Colérica fluorescente

Após o sequestro e reposição do colesterol, os cardiomiócitos foram fixados, lavados com PBS e submetidos à marcação ou com Filipina III (Sigma- Aldrich ®), para análise do colesterol de membrana, ou com a subunidade B da toxina colérica conjugada com Alexa Fluor ® 488 (CTXb) (Invitrogen), para análise das regiões de balsas de membrana, de acordo com protocolo descrito anteriormente (Fernandes *et al.*, 2007). Brevemente, para a marcação com CTXb, as células fixadas foram permeabilizadas, por 15 minutos, com solução PGN (PBS/ gelatina a 0,15% e azida sódica a 0,1%) contendo 0,1 % de saponina. Após esta etapa, as células foram marcadas com CTXb (1 μ g/mL) diluído em PGN por 30 minutos. Após a marcação, as células foram examinadas em microscópio confocal Olympus FV300 / WX61WI com objetiva de 60 X/ 0,7 N.A. As imagens foram coletadas pela profa. Ana Maria de Paula, do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com o nosso grupo de pesquisa. As imagens foram analisadas usando o software Fluoview versão 5.0. Para a marcação com a Filipina III foram utilizados dois protocolos. A fim de visualizarmos qualitativamente a distribuição do colesterol na membrana plasmática, os cardiomiócitos tratados e fixados foram marcados tanto com Filipina III (para detecção do colesterol) (100 μ g/ mL in PGN, por 1 hora à temperatura ambiente) quanto com DAPI (marcador nuclear) e visualizados em microscópio de fluorescência comum Zeiss Axioplan equipado com câmera HRC controlada pelo software Axiovision (Zeiss). Para os ensaios quantitativos de depleção/ retorno do colesterol, apenas a Filipina III foi utilizada. Neste caso, foram coletadas imagens de 10 campos/ lamínula com o auxílio de uma objetiva de imersão em óleo (100x, abertura numérica 1,3)

mantendo constantes tanto o tempo de exposição da CCD quanto a intensidade de iluminação na amostra. Após coletadas, as imagens foram analisadas no programa ImageJ (National Institutes of Health) (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para quantificação da fluorescência. Para isso foram escolhidas, em cada imagem, quatro áreas retangulares iguais e para cada uma dessas áreas foi medida a intensidade de fluorescência. Esses valores foram, então, usados para o cálculo da fluorescência média de cada imagem e, posteriormente, de cada grupo experimental.

3.5) Quantificação do colesterol

A fim de quantificarmos a quantidade de colesterol presente nos fibroblastos controle ou tratados com 5 ou 10 mM de M β CD, as células foram lavadas com PBS +/+, para a retirada da ciclodextrina, e, em seguida, incubadas com PBS contendo 0.02% de EDTA (PBS- EDTA) por 5 minutos, a 37°C, 5% CO₂ para destacarmos as células de seu substrato. Em seguida, os fibroblastos foram coletados e lisados, por 1 hora e 30 minutos, a 4°C, sob leve agitação, em solução-tampão contendo 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 5 mM iodoacetamide, 0.025% NaN₃, 1 mM PMSF, 1 mM di-isopropylfluorophosphate e 0.02 U/mL de aprotinina. Após a lise, uma pequena porção dos extratos celulares de cada grupo foi coletada para quantificação de proteína usando o método de Bradford (Bradford, 1976). O restante das amostras foi submetido à extração de lipídios pelo método de Folch (Folch *et al.*, 1956). Resumidamente, os extratos foram diluídos na razão (8:4:3) de clorofórmio: metanol: amostra. Após misturarmos os solventes e as amostras, os tubos permaneceram em repouso por 5 minutos. O próximo passo foi descartar a fase superior (aquosa) e secar a fase inferior (orgânica) com o auxílio de N₂. Os lipídios secos foram, então, submetidos à quantificação de colesterol usando o Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Estes experimentos de quantificação do colesterol pelo teste fluorimétrico Amplex Red foram feitos com o auxílio do prof. Dr. Allan Jefferson Guimarães, do Departamento de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, em colaboração com nosso grupo de pesquisa. Através do uso de um ensaio fluorimétrico, o colesterol presente nas amostras reage com a enzima colesterol oxidase levando à produção de H₂O₂, que é detectado pelo reagente Amplex Red. Primeiramente, a curva-padrão do colesterol foi

feita através da diluição do padrão de colesterol no tampão de reação em concentrações seriadas entre 0 e 40 μM (50 μL /poço de placa de 96 poços escura). O controle negativo usado foi o tampão de reação sem o colesterol ao passo que o controle positivo foi 10 mM de H_2O_2 diluído em tampão de reação. Os lipídios secos, extraídos das células pertencentes aos grupos controle e tratados com M β CD, foram ressuspensos em 500 μL de metanol e 5 μL dessa solução orgânica foi ressuspensa em 45 μL do tampão de reação (1:10) e pipetados na microplaca. Feito isso, 50 μL de uma solução contendo Red Reagent/ peroxidase Horseradish Peroxidase (HRP)/ colesterol oxidase e colesterol esterase foram adicionados a todos os poços e a reação foi incubada por 30 minutos, a 37 °C, no escuro. A fluorescência foi medida em um fluorímetro (Gemini XPS-Molecular Devices) usando comprimentos de onda de 560 nm para excitação e 590 nm para emissão. Os resultados foram obtidos e a quantidade de colesterol, por miligrama de proteína, foi obtida para cada um dos grupos.

3.6) Estudo da exocitose de lisossomos após sequestro de colesterol

A fim de determinarmos se a depleção de colesterol interferia com a fusão de vesículas lisossomais com a membrana plasmática, um ensaio enzimático quantitativo foi feito com o intuito de detectar a quantidade de enzima lisossomal β -hexosaminidase que era secretada para o sobrenadante da cultura. Dessa forma, quanto maior a quantidade de enzima detectada no sobrenadante, maior a ocorrência de eventos exocíticos.

Para tal experimento, expusemos as células às ciclodextrinas M β CD e H γ CD, ambas na concentração de 10 mM, por tempos distintos, na presença ou ausência de Ca^{2+} extracelular (na ausência de Ca^{2+} , o experimento era feito na presença de 7,0 mM de MgCl_2 e EGTA) ou na presença ou ausência de Ca^{2+} intracelular (na ausência de Ca^{2+} intracelular foi utilizado 1 mM de BAPTA-AM, um quelante intracelular de Ca^{2+}). A fim de verificarmos também a participação do citoesqueleto de actina nos eventos exocíticos, realizamos o experimento de exocitose lisossomal após o tratamento com latrunculina-A, 95nM, por uma hora (uma droga capaz de sequestrar os monômeros de actina G presentes no citoplasma ocasionando despolimerização do citoesqueleto) ou após o tratamento com latrunculina-A, nas mesmas condições, seguido pelo tratamento com M β CD na concentração de 10 mM por 45 minutos. Após a incubação com as

drogas, 350 µL do meio extracelular foi coletado, o restante do meio descartado e as células remanescentes no poço foram lisadas com 500µl de solução contendo Triton x-100 (Sigma- Aldrich ®) a 1% em PBS. Tanto o meio extracelular coletado quanto o lisado celular foram incubados com 50 µL do substrato da enzima β-hexosaminidase: 6 mM de 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide (Sigma- Aldrich ®), dissolvido em tampão citrato (pH 4.5). As reações foram paralisadas com a adição de 100 µL de solução contendo 2,0 M de Na₂CO₃-H₂O e 1,1 M de glicina. Os produtos da reação foram lidos em espectrofluorímetro Synergy 2 (365 nm/ 450 nm- 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 presente e, como controle positivo, foi feita a incubação das células com ionomicina 10 µM (Calbiochem) (uma droga que forma poros na membrana, permitindo a passagem de íons cálcio do meio extracelular para o meio intracelular) por 10 minutos.

3.7) Ensaios de viabilidade celular

Após incubação com as drogas MβCD/ HyCD 10 mM ou ionomicina 10 µM por 10 minutos, na presença ou ausência de Ca²⁺, os cardiomiócitos foram lavados, com PBS aquecido, tripsinizados, centrifugados e ressuspensos em solução HFS (*Hypotonic Fluorochrome Solution*) a qual contém 50 µg/mL de iodeto de propídio (PI) diluído em tampão citrato a 0,1% no qual permaneceram por 4 horas, a 4°C, protegidos da luz. Esse ensaio foi feito com o intuito de possibilitar a quantificação de morte celular após o tratamento com as diferentes drogas de forma semelhante a trabalhos já publicados (Idone *et al.*, 2008).

Foi quantificada a fluorescência do PI em 20.000 células com o auxílio de um citômetro de fluxo Becton Dickinson FACscan (BD Biosciences, USA). Estes experimentos no citômetro de fluxo foram feitos com o auxílio do doutorando Pedro Henrique Gazzinelli Guimarães, do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais e da Dra. Helen Lima Del Puerto, do Departamento de Patologia da mesma universidade, ambos em colaboração com nosso grupo de pesquisa. Os resultados foram analisados no programa Cell Quest Pro software (BD Biosciences, USA).

3.8) Análise quantitativa da dispersão lisossomal

Um conjunto de imagens de cardiomiócitos fixados, com seus núcleos e lisossomos marcados, foi utilizado para a quantificação da dispersão lisossomal após o tratamento com as diferentes ciclodextrinas. Através de algoritmo escrito em linguagem IDL (*Interactive Data Language*) foi determinada, para cada imagem, uma distribuição das distâncias lisossomais médias com relação ao raio médio de cada núcleo. Desta forma, foram selecionados, de cada imagem, núcleos relativamente isolados e, através da determinação das coordenadas [x,y] de suas bordas foram calculadas tanto a posição média do centro do núcleo quanto o raio médio R do mesmo.

Ainda usando o algoritmo computacional, a distância D de cada ponto [x,y] da borda nuclear ao centro médio nuclear foi calculada. Foram truncados dos cálculos os lisossomos que estivessem a uma distância maior que 2R uma vez que foram considerados como pertencentes à outra célula que não a que estava em análise. Por ultimo foi definida a razão D/R (distância média de cada lisossomo com relação ao centro do núcleo/ raio nuclear médio). Este procedimento foi repetido para o maior número possível de células isoladas em cada conjunto de imagens pertencentes a cada tratamento específico. Os resultados dessas análises foram representados por histogramas de distribuição de valores D/R para cada grupo experimental.

O programa em IDL bem como as análises das imagens foram feitos pelo Dr. Fábio Pereira Santos, do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais, em colaboração com nosso grupo de pesquisa.

3.9) Marcação de membrana celular para quantificação de área

Após os tratamentos com as ciclodextrinas (M β CD ou H γ CD) as células foram coradas, ainda vivas, com um marcador de membrana plasmática denominado *CellMask Orange Plasma Membrane Stain* (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante. Resumidamente, cardiomiócitos controle não-tratados, tratados com M β CD 15mM, H γ CD 15 mM ou tratados com M β CD 15 mM previamente à reposição com 0,05 mM de WSC , foram lavados com PBS ++ aquecido e transferidos para pocinhos individuais contendo, cada um, 1,0 mL de solução com CellMask a 5 μ g/ mL em DMEM aquecido. As células permaneceram nessa solução por 5 minutos a 37°C.

Terminado este período, as células foram fixadas em solução contendo paraformaldeído a 4%, em DMEM novo, por 10 minutos a 37°C. Na etapa seguinte, as lamínulas, contendo os cardiomiócitos, foram lavadas três vezes e montadas em lâminas com o uso de gel de montagem para fluorescência. As imagens foram coletadas usando objetiva de 60 X/ 0.7 N.A. acoplada a um microscópio Olympus FV300/ WX61WI operando em modo confocal.

3.10) Knockdown para sinaptotagmina- 7

Com o intuito de estudar a participação da syt-7 na exocitose de lisossomos mediante o sequestro de colesterol, fizemos experimentos com células *knock-down* para syt-7. Para fazermos o *knock-down*, plaqueamos células NRK (*Natural Rat Kidney*) na densidade de $1,25 \times 10^5$ células/poço, em placas de 6 poços, em meio DMEM contendo 10% de soro e 1% de penicilina/estreptomicina, 24 horas antes do experimento. No dia seguinte, trocamos o meio das células por meio DMEM contendo 4% de soro e sem antibiótico e incubamos as células por 30 minutos em estufa a 37°C, 5% CO₂. Separadamente, em tubos eppendorf, preparamos os “mix” de transfecção: no primeiro (mix 1) adicionamos 100 µL de Opti-MEM (Invitrogen) e 3 µL de Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Invitrogen), no segundo mix (mix 2) adicionamos 100 µL de Opti-MEM (Invitrogen) e 8 µL do oligo que promove o silenciamento do RNA para syt-7 (Syt7RSS339874 (GCC AAC UCC AUC AUC GUG AAC AUC A)) ou adicionamos 100 µL de Opti-MEM (Invitrogen) e 8 µL do oligo aleatório (*scrambled*), que é utilizado como controle da transfecção. Após deixarmos os mix em repouso por 5 minutos misturamos o mix 1 com o mix 2 e incubamos por mais 15 minutos à temperatura ambiente. Findo o tempo de incubação, as misturas foram gotejadas sobre as células e a reação foi incubada por 24 horas em estufa. Em seguida, o meio das células foi trocado por DMEM 10% de soro e as mesmas permaneceram por mais 48 horas com este meio antes da coleta das células para avaliação do sucesso do silenciamento ou do experimento de exocitose lisossomal que foi feito de acordo com a metodologia previamente descrita.

Para verificarmos o sucesso do ensaio de silenciamento, realizamos uma reação de RT-PCR para obtenção do cDNA das amostras celulares. Para isso, preparamos as

células transfectadas e isolamos o RNA total com Trizol (Invitrogen). Para isolarmos o RNA total, retiramos o meio da placa de 6 poços, adicionamos 1 mL de Trizol em cada poço, homogeneizamos bem, transferimos o homogenato para tubos de microcentrifuga e incubamos por 5 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, adicionamos 200 µL de clorofórmio (Merck) em cada tubo e homogeneizamos os mesmos, por 15 segundos. Incubamos a reação por mais 3 minutos e centrifugamos as amostras, por 15 minutos, 12.000 g e à 4°C. Após a centrifugação, houve a formação de 3 fases, sendo que o RNA se concentrava na fase superior aquosa, a qual foi coletada. Para precipitarmos o RNA, adicionamos 500 µL de isopropanol (Merck) e incubamos, à temperatura ambiente, por 10 minutos. O próximo passo foi centrifugar as amostras por 10 minutos, 12.000 g e à 4°C. Após a centrifugação, o RNA precipitou-se no fundo do tubo. Para lavarmos o RNA, removemos o sobrenadante, adicionamos 1 mL de álcool 75% (Merck) e vortexamos as amostras. Os tubos foram, em seguida, centrifugados a 7.500 g, por 5 minutos, à 4°C. O último passo foi a solubilização do RNA. Para isso, descartamos o sobrenadante, secamos o sedimento e solubilizamos o mesmo em água livre de DNases e RNases (35 µL/ tubo). Em seguida, as amostras foram aquecidas a 60°C por 10 minutos e estocadas em freezer -70°C até a dosagem do RNA para a produção do cDNA. A partir do RNA total foi preparado o cDNA utilizando-se o kit SuperScript III (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi utilizado em ensaio de PCR para averiguar a presença ou não de cDNA correspondente à *syt-7*, utilizando iniciadores específicos (F e R). As sequências dos iniciadores F e R, respectivamente, são as seguintes: *forward*: 5'-GGG TTT CCC TAT GAG AAA GTG GT-3' e *reverse*: 5'-CCT TCC AGA AGG TCT GCA TCT GG-3'. Alternativamente, foi amplificada a sequência correspondente à actina (*housekeeping gene*), como controle experimental, também utilizando iniciadores específicos (F e R) (*forward*: 5'-CCG TAA AGA CCT CTA TGC CA-3', *reverse*: 5'-CAT CTG CTG GAA GGT GGA CA-3').

A PCR foi realizada em um volume final de 10 µL contendo tampão da Taq DNA polimerase (Tris-HCL 10 mM pH 8,4, KCl 50 mM, 0,1% Triton X-100, MgCl₂ 1,5 mM) 2 pmol de cada iniciador específico, 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase (Phoneutra) junto com 1 µL de cDNA. A mistura foi então submetida à 35 ciclos de 1 min a 95 °C para desnaturação, 1 min a 55 °C para anelamento e 1 min a 72 °C para a extensão em termociclador (Eppendorf). No último ciclo a extensão foi feita por 10 min.

Em seguida, o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,1 % corado com brometo de etídio .

A extração de RNA e as reações de RT-PCR foram feitos em colaboração com a aluna de doutorado Thalita Valverde (Laboratório de Biologia Celular e Molecular- Departamento de Morfologia- Universidade Federal de Minas Gerais) e com o Dr. Pedro Aguiar (Laboratório de Genética Bioquímica- Departamento de Bioquímica e Imunologia- Universidade Federal de Minas Gerais).

3.11) Marcação do citoesqueleto de actina de células previamente tratadas ou não com M β CD

Para verificar modificações no citoesqueleto de actina após sequestro de colesterol, células tratadas ou não com M β CD foram marcadas com faloidina conjugada a Alexa Fluor 488®. Após tratamento com as ciclodextrinas as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por 1 hora, à temperatura ambiente. Findo o tempo de fixação, as células foram lavadas uma vez, com PBS ++ e incubadas com solução de Triton X-100 (0,1%) em PBS ++ (500 μ L por poço) para permeabilização da membrana celular.

Após a permeabilização as células foram incubadas com solução de BSA a 1% em PBS ++, por 30 minutos, para o bloqueio de ligações inespecíficas. Em seguida, as células foram incubadas com faloidina conjugada a Alexa Fluor 488® (1:50) em PBS++/ BSA 1% por 20 minutos no escuro e à temperatura ambiente.

Terminada a incubação as células foram novamente lavadas, duas vezes, com PBS++/, sendo o tempo de cada lavagem igual a 5 minutos.

Para corar os núcleos celulares foi utilizado DAPI na diluição de 1:1000 em PBS ++/ por 1 minuto. Após marcação as lamínulas de vidro contendo as células foram montadas em lâminas de vidro, como descrito no item 3.5 e analisadas ou em microscópio de fluorescência comum ou em microscópio confocal assim como descrito anteriormente.

3.12) Ensaio de pull-down para Rho-GTP

A fim de verificarmos a ativação de proteína Rho em nosso sistema, após o sequestro de colesterol, fizemos um experimento de *pull-down* de Rho com o *Active*

Rho Pull-Down and Detection Kit (Thermo Scientific). Esse kit contém a proteína Rhotekin que apresenta 2 domínios de ligação: um domínio RDB e um domínio GST. Ao domínio RBD se liga a resina glutationa, também presente no kit, ao passo que o domínio GST se liga à Rho-GTP. Sendo assim, a proteína Rhotekin consegue se ligar à resina e ao Rho-GTP e, portanto, consegue capturar o Rho ativado para análise. Para quantificação da ativação de Rho nas células, plaqueamos, 24 horas antes, os fibroblastos WTCL3 em placas de 60 mm, na densidade de 2.5×10^6 células/ poço. No dia seguinte, os fibroblastos foram tratados com 10 mM de M β CD por 20 ou 45 minutos e, findo o tempo de tratamento, foram imediatamente lavados com solução TBS gelada (25 mM Tris- HCl, pH = 7.5; 150 mM NaCl). Após a retirada do TBS, as células receberam 500 μ L/ poço de tampão de lise juntamente com um coquetel de inibidores de protease (Aprotinina 0.8 μ M; 2 mM PMSF, 0.01 mM Pepstatina-A, 20 μ M Leupeptina e 5 mM EDTA pH 8.0) e foram raspadas com o auxílio de um *cell scraper* (os procedimentos experimentais foram todos feitos à 4°C). Feito isso, os extratos celulares foram coletados, centrifugados a 16.000g por 15 minutos e os sobrenadantes foram transferidos para tubos coletores acoplados a *spin cups* contendo, cada um, 100 μ L de resina glutationa e 80 μ L da GST-Rhotekin-RBD. Foram preparados também extratos que foram tratados com GDP para controle negativo da ativação de Rho. Após a transferência, os tubos foram vortexados, incubados a 4°C por 1 hora, centrifugados a 6.000 g por 30 segundos e lavados com *lysis/binding/washing buffer*. Em seguida, as amostras receberam 50 μ L do tampão de amostra SDS 2X contendo β -mercaptoetanol e foram fervidas por 5 minutos. Finda esta etapa, as amostras foram corridas em um gel SDS-PAGE, contendo 10% de acrilamida, transferidas para membrana de PVDF (transferência feita em 2,0 L de tampão contendo 28.8 g glicina, 6.08 g de Tris Base e 200 mL de metanol, no gelo, a 100 V por uma hora). Previamente à incubação com o anticorpo primário, a membrana foi bloqueada em tampão TBS 3% BSA à temperatura ambiente, por 2 horas. Em seguida, a membrana foi lavada com TBST (TBS contendo 0.05% de Tween-20), por 5 minutos. Após essa etapa, a membrana foi incubada *overnight* a 4°C com 10 mL de TBST contendo 3% de BSA e 15 μ L de anticorpo anti-Rho. No dia seguinte, a membrana foi lavada por 5 vezes (5 minutos cada vez) com TBST e incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (20 μ L de anticorpo diluído em 10 mL de TBST e 5% de leite em pó, sem gordura) por uma hora à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes (5 minutos cada vez)

e incubada com revelador por quimioluminescência do kit ECL Plus Western Blotting Detection Reagente (GE Healthcare Life Sciences) conforme instruções do fabricante.

Os experimentos de Pull-Down e Western-Blotting foram feitos com o auxílio do professor Aristóboles Mendes e da Dra. Carolina Damas, ambos do Laboratório de Genes Inflamatórios- Departamento de Morfologia- Universidade Federal de Minas Gerais.

3.13) Estudo de mudanças estruturais na membrana e no citoesqueleto dos fibroblastos após tratamento com M β CD via microscopia de desfocalização

Para a análise das modificações estruturais celulares após tratamento com M β CD foi utilizada a técnica de microscopia de desfocalização. Em poucas palavras, a microscopia de desfocalização é uma técnica utilizada em microscópios ópticos, operando em campo claro, que permite a visualização direta e a quantificação de curvaturas e heterogeneidades presentes em superfícies bidimensionais, mesmo que a superfície em si seja transparente (como é o caso da superfície celular, por exemplo).

Como pode ser inferido pelo nome, a microscopia de desfocalização consiste em introduzir uma pequena desfocalização à imagem, a princípio invisível, de um objeto de fase (objeto que modifica apenas a fase da luz, deixando inalterada a intensidade da mesma) sob um microscópio óptico convencional. Assim, o objeto de fase se torna visível, com a introdução de uma pequena desfocalização que faz com que quaisquer irregularidades presentes em sua superfície ou heterogeneidades sejam detectadas através do contraste produzido na imagem (Neto, 2005). A expressão para o contraste obtido por desfocalização é dada por:

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

onde I é a intensidade luminosa do objeto na posição (x, y) , I_0 é a intensidade luminosa média fora do objeto, Δn é a diferença entre os índices de refração do objeto observado e do meio em que ele está imerso, Δf é a desfocalização, em μm , introduzida e $h(x, y)$ é a espessura do objeto. A expressão da desfocalização nos permite obter informações da curvatura celular uma vez que o laplaciano da função $h(x, y)$ ($\nabla^2 h(x, y)$) representa a curvatura local, do objeto analisado, dada em μm^{-1} . Sendo assim, informações obtidas

pelo contraste na microscopia de desfocalização estão diretamente relacionadas a informações de curvatura do objeto.

O objetivo de usarmos a microscopia de desfocalização no nosso trabalho foi entender (e medir) possíveis mudanças nas curvaturas das células (membrana-citoesqueleto) mediante o sequestro de colesterol. Para isso, medimos o tempo de relaxação das membranas, aplicando uma correlação temporal às imagens obtidas durante todo o tratamento. A expressão da autocorrelação temporal é a seguinte:

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

onde $k(\rho, t_0)$ é a curvatura observada na posição ρ no instante t_0 . O valor da função de autocorrelação temporal $F_t(t)$ em cada instante t é uma medida estatística do quanto a curvatura em um ponto da membrana, num instante qualquer está relacionada ao mesmo ponto num intervalo de tempo t . A função de autocorrelação temporal apresenta um decaimento que, nas nossas células pode ser ajustado como uma função exponencial simples, visto que, em média, ao utilizarmos ajustes como exponenciais duplas, por exemplo, a qualidade do ajuste não ficava tão fidedigna como os ajustes de funções exponenciais simples:

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

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

Os experimentos de desfocalização foram feitos em microscópio invertido Nikon Eclipse TI (Nikon), ao qual havia acoplado um filtro verde capaz de absorver comprimentos de onda da luz na faixa de 530 nm. A objetiva utilizada nesse experimento foi a Nikon Apo TIRF 100X, abertura numérica 1,49, que é uma objetiva de imersão em óleo e que foi aquecida, a 37°C, durante todo o experimento. As células ficaram, ao longo dos 55 minutos de procedimento experimental, no interior de uma câmara de CO₂ aquecida (modelo Chamlyde IC- CU:109) (Live Cell Instrument) a qual fornecia 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 11,04 db e uma taxa de captura de 1 frame por segundo. A distância focal foi

mantida fixa, com uma desfocalização de 1 μm , pelo aparato PFS (*Perfect Focus System*) (Nikon), e a calibração dos níveis de cinza da câmera foi feita conforme descrito anteriormente (Agero *et al.*, 2004).

Nos nossos experimentos de desfocalização gravamos os fibroblastos, em DMEM sem soro, por 10 minutos. Em seguida, sem parar a gravação, adicionamos 5 ou 10 mM de M β CD às células e a aquisição de imagens continuou por mais 45 minutos. Para a análise das imagens, foram selecionados no mínimo 10 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 6 análises por região. Todos os experimentos foram analisados usando um *Plugin* do ImageJ desenvolvido pelos membros do Laboratório de Física Biológica. Este *Plugin* calculava 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 com a função representada em (3) e obtivemos os valores dos tempos de relaxação (τ) e das amplitude das curvaturas (A).

Os experimentos envolvendo microscopia de desfocalização foram feitos em colaboração com as alunas de doutorado Paula Magda da Silva Roma e Ana Paula Alves, ambas do Laboratório de Física Biológica, do Departamento de Física da Universidade Federal de Minas Gerais.

3.14) Estudo das propriedades mecânicas celulares (tensão superficial e rigidez de flexão), após tratamento com M β CD, com o auxílio de pinça óptica e microscopia eletrônica de varredura

Antes de entendermos os conceitos de tensão superficial e de rigidez de flexão no âmbito celular, primeiramente vamos explorar um pouco sobre os conceitos físicos de ambas as propriedades. Pense numa gota de água no ar: a forma da gota é esférica de forma que ela minimiza a sua superfície de contato com o que a circunda e, portanto, minimiza sua energia de superfície. Para aumentar a área da gota é necessário um incremento δE na energia, o qual é proporcional ao incremento δS na área, de forma que $\delta E = \sigma \delta S$, em que σ é a tensão superficial do líquido. O significado físico da tensão superficial num líquido está relacionado às interações intermoleculares de coesão tais como as forças de Wan der Waals, pontes de hidrogênio e interações iônicas. No

interior de um líquido, as forças intermoleculares sobre uma molécula são balanceadas ao passo que na interface líquido-ar, por exemplo, essas forças já não são mais equilibradas, uma vez que na interface as moléculas apresentam interações com moléculas distintas, pertencentes a um fluido diferente. Sendo assim, na interface surge uma força resultante para o centro do líquido e essa força é resultado da tensão superficial (Lecuit e Lenne, 2007). Já a rigidez de flexão é a resistência que um material apresenta ao ser deformado por uma força perpendicular ao seu eixo longitudinal. Em outras palavras, é a resistência em dobrar determinado objeto.

Será que é possível comparar uma célula a uma gota de água? De certa forma, as células isoladas (não aderidas a outras células ou a um substrato) são esféricas e, portanto, minimizam a superfície de contato com o meio de cultura que as circunda. Entretanto, ao contrário de uma gota de água, o interior de uma célula é formado por moléculas distintas e por estruturas que estão embebidas no citoplasma, como as organelas, por exemplo. Além disso, a tensão superficial de um líquido é constante ao passo que a tensão superficial de uma célula depende de sua superfície e a mesma é regulada por reservatórios de membrana que se encontram tanto na própria membrana plasmática (dobras e *ruffles*) quanto em membranas de vesículas citoplasmáticas (Lecuit e Lenne, 2007).

Quando a área superficial celular aumenta devido, por exemplo, à aspiração da membrana celular por uma micropipeta ou à retirada de uma amarra de membrana por uma bolinha de poliestireno, acoplada a uma pinça óptica, a tensão superficial, neste caso, é a tensão que se opõe à variação de área celular e depende, primariamente, do citoesqueleto cortical de actina e das interações dinâmicas locais entre este citoesqueleto e a membrana (Tsai *et al.*, 1994).

Quando se extrai uma amarra de membrana com o auxílio da pinça óptica, a rigidez de flexão desta amarra é caracterizada como sendo o esforço necessário para se dobrar ou enrolar esta amarra.

Para medirmos tanto a rigidez de flexão quanto a tensão superficial cortical dos fibroblastos controle ou tratados com M β CD, adotamos o seguinte protocolo experimental: fibroblastos previamente plaqueados foram tratados com M β CD nas concentrações de 5 ou 10 mM e, posteriormente, lavados com PBS +/+. Em seguida, as células receberam meio novo, sem adição de soro, e foram submetidas à extração de amarras de membrana usando o sistema de OT, o qual é dotado de um laser no

infravermelho, Nd:YVO₄ Osprey, com um comprimento de onda de 1.064 μm (Quantronix, East Setauket, NY). O laser apresenta um perfil de intensidade gaussiano (modo TEM₀₀), uma potência máxima de 35W e o perfil de intensidade do laser tem meia largura de 2.3 ± 0.2 mm no plano focal traseiro das lentes objetivas. O laser no infravermelho é acoplado a um microscópio invertido Eclipse (Nikon, Melville, NY), equipado com uma objetiva PLAN APO 100X 1.4 N.A. DIC H (Nikon) que é capaz de gerar a armadilha óptica. A calibração da pinça foi feita conforme descrito previamente (Pontes *et al.*, 2011).

Fibroblastos, tratados ou não com duas concentrações diferentes de M β CD, receberam, diluídos no meio, 1 μL de bolinhas de poliestireno (sem cobertura), cujos raios eram de 1.52 ± 0.2 μm (Polysciences Inc) e cada plaquinha foi, separadamente, colocada no estágio do microscópio. Uma esfera de poliestireno por vez foi capturada com a OT e pressionada, por 5 segundos, contra a membrana de uma célula, escolhida aleatoriamente, a fim de aderir sobre a superfície da mesma. Em seguida, o estágio motorizado do microscópio (Prior Scientific, Rockland, MA) foi posto para movimentar com uma velocidade controlada $V = 1$ $\mu\text{m/s}$. Imagens de todo o processo foram coletadas com o auxílio de uma câmera CCD (*Charged-Couple Device*) C2400 (Hamamatsu) interligada a um sistema de placa de captura digital Scion, modelo no. FG7) usando uma taxa de captura de 10 frames por segundo. A variação da posição de equilíbrio do centro de massa da bolinha aprisionada foi determinada usando o software ImageJ (National Institutes of Health). Usando a calibração da pinça, o deslocamento da posição do centro de massa foi convertido para medir força. Todos os experimentos foram feitos utilizando uma câmera de CO₂ caseira, adaptada ao microscópio, a qual era capaz de manter condições adequadas para as células em cultura (37 °C and 5% CO₂ pressure). Todos os dados foram analisados usando o software Kaleidagraph (Synergy Software, Essex Junction, VT).

A fim de medirmos os raios das amarras extraídas a partir das células controle e tratadas com M β CD, imediatamente após a extração das amarras, as células foram fixadas em solução contendo 2.5% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0.1 M (pH 7.4), por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, os fibroblastos fixados foram lavados com tampão cacodilato 0.1 M e incubados com tetróxido de ósmio (OsO₄) 1% em tampão cacodilato 0.1 M, por 40 minutos. Após este passo, as células foram submetidas à desidratação seriada em etanol, cujas concentrações variavam de 10% a

100%. Na etapa seguinte à desidratação, as células foram removidas das placas, secas no equipamento de ponto crítico CPD 030 (BAL-TEC, Liechtenstein) e montadas em *stubs* de alumínio. Após a montagem das lamínulas as mesmas foram metalizadas com ouro em um *Sputter SCD 050 Sputter Coater* (BAL-TEC) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) FEI QUANTA 250 (FEI Company). A fim de medir o raio das amarras, nós utilizamos a metodologia previamente descrita por Pontes e colaboradores, 2011. Brevemente, definiu-se $g(y)$ como sendo a média do perfil do nível de cinza ao longo do comprimento da amarra na direção perpendicular ao seu eixo (direção do perfil). y é definido como a distância entre um determinado ponto no perfil de nível de cinza e o eixo de simetria da amarra. Nas imagens obtidas por MEV, $g(y)$ não é tão simétrico em relação ao seu pico (efeito que pode ser um artefato devido ao posicionamento do detector do MEV). Em virtude desta assimetria, é adotado um ajuste de curva que leva em conta metade de uma tangente hiperbólica para cada lado da curva (esquerdo- L e direito-R). O ajuste foi definido conforme a expressão que segue:

$$g(y) = B_0 + B_1 \tanh\left(\frac{y - y_L}{\xi}\right) - B_2 \tanh\left(\frac{y - y_R}{\xi}\right) \quad (4)$$

Onde $B_i > 0$ $i=0,1,2$; y_L e y_R são determinados pelo ajuste de curva do programa Kaleidagraph (Synergy Software, EUA). O raio da amarra foi determinado seguindo a equação seguinte:

$$R = \left(\frac{y_L - y_R}{2}\right) \quad (5)$$

Após medirmos o raio da amarra, R , e a força F_0 exercida para extrair cada amarra das células, calculamos tanto a tensão superficial σ quanto a rigidez de flexão κ , de acordo com as equações que seguem:

$$\sigma = \frac{F_0}{4\pi R} \quad (6)$$

$$\kappa = \frac{F_0 R}{2\pi} \quad (7)$$

Todos os experimentos de extração de amarras e de preparação das amostras para microscopia eletrônica foram realizados em conjunto com o Dr. Bruno Pontes, no Laboratório de Pinças Ópticas, localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os experimentos para obtenção das imagens em microscópio eletrônico de varredura foram feitos com o auxílio do doutorado Fernando Pereira de Almeida, do departamento de Microbiologia localizado no Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.15) Cultivo dos parasitos

Células LLC-MK₂, linhagem celular originalmente isolada de epitélio de revestimento de rim de macaco *Rhesus* e posteriormente imortalizada, foram semeadas em garrafas de cultura de 75 cm² e mantidas em meio DMEM contendo 4,0 g/L de glicose, 4,0 mM de glutamina e suplementado com 10% de soro fetal bovino, mais 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL / 10 mg/mL). Sete dias após o plaqueamento, uma das garrafas contendo as células foi submetida à tripsinização (solução de tripsina 0,05% à 37°C) e as células foram repassadas, na proporção 1:20 (uma parte de células em suspensão para cada 20 partes de meio de cultura), para outras garrafas de 75 cm². O restante das garrafas, contendo uma monocamada confluyente de células, foi infectado com 3,0 x 10⁶ tripomastigotas de cultura de células da cepa Y de *T. cruzi*. Após a infecção, as células foram mantidas em meio DMEM contendo 2% de soro fetal bovino e as mesmas concentrações de penicilina/estreptomicina e de glutamina utilizadas no meio contendo 10% de soro. O meio das células foi trocado a cada dois dias. No sétimo dia de infecção, o meio contendo as formas tripomastigotas foi coletado de cada garrafa, transferido para tubos de centrífuga de 50 mL e centrifugado a 447,60 g, por 10 minutos a 25 °C a fim de eliminar as formas amastigotas contaminantes e restos celulares, auxiliando assim na purificação das formas tripomastigotas. Após a centrifugação, os tubos foram transferidos para a incubadora a 37°C, 5% CO₂ por 3-4 horas para permitir que as formas tripomastigotas,

flageladas, subissem para o sobrenadante. Por fim, o sobrenadante destes tubos foi recolhido e as formas tripomastigotas purificadas foram contadas na porção central da câmara de Neubauer e utilizadas ou para manutenção do ciclo de vida do parasito em cultura ou nos ensaios de invasão.

3.16) Ensaios de invasão celular

Os cardiomiócitos plaqueados, pré-tratados ou não, foram expostos às formas tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, provenientes de sobrenadante de cultura de células LLC-MK₂, purificadas e ressuspensas em meio DMEM sem soro. A exposição aos parasitos ocorreu por um período de 40 minutos com uma multiplicidade de infecção (MOI) de 50 parasitos/célula. Durante todo o processo de invasão as células foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂.

Após este período de incubação, as células foram lavadas com PBS +/- (quatro vezes), para a remoção do excesso de parasitos não internalizados, e fixadas em paraformaldeído 4%, recém-preparado, por 12 a 18 horas, a 4°C.

3.17) Ensaios de adesão

Para os ensaios de adesão dos tripomastigotas (Schenkman et al., 1991), os cardiomiócitos, previamente plaqueados e tratados com 15 mM de MβCD, 15 mM de HyCD ou com 0,05 mM de WSC posterior ao sequestro de colesterol, foram lavados duas vezes com HBSS aquecido. Em seguida, as células foram pré-fixadas com glutaraldeído 2% (Sigma- Aldrich ®) em PBS +/- por 5 minutos à 4 °C. Seguindo esta etapa, as células foram lavadas em PBS e permaneceram, por pelo menos 24 horas, em solução de etanolamina a 0,16 M, pH 8,3. Após este passo as células foram lavadas em PBS por três vezes e em DMEM/ BSA 0,2% por uma vez. Os tripomastigotas, já purificados, foram ressuspensos em DMEM/ BSA 0,2% e incubados, por 40 minutos numa MOI de 50 parasitos por células, com os cardiomiócitos. Após a incubação, os tripomastigotas foram retirados e as células lavadas gentilmente com HBSS para a retirada dos parasitos não aderidos. Em seguida, as células foram fixadas com Bouin (19

mL de solução saturada de ácido pícrico e 1 mL de ácido acético) e coradas com Giemsa para a visualização da adesão do *T. cruzi*.

3.18) Imunocitoquímica

A imunocitoquímica para determinação da taxa de invasão celular, bem como o número de parasitos internalizados e associados a lisossomos foi realizada de acordo com protocolos previamente estabelecidos (Tardieux *et al.* 1992; Andrade *et al.* 2004, Albertti *et al.*, 2010). Após o período de fixação, as células foram lavadas com PBS +/- por três vezes para a retirada do excesso de fixador. Em seguida, foram incubadas em uma solução de bloqueio (PBS +/- contendo 2% de albumina sérica bovina - BSA) por 30 minutos a fim de reduzir ligações inespecíficas dos anticorpos. Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas, por 50 minutos, em câmara escura e úmida, com anticorpo anti-tripomastigota de *T. cruzi* (feito em coelho) na diluição de 1:500 em solução de bloqueio. Cessado o período de incubação, três lavagens com solução de bloqueio foram feitas a fim de remover o excesso de anticorpos não ligados. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com anticorpo secundário feito em cabra anti-IgG de coelho e conjugado com o corante Alexa-Fluor[®] 546 (vermelho), na diluição 1:500 em solução de bloqueio. Após este período, as lamínulas foram novamente lavadas quatro vezes com solução de bloqueio. Estas duas marcações iniciais foram feitas a fim de que as formas tripomastigotas extracelulares do *T. cruzi* pudessem ser identificadas.

Para que pudessemos avaliar os tripomastigotas internalizados e associados a lisossomos, foi feita a permeabilização das células através da incubação das mesmas em solução de bloqueio contendo 0,5% de saponina por 30 minutos. O passo seguinte foi a exposição das células ao anticorpo monoclonal anti- LAMP 1 de camundongo (uma glicoproteína lisossomal), feito em rato (Hybridoma Bank - 1D4B). Esta exposição ocorreu na diluição de 1:50 em solução de bloqueio contendo saponina por um período de 45 minutos. Passado o período de incubação as lamínulas foram lavadas com solução de bloqueio contendo saponina por três vezes. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário feito em cabra anti-IgG de rato conjugado com Alexa-Fluor[®] 488 (verde) diluído 1:250 em solução de bloqueio contendo saponina por um período de 40 minutos. Após a incubação, as lamínulas foram lavadas três vezes com solução de bloqueio contendo saponina e duas vezes com PBS+/. Mediante esta marcação foi

possível visualizar as formas tripomastigotas intracelulares associados a lisossomos, ou seja, que se encontravam em um vacúolo parasitóforo contendo marcadores lisossomais.

Em sequência, o DNA nuclear de células e parasitos, bem como o DNA dos cinetoplastos de *T. cruzi*, foram marcados com um composto fluorescente com afinidade para DNA, DAPI (4-6-diamidino-2-phenylindole) (azul), por um minuto. Em seguida as lamínulas foram lavadas quatro vezes com PBS+/, para a retirada do excesso de DAPI, montadas em lâminas de vidro na presença de gel de montagem para fluorescência (10 mg de PPD- *P-phenylenediamine* - em 10 mL de solução 9:1 de glicerol: Tris pH 8.6) e seladas, em suas bordas, com esmalte incolor. As lâminas permaneceram no interior de uma caixa escura sob refrigeração a -20°C até as análises.

Após a imunomarcção foram avaliados o número de parasitos intracelulares por 100 células (com e sem tratamento) e a porcentagem de parasitos que co-localizaram com marcadores lisossomais. Esta análise foi feita em microscópio de fluorescência Axioplan-2 da Zeiss (objetiva de imersão com aumento de 100x, abertura numérica 1.4).

Os experimentos foram realizados em triplicata para as análises estatísticas. Em cada experimento, cada grupo experimental foi constituído por três lamínulas. Em cada lamínula foram contados de 10 a 15 campos aleatórios (totalizando um número mínimo de 250 células). Por campo, foram analisados o número total de células e de parasitos (filtro azul), o número de parasitos extracelulares (filtro vermelho) e o número de parasitos associados a lisossomos (filtro verde).

3.19) Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos três vezes. Para os experimentos de marcação com Filipina, foi feito o teste estatístico ANOVA seguido pela comparação post-hoc de Newman-Keuls. Nos ensaios de invasão celular, foi contabilizado um mínimo de 200 células por lamínula analisada e o teste T de Student foi aplicado para analisar significância estatística entre os grupos. Para analisar o tempo de relaxação de membrana e propriedades mecânicas celulares foi também usado o teste estatístico ANOVA seguido pela comparação post-hoc de Newman-Keuls. Por último, para analisar as distribuições lisossomais e os histogramas

de área celular foram calculadas as frequências cumulativas de cada grupo experimental e a estatística entre eles foi analisada usando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov.

RESULTADOS

4) RESULTADOS

4.1) *O tratamento com M β CD diminui a quantidade de colesterol presente na membrana plasmática de cardiomiócitos e fibroblastos*

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos em forma de toróide e que são muito utilizadas para aumentar a solubilidade de substâncias apolares, tais como o colesterol. Elas o fazem através da incorporação das substâncias apolares em seu interior hidrofóbico, formando complexos de inclusão não-covalentes e solúveis em água. Em particular, as ciclodextrinas e seus derivativos, tais como a metil-beta ciclodextrina (M β CD) já foram demonstrados ser bastante específicos na extração de colesterol em meio a outros lipídios de membrana (revisto por Gimpl e Gehrig-Burger, 2011). Desta forma, a M β CD foi utilizada neste trabalho para a indução do sequestro de colesterol de membrana dos cardiomiócitos e dos fibroblastos murinos.

Para avaliar a eficiência do tratamento com M β CD em cardiomiócitos murinos primários, estas células foram isoladas e plaqueadas, como descrito no item 3.2 da seção de materiais e métodos, e submetidas ao tratamento com 5, 10 ou 15 mM de M β CD ou com colesterol solúvel (após sequestro realizado com a maior concentração de M β CD), e marcadas com Filipina III, um polieno fluorescente que se liga ao colesterol presente na membrana plasmática (Kruth e Vaughan, 1980). As imagens de fluorescência obtidas de cardiomiócitos tratadas com 15 mM de M β CD (Fig. 1B) demonstram claramente uma diminuição da marcação com Filipina III quando comparadas com células do grupo controle (Fig. 1A). Este resultado confirmou a eficácia do tratamento com a ciclodextrina, M β CD, na concentração utilizada, como agente capaz de remover o colesterol de membrana. Adicionalmente, quando as células foram tratadas com M β CD na mesma concentração, e em seguida expostas à 0,05 mM de WSC (*Water Soluble Cholesterol*), a intensidade de fluorescência retornou para padrões semelhantes aos do grupo controle (Fig. 1C), indicando a reposição do colesterol na membrana celular.

Ensaio quantitativo de detecção da intensidade de fluorescência também foram realizados, com o auxílio do software ImageJ, para a avaliação da quantidade de colesterol na membrana antes ou após o tratamento com M β CD, seguido ou não de reposição com colesterol. Assim como demonstrado qualitativamente, a avaliação

quantitativa do sequestro de colesterol mostrou, de forma dependente da concentração de M β CD, uma diminuição da fluorescência do marcador Filipina III, confirmando o sequestro do colesterol de membrana após o tratamento com a droga (Fig. 1D). O tratamento com 5 mM de M β CD levou à uma pequena redução da intensidade de fluorescência, sendo essa diminuição progressivamente menor, até 30% inferior ao valor encontrado para o grupo controle, quando as células foram submetidas ao tratamento com a maior concentração da β ciclodextrina (15 mM). A reposição do colesterol com WSC reverteu o processo de redução da marcação com Filipina demonstrando, portanto, um aumento da fluorescência devido ao retorno do colesterol para a membrana plasmática.

Foram também realizadas análises quantitativas do sequestro de colesterol de membrana dos fibroblastos murinos imortalizados (WTCL3), através do uso do kit Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen). Para este experimento, plaqueamos os fibroblastos 24 horas antes, sequestramos o colesterol com 5 ou 10 mM de M β CD, lisamos as células em tampão de lise contendo inibidores de proteases, isolamos os lipídios totais pelo método de Folch, secamos a fração contendo os lipídios e ressuspendemos em metanol. Este material foi utilizado para a dosagem do colesterol através de um ensaio colorimétrico em um fluorímetro. De acordo com os dados expostos na terceira coluna da Tabela 1 podemos verificar que o sequestro de colesterol com 5 mM de M β CD conseguiu reduzir consideravelmente a dosagem deste lipídio para aproximadamente 22% da quantidade de colesterol presente no grupo controle. O sequestro com a maior dosagem da ciclodextrina apresentou uma redução para aproximadamente 16% da quantidade de colesterol presente nas células não tratadas. Dessa forma, pode-se concluir que o sequestro de colesterol promovido pela incubação dos fibroblastos com 5 mM ou 10 mM de M β CD foi suficiente para reduzir a quantidade deste lipídio em relação aos fibroblastos não tratados com a ciclodextrina.

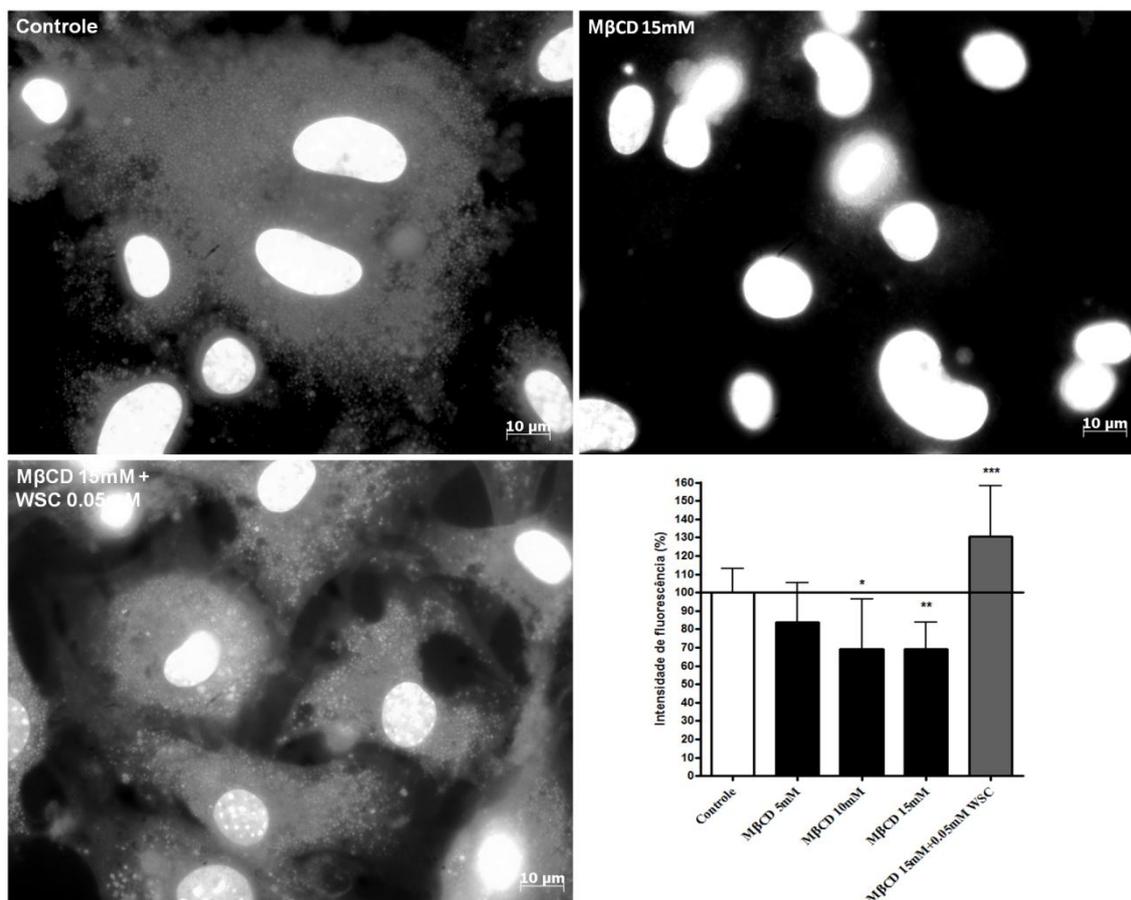


Figura 1: Tratamento com MβCD é eficiente no sequestro do colesterol presente na membrana plasmática dos cardiomiócitos. Imagens de fluorescência dos grupos (A) controle, (B) tratado com 15 mM de MβCD e (C) tratado com 15 mM de MβCD seguido por incubação com 0,05 mM de WSC indicam mudança significativa na fluorescência da Filipina III, ou seja, diminuição da quantidade de colesterol remanescente na membrana plasmática após o sequestro com concentrações distintas de MβCD e o retorno da fluorescência para níveis similares aos do controle após reposição do colesterol com WSC. Os núcleos dos cardiomiócitos estão marcados com DAPI. Dados normalizados (com relação ao controle) são representados como média das triplicatas \pm desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados (* $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$, One way ANOVA seguido por Newman-Keuls). Barra de escala: 10 μ m.

	Concentração colesterol (mmol/ mL)	Extrato total de proteína (mg/ mL)	Colesterol/ proteína (mmol/mg)
Controle	9,102 ± 0.001	0,247 ± 0.001	0,037 ± 0.001
MβCD 5 mM	2,818 ± 0.001	0,344 ± 0.001	0,008 ± 0.001
MβCD 10 mM	2,417 ± 0.001	0,407 ± 0.001	0,006 ± 0.001

Tabela 1: O tratamento com 5 ou 10 mM de MβCD é suficiente para promover a depleção de colesterol dos fibroblastos WTCL3 em relação às células controle. Quantificação da dosagem de colesterol, pelo ensaio colorimétrico com o Amplex Red Cholesterol Assay Kit, e da quantidade total de proteínas presente nos extratos celulares obtidos a partir dos grupos experimentais controle e tratados com 5 ou 10 mM de MβCD. Primeira coluna da tabela refere-se aos valores obtidos pela dosagem dos níveis de colesterol obtidos a partir do output do fluorímetro. A segunda coluna refere-se aos valores de dosagem proteína total obtidos a partir do método de Bradford aplicado aos extratos celulares. A terceira coluna refere-se ao valor do colesterol normalizado pela quantidade de proteína total presente em cada um dos grupos experimentais.

4.2) A depleção do colesterol altera a organização das balsas de membrana em cardiomiócitos

Para avaliarmos o impacto do sequestro do colesterol na organização das balsas de membrana em cardiomiócitos, incubamos as células com diferentes concentrações de ciclodextrinas, fixamos as mesmas e marcamos os microdomínios de membrana utilizando a subunidade B da toxina colérica conjugada a um fluoróforo (CTXb-Alexa 488). A subunidade B da toxina colérica é um homopentâmero que tem afinidade por GM1, um gangliosídeo que reside preferencialmente em regiões de balsas de membrana na face externa da membrana plasmática (Middlebrook e Dorland, 1984; Chinnapen *et al.*, 2007; Day e Kenworthy, 2009). Cardiomiócitos, cujo conteúdo de colesterol permaneceu intacto, obtiveram uma marcação mais intensa com o CTXb fluorescente, indicando possivelmente um predomínio de microdomínios maiores (Fig. 2A) em comparação às células cujo colesterol havia sido sequestrado pelo tratamento com MβCD (Fig. 2B). Por outro lado, células tratadas com uma ciclodextrina inativa para o sequestro do colesterol (HγCD) tiveram um padrão de marcação das balsas lipídicas semelhante ao das células pertencentes ao grupo controle (Fig. 2C). Por último, os cardiomiócitos que tiveram o conteúdo de colesterol diminuído e posteriormente

reposto (Fig. 2D) apresentaram dois tipos de padrão de marcação com CTXb-Alexa 488: tanto células com marcação semelhante às células com colesterol sequestrado (setas), quanto células semelhantes às células controle (asteriscos). Dessa forma, a incubação com M β CD não apenas sequestrou o colesterol dos cardiomiócitos como também promoveu a reorganização das balsas lipídicas neles presentes, processo este que não pôde ser totalmente revertido pela reposição do colesterol.

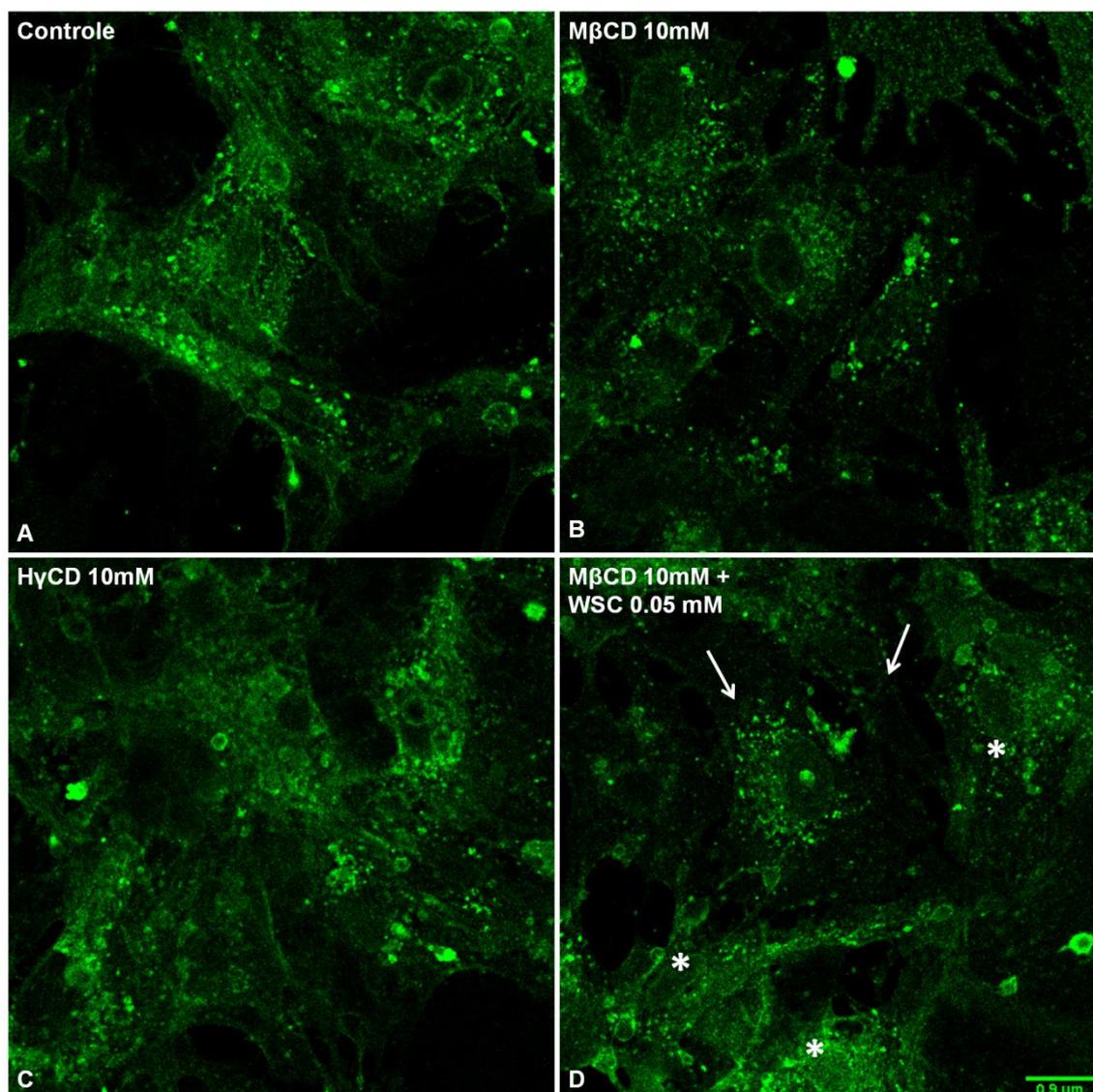


Figura 2: Tratamento com MβCD acarretou mudanças na organização das balsas de membrana dos cardiomiócitos. Imagens obtidas em microscópio confocal de células controle (A) e tratadas com 10mM de MβCD (B) ou 10mM de HγCD (C). Após o tratamento com as ciclodextrinas as células foram lavadas, fixadas e marcadas com CTXb-Alexa 488 o qual reconhece e se liga ao GM1, preferencialmente localizado em balsas de membrana. Em comparação às células controle, as quais apresentam uma marcação mais forte e homogênea do GM1, as células tratadas com 10 mM de MβCD apresentam uma marcação correspondente mais discreta. Já as células tratadas com HγCD apresentam marcação do GM1 similar às células do grupo controle ao passo que as células repostas com colesterol (D) apresentam padrões de marcação semelhantes tanto às células com colesterol sequestrado (setas) quanto às células controle (asteriscos).

4.3) A depleção do colesterol gera mudança na organização do citoesqueleto de actina em cardiomiócitos e em fibroblastos

Estudos prévios demonstraram que, para alguns tipos celulares, o sequestro de colesterol leva a alterações no citoesqueleto de actina e na membrana plasmática tornando este complexo mais rígido como um todo (Sun *et al.* 2007; Qi *et al.*, 2009).

A fim de confirmarmos a ação do tratamento com M β CD na organização do citoesqueleto cortical de actina submetemos culturas de cardiomiócitos ao tratamento com 10 mM de M β CD por 45 minutos, seguida de fixação e marcação com faloidina conjugada com AlexaFluor 488[®], um composto capaz de se ligar à actina F (actina polimerizada). As amostras marcadas foram analisadas em microscópio de fluorescência. Cardiomiócitos controle (Fig. 3 A) apresentaram a marcação do citoesqueleto cortical de actina, além da marcação de filamentos de actina presentes nas miofibrilas intracelulares (padrão bandeado de marcação, formado por zonas claras e escuras), o qual está indicado pelas setas. Por outro lado, em cardiomiócitos tratados apenas com M β CD (Fig. 3 B) foi possível observar alta marcação do citoesqueleto cortical de actina, mais evidente que nas células controle, e com o aparecimento mais frequente de fibras de estresse (SF) e de possíveis pontos de adesão focal (FP). Além disso, nestas células ocorreu o desaparecimento do padrão bandeado do citoesqueleto.

Com o objetivo de avaliar, se o efeito do tratamento com a ciclodextrina se devia a uma reorganização do citoesqueleto de actina pré-existente ou à formação de novos filamentos de actina, os cardiomiócitos foram tratados com 95 μ M de latrunculina-A por 1 hora, seguido ou não por tratamento com 10 mM de M β CD por 45 minutos. A latrunculina-A é uma droga extraída da esponja do mar vermelha, *Latrunculia magnifica*, que causa despolimerização do citoesqueleto de actina por sequestrar os monômeros de actina G dispersos no citoplasma (Spector *et al.*, 1983; Yarmola *et al.*, 2000). Como esperado, o tratamento com a latrunculina-A (Fig. 3 C), promoveu a despolimerização maciça dos filamentos de actina presentes tanto no citoesqueleto cortical quanto nas miofibrilas intracelulares. Por outro lado, o tratamento com M β CD posterior ao tratamento com a latrunculina-A (Fig. 3 D) foi capaz de recuperar parcialmente o citoesqueleto cortical de actina, com formação de actina F,

aparentemente bem próxima à membrana celular. Neste caso, no entanto, não foram observadas fibras de estresse como no grupo tratado apenas com M β CD.

Os mesmos ensaios foram realizados com os fibroblastos WTCL3, os quais foram submetidos ao tratamento com 5 ou 10 mM M β CD por 45 minutos ou alternativamente com latrunculina-A, na mesma dosagem e no mesmo tempo utilizados para os cardiomiócitos. No entanto, nestes ensaios as células foram analisadas em microscópio de fluorescência confocal. Fibroblastos tratados com 5 (Fig 4 D-F) ou 10 mM de M β CD (Fig. 4 G-I), assim como previamente observado para cardiomiócitos, apresentaram uma maior quantidade de fibras de estresse no citoesqueleto cortical de actina em relação aos fibroblastos controle não tratados (Fig 4 A-C). O tratamento com latrunculina-A, nestas células, também mostrou uma redução significativa da quantidade de actina polimerizada (Fig. 5 A-C), assim como para os cardiomiócitos,. Da mesma forma, quando os fibroblastos foram previamente tratados com latrunculina-A e, em seguida, incubados com 5 mM (Fig. 5 D-F) ou 10 mM (Fig 5 G-I) de M β CD percebemos nitidamente uma repolimerização do citoesqueleto de actina, com a formação de novas fibras de estresse.

Qi e colaboradores em 2009 (Qi *et al.*, 2009) demonstraram que o tratamento de células MC3T3 (linhagem de osteoblastos) com M β CD era capaz de induzir a ativação de Rho, uma proteína intimamente ligada à polimerização do citoesqueleto de actina e formação de fibras de estresse. A fim de verificarmos se esta polimerização de actina, induzida por tratamento com M β CD, ocorria via ativação de Rho, realizamos um ensaio de *pull-down* para a detecção de Rho-GTP (Rho ativa). Para isto fibroblastos WTCL3 foram previamente tratados com 10 mM de M β CD por 20 ou 40 minutos, lisados e utilizados nos ensaios de *pull down*. Pudemos verificar que nos 20 primeiros minutos de tratamento com a ciclodextrina sequestradora de colesterol (figura 6 A) já houve ativação considerável de Rho e esta ativação perdurou até o final do tratamento. Foi também dosada a atividade de Rho dos fibroblastos controle e de extratos celulares incubados com GDP, o controle negativo da técnica. A figura 6 B mostra a membrana de PVDF corada com vermelho de Ponceau indicando que em todos os grupos as quantidades de proteínas utilizadas foram semelhantes.

Desta forma, podemos concluir que o sequestro de colesterol promovido pelo tratamento com a M β CD não é capaz apenas de reorganizar o citoesqueleto de actina

como também de induzir a polimerização do mesmo tanto em cardiomiócitos quanto em fibroblastos, sendo que, neste último, a polimerização da actina ocorre via ativação de Rho.

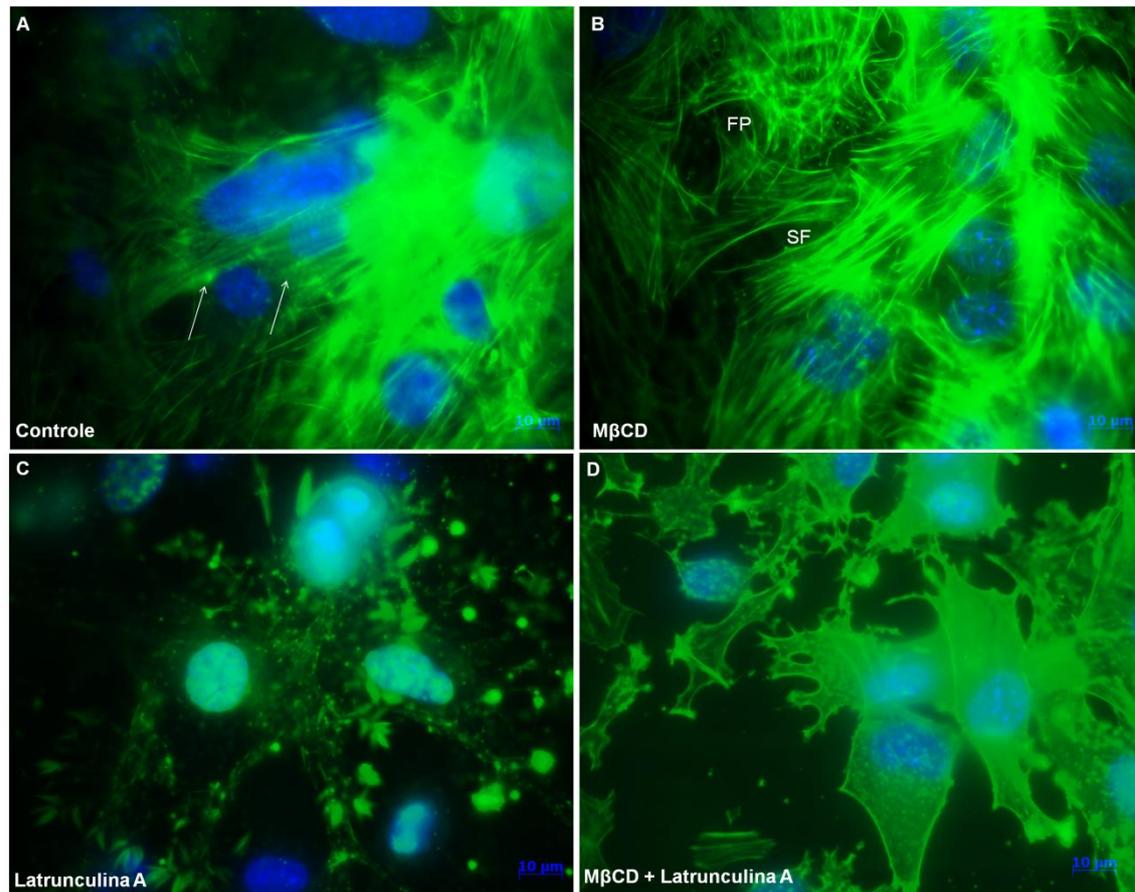


Figura 3: Depleção do colesterol modifica o citoesqueleto de actina dos cardiomiócitos. Imagens representativas do citoesqueleto de actina de cardiomiócitos controle (A), tratados com 10mM de M β CD por 45 minutos (B), tratados com 95 μ M de latrunculina-A por uma hora (C) e tratados com ambas as drogas (D) e marcados com faloidina conjugada a Alexa488[®]. As células foram também marcadas com o fluoróforo DAPI, para a identificação dos núcleos celulares. Setas indicam a presença de citoesqueleto bandeado característico de cardiomiócitos (A), FP: pontos de adesão focal e SF: fibras de estresse (C). Barra de escala: 10 μ m.

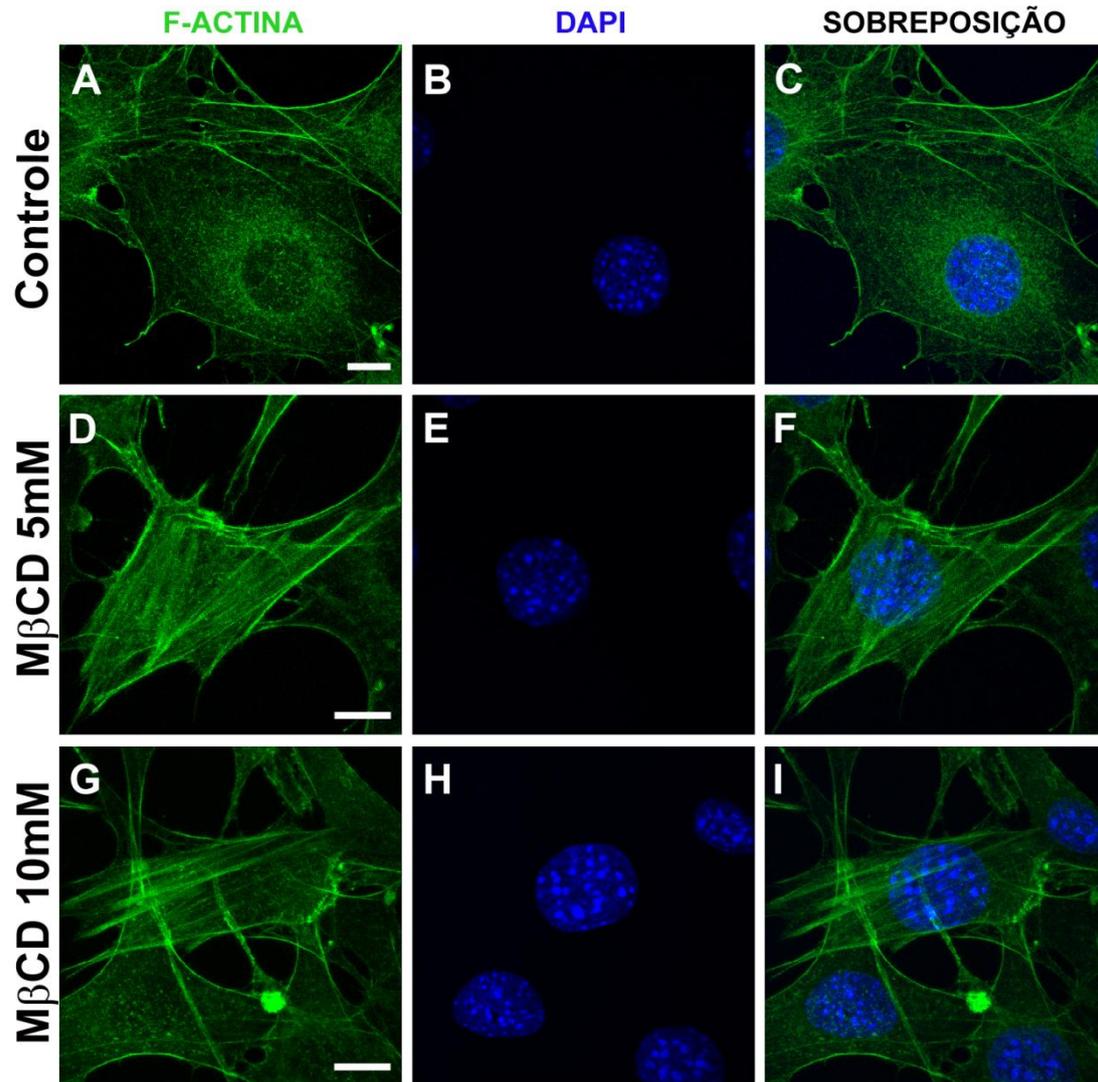


Figura 4: Depleção do colesterol modifica o citoesqueleto de actina dos fibroblastos. Imagens representativas do citoesqueleto de actina de fibroblastos controle (A-C), tratados com 5mM de M β CD por 45 minutos de (D-F), tratados com 10mM de M β CD por 45 minutos (G-I) fixados e marcados com faloidina conjugada a Alexa488[®] e com DAPI (núcleos). A faloidina é uma droga capaz de se ligar à actina –F (filamentosa). Dessa forma, a marcação em verde representa o citoesqueleto de actina fibrilar presente nos fibroblastos submetidos aos diferentes tratamentos. Nota-se o aumento do aparecimento de fibras de estresse nos fibroblastos tratados com as ciclodextrinas em comparação às células não tratadas. Barra de escala: 10 μ m.

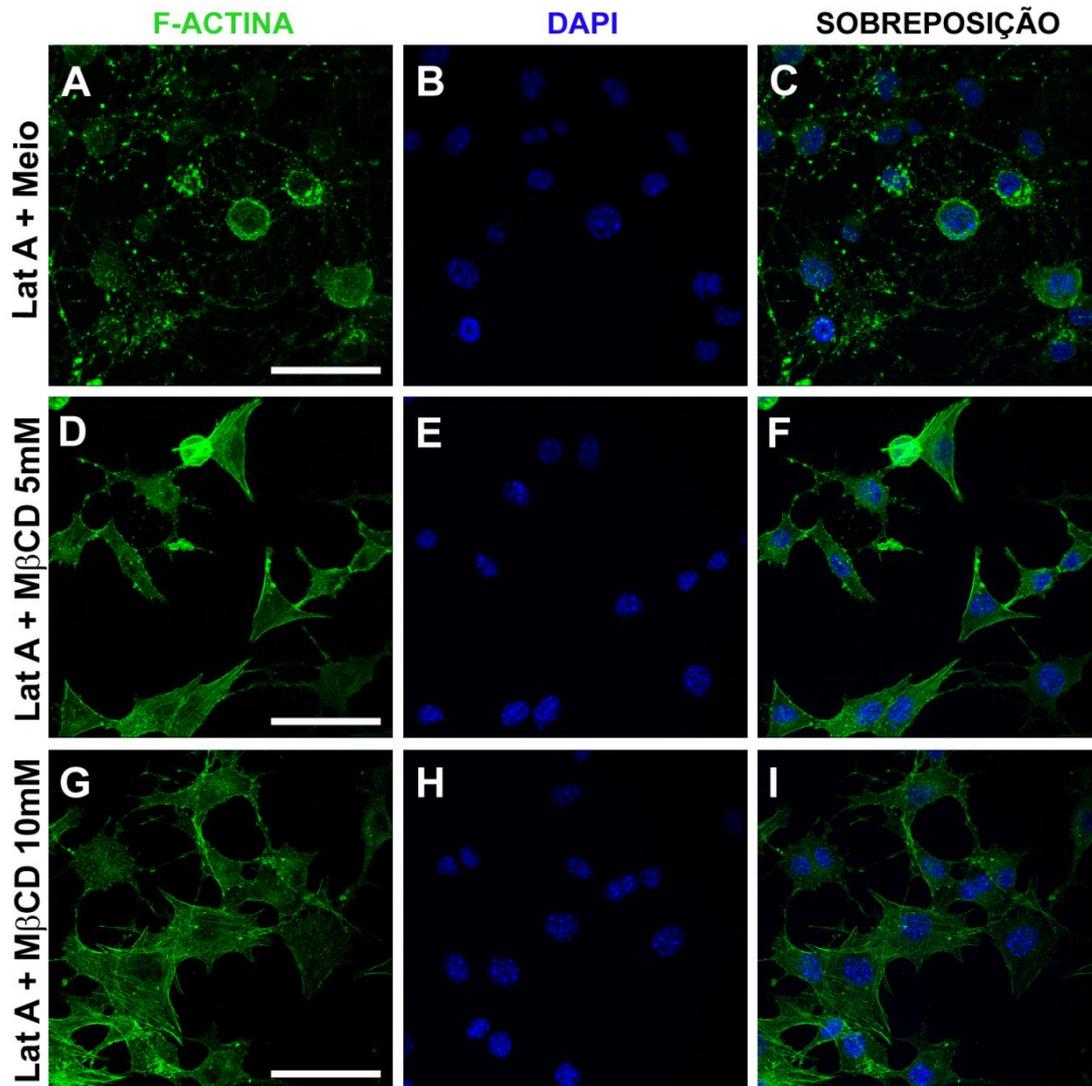


Figura 5: O tratamento com M β CD é capaz de induzir polimerização do citoesqueleto de actina em fibroblastos. Fibroblastos foram submetidos aos seguintes tratamentos: incubação com latrunculina-A, 95 nM, por uma hora seguida por lavagem com PBS e incubação com meio DMEM fresco, sem soro, por 45 minutos (A-C); incubação com prévia com latrunculina seguida por lavagem com PBS +/- e incubação com M β CD 5mM, diluída em meio sem soro, por 45 minutos (D-F) e incubação prévia com latrunculina seguida por lavagem com PBS +/- e incubação com M β CD 10mM, diluída em meio sem soro (G-I). As células foram fixadas simultaneamente e processadas para marcação do citoesqueleto de actina com o uso da faloidina conjugada a Alexa-488. Os núcleos celulares também foram marcados com DAPI. Feita a marcação as células foram fotografadas em microscópio confocal. Barra de escala: 10 μ m.

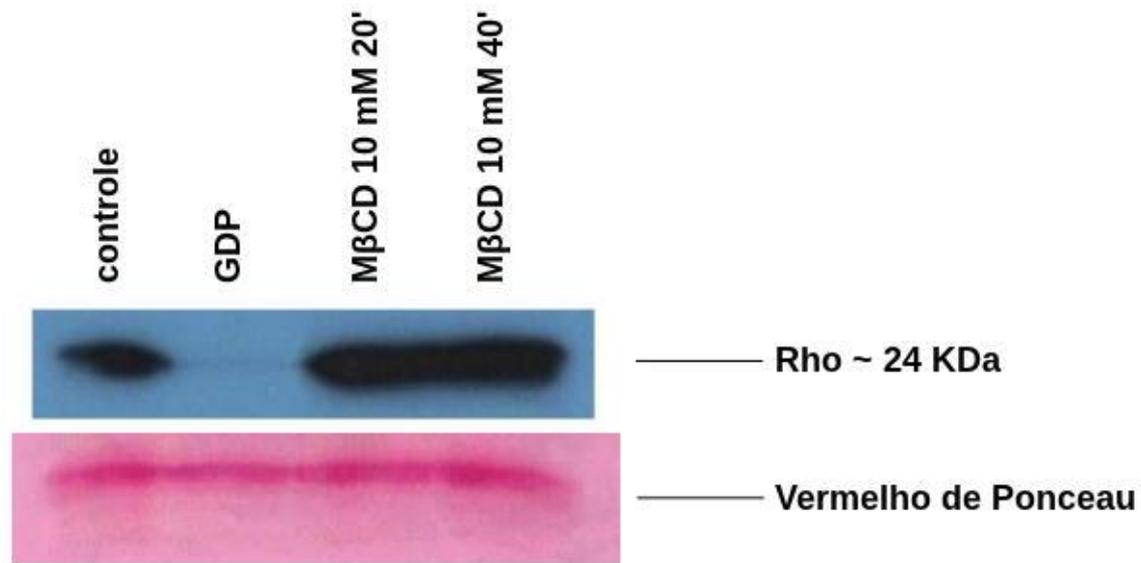


Figura 6: O sequestro de colesterol nos fibroblastos é capaz de ativar Rho já nos primeiros 20 minutos de tratamento. Fibroblastos, incubados com M β CD 10mM por 20 e 40 minutos, foram submetidos ao ensaio de pull-down para Rho-GTP, ou seja, Rho ativado. Para isso, as células foram lisadas e o extrato celular obtido foi centrifugado e colocado em contato com a proteína Rhotekin juntamente com a resina glutationa. A proteína Rhotekin apresenta 2 domínios de ligação: um à proteína Rho-GTP (domínio GST) e o outro se liga à resina glutationa (domínio RBD). Após a incubação da proteína Rhotekin juntamente com os extratos celulares foi feita uma centrifugação e essas amostras, após fervura, foram corridas em gel de Poliacrilamida 12%, transferidas para membrana PVDF e reveladas em filme fotográfico por quimioluminescência. Em (A) temos o western-blotting mostrando que após 20 ou 40 minutos de tratamento já é possível ter ativação de Rho nos fibroblastos. Células controle e extrato celular incubado com GDP foram utilizados como comparativos para verificarmos a ativação de Rho. Em (B) temos a membrana de PVDF corada com vermelho de Ponceau após a transferência das proteínas.

4.4) O sequestro de colesterol promove mudanças na dinâmica de membrana e citoesqueleto dos fibroblastos

Na seção anterior verificamos, para células fixadas, que o sequestro de colesterol promove mudanças no citoesqueleto de actina. A fim de verificarmos mudanças na dinâmica tanto na membrana quanto no citoesqueleto de células mediante o sequestro de colesterol, utilizamos a técnica de microscopia de desfocalização (Agero *et al.*, 2003 e 2004). Esta técnica é relativamente simples e implica em introduzir uma pequena desfocalização na imagem da célula viva, em tempo real, e filmá-la durante o tempo desejado. Assim, uma célula, cuja membrana seria invisível quando no foco, passa a ser visível quando aplicada a ela certa desfocalização. Outras técnicas podem ser usadas para a observação de células em um microscópio óptico, as mais comuns são contraste de fase (Zernick, 1942) e DIC ou Nomarsk (Pluta, 1988). As principais vantagens da microscopia de desfocalização são que nela não é preciso de nenhum filtro ou elemento óptico no microscópio e podemos obter diretamente as flutuações do conjunto membrana-citoesqueleto pelo contraste da imagem desfocalizada.

Para os experimentos de desfocalização utilizamos fibroblastos WTCL3. O experimento foi feito em microscópio Nikon Eclipse, acoplado com PFS (*Perfect Focus System*), que permitiu a manutenção de um foco constante ao longo do experimento, e com objetiva Nikon de aumento 100x, N.A.= 1,49. Durante o experimento, filmamos uma célula única inicialmente por 10 minutos para avaliação do estado da dinâmica celular no estado controle, não tratado. Em seguida, mantendo a mesma célula no campo, eram adicionados 5 ou 10 mM de M β CD e a célula continuava a ser filmada por mais 45 minutos, em uma taxa de captura de 1 *frame* por segundo, usando uma câmera UNIQ de 12 bits (ou 4096 níveis de cinza), com pixel quadrado de 0.064 μ m de lado. Após o término do experimento, obtínhamos um conjunto de 3300 imagens que foram posteriormente analisadas, de 600 em 600 imagens (correspondentes a intervalos de 10 minutos), com exceção dos 5 minutos finais nos quais 300 imagens foram analisadas. Toda a informação obtida no experimento foi dada em forma de contraste de níveis de cinza obtidos a partir das imagens. Mudanças nos níveis de cinza representam a mudança da curvatura local da membrana. Assim, as flutuações obtidas foram interpretadas como mudanças no comportamento das células supondo-se a calibração prévia da câmera.

Para análise dos dados, o *background* das imagens foi corrigido e as correlações temporais dos *ruffles* de membrana foram medidas através da oscilação do contraste. Áreas quadradas (50 pixels de lado) nas bordas das células (Fig. 7) foram escolhidas e o Plugin, do ImageJ, desenvolvido pelo prof. Ubirajara Agero, do departamento de Física da UFMG, foi utilizado para calcular a correlação temporal entre os pontos ao longo da área do quadrado selecionada.

A análise da dinâmica das células submetidas ao sequestro de colesterol foi feita da seguinte maneira: após a captura de imagens das células no estado controle (por 10 minutos- frames 0-600- fig. 8 A e B, 9 A) foi adicionado às células 5 ou 10 mM de M β CD e a captura de imagens continuou sendo feita até o quinquagésimo quinto minuto do experimento (correspondendo ao tratamento com M β CD por 45 minutos) (Figs 8 B-G e Fig.9 B-E). Após a coleta das imagens, as mesmas foram analisadas, no programa ImageJ, através da aplicação do *Plugin* para correlação temporal ao longo de uma área quadrada de 50 pixels de lado. Os resultados da aplicação da função correlação temporal às imagens estão na figura 9.

Os dados foram ajustados com uma equação de decaimento exponencial simples, como apresentado abaixo:

$$y = Ae^{\frac{-t}{\tau}} \quad (3)$$

Onde, A é a amplitude da exponencial e τ é o tempo de relaxação da membrana e do citoesqueleto ajustados pela exponencial.

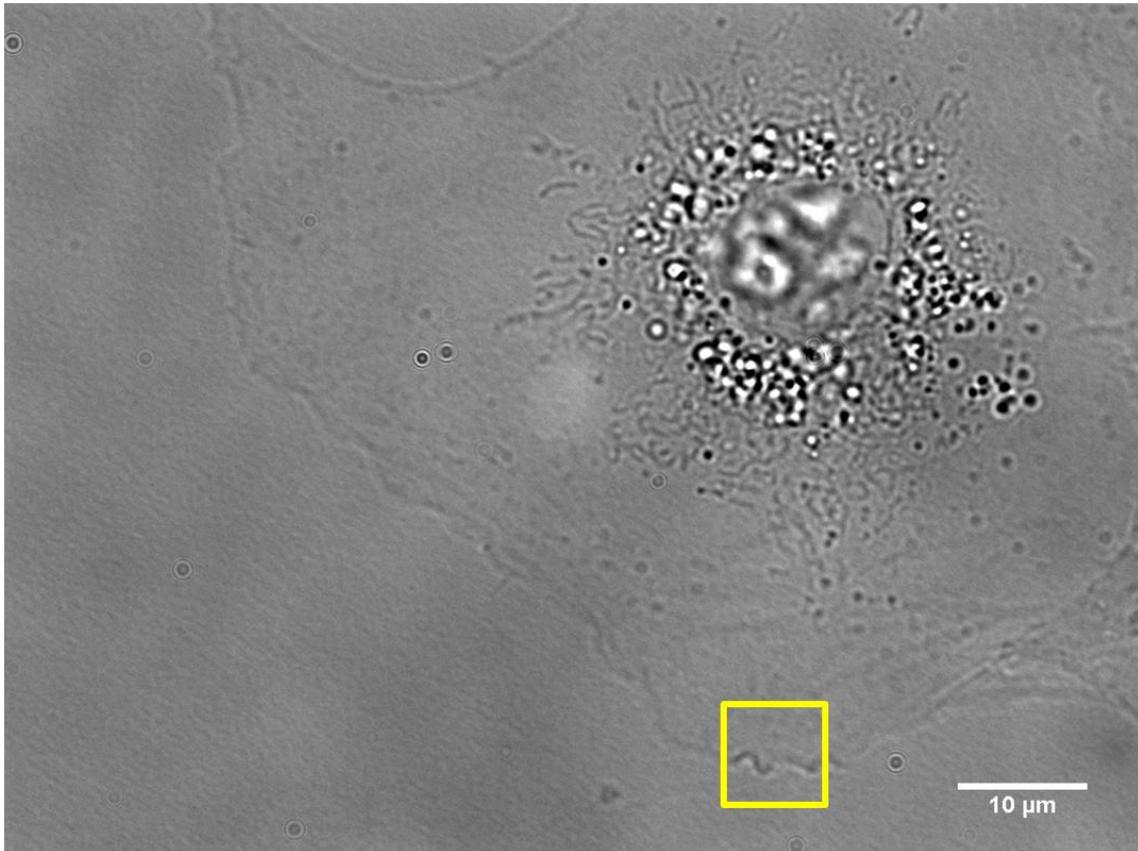


Figura 7: Fibroblasto embrionário murino WTCL3, visto desfocalizado de 1 μm , em microscópio Nikon Eclipse, acoplado com PFS (*Perfect Focus System*) e com objetiva Nikon (aumento 100x, N.A. 1,49). Na borda da célula é possível ver algumas ondulações, os denominados *ruffles* de membrana, que produzem uma variação de contraste que oscila ao longo do tempo. O quadrado amarelo mostra, aproximadamente, uma das 10 áreas escolhida para a análise das correlações temporais em intervalos de 10 em 10 minutos num total de 55 minutos.

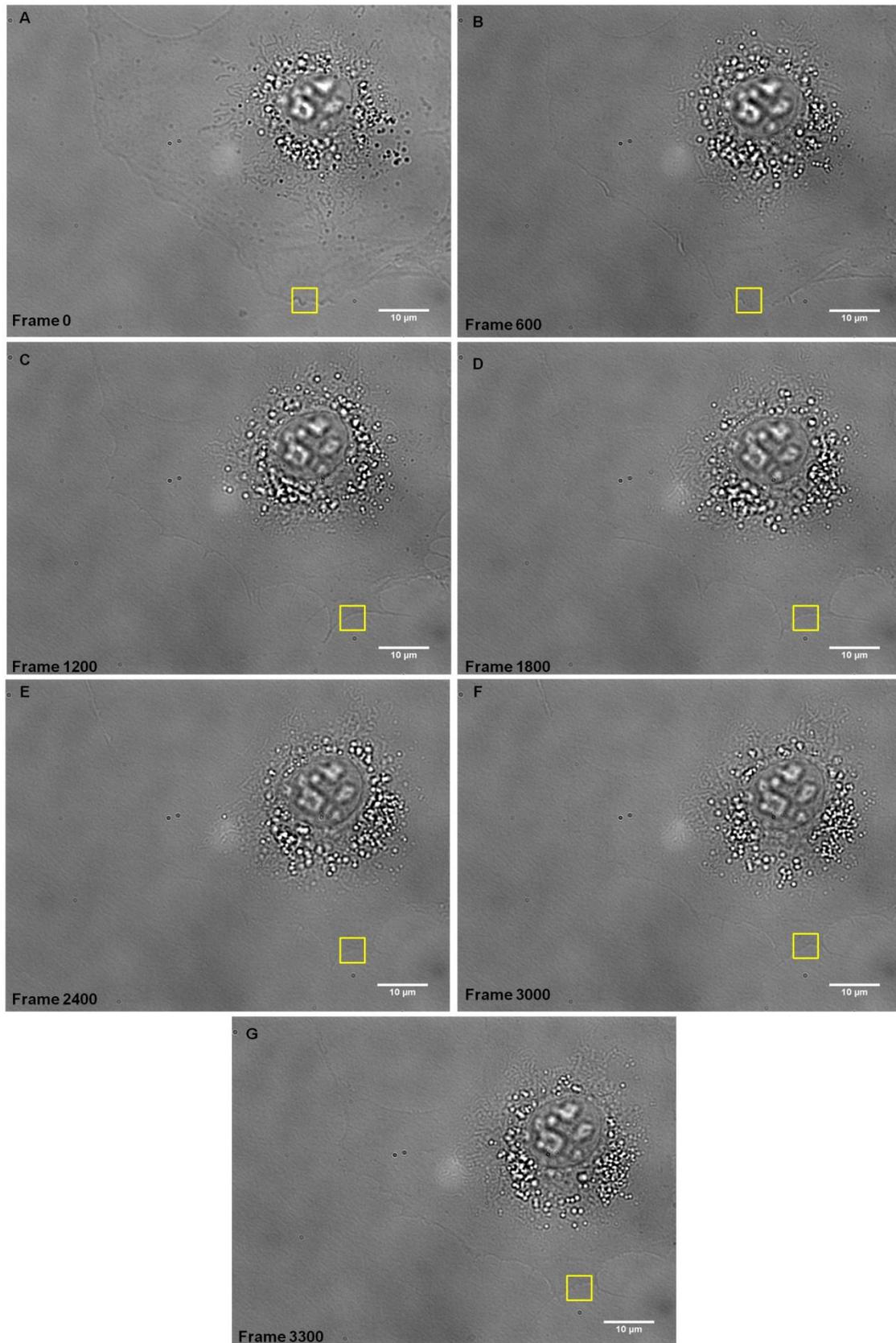


Figura 8: Imagens do fibroblasto WTCL3 visto, no microscópio de desfocalização, ao longo de 55 minutos de experimento. A) Fibroblasto após 1s de experimento na condição controle. B-G) Fibroblasto ao longo do tempo de incubação com 10 mM da ciclodextrina M β CD

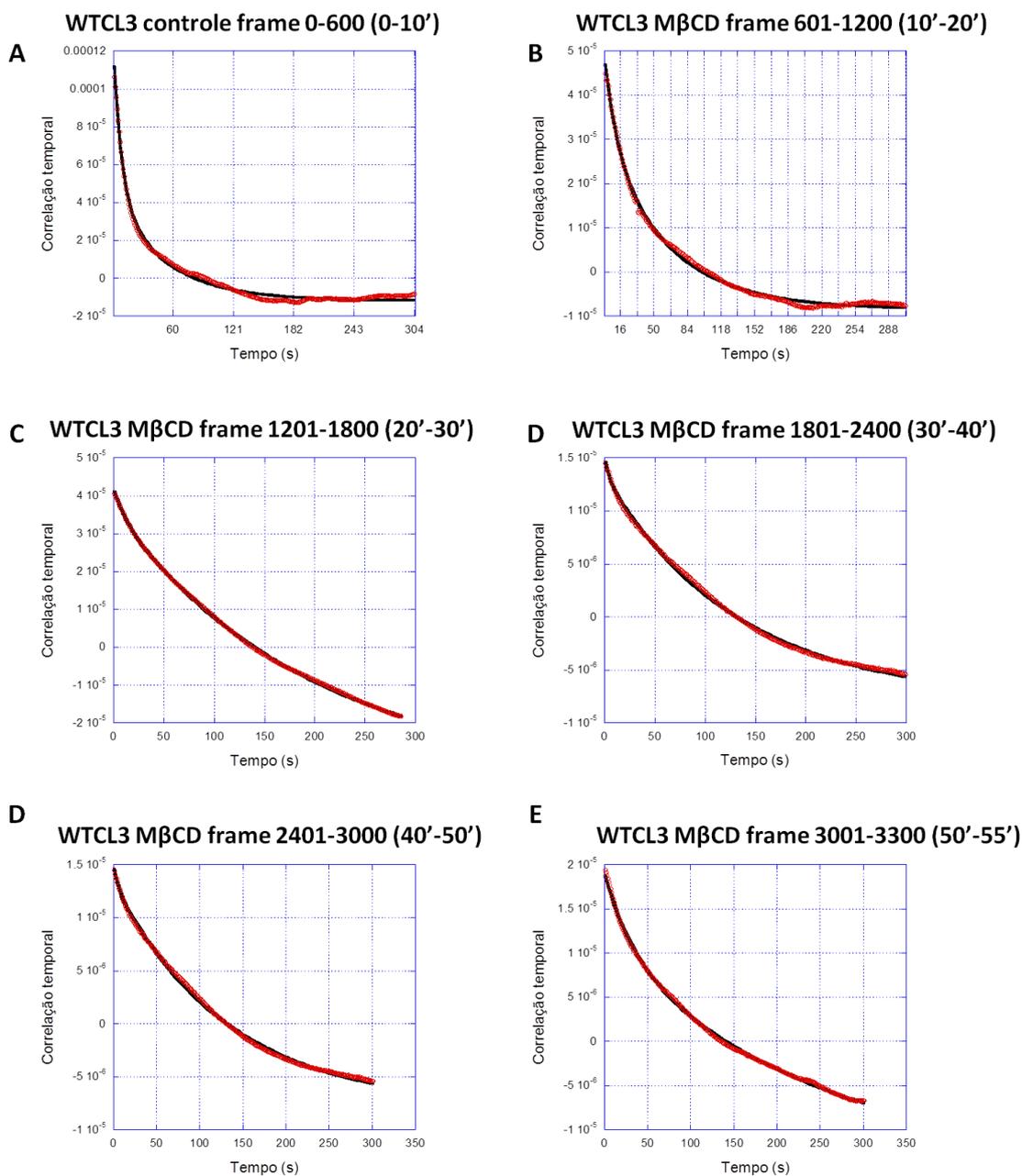


Figura 9: O sequestro de colesterol altera a dinâmica de membrana e de citoesqueleto de fibroblastos. Gráficos de correlação temporal obtidos na condição controle (A), nos 10 minutos iniciais de experimento, e nas condições experimentais de tratamento com 10 mM de MβCD nos tempos (B) 20, (C) 30, (D) 40, (E) 50. As curvas de decaimento com ajuste exponencial duplo mostram que, ao longo do tratamento com MβCD, a correlação temporal dos níveis de cinza, entre os pontos presentes nos retângulos, é modificada revelando mudanças na dinâmica tanto da membrana quanto do citoesqueleto da célula submetida ao sequestro de colesterol.

Os valores obtidos dos ajustes exponenciais foram organizados em gráficos que estão representados nas figuras 10 e 11. Analisemos, primeiramente, os valores dos tempos de relaxação, τ , expressos nas letras A e B da figura 10. Podemos perceber um comportamento mais claro nos fibroblastos tratados com 5mM da ciclodextrina depletora do colesterol (Fig 10 A). Nestes casos, o tempo de relaxação da célula aumenta com o passar do tempo de tratamento atingindo seu pico entre 20 e 30 minutos de tratamento. Em seguida, os valores dos tempos de relaxação diminuem para valores próximos aos valores controle. Já para as células tratadas com a maior concentração de M β CD os tempos de relaxação, τ (Fig 10 B), atingem seus picos num intervalo maior: entre 20 e 40 minutos de tratamento. De qualquer forma, após atingir o pico de aumento nos tempos de relaxação, os valores de τ também caem para valores semelhantes aos valores controle.

Além do tempo de relaxação foram também analisadas as amplitudes das exponenciais, A, (Fig. 11 A e B) que indicam as variações na amplitude da curvatura celular, segundo a técnica da microscopia de desfocalização. Tanto para os fibroblastos tratados com 5 (Fig. 11 A) ou com 10 mM (Fig. 11 B) a amplitude de oscilação do complexo membrana-citoesqueleto diminui em relação às células no estado não-tratado. Em linhas gerais podemos dizer que tanto o tempo de relaxação quanto a amplitude de curvatura da membrana celular dos fibroblastos modificam seus comportamentos à medida em que o colesterol é depletado das células.

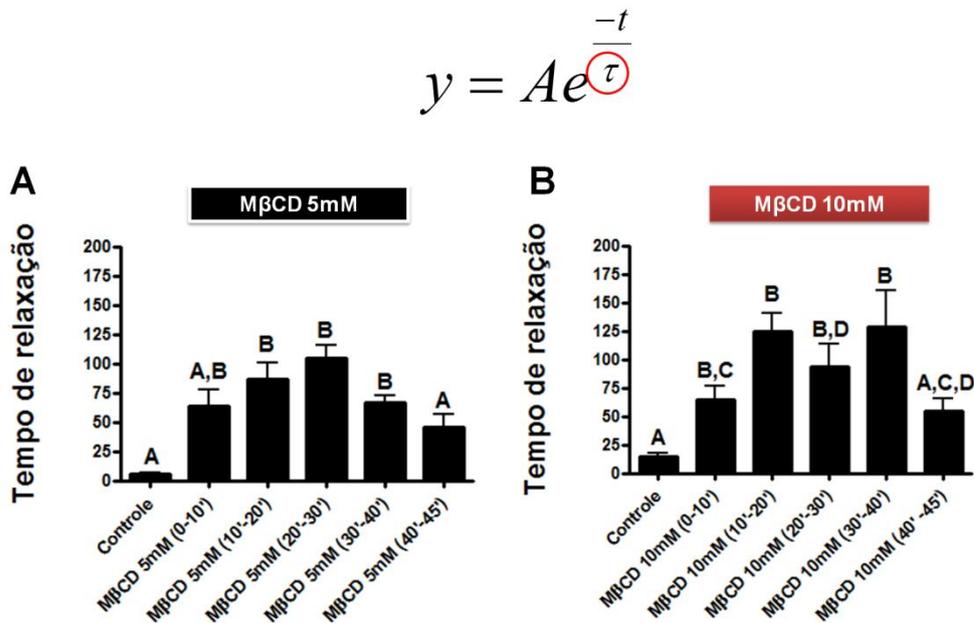


Figura 10: O tempo de relaxação dos fibroblastos, τ , aumenta após um período de tratamento com a MβCD e depois retorna para valores semelhantes ao do estado controle. Tempo de relaxação τ obtidos para os fibroblastos WTCL3 tratados com 5 (A) ou 10 mM (B) de MβCD. Os fibroblastos foram filmados durante 10 minutos, sem adição da ciclodextrina depletores do colesterol, e, em seguida, a essas células foi adicionada a ciclodextrina depletores do colesterol, que permaneceu agindo nas células por 45 minutos. Após o experimento, as células foram analisadas e da análise foi extraído o tempo de relaxação, m_3 , dado pela equação acima dos gráficos.

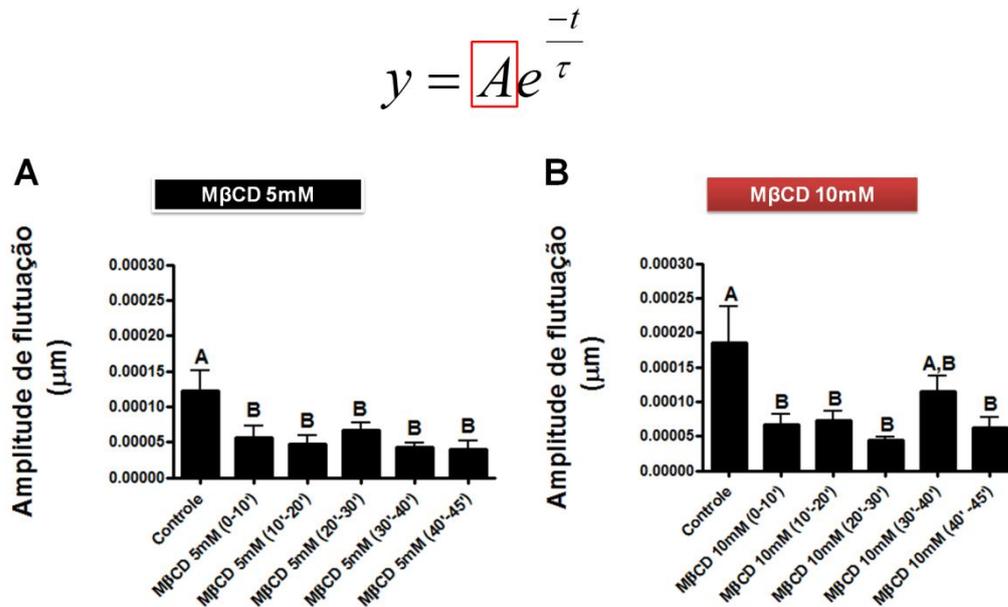


Figura 11: A amplitude de curvatura, A , diminui durante o período de tratamento com a MβCD. Amplitudes A obtidas para os fibroblastos WTCL3 tratados com 5 (A) ou 10 mM (B) de MβCD. Os fibroblastos foram filmados durante 10 minutos, sem adição da ciclodextrina depletora do colesterol, e, em seguida, a essas células foi adicionada a ciclodextrina depletora do colesterol, que permaneceu agindo nas células por 45 minutos. Após o experimento, as células foram analisadas e da análise foi extraído a amplitude de variação da curvatura, A , dada pela equação acima dos gráficos.

4.5) O sequestro de colesterol nos fibroblastos aumenta tanto a rigidez de flexão quanto a tensão superficial dessas células

Para se analisar propriedades mecânicas de células através do uso de pinças ópticas é necessário que uma bolinha de poliestireno, aprisionada pelo laser no infravermelho, chegue até a membrana celular e se prenda na mesma. Feito isso, ao deslocarmos o estágio do microscópio, um pequeno canudinho de membrana será formado e este canudinho, denominado amarra, possui tanto componentes de membrana plasmática quanto componentes de citoesqueleto cortical, tais como a actina (Fig. 12 A). Quando a amarra está sendo extraída ocorre uma transição de fase na qual o catenóide, formado nos estágios iniciais da extração, se transforma num canudo (a amarra propriamente dita). Neste ponto onde ocorre a transição de fase entre catenóide e amarra a força para se extrair a amarra é máxima. Em seguida, uma vez formada a amarra, a força para extraí-la da célula é constante e de valor F_0 (Fig. 12 B). Quando medimos diversos valores de F_0 para fibroblastos controle e tratados com M β CD nas concentrações de 5 ou 10 mM verificamos que o valor de F_0 aumenta mediante o sequestro de colesterol e é significativamente maior para as células tratadas com a maior concentração da ciclodextrina (Fig. 12 C).

Após a extração das amarras nos diferentes grupos de fibroblastos, tratados ou não com a ciclodextrina, avaliamos a tensão superficial σ e a rigidez de flexão κ . Para isso, foram medidos os raios das amarras (por microscopia eletrônica de varredura), os quais foram utilizado nas equações (6) e (7) escritas na seção de materiais e métodos. Em seguida, fizemos várias fotos das amarras, nas diferentes condições, como representado na figura 12 D. Após análise, os raios das amarras foram medidos e não houve diferença entre os tamanhos dos mesmos entre os diferentes grupos (Fig. 12 E).

Em seguida, os valores da tensão superficial e da rigidez de flexão foram calculados e colocados na tabela 2.

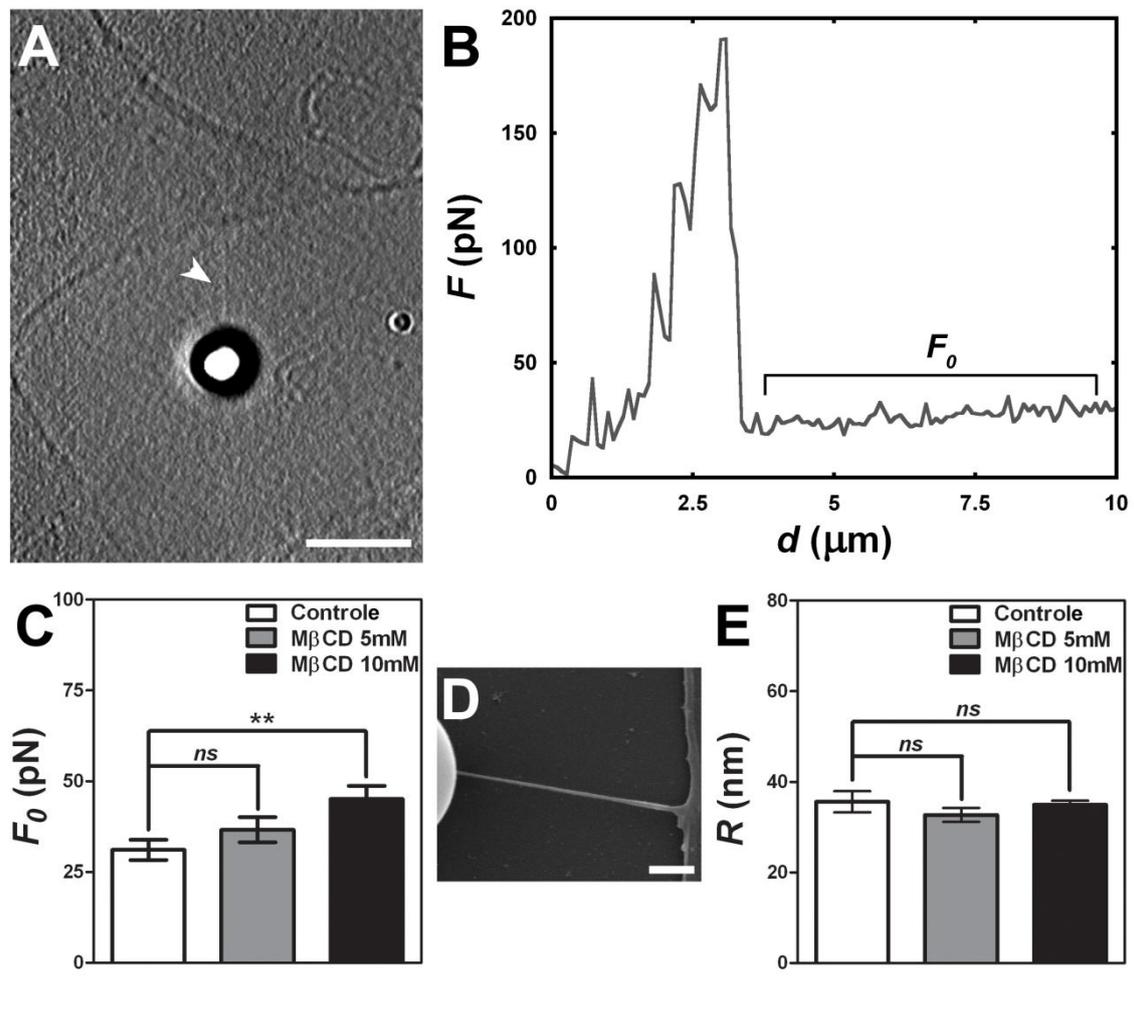


Figura 12: O sequestro de colesterol induz um aumento na força F_0 para se extrair amarras em fibroblastos. (A) Imagem típica de uma amarra já extraída de um fibroblasto. (B) Gráfico de força para se extrair uma amarra. (C) Gráfico das médias das forças F_0 para se extrair amarras dos fibroblastos controle e tratados com 5 ou 10 mM de M β CD. (D) Figura representativa de uma amarra celular vista em microscópio eletrônico de varredura. (E) Média dos valores dos raios obtidos para os fibroblastos controle e tratados com 5 ou 10 mM de M β CD. Barra de escala 1 μm .

	Tensão superficial σ (pN/ μm)	Rigidez de flexão κ (pN . μm)
Controle	67 ± 9	$0,18 \pm 0,02$
MβCD 5mM	95 ± 9	$0,18 \pm 0,02$
MβCD 10mM	102 ± 9	$0,25 \pm 0,03$

Tabela 2: O sequestro de colesterol aumenta tanto valores da tensão superficial quanto da rigidez de flexão em fibroblastos. Após a extração de amarras de fibroblastos controle e tratados com 5 ou 10 mM de M β CD, foram medidos a força F_0 necessária para a extração dessas amarras e o raio R dessas amarras. Após a obtenção destes dados, os valores de tensão superficial e de rigidez de flexão foram calculados conforme as equações 6 e 7.

De acordo com os valores da Tabela 2, podemos verificar que o sequestro de colesterol com 5 ou 10 mM foi capaz de induzir aumento significativo da tensão superficial nos fibroblastos em relação às células controle. Já a rigidez de flexão alterou seu valor apenas para o tratamento com 10 mM da ciclodextrina.

Em resumo, podemos concluir que o sequestro de colesterol promove um aumento nos valores de tensão superficial e rigidez de flexão que são indicativos de um aumento de rigidez celular.

4.6) A depleção do colesterol provoca exocitose lisossomal nos cardiomiócitos e nos fibroblastos

O processo de fusão dos lisossomos com a membrana plasmática, denominado de exocitose lisossomal, é um evento regulado por cálcio e também por proteínas do complexo SNARE em um mecanismo semelhante ao da fusão das vesículas preenchidas com neurotransmissores na membrana pré-sináptica (Rao *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 1997).

Trabalhos publicados demonstram que o sequestro de colesterol altera a fusão de vesículas sinápticas com a membrana gerando eventos de exocitose não-regulados (Wasser *et al.*, 2007). Ademais, alguns estudos também demonstraram que, em situações onde a tensão superficial aumenta localmente, há exocitose de vesículas membranosas que doam membrana para a membrana plasmática, diminuindo assim a tensão da mesma e retornando a célula para condições homeostáticas (Raucher e Sheetz, 1999). Como o sequestro de colesterol aumenta a tensão superficial do conjunto citoesqueleto-membrana, estudar a ocorrência de eventos exocíticos faz-se importante. Com o intuito de verificar o comportamento da exocitose de lisossomos, em células cujo conteúdo de colesterol havia sido reduzido, realizamos um ensaio cinético enzimático, no qual avaliamos a atividade da enzima beta-hexosaminidase, residente em lisossomos, no meio extracelular de células em cultura. Para isso, incubamos os fibroblastos com M β CD ou H γ CD, ambos na concentração de 10 mM e tanto o sobrenadante quanto o produto de lise dessas células foram incubados com um substrato fluorescente da beta-hexosaminidase. Células não tratadas ou incubadas com ionomicina (um ionóforo que permite o influxo de Ca²⁺ do meio extra para o meio intracelular e induz exocitose lisossomal (Jans *et al.*, 2004)) foram utilizadas para controles negativo e positivo respectivamente. Realizamos também experimentos com cardiomiócitos uma vez que estas são células que sofrem constante estresse mecânico devido ao processo de contração. Dessa forma, o reparo de membrana nessas células é um evento importante para a sobrevivência e contractilidade das mesmas. Os experimentos foram feitos na presença ou ausência de Ca²⁺ apenas em cardiomiócitos visto que esse íon é importante, nessas células, não somente no processo de exocitose como também no processo de contração.

A figura 13 mostra a exocitose lisossomal mediada pelo tratamento com M β CD. Nessas células foram realizados experimentos apenas na presença de Ca²⁺. De acordo

com a figura 13, podemos verificar que após os 10 primeiros minutos de tratamento com a ciclodextrina depletora do colesterol não houve diferença significativa nos níveis de beta-hexosaminidase em relação às células controle, não tratadas (Fig. 13). Após 20 ou 40 minutos de exposição à ciclodextrina, os níveis de exocitose elevaram-se aproximadamente 4 vezes em comparação com os níveis observados nas células não tratadas (Fig. 13). Por outro lado, a incubação das células com H γ CD, a ciclodextrina inativa para o sequestro do colesterol, não induziu exocitose expressiva de lisossomos nos fibroblastos (Fig. 13).

Os experimentos de exocitose lisossomal também foram feitos em cardiomiócitos (Fig.14). Já nos 10 primeiros minutos após a adição da β ciclodextrina na presença de Ca²⁺, ocorrem eventos de exocitose de lisossomos, cerca de 3,5 vezes maiores se comparados com eventos exocíticos nas células controle (Fig 14). Dessa maneira, podemos dizer que a dinâmica de exocitose nos cardiomiócitos é aparentemente mais rápida se comparada à dinâmica de exocitose em fibroblastos (comparar Figs. 13 e 14). Os níveis de exocitose nas células cardíacas foram ainda maiores com o aumento progressivo do tempo de incubação com M β CD. Após 20 ou 40 minutos de exposição à ciclodextrina, os níveis de exocitose elevaram-se 5,5 vezes em comparação com os níveis observados nas células não tratadas (Fig. 14). Por outro lado, a incubação das células com H γ CD, a ciclodextrina inativa para o sequestro do colesterol, também não induziu exocitose expressiva de lisossomos nos cardiomiócitos, assim como o ocorrido em fibroblastos (Fig. 13 e 14). A fim de testarmos se estes eventos ocorriam sem a regulação do Ca²⁺ (como ocorre com as vesículas sinápticas), o mesmo ensaio foi realizado na ausência de Ca²⁺ e na presença de Mg²⁺. O uso de EGTA, agente capaz de quelar o Ca²⁺ extracelular, não foi capaz de impedir a ocorrência de eventos exocíticos promovidos pelo sequestro do colesterol. Pelo contrário, na ausência de Ca²⁺, os eventos exocíticos aumentaram ligeiramente em comparação aos eventos na presença deste mesmo íon (Fig. 14).

Para confirmarmos que a leitura de níveis elevados da enzima beta-hexosaminidase no meio extracelular ocorreu devido a processos de exocitose lisossomal e não a processos de morte celular, realizamos um ensaio de viabilidade celular. Neste teste, os cardiomiócitos incubados com as ciclodextrinas M β CD/ H γ CD foram tripsinizados e incubados com a solução HFS, a qual continha PI (iodeto de propídio), um corante nuclear impermeável à membrana celular íntegra. Controles negativo e positivo (cardiomiócitos não tratados e tratados com ionomicina,

respectivamente) também foram analisados. A figura 15 mostra que o tratamento com M β CD não interferiu na viabilidade celular nem na presença e nem na ausência de cálcio (Fig. 15). Assim como esperado, o tratamento com H γ CD também não levou à morte celular.

A fim de verificar se o processo de exocitose lisossomal, desencadeado pelo sequestro de colesterol, poderia depender do cálcio intracelular, fizemos o ensaio enzimático de detecção da enzima beta-hexosaminidase na presença de uma droga quelante de Ca²⁺ intracelular, o BAPTA-AM. Para isso, expusemos os cardiomiócitos a 10 mM de M β CD, por 10, 20 ou 40 minutos, na presença ou não de BAPTA-AM (Fig. 16). Não foi possível detectar diferença significativa nos níveis de exocitose entre controle negativo e controle tratado apenas com BAPTA-AM. Comparando-se os grupos tratados com M β CD, na presença ou ausência de BAPTA-AM, percebemos diferenças estatísticas apenas em estágios mais longos de exposição à β ciclodextrina (20 e 40 minutos), onde a presença do agente quelante intracelular de Ca²⁺ levou a uma pequena diminuição nos níveis de exocitose (Fig. 16).

Além de testarmos a dependência da exocitose lisossomal com relação ao Ca²⁺ intra e extracelular também testamos a dependência desta exocitose com relação à proteína sinaptotagmina- VII, syt-VII, que é uma proteína sensora de Ca²⁺ nesta organela. Para isso, fizemos um experimento de siRNA, em células de rato NRK, no qual promovemos o silenciamento do RNA para syt-VII. Como controle da reação de siRNA também fizemos a transfecção com um oligo aleatório ou *scrambled*. Após a confirmação do sucesso do silenciamento de syt-VII (Fig. 17 A) fizemos um ensaio de exocitose lisossomal (Fig. 17 B). Adicionamos, a cada um dos grupos experimentais, células tratadas com ionomicina e, em seguida, com M β CD visto que a exocitose lisossomal em células epiteliais, como nas células NRK, ocorre de maneira mais restrita (Xu *et al.*, 2012) em comparação à exocitose dessas mesmas organelas em fibroblastos. Podemos ver pela Fig. 17 B, que a exocitose lisossomal, sobretudo aquela estimulada pela ionomicina, previamente ao sequestro de colesterol, continuou acontecendo mesmo na ausência da syt-VII.

Em linhas gerais, foi possível observar que o processo de exocitose lisossomal, induzido pelo sequestro do colesterol, ocorre mesmo na ausência de Ca²⁺ extra ou intracelular e mesmo na ausência da proteína sensora desse íon em vesículas lisossomais, a sinaptotagmina 7. Embora na ausência de cálcio intracelular, a exocitose induzida pelo sequestro de colesterol tenha sido menor, os resultados indicam que o

recrutamento e a fusão de lisossomos mediante o tratamento com M β CD é um evento majoritariamente não regulado por Ca²⁺ e que depende de mudanças na quantidade de colesterol presente na membrana plasmática.

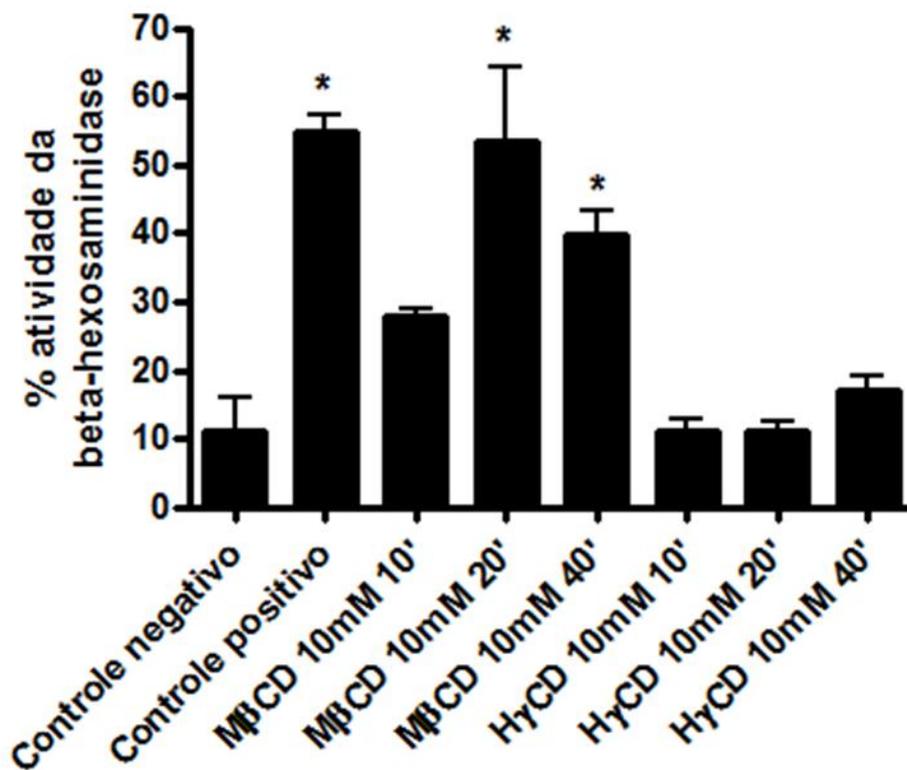


Figura 13: O tratamento dos fibroblastos WTCL3 com MβCD, mas não com HγCD, gera excitose lisossomal. Os fibroblastos imortalizados foram expostos a 10 mM de MβCD ou à mesma concentração de HγCD, por 10, 20 ou 40 minutos, a 37°C, na presença de cálcio. Tanto o meio extracelular quanto o produto do lisado celular foi coletado e incubado com o 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide, substrato fluorescente da beta-hexosaminidase, uma enzima residente em lisossomos. Os resultados deste gráfico foram expressos como a razão entre a atividade da β-hexosaminidase no meio extracelular pela atividade total desta mesma enzima (leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante/ leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante + leitura da β-hexosaminidase no lisado celular). Células tratadas com 10 μM de ionomicina (Calbiochem), por 10 minutos, foram usadas com controle positivo da excitose. Os dados foram representados como média de triplicatas ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre controle e grupos experimentais. ($p < 0.05$, teste T de Student).

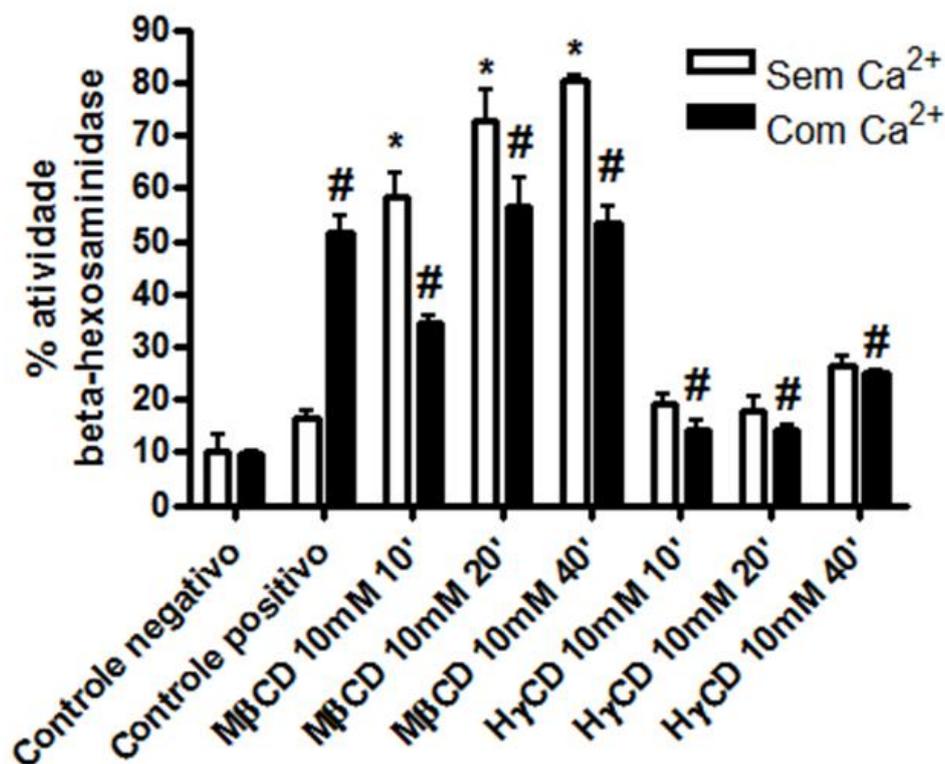


Figura 14: O tratamento dos cardiomiócitos com MβCD, mas não com HγCD, gera excitose lisossomal. Os cardiomiócitos foram expostos a 10 mM de MβCD ou à mesma concentração de HγCD, por 10, 20 ou 40 minutos, a 37°C, tanto na ausência (barras brancas) quanto na presença de cálcio (barras pretas). Tanto o meio extracelular quanto o produto do lisado celular foi coletado e incubado com o 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide, substrato fluorescente da beta-hexosaminidase, uma enzima residente em lisossomos. Os resultados deste gráfico foram expressos como a razão entre a atividade da β-hexosaminidase no meio extracelular pela atividade total desta mesma enzima (leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante/ leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante + leitura da β-hexosaminidase no lisado celular). Células tratadas com 10 μM de ionomicina (Calbiochem), por 10 minutos, foram usadas com controle positivo da excitose. Os dados foram representados como média de triplicatas ± desvio padrão. Os asteriscos indicam diferenças estatísticas entre controle e grupos experimentais (na ausência de Ca²⁺ extracelular) ao passo que os quadrados (#) indicam as mesmas diferenças na presença de Ca²⁺ extracelular. (p < 0.05, teste T de Student).

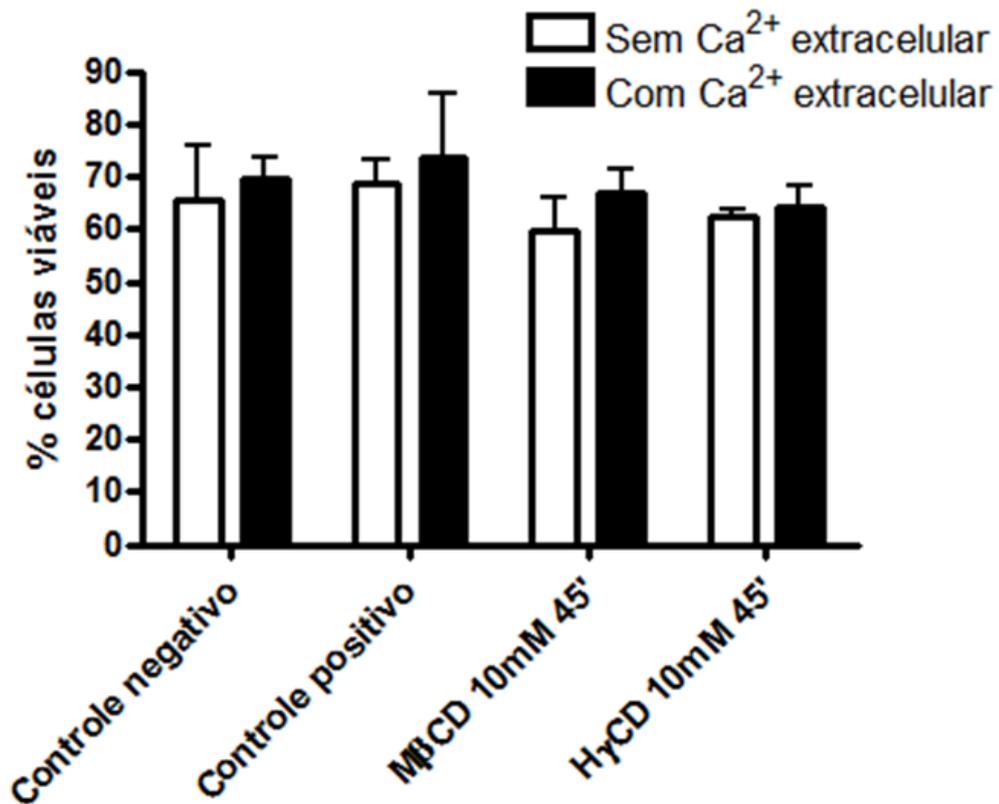


Figura 15: O sequestro de colesterol de membrana de cardiomiócitos, na presença ou ausência de Ca²⁺, não provoca morte celular. Após tratamento com MβCD ou com HγCD na ausência (barras brancas) ou na presença de cálcio extracelular (barras pretas), os cardiomiócitos foram tripsinizados, coletados e incubados com solução HFS, contendo PI. As células que se tornaram inviáveis após o tratamento com as ciclodextrinas coraram-se com o iodeto de propídio. Este ensaio de verificação de morte celular só é possível uma vez que o PI é impermeável à membrana de células saudáveis. Após a incubação com a solução HFS, as células foram contadas e lidas em um citômetro de fluxo. Os dados foram explicitados como a média de triplicatas ± desvio padrão. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

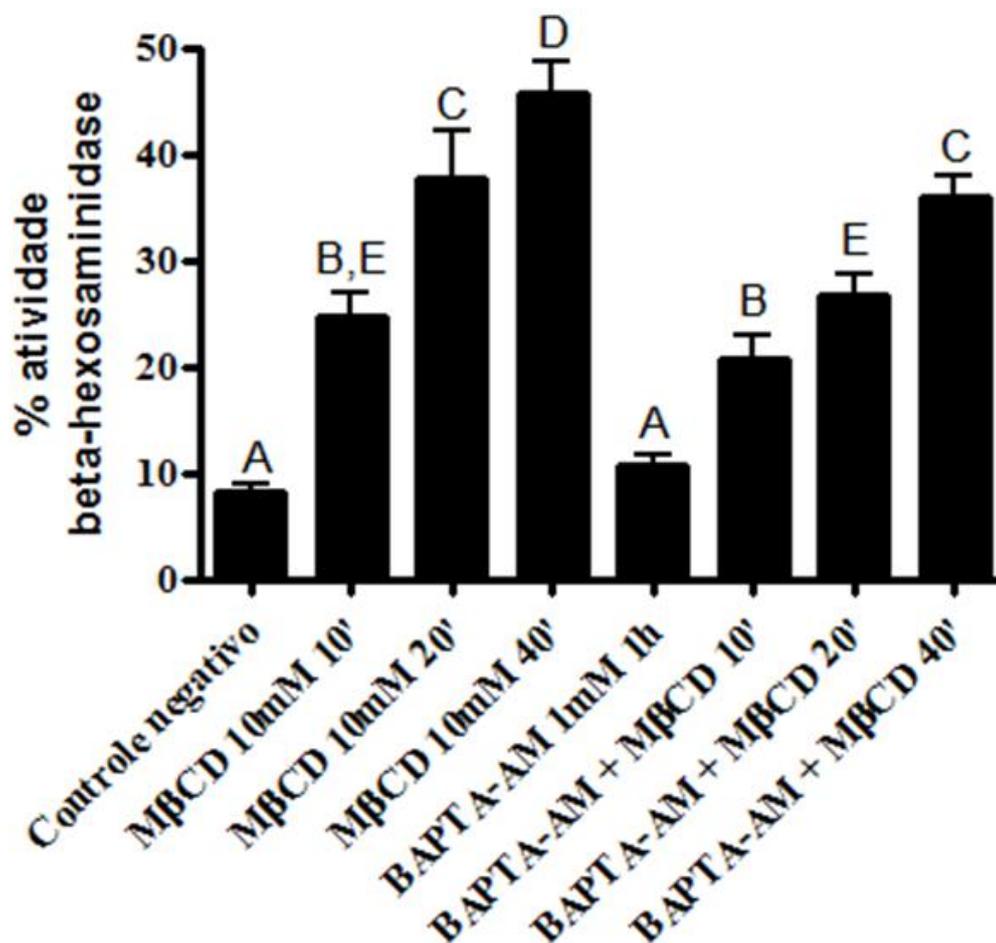


Figura 16: O sequestro de colesterol promove a excitose lisossomal mesmo quando o cálcio intracelular é quelado. Os cardiomiócitos foram expostos a 10 mM de MβCD por 10, 20 ou 40 minutos, a 37°C ou alternativamente à mesma concentração da droga (nos mesmos tempos de exposição) mediante a presença de 1mM de BAPTA-AM (1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester), droga capaz de penetrar através da membrana plasmática. Uma vez no citoplasma o BAPTA é capaz de quelar o cálcio intracelular. Para o ensaio de excitose, tanto o meio extracelular quanto o produto do lisado celular foi coletado e incubado com o 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide, substrato fluorescente da beta-hexosaminidase, uma enzima residente em lisossomos. Os resultados deste gráfico foram expressos como a razão entre a atividade da β-hexosaminidase no meio extracelular pela atividade total desta mesma enzima (leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante/ leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante + leitura da β-hexosaminidase no lisado celular). Os dados foram representados como média de triplicatas ± desvio padrão. Letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais ao passo que letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. ($p < 0.05$, teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Neuman Keuls).

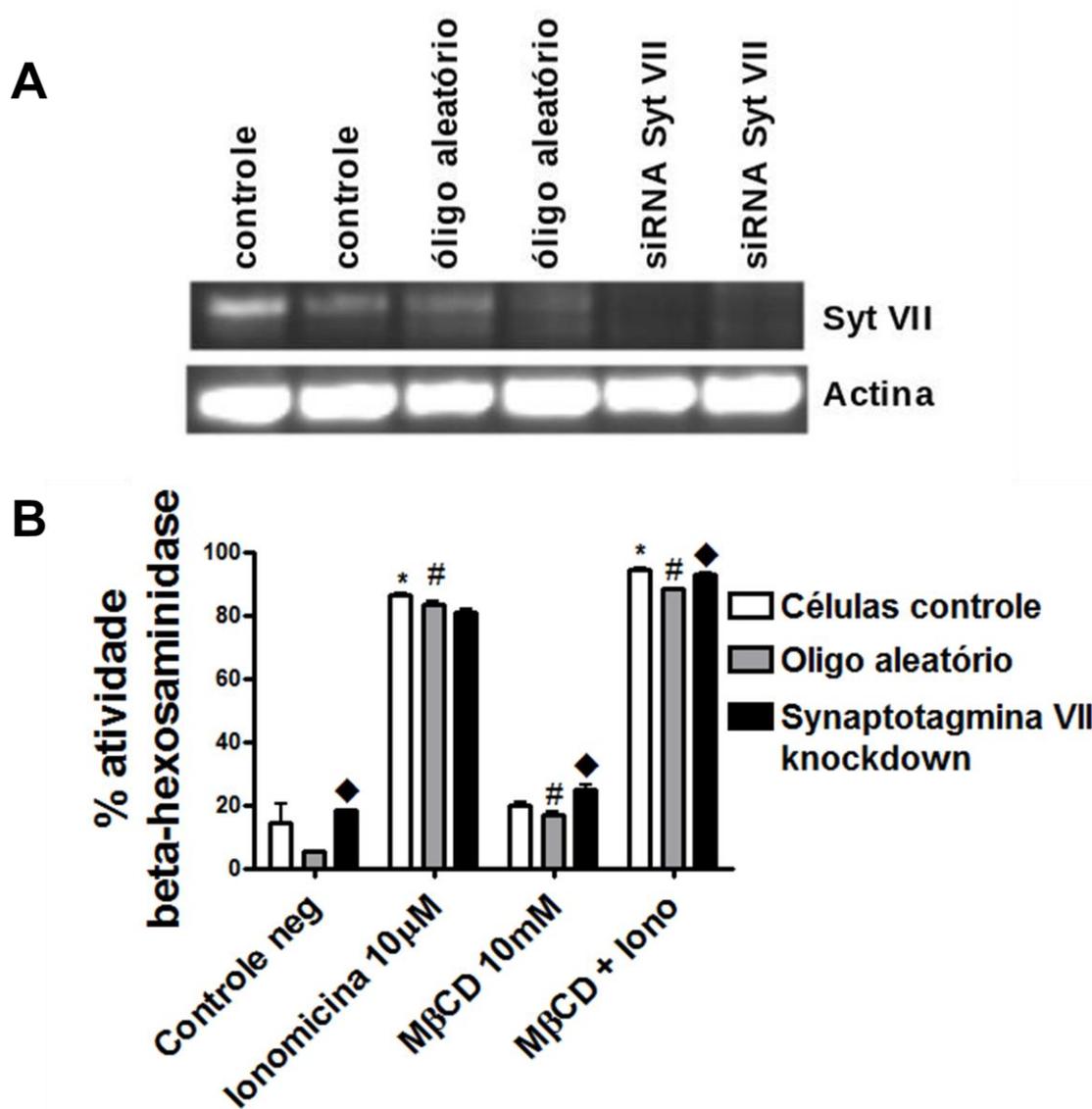


Figura 17: O sequestro de colesterol gera excitose lisossomal mesmo em células *knockdown* para **syt VII**. Três grupos de células: NRK selvagens, NRK transfectadas com oligos aleatórios (*scrambled*) ou NRK transfectadas com o oligo para siRNA de syt-VII foram submetidos a ensaios de excitose lisossomal. Para a confirmação da eficiência do knockdown foi feito um RT-PCR para syt-VII nas células selvagens, transfectadas scrambled e transfectadas com oligo para syt-VII (A). Para o ensaio de excitose lisossomal (B) as células epiteliais foram expostas a 10 mM de MβCD a 37°C, diluído em meio de cultura sem soro. Tanto o meio extracelular quanto o produto do lisado celular foi coletado e incubado com o 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide, substrato fluorescente da beta-hexosaminidase, uma enzima residente em lisossomos. Os resultados deste gráfico foram expressos como a razão entre a atividade da β-hexosaminidase no meio extracelular pela atividade total desta mesma enzima (leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante/ leitura da β-hexosaminidase no sobrenadante + leitura da β-hexosaminidase no lisado celular). Células tratadas com 10 µM de ionomicina (Calbiochem), por 10 minutos, foram usadas com controle positivo da excitose. Como as células epiteliais apresentam

secreção lisossomal limitada foi feito um grupo em que as células eram primeiramente estimuladas com ionomicina e, em seguida, o sequestro de colesterol era feito. Os dados foram representados como média de triplicatas \pm desvio padrão. Os asteriscos (*) indicam diferenças estatísticas entre controle e grupos experimentais para as células selvagens, os quadrados (#) indicam diferenças estatísticas entre as células *scrambled* tratadas e controle e os losangos (◆) indicam diferenças estatísticas entre as células controle e tratadas, todas elas *knockdown* para syt-VII ($p < 0.05$, teste T de Student). Foram realizadas comparações estatísticas intragrupos.

4.7) A depleção de colesterol modifica a distribuição lisossomal nos cardiomiócitos

Com o intuito de visualizar os efeitos promovidos pelo sequestro de colesterol na distribuição dos lisossomos remanescentes na célula (aqueles que não sofreram exocitose), foram coletadas imagens de cardiomiócitos tratados com M β CD, H γ CD ou M β CD + WSC, fixados e marcados com DAPI (corante nuclear) e com anti-LAMP 1 (marcador lisossomal). Imagens representativas de cada grupo experimental estão ilustradas na figura 18. Análises qualitativas destas imagens revelam uma distribuição mais restrita dos lisossomos à região perinuclear, nas células tratadas com 10 ou 15 mM de M β CD (Fig. 18 B e C), em comparação com as células não tratadas (Fig. 18 A) ou com as células tratadas com H γ CD (Fig. 18 D e E). A reposição do colesterol após o tratamento com M β CD aparentemente reverteu a distribuição dos lisossomos para padrões semelhantes aos observados nas células controle (Fig. 18 F). Para verificar de forma precisa as diferenças nas distribuições lisossomais entre grupos experimentais distintos, as mesmas imagens coletadas anteriormente foram utilizadas para a realização de um ensaio quantitativo de dispersão (Fig. 19).

Primeiramente, para cada um dos núcleos isolados foi calculado um raio médio (R). O próximo passo foi selecionar cada lisossomo associado ao seu respectivo núcleo e medir a distância média de cada lisossomo ao centro celular (D). Por fim, com a distância lisossomal média (D) relativa ao raio nuclear médio (R) foi definida a razão D/R na qual valores próximos a um indicariam que os lisossomos estariam próximos à região perinuclear ao passo que valores maiores indicariam que os lisossomos estariam mais frequentes nas bordas da célula em análise. Esta razão D/R foi calculada para diversos grupos de lisossomos, associados aos seus respectivos núcleos, em diferentes grupos experimentais. Os resultados desta análise consistem em distribuições de valores de D/R associados a cada tratamento e estão representados como histogramas na figura 19.

Ajustes gaussianos para a distribuição de lisossomos em células não tratadas mostrou que a maioria destas organelas está localizada na razão 1.3 com relação ao centro celular ao passo que o pico do ajuste gaussiano para as células tratadas com 10 mM de M β CD mostram uma razão de 1.2 (Fig. 19 A). O mesmo padrão é observado em cardiomiócitos tratados com concentrações maiores da ciclodextrina metilada (Fig. 19

B). É possível perceber também nessas distribuições que lisossomos localizados em razões maiores, ou seja, mais distantes do núcleo celular, são mais frequentes no grupo controle e são eventos mais raros nos grupos tratados com M β CD (Fig. 19 A e 19 B). Em contrapartida, nenhuma diferença significativa na distribuição lisossomal foi observada quando as células foram tratadas com 10 ou 15 mM de H γ CD em comparação às células não tratadas (Fig. 19 C e 19 D). Por último, a reposição do colesterol após o sequestro do mesmo promovido pelo tratamento com M β CD conseguiu, pelo menos em parte, reverter a dispersão lisossomal para padrões semelhantes aos observados nas células controle (Fig. 19 E).

Frequências cumulativas de lisossomos (Fig. 19 F) obtidas a partir dos histogramas da figura 19 (Fig. 19 A à 19 E) foram plotadas e analisadas estatisticamente através do teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com 10 ou 15 mM de M β CD em relação ao grupo controle. Os grupos experimentais relativos aos tratamentos com 10 e 15 mM H γ CD ou com 15 mM de M β CD + WSC não apresentaram diferenças nas frequências cumulativas em comparação ao grupo controle.

A fim de provar que o rearranjo na distribuição lisossomal não foi consequência de um possível aumento na área superficial celular em decorrência do sequestro de colesterol, células tratadas (ou não) com M β CD ou com seu análogo inativo, H γ CD, bem como os cardiomiócitos tratados com M β CD + WSC foram marcadas com um marcador específico de membrana celular, o Cell Mask (Invitrogen). Imagens foram coletadas e a área superficial de um conjunto de células de cada grupo foi calculada usando o software ImageJ. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os grupos distintos (Fig. 20).

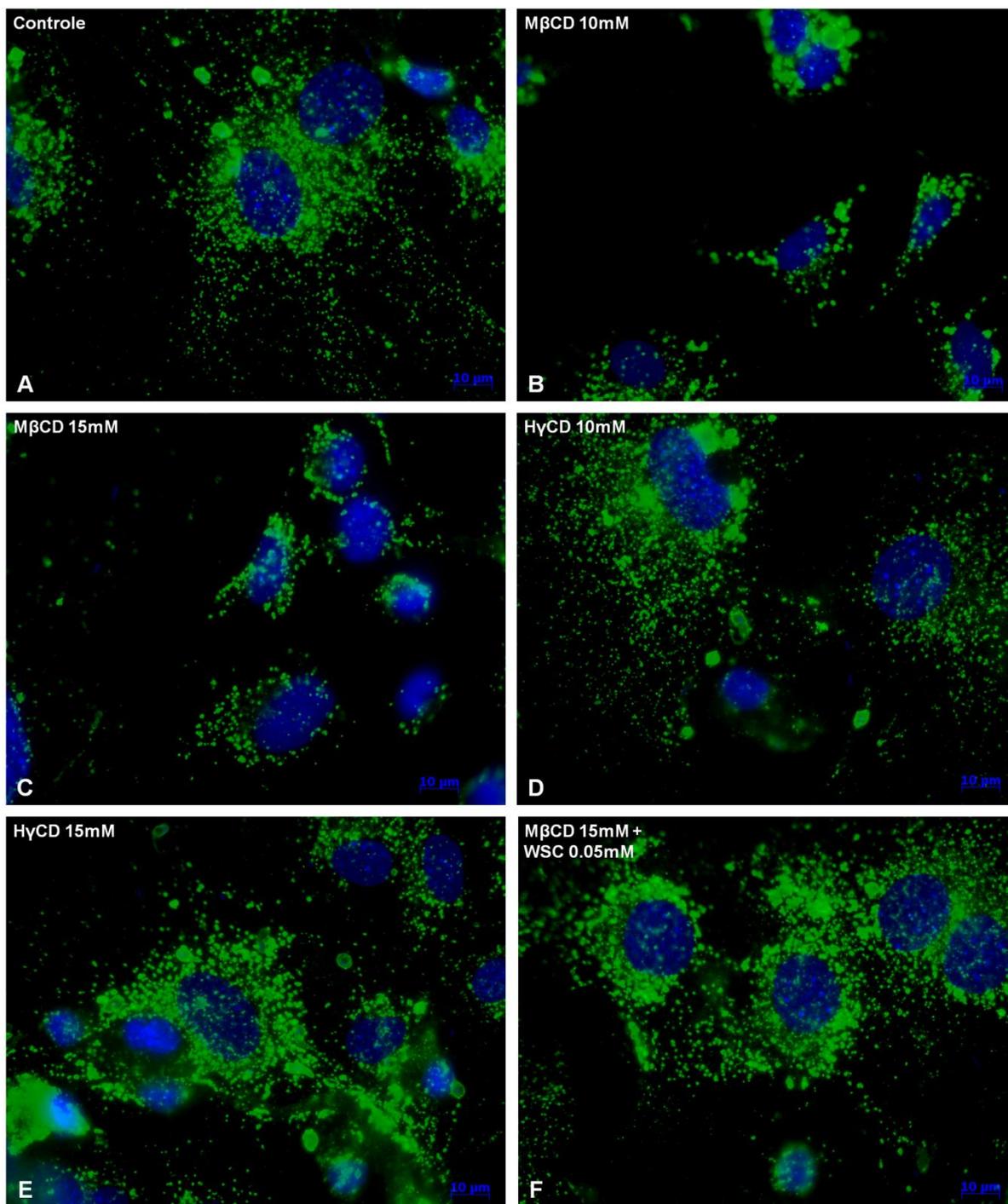


Figura 18: A depleção do colesterol gera mudanças na distribuição de lisossomos nos cardiomiócitos. Painéis representativos da distribuição lisossomal em cardiomiócitos controle (A), tratados com MβCD nas concentrações de 10 mM (B) ou 15 mM (C) ou ainda tratados com HγCD nas concentrações de 10 mM (D) ou 15 mM (E). A reposição com 0.05 mM de WSC após o sequestro com 15 mM de MβCD também foi representada no painel (F). Após a incubação com as drogas as células foram lavadas, fixadas, submetidas à imunocitoquímica pra LAMP-1 (verde), DAPI (azul) e analisadas em microscópio de fluorescência. Em comparação aos cardiomiócitos não tratados (A), os quais exibiam marcação para LAMP-1 homogênea e bem distribuída, as células tratadas com MβCD (B) e (C) exibiram uma marcação mais heterogênea para LAMP-1 apresentando lisossomos localizados preferencialmente

próximos aos núcleos celulares. Por outro lado, os cardiomiócitos que foram incubados com H γ CD ou que tiveram o seu conteúdo colestérico repostado (D), (E) e (F), respectivamente, apresentaram distribuição lisossomal semelhante à vista nas células controle. Barra de escala: 10 μ m.

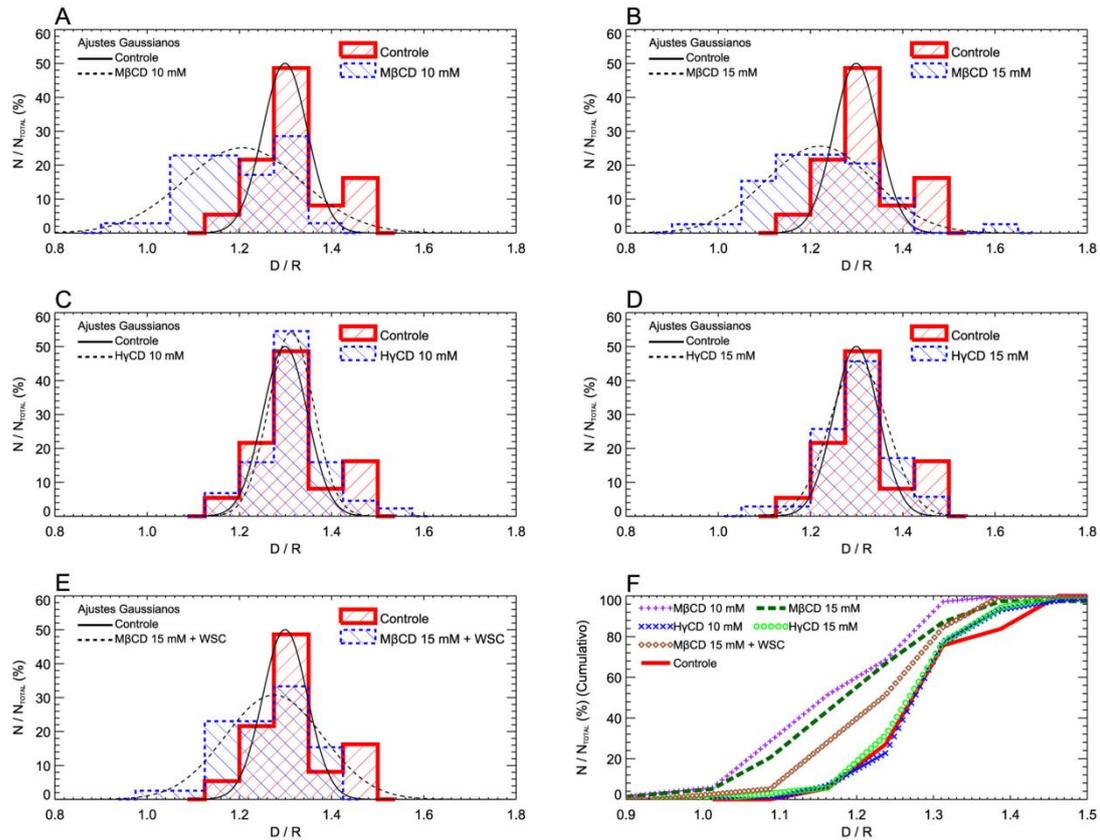


Figura 19: O tratamento dos cardiomiócitos com M β CD, mas não com HyCD, gera uma distribuição lisossomal mais restrita, próxima ao núcleo celular. A análise quantitativa da distribuição lisossomal, relativa a determinado núcleo celular, em células tratadas com 10 mM de M β CD (A), 15 mM de M β CD (B), 10 mM de HyCD (C), 15 mM de HyCD (D) ou 15 mM de M β CD seguido pela incubação com 0.05 mM WSC (E) foi feita sempre em relação à mesma distribuição de lisossomos em células não tratadas. A distância média entre um lisossomo e seu respectivo centro celular é representada pela letra D e relação entre a distância média D de cada lisossomo relativa ao raio nuclear (R) de seu respectivo núcleo é dada por D/R . Valores de D/R próximos à unidade indicam que os lisossomos distribuem-se mais próximos ao núcleo celular, ao passo que valores maiores desta razão indicam uma distribuição mais distante do núcleo de suas células. A razão D/R foi medida para diversos grupos de lisossomos associados aos núcleos de suas células, em diferentes tratamentos. Os resultados desta análise foram expressos como distribuições em histogramas de valores de D/R para várias células (N representa o número de células analisadas) representantes dos grupos experimentais distintos. O histograma de cada tratamento foi representado por uma linha tracejada azul ao qual sempre foi superposto o histograma representativo das células controle (linha sólida vermelha). Ajustes gaussianos de cada uma das distribuições foram adicionados de forma a evidenciar a tendência estatística principal de cada gráfico. O eixo x de cada gráfico representa a razão D/R ao passo que o eixo y representa o valor da porcentagem de núcleos analisados em cada tratamento normalizado pelo número total de células. (F) Frequência cumulativa referente aos histogramas. Sinais de mais roxos representam células tratadas com M β CD a 10 mM, retângulos verde escuros representam células tratadas com 15 mM de M β CD, cruzes azuis representam

células tratadas com 10 mM de H γ CD, círculos verde claros representam células tratadas com 15 mM de H γ CD, losangos marrons representam células cujo conteúdo de colesterol foi repostado por WSC após prévio sequestro e a linha vermelha contínua representa células controle. O teste estatístico Kolmogorov-Smirnov (KS) foi realizado com o intuito de comparar as frequências cumulativas entre elas. Diferenças estatísticas significativas foram obtidas para cardiomiócitos incubados com M β CD 10 mM 0.02% (p=0.0002) ou M β CD 15 mM 0.03% (p=0.0003) em relação às células não tratadas ao passo que não foram encontradas significâncias estatísticas entre as células controle e as tratadas com 10 ou 15 mM da ciclodextrina inativa (respectivamente 79.49% (p=0.7949) e 86.03% (p=0.8603)) e nem entre as células controle e aquelas que tiveram o colesterol reintroduzido (6.44% (p=0.0644)).

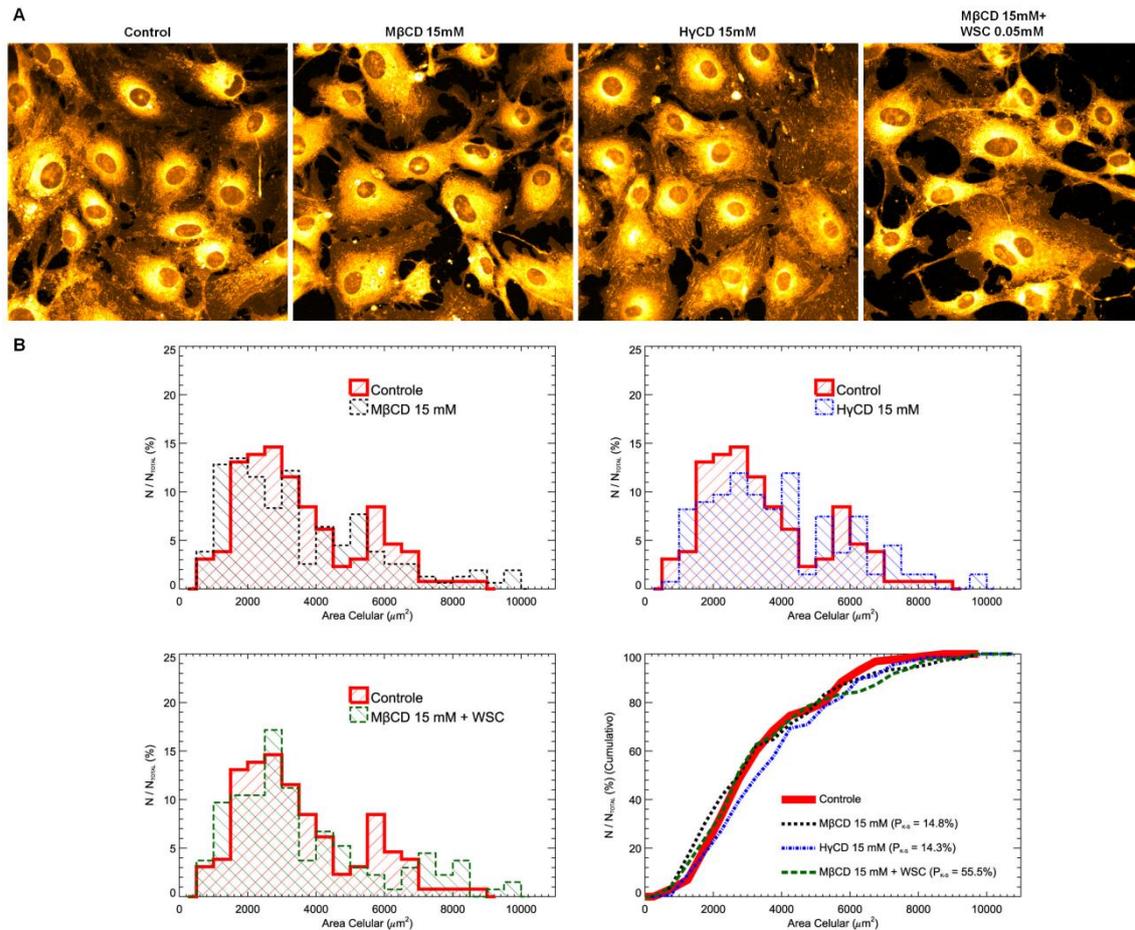


Figura 20: Depleção do colesterol não modifica a área dos cardiomiócitos. (A) Figura representativa de células controle, tratadas com 15 mM de MβCD, com 15 mM HyCD e células com colesterol repostado pelo WSC após prévio sequestro marcadas com *CellMask*® *Orange plasma membrane stain*. Brevemente, os cardiomiócitos foram tratados com as ciclodextrinas, lavados e incubados em solução de 5 μg/mL de *CellMask* em meio fresco, por 5 minutos à 37°C. Passado o período de incubação, os cardiomiócitos foram fixados por 10 minutos, a 37°C, lavados e montados com gel de montagem para fluorescência e imediatamente analisados em microscópio confocal. (B) Histogramas mostrando distribuições das áreas celulares para os diferentes tratamentos (MβCD 15 mM- linha tracejada preta; HyCD 15 mM- linha tracejada azul e WSC 0.05 mM após sequestro com MβCD 15 mM- linha tracejada verde) em comparação com as células controle não tratadas- linha contínua vermelha. No gráfico de frequências cumulativas, temos que os testes estatísticos KS nos forneceram os seguintes valores: controle vs MβCD 15 mM é 14.8% (p=0.148); controle vs HyCD 15 mM é 14.3% (p=0.143) e controle vs WSC é 55.5% (p=0.555). No conjunto, esta análise estatística mostra que não há diferenças entre as áreas de células controle e dos demais grupos experimentais.

4.8) *A exocitose lisossomal induzida por tratamento com M β CD parece ser diferente daquela induzida por despolimerização do citoesqueleto*

Existem relatos na literatura que o citoesqueleto de actina tem papel regulador em eventos de exocitose vesicular. Diversos autores demonstraram que na região subplasmalemar (logo abaixo da membrana plasmática) de células cromaffin, células neuroendócrinas da medula da adrenal, existe um citoesqueleto de actina polimerizado que funciona como uma barreira para o processo de secreção de seus grânulos (Aunes & Bader, 1988; Nakata & Hirokawa, 1992). Além destes, outros estudos com células pancreáticas também indicaram o citoesqueleto cortical de actina como bloqueador de eventos de exocitose (Mualen *et al.*, 1995). Estudos mais recentes revelaram, no entanto, que o citoesqueleto de actina poderia atuar também como um facilitador do processo de exocitose, por auxiliar na formação de um *pool* de vesículas exocíticas próximo à membrana plasmática e facilmente acessível para fusão e liberação de seu conteúdo (Malacombe *et al.*, 2006). Ademais, outros pesquisadores mostraram, em um trabalho anterior, que nessas células cromaffin existiam dois reservatórios de grânulos: um que se localizava próximo à membrana plasmática, e que não estava diretamente associado ao citoesqueleto de actina, e um outro mais interno que estava diretamente associado aos microfilamentos (Aunes e Bader, 1988).

Como o tratamento com M β CD em nossos ensaios levou a um aumento da exocitose lisossomal, bem como a formação de fibras de estresse ou polimerização da actina, mesmo após o tratamento com latrunculina-A, decidimos verificar se o efeito do sequestro do colesterol sobre o citoesqueleto celular poderia influenciar a exocitose lisossomal induzida pelo tratamento com M β CD. Para isto, culturas de cardiomiócitos e de fibroblastos previamente incubadas, ou não, com latrunculina-A, foram submetidas ao sequestro de colesterol com 10 mM de M β CD durante 10, 20 ou 40 minutos. Tanto o sobrenadante dessas células quanto o conteúdo do lisado celular foram coletados para dosagem da atividade da enzima beta-hexosaminidase conforme descrito anteriormente. Células controle e células incubadas apenas com latrunculina-A também foram analisadas no ensaio enzimático (Fig. 21). A atividade de β -hexosaminidase no sobrenadante de culturas de cardiomiócitos (Fig. 21 A) tratadas com M β CD em comparação às células do grupo controle foram reprodutíveis e semelhantes aos

resultados obtidos anteriormente. Quando comparados os valores de exocitose lisossomal entre os grupos controle não tratado e tratado com latrunculina-A foi possível identificar que apenas o tratamento com o agente despolimerizador do citoesqueleto já foi capaz de induzir a exocitose lisossomal (Fig. 21 A). Ademais, o tratamento com latrunculina-A prévio ao tratamento com M β CD por 10, 20 e 40 minutos induziu um nível ainda maior de exocitose quando comparado com o grupo tratado apenas com M β CD, no mesmo tempo, ou latrunculina isoladamente (Fig. 21 A). Quando analisamos o cenário da exocitose lisossomal em fibroblastos WTCL3 o resultado é bem semelhante (Fig. 21 B): o tratamento com latrunculina-A foi capaz de induzir exocitose lisossomal com índices superiores à exocitose lisossomal induzida apenas pelo tratamento com M β CD. O tratamento combinado latrunculina-A seguido pelo tratamento com M β CD produziu também níveis superiores de exocitose lisossomal quando comparados com os grupos que receberam apenas a ciclodextrina. Estes resultados sugerem que os *pools* de lisossomos recrutados para a exocitose pelo tratamento com essas duas drogas, possam ser diferentes.

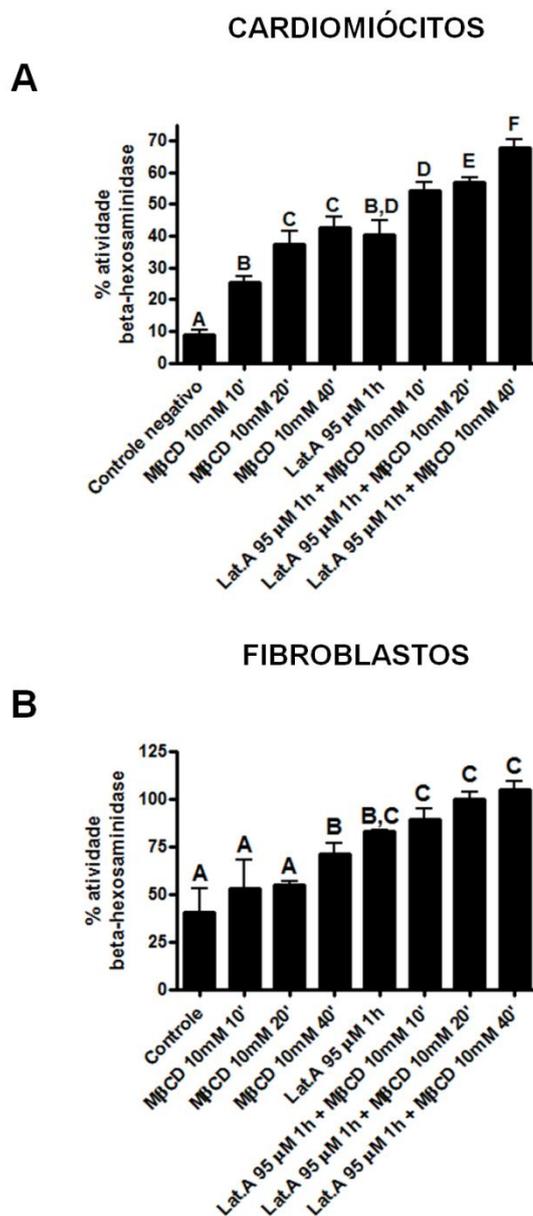


Figura 21: Depleção do colesterol promove excitose lisossomal na presença ou na ausência de um citoesqueleto de actina íntegro. (A) Cardiomiócitos e (B) fibroblastos tratados previamente (ou não) com latrunculina-A 95 μ M por uma hora foram incubados com 10mM de M β CD por 10, 20 ou 40 minutos. Em seguida, ambos sobrenadante e lisado das culturas celulares foram coletados e colocados em contato com o substrato da enzima beta-hexosaminidase conforme metodologia previamente descrita. Os resultados deste gráfico foram expressos como a razão entre a atividade da β -hexosaminidase no meio extracelular pela atividade total desta mesma enzima (leitura da β -hexosaminidase no sobrenadante/leitura da β -hexosaminidase no sobrenadante + leitura da β -hexosaminidase no lisado celular). Os dados foram representados como média de triplicatas \pm desvio padrão. Letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais ao passo que letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. ($p < 0.05$, teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Neuman Keuls).

4.9) A depleção de colesterol diminui a entrada do *T. cruzi* em cardiomiócitos primários murinos

Os nossos resultados listados nas seções anteriores mostram que tanto fibroblastos quanto cardiomiócitos, que foram submetidos ao sequestro de colesterol, sofrem dois processos simultâneos: enrijecimento do córtex celular e exocitose de lisossomos próximos à periferia celular. Sabemos, de trabalhos anteriores, que o parasito intracelular obrigatório, *T. cruzi*, pode depender de microdomínios de membrana, enriquecidos em colesterol, para o sucesso da sua entrada (Barrias *et al.*, 2007 e Fernandes *et al.*, 2007). Apesar de esses dois trabalhos terem mostrado a importância do colesterol na entrada do parasito, eles não sugeriram nenhum mecanismo através do qual os microdomínios lipídicos poderiam interferir no processo. Igualmente, sabemos que o *T. cruzi*, aparentemente, usa lisossomos que estão próximos à região cortical para invadirem a célula hospedeira e, para que o recrutamento desses lisossomos possa ocorrer, o estímulo do parasito na membrana celular necessita de um citoesqueleto relativamente maleável. Como o sequestro de colesterol, aparentemente, depleta os lisossomos próximos ao córtex celular e enrijece a célula, nos propusemos a investigar se a diminuição da entrada do *T. cruzi*, em células com menor conteúdo colestérico, poderia ocorrer por causa destes motivos supracitados.

Uma vez que a entrada do *T. cruzi* em células fagocíticas não-profissionais, como os cardiomiócitos, é um evento importante e determinante no estabelecimento da infecção e possível desenvolvimento da forma clínica da doença, resolvemos primeiramente verificar a importância do colesterol na entrada do *T. cruzi* em cardiomiócitos murinos obtidos a partir de cultura primária de animais neonatos.

Para isto, cardiomiócitos foram previamente plaqueados e incubados com 10 ou 15 mM de M β CD por 45 minutos à 37°C, já que estas condições foram eficientes no sequestro do colesterol de membrana e sabidamente ideais para tratamento com ciclodextrinas (Kruth *et al.*, 1980). Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com formas tripomastigotas purificadas da cepa Y de *T. cruzi*, por 40 minutos. Em acordo com dados publicados para macrófagos (Barrias *et al.*, 2007), verificamos que a depleção do colesterol da membrana plasmática de cardiomiócitos também acarretou uma diminuição na invasão do parasito (Fig. 22 A e C). Foi observada uma redução de 85-90% na entrada do *T. cruzi* em cardiomiócitos previamente tratados com 10 ou 15 mM de M β CD (Fig. 22 A). Para garantirmos que o efeito observado era mesmo devido

ao sequestro do colesterol, alternativamente, as células foram tratadas com HyCD, uma ciclodextrina semelhante a M β CD, porém com menor afinidade para o colesterol, nas mesmas concentrações (10 e 15 mM). Após exposição das células tratadas com HyCD ao *T. cruzi*, verificamos que a entrada do parasito teve valores semelhantes ao do grupo controle não-tratado (Fig. 22 A e C). Ademais, também mostramos que a menor invasão do *T. cruzi* nas células tratadas com M β CD não ocorreu devido a processos de morte celular, uma vez que o número de células presentes nos diferentes grupos experimentais, em 10 campos analisados, não foi estatisticamente diferente entre os grupos (Fig. 22 A, números sobre as barras).

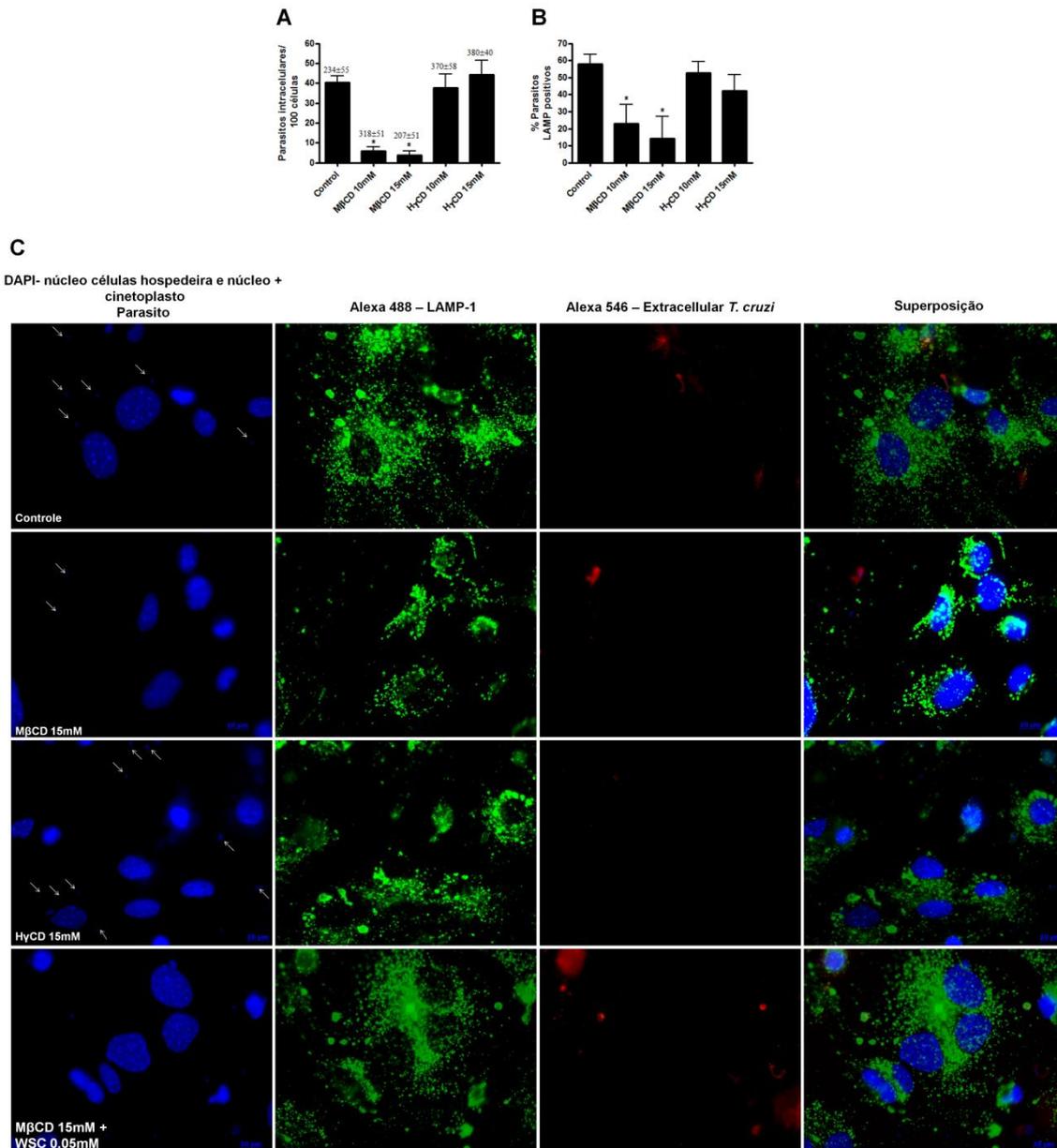


Figura 22: A invasão do *T. cruzi* bem como a associação do mesmo a lisossomos são reduzidas após o sequestro de colesterol. Cardiomiócitos, pré-tratados ou não com as ciclodextrinas, foram lavados e desafiados com tripomastigotas de *T. cruzi* com uma M.O.I. de 50, por 40 minutos à 37°C. Após a infecção, as células foram lavadas, fixadas e processadas para imunofluorescência através da qual seria possível a detecção dos parasitos totais e parasitos intracelulares associados a lisossomos. Tanto a invasão (A) quanto a associação lisossomal (B) dos tripomastigotas diminuiu significativamente mediante tratamento com 10 ou 15 mM de M β CD e essa redução não foi observada após tratamento com HyCD nas mesmas concentrações. A reposição do colesterol reverteu o efeito do tratamento com M β CD na invasão (A) e parcialmente na associação a lisossomos (B) do *T. cruzi*. O número médio de cardiomiócitos \pm desvio padrão analisados em 10 campos (por lâmina analisada) encontra-se sobre as barras (A). Os dados explicitados são médias de triplicatas \pm desvio padrão. Asteriscos representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$, Teste t de Student) entre controle e grupos tratados. (C) Painéis representativos da invasão do *T. cruzi* bem como de sua associação com lisossomos em cardiomiócitos. Células e parasitos totais, bem como o DNA dos cinetoplastos dos parasitos foram marcados com DAPI, os lisossomos foram marcados com anti-LAMP 1 (anticorpo primário) e com anticorpo secundário fluorescente AlexaFluor 488. Os parasitos extracelulares nos campos foram marcados com anticorpo primário feito em coelho e com anticorpo secundário fluorescente AlexaFluor 546. De cima para baixo: cardiomiócitos tratados com 15 mM de M β CD, cardiomiócitos tratados com a mesma concentração de HyCD, cardiomiócitos tratados com 15 mM de M β CD e em seguida repostos com 0,05 mM de WSC. Setas azuis explicitam os tripomastigotas de *T. cruzi* presentes no campo representativo. Elipsóides amarelos mostram tripomastigotas associados a lisossomos e triângulos vermelhos indicam tripomastigotas extracelulares. A última coluna ilustra a combinação das três colunas anteriores. Barra de escala: 10 μ m.

4.10) A invasão do *T. cruzi* é restaurada após a reposição do colesterol

A fim de verificarmos se a diminuição da entrada do *T. cruzi* deveu-se exclusivamente ao efeito da droga, M β CD, no sequestro de colesterol da membrana dos cardiomiócitos, tratamos as células com esta ciclodextrina e, em seguida, incubamos as mesmas com WSC, uma fonte exógena de colesterol que é capaz de repor o colesterol previamente sequestrado. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e expostas aos tripomastigotas de *T. cruzi*. Ao examinarmos as figuras 22 A e 22 C podemos verificar que, após a reposição do colesterol a invasão do *T. cruzi* nos cardiomiócitos retorna a valores semelhantes ao controle não tratado indicando assim, a participação do colesterol durante a entrada do parasito.

4.11) A depleção do colesterol diminui a associação do *T. cruzi* a lisossomos durante sua invasão em cardiomiócitos

Uma vez que determinamos que o sequestro de colesterol também afetava a entrada de *T. cruzi* em cardiomiócitos, resolvemos verificar se esta diminuição se devia à uma alteração na disponibilidade de lisossomos nas células hospedeiras após o sequestro de colesterol. Primeiramente, porque é sabido que o recrutamento e fusão de lisossomos na célula hospedeira é essencial para o estabelecimento de uma infecção viável e estável por esse parasito (Andrade *et al.*, 2004; Tardieux *et al.*, 1994; Tardieux *et al.*, 1992 e Burleigh e Andrews, 1995). Em segundo lugar, porque já havíamos demonstrado neste trabalho que o sequestro de colesterol nestas células levava à uma diminuição na quantidade de lisossomos próximos ao córtex celular. Dessa forma, investigamos como estava a associação lisossomal dos tripomastigotas, durante o processo de invasão celular, após o tratamento com M β CD.

Células não tratadas e tratadas com M β CD, em diferentes concentrações, foram expostas ao *T. cruzi* por 40 minutos, lavadas com PBS, fixadas e submetidas à imunofluorescência para detecção de parasitos intra e extracelulares. A remoção de colesterol da membrana dos cardiomiócitos mediante tratamento com M β CD não apenas diminuiu a invasão dos tripomastigotas (Fig. 22 A e C) como também a associação dos mesmos a lisossomos (Fig 22 B e C). A pré-incubação dos cardiomiócitos com 10 mM de M β CD gerou uma redução de aproximadamente 60% no

número de parasitos internalizados que co-localizaram com LAMP-1 (Fig. 24 B). Além disso, quanto maior a concentração de M β CD utilizada menor era a quantidade de tripomastigotas internalizados (Fig. 22 A) e a quantidade de parasitos que se associaram a LAMP-1 (Fig. 22 B). O tratamento com 15 mM de M β CD provocou uma redução de 75% na associação lisossomal aos tripomastigotas internalizados. Em contrapartida, células previamente incubadas com H γ CD, a ciclodextrina análoga inativa do M β CD, não apresentaram diferenças estatísticas com relação à invasão do *T. cruzi* (Fig. 22 A e C) ou à associação do mesmo a lisossomos (Fig. 22 B e C) quando comparadas às células controle não tratadas.

4.12) A depleção do colesterol não altera a adesão dos tripomastigotas de T. cruzi aos cardiomiócitos

Conforme verificado anteriormente, o sequestro de colesterol promove uma diminuição tanto na entrada quanto na associação lisossomal dos tripomastigotas de *T. cruzi* nos cardiomiócitos tratados com M β CD. A fim de verificarmos se esta diminuição na entrada estava de alguma forma vinculada ao processo de adesão do parasito às membranas de suas células hospedeiras, realizamos um ensaio de adesão conforme protocolo descrito previamente (Schenkman *et al.*, 1991b). Verificamos que não houve diferença entre os grupos tratados com as ciclodextrinas (ativa e inativa para o sequestro do colesterol), ou a β ciclodextrina + WSC, e o grupo controle (Fig. 23 A a D). Uma análise quantitativa da adesão dos tripomastigotas foi feita na qual analisamos o número de parasitos aderidos por 100 células. Nenhuma diferença estatística foi observada quando comparamos o grupo controle e os grupos experimentais tratados com as ciclodextrinas (Fig. 23 E).

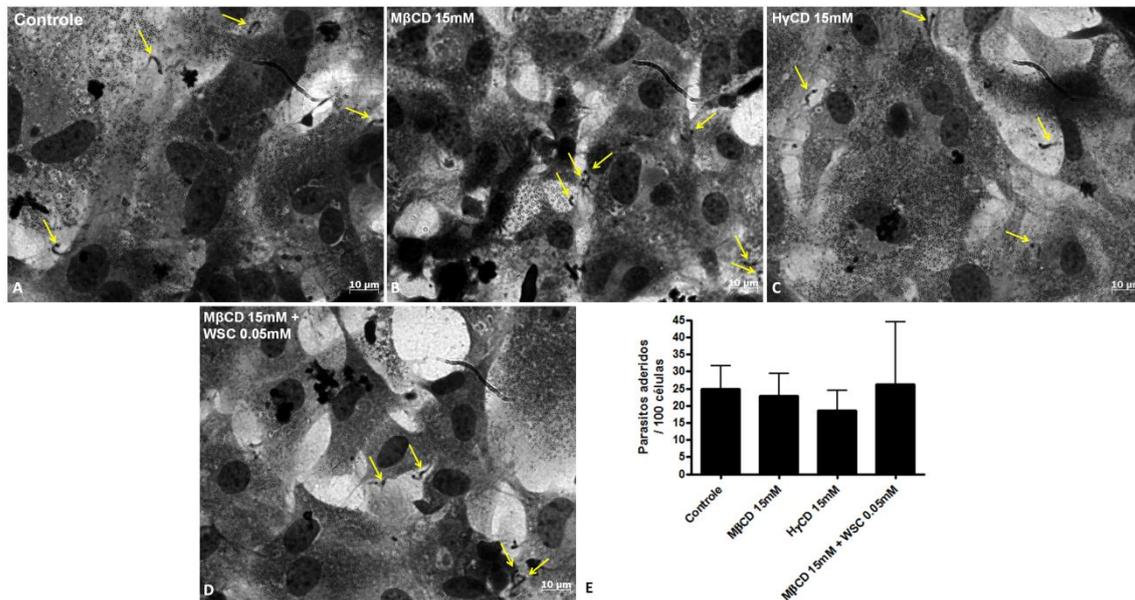


Figura 23: A depleção do colesterol de membrana não altera a adesão do *T. cruzi* em cardiomiócitos primários. Imagens representativas de células controle (A), tratadas com 15 mM de MβCD (B) ou com 15 mM de HyCD e células cujo colesterol foi sequestrado e repostado com 0,05 mM de WSC. (D) Quantificação de parasitos aderidos para cada 100 células contadas (E). Os cardiomiócitos, tratados ou não, foram pré-fixados com glutaraldeído a 2% em PBS por 5 minutos, a 4°C. Após esta etapa, as células foram lavadas em PBS e incubadas, por 24 horas, com etanolamina 0,16 M (pH 8,3) a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS e com DMEM/ BSA 0,2% e foram submetidas ao contato com as formas tripomastigotas do *T. cruzi*, MOI 50, por 40 minutos. Após incubação as células foram lavadas, fixadas com Bouin e marcadas com o corante giemsa. Os dados são mostrados como sendo a média de triplicadas ± desvio padrão. Barra de escala: 10μm.

4.13) *Tratamento com latrunculina-A, prévio ao sequestro de colesterol, aparentemente, não interfere na taxa de infecção de cardiomiócitos pelo T. cruzi*

Demonstramos, nos itens 4.9 e 4.11, desta seção, que o sequestro de colesterol reduziu a entrada do *T. cruzi* nas células musculares e que esta redução foi uma consequência da diminuição da associação dos parasitos a lisossomos. Verificamos também, no item 4.8, que a ação da latrunculina-A e do sequestro de colesterol são aparentemente diferenciais no *pool* de lisossomos que é excitado pelas células. Dessa forma, a ação tanto da latrunculina quanto da M β CD interferem tanto no citoesqueleto quanto na exocitose lisossomal e é sabido que tanto o citoesqueleto cortical de actina quanto o *pool* cortical de lisossomos podem interferir na internalização do *T. cruzi* na célula hospedeira (Woolsey & Burleigh, 2004; Andrade & Andrews, 2004 e 2005; Fernandes *et al.*, 2011, Tardieux *et al.*, 1992 e 1994). Como o principal reservatório de lisossomos utilizado pelo *T. cruzi* na sua invasão é aquele localizado na periferia celular, exatamente aquele que a ciclodextrina parece depletar, decidimos fazer um experimento em que submeteríamos os cardiomiócitos tanto ao tratamento com latrunculina quanto com M β CD. Dessa forma, realizamos experimentos de invasão nos quais as células foram tratadas ou não por 1 hora com latrunculina-A 95 μ M, previamente ao tratamento com 10 mM de M β CD. Após os tratamentos as células foram lavadas com PBS e expostas ao *T. cruzi*, com uma M.O.I. de 50 por 40 minutos. Após a exposição, as células foram lavadas novamente com PBS +/+, fixadas e processadas para imunocitoquímica, na qual foram marcados o DNA do *T. cruzi* e dos cardiomiócitos (azul), a glicoproteína lisossomal LAMP-1 (verde) e os tripomastigotas extracelulares (vermelho) segundo metodologia já descrita. Foram analisados o número de parasitos intracelulares por 100 células (Fig. 24 A e C) e o número de parasitos intracelulares que se associaram a marcadores lisossomais (Fig 24 B e C) em 10 campos aleatórios quantificados (mínimo de 250 células analisadas). De acordo com a fig. 24, o tratamento apenas com latrunculina-A não produziu diferenças nem na taxa de infecção e nem no número de parasitos intracelulares associados a lisossomos, em relação ao grupo controle, não tratado com nenhuma das drogas. Como esperado, o tratamento com M β CD diminuiu tanto o número de parasitos internalizados quanto o número de parasitos intracelulares associados a lisossomos. Entretanto, não foram observadas diferenças nem nas taxas de infecção e nem à associação com lisossomos entre células

tratadas apenas com M β CD e células tratadas com latrunculina-A previamente ao tratamento com M β CD.

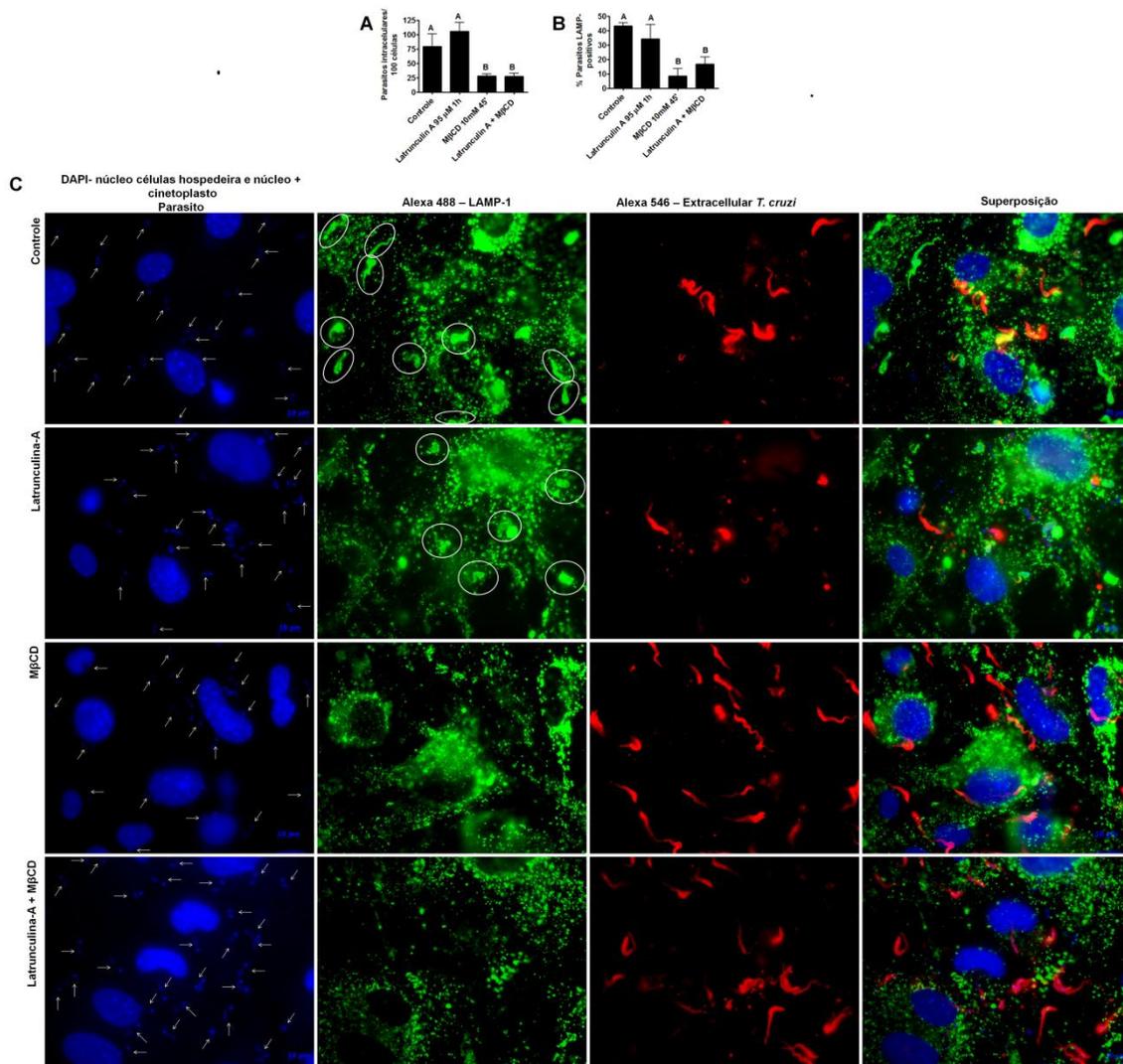


Figura 24: O tratamento com latrunculina-A, prévio à incubação com MβCD, não altera a taxa de infecção dos cardiomiócitos por tripomastigotas de *T. cruzi*. Cardiomiócitos, pré-tratados ou não com 95 μM de latrunculina-A, foram lavados, incubados (ou não) com MβCD e desafiados com tripomastigotas de *T. cruzi* numa M.O.I. de 50, por 40 minutos à 37°C. Após a infecção, as células foram lavadas, fixadas e processadas para imunofluorescência através da qual seria possível a detecção dos parasitos totais e parasitos intracelulares associados a lisossomos. (A) taxa de invasão e (B) associação lisossomal de células controle, ou expostas aos diferentes tratamentos. Os dados mostrados são médias de triplicatas ± desvio padrão. Letras iguais indicam grupos estatisticamente iguais ao passo que letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. ($p < 0.05$, teste one-way ANOVA seguido de pós-teste Neuman Keuls). (C) Painéis representativos da invasão do *T. cruzi* bem como de sua associação com lisossomos em cardiomiócitos. Células e parasitos totais, bem como o DNA dos cinetoplastos dos parasitos foram marcados com DAPI, os lisossomos foram marcados com anti-LAMP 1 (anticorpo primário) e com anticorpo secundário fluorescente AlexaFluor 488. Os parasitos extracelulares nos campos foram marcados com soro de coelho anti-*T. cruzi* e com anticorpo secundário fluorescente AlexaFluor 546. De cima para baixo: cardiomiócitos controle, cardiomiócitos tratados com 95 μM de latrunculina-A, cardiomiócitos tratados com 10 mM de MβCD, cardiomiócitos tratados previamente com

95 μM de latrunculina-A e posteriormente com 10 mM de M β CD e em seguida infectados. Setas explicitam os tripomastigotas de *T. cruzi* presentes no campo (DAPI), enquanto elipsóides mostram tripomastigotas associados a lisossomos (LAMP-1). A terceira coluna mostra parasitos extracelulares (em vermelho), marcados com anticorpo anti-*T. cruzi*. A última coluna mostra a combinação das três colunas anteriores. Barra de escala: 10 μm .

DISCUSSÃO

5) DISCUSSÃO

A membrana plasmática e o citoesqueleto de actina estão intimamente ligados e é essa conexão que confere às células a dinâmica necessária em diversos eventos, tais como migração, endocitose e exocitose de vesículas, divisão celular, manutenção do volume e área e controle da tensão superficial (revisito por Doherty e McMahon, 2008). A conexão entre citoesqueleto cortical de actina e membrana pode ocorrer em regiões da membrana plasmática que são enriquecidas em colesterol e esfingolípídios, microdomínios ordenados denominados balsas de membrana (Chichili e Rodgers, 2009). Estudos de proteômica apontam que proteínas componentes ou associadas ao citoesqueleto, tais como actina, tubulina, miosina, α -actinina e supervillina se clusterizam e se ligam à regiões de membrana onde se localizam as balsas (Nebl *et al.*, 2002 e MacLellan *et al.* 2005). Ademais, tais proteínas do citoesqueleto, aparentemente, não apenas se particionam junto com estas regiões de balsas de membrana como ainda as organizam, segundo estudos feitos em membranas-modelo (Liu e Fletcher, 2006). Os microdomínios de colesterol também concentram algumas integrinas, as quais regulam a organização do citoesqueleto, o tráfego de membranas e conexões com a matriz extracelular por intermédio dos pontos de adesão focal (Fuentes e Butler, 2012). Além dessas proteínas, alguns fosfoinosítídeos, tais como PIP2 (fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato) também modulam a coesão entre a bicamada lipídica e os microfilamentos presentes no córtex celular (Caroni, 2001).

Com o intuito de se estudar a modulação do citoesqueleto de actina pelos microdomínios de membrana, o sequestro de colesterol por ciclodextrinas vem se tornando uma ferramenta importante. As ciclodextrinas são moléculas formadas por anéis glicídicos que apresentam uma cavidade lipofílica e um exterior hidrossolúvel. Desta forma, as β -ciclodextrinas são as drogas mais utilizadas no sequestro do colesterol por apresentarem uma cavidade que consegue acoplar este lipídio de maneira a sequestrá-lo da bicamada eficientemente (Yancey *et al.*, 1996).

Em nosso trabalho realizamos o sequestro de colesterol, com a M β CD, em dois tipos celulares: fibroblastos e cardiomiócitos, sendo que o sequestro de colesterol feito nestes últimos não havia sido feito em outros estudos publicados. Mostramos, por dois métodos diferentes (marcação por Filipina- cardiomiócitos e ensaio colorimétrico de

detecção em extratos celulares lipídicos- fibroblastos) que o sequestro de colesterol realizado em nossos sistemas foi feito com sucesso (Fig. 1 e Tabela 1). Verificamos também que o sequestro de colesterol foi feito de forma a modificar as estruturas de microdomínios, visualizados através da marcação com CTX-B (subunidade B da toxina colérica que apresenta afinidade por GM1, um componente característico de balsas de membranas (Fig. 2). Padronizada a extração do lipídio, resolvemos investigar o comportamento estático e dinâmico das propriedades mecânicas das células cujo colesterol havia sido sequestrado em comparação com as células controle não tratadas. Primeiramente, decidimos investigar se o citoesqueleto de actina estava, de alguma forma, modificado pela extração do colesterol de membrana e, em caso positivo, se seria essa modificação do citoesqueleto um rearranjo das fibras de actina ou uma polimerização de fato. Para isso, após o sequestro de colesterol, as células foram marcadas com faloidina conjugada ao fluoróforo AlexaFluor 488, sendo que a faloidina é uma droga que apresenta afinidade pela actina polimerizada. Para os cardiomiócitos, que receberam apenas tratamento com 10mM de M β CD, verificamos que, após o sequestro de colesterol, essas células apresentavam mais fibras de estresse, em comparação com o caso controle e, aparentemente mais pontos de adesão focal, além da perda do estriamento característico (Figs. 3 B e 3A). Os fibroblastos, tratados com 5 ou 10 mM de M β CD, também apresentaram mais fibras de estresse em comparação às células controle, não tratadas com a ciclodextrina (Fig. 4). Fizemos também experimentos para demonstrar que o sequestro de colesterol não apenas reorganizou o citoesqueleto de actina como também gerou polimerização dos microfilamentos. Para isso, despolimerizamos o citoesqueleto de actina com o uso da latrunculina-A e, em seguida, expusemos essas células ao sequestro de colesterol. Pudemos verificar que o sequestro de colesterol foi capaz de repolimerizar as fibras de actina de fibroblastos previamente tratados com latrunculina-A. Sendo assim, não somente a ausência de colesterol gerou um rearranjo da actina como também repolimerizou-a (Figs. 3 e 5)

Trabalhos anteriores, realizados em osteoblastos de linhagem, mostraram que o estresse nutricional por privação de soro seguido pelo tratamento, por 60 minutos, com 5 mM de M β CD, levava a um aparecimento de fibras de estresse por ativação de Rho (Qi *et al.*, 2009). Verificamos que para o caso dos fibroblastos, em que o sequestro de colesterol é feito sem a privação prévia de soro, a ativação de Rho já ocorre nos primeiros 20 minutos de incubação com 10 mM M β CD e essa ativação perdura até o final do tratamento (Fig. 6). Sendo assim, a formação de diversas fibras de estresse nas

células cujo colesterol foi retirado da membrana ocorreu, provavelmente, pela ativação da proteína Rho. O aumento da quantidade de fibras de estresse nas células com menos colesterol nos levou a investigar se a dinâmica do citoesqueleto-membrana dessas células também estava alterado, uma vez que tínhamos observado apenas as células fixadas. Verificamos, de forma inédita, utilizando a microscopia de desfocalização, que o tempo de relaxação aumenta ao longo do tempo de tratamento e depois decai ao final do tratamento tanto com 5 quanto com 10mM de M β CD (Fig. 10). Já a amplitude de oscilação da membrana dos fibroblastos diminui com o passar do tempo em que as células são expostas à ciclodextrina (Fig. 11). O aumento do tempo de relaxação está intimamente ligado ao aumento de viscosidade do citoesqueleto de actina já que essas duas grandezas são diretamente proporcionais. Dessa forma, é possível que os fibroblastos reorganizem seu citoesqueleto durante o tratamento com as ciclodextrinas e que esse rearranjo aumente a viscosidade do conteúdo citoplasmático levando a um aumento transiente do tempo de relaxação celular. Fizemos também, utilizando fibroblastos, experimentos de pinçamento óptico com extração de amarras celulares de células não tratadas e tratadas com 5 ou 10 mM de M β CD. Obtivemos resultados interessantes, que nos mostram que, apesar do raio das amarras celulares extraídas terem sido constantes entre os tratamentos (Fig. 12 E), a força para se extrair a amarra, F_0 , bem com a tensão superficial σ aumentaram significativamente, sobretudo para o tratamento com a maior concentração da ciclodextrina (Fig. 12 C e Tabela 2). Já a rigidez de flexão κ (ou rigidez de curvatura) apresentou um pequeno aumento apenas para o caso em que os fibroblastos foram tratados com 10 mM de M β CD (Tabela 2). A rigidez de curvatura, ou rigidez de flexão, também pode ser discutida mediante resultados obtidos pela microscopia de desfocalização. Vimos que a amplitude das oscilações da membrana nos fibroblastos diminui com o passar do tempo de tratamento já que a rigidez de curvatura é tão maior quanto menor for a amplitude de relaxação das membranas. Dessa forma, como vemos uma diminuição da amplitude de relaxação à medida que o sequestro de colesterol é feito já era de se esperar um aumento na rigidez de flexão do complexo membrana-citoesqueleto.

Ainda sobre a relevância dos experimentos de pinça-óptica, vale ressaltar que estes experimentos de extração de *tethers* celulares, mediante o sequestro de colesterol, também são inéditos visto que os dados tanto de rigidez de curvatura quanto de tensão superficial foram obtidos a partir da medida dos raios das amarras feita por microscopia

eletrônica de varredura, metodologia esta estabelecida de forma pioneira pelo Laboratório de Pinças Ópticas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Nossos resultados estão em acordo com dados previamente publicados, obtidos por outras metodologias, tais como a extração de amarras celulares por aspiração em micropipeta ou por microscopia de força atômica, que mostram o aumento da rigidez celular devido ao sequestro de colesterol (Byfield *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2007). No ano de 2012, Nima e colaboradores (Nima *et al.*, 2012) publicaram um trabalho em que a pinça óptica é utilizada para se medir propriedades mecânicas de células HEK 293, um tipo de célula de linhagem derivada de rim humano embrionário. A partir do pinçamento óptico estes pesquisadores verificaram que o sequestro de colesterol aumentava a força de equilíbrio do *tether* bem como a rigidez e energia de adesão do mesmo. Entretanto, neste trabalho o raio das amarras foi medido utilizando tratamento das imagens obtidas por microscopia óptica. Esta metodologia não apresenta muita precisão visto que o tamanho do raio da amarra encontra-se próximo ao limite de resolução do microscópio óptico. Entretanto, mesmo com as limitações na medida dos raios, este trabalho corrobora nossos dados mostrando o sequestro do colesterol como a causa do aumento dos valores das propriedades mecânicas.

Uma explicação plausível para o aumento do enrijecimento celular reside no fato que, anteriormente ao sequestro de colesterol, os microdomínios aglomeravam-se, em pontos específicos da membrana, nos quais residiam as proteínas transmembranares de ligação entre citoesqueleto e matriz extracelular. Uma vez que o sequestro de colesterol é realizado pela incubação com a M β CD, as balsas são rompidas ou desorganizadas. Dessa forma, proteínas de conexão que estavam localizadas em pontos específicos da membrana passam a se distribuir em demais regiões corticais, levando assim a um aumento da rigidez celular como um todo. Essa hipótese também é corroborada pelos dados apresentados no trabalho de Norman e colaboradores, em 2010, que demonstra que o sequestro de colesterol promove um aumento de pontos focais de adesão (Norman *et al.*, 2010).

Mencionamos, no início desta seção, que a conexão entre membrana e citoesqueleto também é importante para a regulação da tensão superficial das células. Em condições homeostáticas, a tensão superficial é constante e uniforme ao longo da membrana plasmática. Entretanto, em 1999, Raucher e Sheetz demonstraram que, ao se puxar uma amarra de membrana de um fibroblasto, a força necessária para se extrair essa membrana era constante até certo valor, a partir do qual esta força aumentava

consideravelmente. Uma explicação para a manutenção de valores constantes de força para se extrair a amarra é que haveria um reservatório de membrana no interior celular, capaz de doar membrana para a bicamada externa (membrana plasmática) quando a mesma sofria uma variação da sua área superficial pela extração da amarra. Quando esse reservatório de membrana se esgotava, um aumento na força para extrair o *tether* era sentido (Raucher e Sheetz, 1999). Variações na tensão superficial também ocorrem quando as células são expostas a soluções hipotônicas, quando há variação significativa do volume das mesmas. Dessa forma, para que não haja lise celular, é necessário que haja doação de membrana proveniente de estoques intracelulares (revisito por Morris e Homann, 2001). Durante o espraiamento celular, também é percebido um aumento transiente na tensão que é aliviado tanto pela secreção de vesículas com origem no Golgi quanto pela contração do córtex de actina promovido pela ação da miosina (Gauthier *et al.*, 2001). Tendo em vista este cenário e o fato que o sequestro de colesterol aumenta a tensão superficial dos fibroblastos, resolvemos investigar se, de alguma maneira, a depleção deste lipídio poderia estar desencadeando a exocitose de alguma vesícula intracitoplasmática. Como os lisossomos são vesículas intracelulares capazes de exocitar, em modelos de reparo de membrana plasmática (Reddy *et al.*, 2001), investigamos se esta organela seria a responsável pela doação de membrana em nosso modelo de depleção do colesterol. Dessa maneira, realizamos um ensaio colorimétrico para detecção da enzima beta-hexosaminidase no sobrenadante de células controle e tratadas com M β CD. Esta enzima é residente em lisossomos e, no nosso ensaio, é detectada como sendo indicativo de exocitose. Nossos dados mostram que tanto cardiomiócitos quanto fibroblastos, tratados com M β CD apresentam exocitose lisossomal (Fig. 13 e Fig.14). Esses dados estão em acordo com dados que demonstraram a exocitose lisossomal em diferentes tipos celulares mediante o sequestro de colesterol (Chen *et al.*, 2010 e Xu *et al.*, 2012), embora tais trabalhos não tenham discutido um mecanismo que poderia explicar tal fenômeno. Além de demonstrar a exocitose lisossomal tanto em cardiomiócitos quanto em fibroblastos, mostramos também que, para os cardiomiócitos a exocitose acontecia de forma independente tanto do cálcio intra quanto do cálcio extracelular (Fig. 13 e Fig. 16). Uma vez que a exocitose de lisossomos, provocada pela diminuição do conteúdo de colesterol, aparentemente não depende do íon Ca²⁺, resolvemos também investigar se tal fenômeno era independente da proteína sensora de Ca²⁺ nos lisossomos, a sinaptotagmina VII. Dessa forma, fizemos experimentos com células NRK nos quais realizamos o

knockdown dessa proteína syt-VII por meio de siRNA. Após o *knockdown*, realizamos o sequestro de colesterol dessas células e mostramos que o fenômeno da exocitose lisossomal continuava ocorrendo mesmo na ausência de syt VII (Fig. 17). Uma explicação para o motivo da ocorrência de exocitose lisossomal não-regulada por Ca^{2+} nestes casos, pode residir no fato que proteínas do complexo SNARE, tais como a SNAP 23, por exemplo, que está relacionada à exocitose lisossomal (Salaun *et al.* 2005), se particionam em microdomínios lipídicos. Mediante a ruptura dos microdomínios gerada pela depleção do colesterol, essas proteínas do complexo SNARE poderiam ter sua sinalização e sua posição na membrana alteradas, gerando também, alterações no processo de secreção das organelas acídicas.

Nosso trabalho também demonstra, para cardiomiócitos, que a exocitose lisossomal causada pela depleção do colesterol de membrana parece ocorrer de um reservatório específico, próximo ao córtex celular (Fig. 18). Outra evidência de que isso realmente ocorre foi demonstrada através da quantificação da distribuição dos lisossomos remanescentes: quando as células são tratadas com M β CD, a maioria dos lisossomos não secretados permanecem junto à periferia nuclear, o que não ocorre, por exemplo, com lisossomos de células controle ou tratadas com H γ CD, que apresentam uma distribuição mais homogênea dessas organelas. Células cujo colesterol foi depletado e, em seguida, repostado, apresentam uma distribuição intermediária entre os casos tratados com M β CD e o caso controle (Fig.19). Ademais, provamos que essa distribuição dos lisossomos não foi um artefato de mudança de área superficial dos cardiomiócitos uma vez que, em média, essas células não produziram modificações substancialmente significativas em suas áreas (Fig. 20). Dessa forma, nossos dados sugerem que a depleção do colesterol em cardiomiócitos provoca uma exocitose de lisossomos próximos ao córtex celular. Visto isso, e na tentativa de correlacionarmos esses nossos dados com os dados de aumento de tensão e polimerização do citoesqueleto de actina, mediante o tratamento com M β CD, resolvemos investigar o papel do citoesqueleto na exocitose lisossomal. Para isso, realizamos, em cardiomiócitos e em fibroblastos, a depleção do citoesqueleto de actina com o uso de latrunculina A e, posteriormente, expusemos estas células ao M β CD. Verificamos que a latrunculina A sozinha já foi capaz de induzir exocitose lisossomal (Fig. 21). Quando o sequestro de colesterol era feito nas células previamente tratadas com latrunculina, a exocitose continuava ocorrendo em um processo parcialmente aditivo, se comparado às células tratadas somente com latrunculina-A ou somente com M β CD (Fig. 21). Se

compararmos as barras nos gráficos que ilustram a exocitose de lisossomos evocada pela despolimerização do citoesqueleto de actina podemos perceber que ela tem tamanho diferente daquela que indica a exocitose lisossomal causada pelo sequestro de colesterol. Tal resultado nos leva a sugerir que, provavelmente, o *pool* de lisossomos recrutado pela despolimerização dos microfilamentos seja diferente daquele *pool* cortical recrutado pela depleção do colesterol. Em acordo com essa hipótese, trabalhos em células cromaffin, secretoras de catecolaminas localizadas nas glândulas adrenais, revelaram que nestes tipos celulares existem dois reservatórios de vesículas: um, localizado nas proximidades da membrana plasmática e que se comportaria como um *pool* de vesículas prontamente liberáveis e que não seria influenciado pelo citoesqueleto (mas poderia, através de proteínas acessórias, se apoiar no citoesqueleto), e um segundo *pool* de grânulos, localizado mais no interior do citoplasma e que estão conectados a demais elementos do citoesqueleto por filamentos de actina. Tal *pool* poderia ser exocitado quando o primeiro *pool* já tivesse esgotado. Ademais, este trabalho também mostrou que drogas despolimerizadoras do citoesqueleto, tais como a citocalasina, por exemplo, poderiam estimular a exocitose desse reservatório mais interno, ao passo que o reservatório “docado” não seria sensível a essas drogas despolimerizadoras do citoesqueleto (Aunis e Bader, 1988). Dessa forma, sugerimos que o sequestro de colesterol exocita o *pool* lisossomal mais externo, próximo à membrana plasmática, uma vez que o citoesqueleto de actina, localizado logo abaixo dessa região, provavelmente, empurra as vesículas quando a polimerização dos microfilamentos ocorre. Já a secreção lisossomal induzida pela despolimerização de actina deve mobilizar, principalmente, o reservatório lisossomal mais interno e conectado ao citoesqueleto de actina de forma direta.

Até o momento, nossos resultados mostraram que o sequestro de colesterol gera polimerização e reorganização do citoesqueleto de actina e exocitose dos lisossomos localizados junto ao córtex celular. Sabemos também que as regiões ricas em colesterol estão envolvidas não somente em sinalizações intracelulares em situações fisiológicas como também em situações patológicas, uma vez que vários patógenos dependem de balsas de membrana para internalizarem em suas respectivas células hospedeiras. Dentre esses patógenos, podemos citar o parasito intracelular obrigatório, o *Trypanosoma cruzi*. Em 2007, já havia sido demonstrado por dois grupos, de forma independente, que o sequestro de colesterol diminuía a entrada do *T. cruzi* em alguns tipos celulares. Entretanto, nenhum mecanismo que explicasse essa diminuição na

entrada foi proposto (Barrias *et al.*, 2007 e Fernandes *et al.*, 2007). Realizamos, então, de forma inédita, a infecção das formas tripomastigotas de cultura de tecidos, da cepa Y, em culturas primárias de cardiomiócitos murinos neonatos, na presença e na ausência de colesterol. Verificamos que, nesses tipos celulares, a entrada do *T. cruzi* diminuiu significativamente nas células com menor quantidade de colesterol. Esta diminuição da entrada poderia estar relacionada ao aumento da rigidez celular devido à depleção do conteúdo colestérico de forma que o *T. cruzi*, ao tentar estimular estas células para efetivar a sua entrada se deparavam com uma barreira energeticamente difícil de ser transposta. Ademais, verificamos que, ao incubarmos previamente os cardiomiócitos com HyCD, o processo de entrada do parasito não era afetado e que a infecção parecia retornar a níveis semelhantes ao observado nas células controle quando o colesterol era repostado nas células previamente depletadas desse lipídio (Fig. 22). Sabemos que duas das etapas importantes para o sucesso da internalização do *T. cruzi* em sua célula hospedeira são a adesão e a associação dos mesmos a lisossomos. Dessa forma, investigamos se o sequestro de colesterol poderia, de alguma forma, interferir em pelo menos uma dessas duas etapas. Fizemos, então, ensaios de adesão do *T. cruzi*, em cardiomiócitos depletados em seu conteúdo colestérico e pré-fixados, para impedir a internalização do parasito. Verificamos que o tratamento prévio dos cardiomiócitos com M β CD não alterou a taxa de adesão do *T. cruzi* à membrana dos cardiomiócitos (Fig. 23). O próximo passo foi investigar se a associação lisossomal ao vacúolo parasitóforo estava comprometido nas células depletadas. Sendo assim, fizemos a infecção dos cardiomiócitos, após o sequestro de colesterol, fixamos as células e submetemo-nas ao processo de imunocitoquímica para marcação de LAMP-1, uma proteína lisossomal. Assim, seria possível ver, nos casos em que o parasito estivesse associado a lisossomos, um vacúolo parasitóforo revestido por LAMP-1. Após a quantificação, verificamos uma diminuição na associação do *T. cruzi* a lisossomos apenas nos casos em que o colesterol havia sido sequestrado (Fig.22). Este resultado é muito interessante uma vez que o *T. cruzi* depende de lisossomos, possivelmente daqueles docados ao córtex celular, para a sua entrada na célula hospedeira e é exatamente este *pool* de lisossomos que é secretado pelo sequestro de colesterol. Para confirmarmos esta nossa hipótese, que o sequestro de colesterol age na secreção de um reservatório mais externo de lisossomos, fizemos a infecção de cardiomiócitos que haviam sido previamente tratados com latrunculina ou com latrunculina e M β CD. Verificamos que, nos casos em que as células haviam sido tratadas apenas pela latrunculina-A, nem a entrada e nem a associação a lisossomos dos

tripomastigotas foi diferente estatisticamente daquela observada nas células controle. Em adição a esses dados, as células que foram tratadas com latrunculina e depois com M β CD apresentaram a mesma redução da taxa de infecção e de associação a lisossomos que as células tratadas apenas com M β CD (Fig. 24). Dessa forma, podemos, mais uma vez sustentar a nossa hipótese de que o sequestro de colesterol age em um reservatório diferente daquele que a latrunculina age sendo que o primeiro, mais cortical, é exatamente aquele mais usado pelo *T. cruzi* para o estabelecimento de uma infecção bem sucedida.

Em conjunto, nossos dados mostram que o sequestro de colesterol nas células induz a reorganização e polimerização do citoesqueleto de actina, com consequente aumento da rigidez celular bem como a secreção de um *pool* de lisossomos corticais. Tal cenário interfere não apenas na fisiologia da célula como também em condições patológicas em que essas células são desafiadas por parasitos como o *T. cruzi*. Por depender de um citoesqueleto de actina relativamente maleável e de lisossomos docados para o sucesso da sua invasão, o *T. cruzi*, ao infectar células com menor quantidade de colesterol deparam-se com uma barreira cortical mais rígida e menos lisossomos disponíveis o que gera uma inexorável diminuição da infectividade dessas células pelo parasito.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6) CONSIDERAÇÕES FINAIS

Realizamos, no presente trabalho, uma série de experimentos interdisciplinares, que envolveram Biologia Celular, Biologia Molecular e Física com o intuito de desvendarmos possíveis modificações, em fibroblastos imortalizados e cardiomiócitos murinos primários, causadas pelo sequestro do colesterol devido tratamento com a ciclodextrina M β CD. Após verificarmos que o sequestro de colesterol nos nossos sistemas foi feito de forma eficiente e que não apenas o conteúdo deste lipídio era alterado como também os microdomínios de membrana enriquecidos nesse lipídio, resolvemos investigar as propriedades mecânicas (estáticas e dinâmicas) do complexo citoesqueleto-membrana nos tipos celulares estudados. Mostramos que, tanto em miócitos quanto em fibroblastos, o citoesqueleto de actina dessas células, mediante redução do conteúdo colestérico, apresentou um aumento de fibras de estresse, o que sugeria um possível aumento da rigidez celular. A fim de confirmarmos este quadro, realizamos experimentos de extração de amarras celulares por pinçamento óptico (OT) bem como microscopia de desfocalização (DM), experimentos estes fundamentais já que foram feitos com células vivas, em tempo real. Ademais, os experimentos de DM nos permitiu acompanhar a evolução celular à medida que o sequestro de colesterol era feito, resultado este inédito na literatura.

Vimos, por essas técnicas físicas, que o complexo membrana-citoesqueleto (MC) ficou realmente mais rígido. Pelas amarras, demonstramos que tanto a rigidez de flexão quanto a tensão superficial aumentaram quando o colesterol foi sequestrado dos fibroblastos. Já a DM nos mostrou que, com o passar do tempo de tratamento com a M β CD, a amplitude de oscilação do complexo MC diminuiu. O tempo de relaxação do complexo MC aumentou, nos primeiros estágios do tratamento e depois decaiu para valores semelhantes aos do controle, nos estágios finais do sequestro.

Devido ao aumento da tensão celular, resolvemos verificar se algum processo de exocitose estaria acontecendo no intuito de estabilizar a tensão novamente na membrana e levantamos a hipótese que a origem dessas vesículas, no nosso sistema, poderia ser lisossomal. Dessa forma, realizamos experimentos enzimáticos nos quais a enzima beta-hexosaminidase, residente em lisossomos, era dosada no sobrenadante da cultura. Dessa

forma, verificamos que tanto em cardiomiócitos quanto em fibroblastos, o sequestro do colesterol induziu exocitose de lisossomos de forma tempo-dependente. Ademais, quando tratamos as células com uma ciclodextrina análoga à M β CD, porém, com menor afinidade pelo colesterol, verificamos que a exocitose lisossomal ocorria apenas em níveis basais, semelhantes ao controle. Ainda, para cardiomiócitos, verificamos que a exocitose lisossomal mediada pelo sequestro de colesterol era independente tanto do cálcio intra quanto do cálcio extracelular. Utilizando células NRK silenciadas para a proteína sensora de cálcio nos lisossomos, a sinaptotagmina-7, ainda verificamos que a exocitose lisossomal estimulada pelo tratamento com M β CD continuava acontecendo.

Realizamos também experimentos que quantificaram a distribuição dos lisossomos remanescentes, que não foram excitados pelos cardiomiócitos cujo colesterol havia sido depletado. Dessa forma, verificamos que a maioria dos lisossomos não excitados, permaneciam na região perinuclear, o que nos indicou que a população excitada localizava-se mais no córtex celular. Dessa forma, em poucas palavras, podemos dizer que o sequestro de colesterol nas células estudadas nesse trabalho provocou um aumento da rigidez celular e que esse aumento de rigidez foi acompanhado por exocitose de lisossomos corticais.

Sabemos de trabalhos prévios que o colesterol também é importante em eventos de interação célula-hospedeira e patógenos. Dentre patógenos importantes, podemos destacar o *T. cruzi*, que depende do colesterol celular para conseguir entrar em sua célula hospedeira. Embora os estudos anteriores tenham apontado essa importância, nenhum mecanismo havia sido proposto até o momento que explicasse o motivo pelo qual o colesterol se fazia importante nos momentos iniciais de entrada do parasito. Mostramos pela primeira vez que não somente a entrada do *T. cruzi* diminuía com o sequestro do colesterol como também a associação dos parasitos a lisossomos para formação de um vacúolo parasitóforo viável. Este resultado corrobora mais uma vez o fato que o sequestro de colesterol provavelmente depleta um reservatório lisossomal mais cortical visto que é este reservatório que o parasito utiliza para invadir sua célula hospedeira. Além disso, é possível que a entrada dos tripomastigotas diminuísse mediante o sequestro uma vez que, estando o complexo CM mais rígido, maior a barreira energética que deveria ser transposta pelo parasito quando o mesmo estimulava a célula para o recrutamento de lisossomos e posterior entrada.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

AGERO, U.; MONKEN, C.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T. and MESQUITA, O.N., *Cell surface fluctuations studied with defocusing microscopy*, Physical Review E: Statistical, Nonlinear and Soft Matter Physics, **67** (5 pt.1): 51904-51913 (2003);

AGERO, U.; MESQUITA, L.G.; NEVES, B.R.A.; GAZZINELLI, R.T. and MESQUITA, O.N., *Defocusing microscopy*, Microscopy Research and Technique, **65** (3): 159-165 (2004);

ALEXANDER, J. and RUSSEL, D.G., *The interaction of Leishmania species with macrophages*, Advances in Parasitology, **31**: 175-254 (1992);

AMANO, M.; CHIHARA, K.; KIMURA, K.; FUKATA, Y. *et al.*, *Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase*, Science, **275**: 1308-1311 (1997);

ANDRADE, L.O. and ANDREWS, N.W., *Lysosomal fusion is essential for the retention of Trypanosoma cruzi inside host cells*, The Journal of Experimental Medicine, **200** (9): 1135-1143 (2004);

ANDRADE, L.O. and ANDREWS, N.W., *The Trypanosoma cruzi- host cell interplay: location, invasion, retention*, Nature Reviews Microbiology, **3**(10): 819-823 (2005);

ANDRADE, L.O.; GALVÃO, L.M.C.; MEIRELLES, M.N.S.L.; CHIARI, E. *et al.*, *Differential tissue tropism of Trypanosoma cruzi strains: an in vitro study*, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, **105** (6): 834-837, (2010);

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. and MACEDO, A.M., *Differential tissue distribution of diverse clones of Trypanosoma cruzi in infected mice*. Molecular and Biochemical Parasitology, **100**(2): 163-72 (1999);

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J. and MACEDO, A.M., *Trypanosoma cruzi: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations*. Experimental Parasitology, **100**(4): 269-275 (2002);

ANDREWS, N.W. and CHAKRABARTI, S., *There's more to life than neurotransmission: the regulation of exocytosis by synaptotagmin VII*, Trends in Cell Biology, **15** (11):626-631 (2005);

AUNES, D and BADER, M.F., *The cytoskeleton as a barrier to exocytosis in secretory cells*, The Journal of Experimental Biology, **139**: 253-266 (1988);

BARR, S.C.; HAN, W.; ANDREWS, N.W.; LOPEZ, J.W.; BALL, B.A.; PANNABECKER, T.L. and GILMOUR JR, R.F., *A factor from Trypanosoma cruzi induces repetitive cytosolic free Ca²⁺ transients in isolated primary canine cardiac myocytes*, Infection and Immunity, **64** (5) 1770-1777 (1996);

BARRIAS, E.S.; DUTRA, J.M.; DE SOUZA, W. and CARVALHO, T.M., *Participation of macrophage membrane rafts in Trypanosoma cruzi invasion process*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **363**: 828-834 (2007);

BRADFORD, M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding*, Analytical Biochemistry, **72**: 248-254 (1976);

BRENER, Z., *Biology of Trypanosoma cruzi*, Annual Review of Microbiology, **27**: 347-382, 1973;

BURLEIGH, B.A. CALER, E.V., WEBSTER, P. and ANDREWS, N.W., *A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells*, The Journal of Cell Biology, **136** (3): 609-620 (1997);

BURLEIGH, B.A. and ANDREWS, N.W., *Signaling and host cell invasion by Trypanosoma cruzi*, Current Opinion in Microbiology, **1**: 461-465 (1998);

BURLEIGH, B.A and ANDREWS, N.W., *The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells*, Annual Reviews in Microbiology, **49**: 175-200 (1995b);

BURLEIGH, B.A. and WOOLSEY, A.M., *Cell signaling and Trypanosoma cruzi invasion*, Cellular Microbiology, **4** (11): 701-711 (2002);

BYFIELD, F.J., ARANDA-ESPINOZA, H., ROMANENKO, V.G., ROTHBÇAT, G.H. *et al.*, *Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells*, Biophysical Journal, **87**: 3336-3343 (2004);

CALER, E.V.; CHAKRABARTI, S.; FOWLER, K.T.; RAO, S. and ANDREWS, N.W., *The Exocytosis-regulatory Protein Synaptotagmin VII Mediates Cell Invasion by Trypanosoma cruzi*, The Journal of Experimental Medicine, **193** (9): 1097-1104 (2001);

CAMPBELL, S.M., CROWE, S.M. and MAK, J., *Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions*, Journal of Clinical Virology **22**: 217-227 (2001);

CARLIER, Y; TORRICO, F.; SOSA-ESTANI, S.; RUSSOMANDO, G. *et al.*, *Congenital Chagas' Disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women*, PLoS Neglected Tropical Diseases, **5** (10) 1250-1253 (2011)

CARONI, P., *Actin cytoskeleton regulation through modulation of PI(4,5)P2 rafts*, The EMBO Journal, **20** (16): 4332-4336 (2001);

CHAKRABARTI, S.; ANDRADE, L.O. and ANDREWS, N.W., *Trypanosoma cruzi* invades synaptotagmin VII- deficient cells by a PI-3 kinase independent pathway, *Molecular & Biochemical Parasitology*, **141**: 125-128 (2005);

CHAZAL, N. and GERLIER, D., *Virus entry, assembly, budding and membrane rafts*, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**: 226-237 (2003);

CHEN, F.W., LI, C. and IOANNOU, Y.A., *Cyclodextrin induces calcium- dependent lysosomal exocytosis*, *PLoS One*, **5** (11): e15054 (2010);

CHINNAPEN, D.J.; CHINNAPEN, H.; SASLOWSKY, D. and LENCER, W.I., *Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER*, *FEMS Microbiology Letters*, **266**: 129-137 (2007);

CHINI, B. and PARENTI, M., *G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there?*, *Journal of Molecular Endocrinology*, **32**: 325–338 (2004);

CHRZANOWSKA-WODNICKA and BURRIDGE, K.; *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*, *The Journal of Cell Biology*, **133** (6):1403-1415 (1996);

COURA, J. R. and BORGES-PEREIRA, J., *Chagas' disease: 100 years after its discovery. A systemic review*, *Acta Tropica*, **115**: 5:13 (2010);

DAHAN, A.; MILLER, J.M.; HOFFMAN, A.; AMIDON, G.E. *et al.*, *Interplay in using cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers: mechanistic modeling and application to progesterone*, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99** (6): 2739-2749 (2010);

DAVIS, M.E. and BREWSTER, M.E., *Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future*, *Nature Reviews Drug Discovery*, **3**: 1023-1035, (2004)

DAY, C.A. and KENWORTHY, A.K., *Tracking microdomain dynamics in cell membranes*, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1788**: 245-253 (2009);

DE CURTIS, I. and MELDOLESI, J., *Cell surface dynamics- how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton*, Journal of Cell Science, **125**: 4435-4444 (2012);

DEL POZO, M.A., *Integrin signaling and lipid rafts*, Cell cycle, **3** (6): 725-728 (2004);

DIAS, J.C.P., *Globalização, iniquidade e doença de Chagas*, Cadernos de Saúde Pública, **23** (1): 13-22 (2007);

DOHERTY, G.J. and McMAHON, H.T., *Mediation, modulation and consequences of membrane-cytoskeleton interactions*, Annual Reviews of Biophysics, **37**: 65-95 (2008);

DUNCAN, M.J.; LI, G.; SHIN, J.S.; CARSON, J.L. and ABRAHAN, S.N., *Bacterial penetration of bladder epithelium through lipid rafts*, The Journal of Biological Chemistry, **279**: 18944-18951 (2004);

GAROFF, H.; HEWSON, R. and OPSTELTEN, D.J., *Virus maturation by budding*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, **62** (4): 1171-1190 (1998);

FERNANDES, M.C.; CORTEZ, M.; YONEYAMA, K.A.G.; STRAUSS, A.H.; YOSHIDA, N. and MORTARA, R.A., *Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains*, International Journal of Parasitology, **37**: 1431-1441 (2007);

FERNANDES, M.C.; CORTEZ, M.; FLANNERY, A.R.; TAM, C. *et al.*, *Trypanosoma cruzi subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion*, Journal of Experimental Medicine, **208** (5) 909-921 (2011);

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S., *A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues*, The Journal of Biological Chemistry, 497- 509 (1956);

FREITAS, J.M.; ANDRADE, L.O.; PIRES, S.F.; LIMA, R. *et al.*, *The MHC gene region of murine hosts influences the differential tissue tropism of infecting Trypanosoma cruzi strains*, PLoS One, **4** (9): e51113-e51119 (2009);

FUENTES, D.E. and BUTLER, P.J., *Coordinated mechanosensitivity of membrane rafts and focal adhesions*, Cellular and Molecular Bioengineering, **5** (2) 143-154 (2012);

GAUTHIER, N.C.; FARDIN, M.A. ROCA-CUSACHS, P and SHEETZ, M.P., *Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading*, PNAS, **108** (5) 14467-14472 (2011);

GIL, C.; SOLER-JOVER, A.; BLASI, J. and AGUILERA, J., *Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **329** : 117-124 (2005);

GIMPL, G. and GEHRIG-BURGER, K., *Probes for studying cholesterol binding and cell biology*, Steroids, **76**: 216-231 (2011);

GRIMMER, S.; DEURS, B.V. and SANDVIG, K., *Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol*, Journal of Cell Science, **115**: 2953-2962 (2002);

HAYNES, M.P.; PHILLIPS, M.C. and ROTHBLAT, G.H., *Efflux of cholesterol from different cellular pools*, Biochemistry, **39**: 4508–4517 (2000).

IKONEN, E., *Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, **9**: 125-138 (2008);

INCARDONA, J.P. and EATON, S., *Cholesterol in signal transduction*, Current Opinion in Cell Biology, **12**: 193-203 (2000);

INSEL, P.A.; HEAD, B.P.; PATEL, H.H.; BUNDEY, R.A. and SWANEY, J.S., *Compartmentation of G- protein-coupled receptors and their signaling components in lipid rafts and caveolae*, Biochemical Society Transactions, **33** (5): 1131-1134 (2005);

JAHN, R. and FASSHAUER, D., *Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles*, Nature, **490**: 201-207 (2012);

JANS, R.; SARTOR, M.; JADOT, M.; POUMAY, Y., *Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes*, Archives of Dermatology Research, **296**: 30-41 (2004);

KRUTH, H.S. and VAUGHAN, M., *Quantification of low density lipoprotein binding and cholesterol accumulation by single human fibroblasts using fluorescence microscopy*, Journal of Lipid Research **21**: 123-130 (1980);

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 **100** (24): 13964- 13969 (2003);

LAFONT, F. and VAN DER GOOT, F.G., *Bacterial invasion via lipid rafts*, Cellular Microbiology, **7** (5): 613-620 (2005);

LAMB, M.E.; ZHANG, C., SHEA, T., KYLE, D.J. and L. M. Fredrik LEEB-LUNDBERG, L.M.F., *Human B1 and B2 bradykinin receptors and their agonists target caveolae-related lipid rafts to different degrees in HEK293 cells*, Biochemistry, **41** (48): 14340–14347 (2002);

LANGE, Y., *Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts*, Journal of Lipid Research, **32**: 329-339 (1991);

LECUIT, T. and LENNE, P.F., *Cell surface mechanics and the control of the cell shape, tissue patterns and morphogenesis*, Nature Reviews Molecular Cell Biology, **8**: 633-644 (2008);

LEITE, M.F.; MOYER, M.S. and ANDREWS, N.W., *Expression of the mammalian calcium signaling response to Trypanosoma cruzi in Xenopus laevis oocytes*, Molecular and Biochemical Parasitology, **92** (1): 1-13 (1998);

LEVITAN, I and GOOCH, K.J., *Lipid rafts in membrane- cytoskeleton interactions and control of cellular biomechanics: actions of oxLDL*, Antioxidants and Redox Signaling, **9** (9) : 1519-1534 (2007);

LEY, V.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. and ANDREWS, N.W., *The exit of Trypanosoma cruzi from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments*, The Journal of Experimental Medicine, **171**: 401-413 (1990);

LINETTI, A.; FRATANGELI, A.; TAVERNA, E; VALNEGRI, P. *et al.*, *Cholesterol reduction impairs exocytosis of synaptic vesicles*, Journal of Cell Science, **123**: 595-605 (2009);

LIU, A.P. and FLETCHER, D.A., *Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers*, Biophysical Journal, **91**: 4064-4070 (2006);

LU, Y.;LIU, D.X. and TAMA, J.P., *Lipid rafts are involved in SARS-CoV entry into Vero E6 cells*, Biochemical and Biophysical Research Communications, **369**: 344- 349 (2008);

MACLELLAN, D.L.; STEEN, H.; ADAM, R.M.; GARLICK, M. *et al.*, *A quantitative proteomic analysis of growth factor- induced compositional changes in lipid rafts of human smooth muscle cells*, Proteomics, **5**: 4733-4772 (2005);

MALACOMBE, M., BADER, M.F. and GASMANN, S., *Exocytosis in neuroendocrine cells: new tasks for actin*, Biochimica et Biophysica Acta, **1763**: 1175-1183 (2006);

MAÑES, S.; DEL REAL, G. and MARTINEZ-A, C., *Pathogens: raft hijackers*, Nature Reviews Immunology, **3**: 557-568 (2003);

MIDDLEBROOK, J.L.; DORLAND, R.B., *Bacterial toxins: cellular mechanisms of action*, Microbiology Reviews, **48**: 199-221 (1984);

MING, M.; EWEN, M.E. and PEREIRA, M.E.A., *Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF- β signaling pathway*, Cell, **82**: 287-296 (1995);

MORRIS, C.E. and HOMANN, U., *Cell surface area regulation and membrane tension*, The Journal of Membrane Biology, **179**: 79-102 (2001);

MUALLEN,S.; KWIATKOWSKA, K.; XU, X. and YIN, H.L., *Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in non-excitabile cells*, The Journal of Cell Biology, **128** (4): 589-598 (1995);

NAKATA, T and HIROKAWA, N., *Organization of cortical cytoskeleton of cultured chromaffin cells and involvement in secretion as revealed by quick-freeze, deep-etching, and double-label immunoelectron microscopy*, The Journal of Neuroscience, **12** (6): 2186-2197 (1992);

NEBL, T.; PESTONJAMASP, K.N.; LESZYSK, J.D.; CROWLEY, J.L. *et al.*, *Proteomic analysis of a detergent-resistant membrane skeleton from neutrophil plasma membranes*, The Journal of Biological Chemistry, **45** (8) 43399- 433409 (2002);

NETO, J.C., *Motilidade do citoesqueleto de macrófagos e sua relação com o processo de fagocitose estudados através de microscopia de desfocalização*, 128f. Tese (Doutorado em Física)- Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Física, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005;

NIMA, K.; GUPTA, S.; FARREL, B.; BROWNELL, W.E. *et al.*, *Effects of cholesterol on nano-mechanical properties of the living plasma membrane*, Soft Matter, **8**: 8350-8360 (2012);

NORMAN, L.L.; OEATAMA, R.J.; DEMBO, M.; BYFIELD, F. *et al.*, *Modification of cellular cholesterol content affects traction force, adhesion and cell spreading*, Cellular and Molecular Bioengineering, **3**(2) 151-162 (2010);

PAILA, Y.D. and CHATTOPADHYAY, A., *Membrane cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors*, *Subcellular Biochemistry*, **51**: 439-466 (2010);

PANG, Z.P. and SÜDHOF, T.C., *Cell biology of Ca²⁺- triggered exocytosis*, *Current Opinion in Cell Biology*, **22**: 496-505 (2010);

PELKMAN, L.; PUNTENER, D. and HELENIUS, A., *Local actin polymerization and dynamic recruitment in SV40- induced internalization of caveolae*, *Science* **296**: 535-539 (2002);

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

PINTO, A.M.T, *Infecção in vitro com Trypanosoma cruzi modifica o padrão de secreção de cardiomiócitos*, 85f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular)- Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

PLUTA, M., *Advanced Light Microscopy*, Warszawa : PWN ; Amsterdam ; New York : Elsevier (vol. I, II and III) : Distribution for the USA and Canada, Elsevier Science Pub. Co., 1988;

PRATA, A., *Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease*. *The Lancet Infectious Diseases*, **1**: 92-100 (2001);

PUCADYIL, T.J.; TEWARY, P. MADHUBALA, R. and CHATTOPADHYAY, A., *Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: implication in leishmaniasis*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, **133**: 145-152 (2004);

QI, M., LIU, Y.; FREEMAN, M.R. and SOLOMON, K.R., *Cholesterol-regulated stress fiber formation*, Journal of Cellular Biochemistry, **106**: 1031-1040 (2009);

RAO, S.K.; HUYNH, C.; PROUX-GILLARDEUX, V.; GALLI, T. and ANDREWS, N.W., *Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis*, The Journal of Biological Chemistry, **279** : 20471-20479 (2004)

RAUCHER, D. and SHEETZ, M., *Characteristics of a membrane reservoir buffering membrane tension*, Biophysical Journal, **77**: 1992-2002 (1999);

REDDY, A.; CALER, E.V. and ANDREWS, N.W., *Plasma membrane repair is mediated by Ca^{2+} -regulated exocytosis of lysosomes*, Cell, **106**: 157-169 (2001)

RIETHMÜLLER, J.; RIEHLE, A.; GRASSMÉ, H. and GULBINS, E., *Membrane rafts in host-pathogen interactions*, Biochimica et Biophysica Acta, **1758**: 2139-2147 (2006);

RODRIGUEZ, A.; SAMOFF, E.; RIOULT, M.G., CHUNG, A. and ANDREWS, N.W., *Host cell invasion by trypanosomes requires lysosomes and microtubule/ kinesin-mediated transport*, The Journal of Cell Biology, **134** (2): 349-362 (1996);

RODRIGUEZ, A.; WEBSTER, P.; ORTEGO, J and ANDREWS, N.W.; *Lysosomes behave as Ca^{2+} -regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells*, The Journal of Cell Biology, **137**: 93-104 (1997);

SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.A.; LIMA, A.P.C.A.; MORROT, A.; JULIANO, L. and MÜLLER-ESTERL, W., *Host cell invasion by Trypanosoma cruzi is potentiated by activation of bradykinin B_2 receptors*, The Journal of Experimental Medicine, **192** (9) 1289-1300 (2000);

SALAUN, C., GOULD, G.W. and CHAMBERLAIN, L.H., Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry*, **280**: 19449-19453 (2005);

SCHENKMAN, S. and MORTARA, R., *HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by Trypanosoma cruzi trypomastigotes*, *Journal of Cell Science*, **101**:895-905 (1992);

SCHENKMAN, S.; DIAZ, C. and NUSSENZWEIG, V. *Attachment of Trypanosoma cruzi trypomastigotes to receptors at restricted cell surface domains*, *Experimental Parasitology*, **72**: 76-86 (1991);

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E.S. and NUSSENZWEIG, V., *Attachment of Trypanosoma cruzi to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton*, *Infection and Immunity*, **59** (2) 645-654 (1991);

SCHONN, J.S., MAXIMOV, A.; LAO, Y.; SÜDHOF, T.C. and SORENSEN, J.B., *Synaptotagmin-1 and -7 are functionally overlapping Ca²⁺ sensors for exocytosis in adrenal chromaffin cells*, *PNAS*, **105** (10): 3998-4003 (2008);

SHIN, J.S.; GAO, Z.; ABRAHAN, S.N. , *Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells*, *Science*, **289**: 785–788 (2000);

SIMONS, K. and EHEHALT, R., *Cholesterol, lipid rafts and disease*, *The Journal of Clinical Investigation*, **110** (5): 597-603 (2002);

SIMONS, K. and IKONEN, E.; *Functional rafts in cell membranes*, *Nature*, **387** (6633): 569-572 (1997);

SIMONS, K. and TOOMRE, D., *Lipid rafts and signal transduction*, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **1**: 31-41 (2000);

SIMONS, K. and VAZ, W.L.C., *Model systems, lipid rafts and cell membranes*, Annual Reviews in Biophysics and Biomolecular Structure, **33**: 269-295 (2004);

SPECTOR, I.; SHOCHET, N.R.; KASHMAN, Y. and GROWEISS, A., *Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells*, Science, **219**: 493-495 (1983);

SREEJIT, P.; KUMAR, S.; VERMA, R.S., *An improved protocol for primary culture of cardiomyocyte from neonatal mice*, In Vitro Cell and Developmental Biology- Animal **44**: 45-50 (2008);

STECK, T.L.; KEZDY, F.J. and LANGE, Y., *An activation-collision mechanism for cholesterol transfer between membranes*, Journal of Biological Chemistry, **263**: 13023-13031 (1988);

SUN, M.; NORTHUP, N.; MARGA, F.; HUBER, T.; BYFIELD, F.J.; LEVITAN, I. and FORGACS, G., *The effect of cellular cholesterol on membrane cytoskeleton adhesion*, Journal of Cell Science, **120**: 2223-2231 (2007);

SUOMALAINEN, M., *Lipid rafts assembly of enveloped viruses*, Traffic **3**: 705-709 (2002);

TAKAHASHI, T. and SUZUKI, T., *Function of membrane rafts in viral lifecycles and host cellular response*, Biochemistry Research International, **2011**: 1-23 (2011);

TAM, C.; IDONE, V.; DEVLIN, C.; FERNANDES, M.C. *et al.*, *Exocytosis of acid sphingomyelinase by wounded cells promotes endocytosis and plasma membrane repair*, The Journal of Cell Biology, **189** (6): 1027-1038 (2010);

TARDIEUX, I.; NATHANSON, M.H. and ANDREWS, N.W., *Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca^{2+} transients*, The Journal of Experimental Medicine **179**: 1017-1022 (1994);

TARDIEUX, I; WEBSTER, P.; RAVESLOOT, J., BORON, W.; LUNN, A.J.; HEUSER, J.E. and ANDREWS, N.W., *Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells*, *Cell* **71**: 1117-1130 (1992);

TEIXEIRA, A.R.L., NITZ, N., GUIMARO, M.C., GOMES, C. and SANTOS-BUCH, C.A., *Chagas disease*, *Postgraduate Medical Journal* , **82**:788-798 (2006);

TSAI, M.A.; FRANK, R.S. and WAUG, R.E., *Passive mechanical behavior of human neutrophils: effect of cytochalasin B*, *Biophysica Journal*, **66**: 2166-2172 (1994);

TYLER, K.M. and ENGMAN, D.M., *The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited*, *International Journal for Parasitology*, **31**: 472-481, (2001);

VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; REIS, D.D.A.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.; TOSTES, S. MOREIRA, M.C.V.; FILHO, G.B. and PENA, S.D.J., *Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic chagas disease. Differential distribution of genetic types into diverse organs*, *American Journal of Pathology*, **156** (5): 1805-1809 (2000);

VIEIRA, F.S.; CORRÊA, G. EINICKER-LAMAS, M. and COUTINHO-SILVA, R., *Host-cell lipid rafts: a safe door for microorganisms?*, *Biology of the Cell*, **102**: 391-407 (2010);

WAGABI, M.C.; KERAMIDAS, M.; FEIGE, J-J.; ARAÚJO-JORGE, T.C. and BAILLY, S., *Activation of transforming growth factor β by Trypanosoma cruzi*, *Cellular Microbiology*, **7** (4): 511-517 (2005);

WASSER, C.R.; ERTUNC, M.; LIU, X.; KAVALALI, E.T.; *Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling*, *The Journal of Physiology*, **579**: 413-429 (2007);

WATABE, T.; NISHIHARA, A.; MISHIMA, K.; YAMASHITA, J.; SHIMIZU, K.; MIYAZAWA, K.; NISHIKAWA, S.I. and MIYAZONO, K., *TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells*, The Journal of Cell Biology, **163** (6): 1303-1311 (2003);

WINBERG, M.E.; HOLM, A.; SÄRND AHL, E.; VINET, A.F. *et al.*, *Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action of membrane rafts, Microbes and Infection, **11**: 215-222 (2009);

WOOLSEY, A.M. and BURLEIGH, B.; *Host cell actin polymerization is required for cellular retention of Trypanosoma cruzi and early association with endosomal/lysosomal compartments*, Cellular Microbiology, **6** (9): 829-838, 2004;

WOOLSEY, A.M.; SUNWOO, L.; PETERSEN, C.A.; BRACHMANN, S.M.; CANTLEY, L.C. and BURLEIGH, B.A., *Novel PI-3 kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation*. Journal of Cell Science., **116**: 3611-3622 (2003);

XU, J.; TOOPS, K.A.; DIAZ, F.; CARVAJAL-GONZALES *et al.*, *Mechanism of polarized lysosome exocytosis in epithelial cells*, Journal of Cell Science, **125** (24) 5937- 5943 (2012);

YANCEY, P.G., RODRIGUEZA, W.V.; KILSDONK, E.P.; STOU DT, G.W. *et al.*, *Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins: demonstration of kinetic pools and mechanism of efflux*, The Journal of Biological Chemistry, **271**: 16026-16034 (1996);

YARMOLA, E.G.; SOMASUNDARAN, T.; BORING, T.A.; SPECTOR, I. *et al.*, *Actin- Latrunculin A structure and function: differential modulation of actin-binding protein function by Latrunculin-A*, The Journal of Biological Chemistry, **275** (33): 28120-28127 (2000);

YOSHIDA, N. and CORTEZ, M., *Trypanosoma cruzi: parasite and host cell signaling during the invasion process*, Subcellular Biochemistry, **47**: 82-91 (2008);

ZAMIR, O. and CHARLTON, M.P., *Cholesterol and synaptic transmitter release at crayfish neuromuscular junctions*, Journal of Physiology, **571.1**: 83-99 (2006);

ZERNIKE, F., *Phase contrast: a new method for the microscopic observation of transparent objects, part II*, Physica **9** (10): 974-986 (1942);

ZUO, W. and CHEN, Y.G., *Specific activation of mitogen-activated protein kinase by transforming growth factor- β receptors in lipid rafts is required for epithelial cell plasticity*, Molecular Biology of the Cell, **20**: 1020–1029 (2009).

ARTIGO PUBLICADO SOBRE A TESE

Membrane Cholesterol Regulates Lysosome-Plasma Membrane Fusion Events and Modulates *Trypanosoma cruzi* Invasion of Host Cells

Bárbara Hissa¹, Jacqueline G. Duarte¹, Ludmila F. Kelles¹, Fabio P. Santos², Helen L. del Puerto³, Pedro H. Gazzinelli-Guimarães⁴, Ana M. de Paula², Ubirajara Agero², Oscar N. Mesquita², Cristina Guatimosim¹, Egler Chiari⁴, Luciana O. Andrade^{1*}

1 Department of Morphology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Department of Physics, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **3** Department of General Pathology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **4** Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Abstract

Background: Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* are able to invade several types of non-phagocytic cells through a lysosomal dependent mechanism. It has been shown that, during invasion, parasites trigger host cell lysosome exocytosis, which initially occurs at the parasite-host contact site. Acid sphingomyelinase released from lysosomes then induces endocytosis and parasite internalization. Lysosomes continue to fuse with the newly formed parasitophorous vacuole until the parasite is completely enclosed by lysosomal membrane, a process indispensable for a stable infection. Previous work has shown that host membrane cholesterol is also important for the *T. cruzi* invasion process in both professional (macrophages) and non-professional (epithelial) phagocytic cells. However, the mechanism by which cholesterol-enriched microdomains participate in this process has remained unclear.

Methodology/Principal Finding: In the present work we show that cardiomyocytes treated with M β CD, a drug able to sequester cholesterol from cell membranes, leads to a 50% reduction in invasion by *T. cruzi* trypomastigotes, as well as a decrease in the number of recently internalized parasites co-localizing with lysosomal markers. Cholesterol depletion from host membranes was accompanied by a decrease in the labeling of host membrane lipid rafts, as well as excessive lysosome exocytic events during the earlier stages of treatment. Precocious lysosomal exocytosis in M β CD treated cells led to a change in lysosomal distribution, with a reduction in the number of these organelles at the cell periphery, and probably compromises the intracellular pool of lysosomes necessary for *T. cruzi* invasion.

Conclusion/Significance: Based on these results, we propose that cholesterol depletion leads to unregulated exocytic events, reducing lysosome availability at the cell cortex and consequently compromise *T. cruzi* entry into host cells. The results also suggest that two different pools of lysosomes are available in the cell and that cholesterol depletion may modulate the fusion of pre-docked lysosomes at the cell cortex.

Citation: Hissa B, Duarte JG, Kelles LF, Santos FP, del Puerto HL, et al. (2012) Membrane Cholesterol Regulates Lysosome-Plasma Membrane Fusion Events and Modulates *Trypanosoma cruzi* Invasion of Host Cells. *PLoS Negl Trop Dis* 6(3): e1583. doi:10.1371/journal.pntd.0001583

Editor: Eric Dumonteil, Universidad Autónoma de Yucatán, Mexico

Received: July 22, 2011; **Accepted:** February 12, 2012; **Published:** March 27, 2012

Copyright: © 2012 Hissa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work has been funded by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluidos Complexos (IFCx). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: landrade@icb.ufmg.br

Introduction

Trypanosoma cruzi, the etiological agent of Chagas' disease, is a protozoan parasite capable of invading several types of non-professional phagocytic cells including fibroblasts, endothelial cells, and myocytes [1,2]. Invasion occurs when parasite attaches to and stimulates host cell, leading to intracellular calcium signaling events that culminate with lysosome recruitment and fusion with the host cell plasma membrane and formation of the parasitophorous vacuole [3,4,5]. Several factors, such as parasite membrane proteins and proteins shed or secreted by the parasite, are known to interact with host cell membrane receptors during

the *T. cruzi* entry process into host cells [6,7,8,9,10,11]. Therefore, host cell plasma membrane plays an important role in *T. cruzi* adhesion and internalization, and modulates intracellular signaling events that are imperative for a successful infection of host cells by the parasite.

The host cell plasma membrane is a complex structure formed by a fluid and dynamic lipid bilayer to which various proteins and ligands with different biological functions are associated [12]. It is well established that the plasma membrane is not a homogeneous structure. On the contrary, the plasma membrane not only presents an asymmetric lipid distribution over its exoplasmic and cytoplasmic leaflets [13], but also shows inhomogeneities in the

Author Summary

Trypanosoma cruzi, is the etiological agent of a neglected tropical malady known as Chagas' disease, which affects about 8 million people in Latin America. 30–40% of affected individuals develop a symptomatic chronic infection, with cardiomyopathy being the most prevalent condition. *T. cruzi* utilizes an interesting strategy for entering cells: *T. cruzi* enhances intracellular calcium levels, which in turn trigger the exocytosis of lysosomal contents. Lysosomes then donate their membrane for the formation of the parasitophorous vacuole. Membrane rafts, cholesterol-enriched microdomains in the host cell plasma membrane, have also been implicated in *T. cruzi* invasion process. Since both plasma membrane and lysosomes collaborate in parasite invasion, we decided to study the importance of these membrane domains for lysosomal recruitment and fusion during *T. cruzi* invasion into host cells. Our results show that drug dependent depletion of plasma membrane cholesterol changes raft organization and induces excessive lysosome exocytosis in the earlier stages of treatment, leading to a depletion of lysosomes near the cell cortex, which in turn compromises *T. cruzi* invasion. Based on these results, we propose that cholesterol depletion leads to unregulated exocytic events of pre-docked lysosomes, reducing lysosome availability at the cell cortex and consequently compromising *T. cruzi* infection.

lateral distribution of lipids. In 1997, these lateral asymmetries were well described by Simons and Ikonen as sphingolipids and cholesterol-enriched microdomains known as lipid rafts [14]. These microdomains are likely to be kept together due to lateral association between carbohydrate heads of glycosphingolipids and the presence of cholesterol molecules filling the empty area between those lipids. Several proteins were also identified inside lipid rafts: e.g., GPI- anchored proteins, transmembrane proteins, and tyrosin kinases among others [15,16,17]. Due to their specific characteristics, lipid rafts play several roles in cell signaling, molecular organization and membrane trafficking [18]. Beyond these cellular functions, several works show that these microdomains are also involved in internalization of pathogens like virus, bacteria and protozoans [19,20,21]. Recently, two independent groups have shown that cholesterol-enriched regions might be involved in *T. cruzi* entry into host cells [22,23]. According to these authors, cholesterol localized in cell membranes contributes significantly to the infectivity of metacyclic trypomastigotes and extracellular amastigotes in non-professional phagocytic cells (Vero and HeLa cells [23]), or to the infectivity of tissue culture trypomastigotes in professional phagocytic cells [22]. In both works, methyl-beta cyclodextrin (M β CD) depletion of host cell membrane cholesterol considerably reduced parasite infectivity. However, the mechanism by which cholesterol-enriched membrane microdomains contribute to infectivity of *T. cruzi* was not elucidated.

It is well established that several proteins and receptors associated with lipid rafts are responsible for triggering intracellular signaling cascades [24]. *T. cruzi* interaction with host cells also evokes various host signaling events that culminate with recruitment and fusion of lysosomes with the plasma membrane and the subsequent formation of a viable parasitophorous vacuole, without which parasites are able to escape from its host cell [3,4,5,25]. SNARE complex proteins (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptor*), SNAP-23 (*Synaptosome-Associated Proteins*) and Syntaxin 4 at the plasma membrane and

VAMP-7 on lysosomal membranes, have been shown to coordinate lysosome fusion with plasma membrane [26]. Interestingly, it has been demonstrated that SNARE protein complexes are preferentially localized in lipid rafts [27,28,29].

Since lysosomal fusion is essential for the successful invasion of *T. cruzi* into host cells and signaling proteins, as well as proteins of the SNARE complex, reside in rafts, we decided to evaluate if altering the concentration and distribution of cholesterol interferes with the *T. cruzi* invasion process and if these changes affected the lysosomal fusion events during this process. We tested this by sequestering the cholesterol from cell membranes of primary mouse cardiomyocytes with M β CD before exposure to *T. cruzi* trypomastigotes. Our results show that the diminishment of *T. cruzi* entry into host cells after cholesterol sequestration is a consequence of the reduction in lysosomal recruitment during the formation of the parasitophorous vacuole. We then demonstrate that this decrease in lysosome recruitment and fusion during parasite entry into host cells is a consequence of unregulated lysosomal exocytosis events, which reduce the number of lysosomal vesicles that are normally localized near the cell cortex and available for the formation of the parasitophorous vacuole.

Methods

Ethics statement

All animals were maintained in our animal facilities in compliance with the guidelines of the UFMG (Universidade Federal de Minas Gerais) ethics committee for the use of laboratory animals (protocol 45/2009 approved by CETEA-UFMG) and are in accordance with CONCEA, the Brazilian institution that regulates animal husbandry.

Cells and parasites

Primary cultures of murine neonatal cardiomyocytes were prepared from fifteen neonatal (1–3 day old) Swiss mice. After euthanization by decapitation hearts were removed aseptically and kept on ice in Hanks' balanced salt solution (HBSS) (Sigma-Aldrich) (pH 7.4). Hearts were washed three times with fresh ice-cold HBSS, minced into small fragments and washed twice during mincing. Cardiac tissue was first dissociated overnight at 4°C in an enzymatic solution containing 0.05% (vol/vol) trypsin-EDTA 0.25% (Sigma-Aldrich) in HBSS and then trypsin was inhibited with 1 mL of soybean trypsin inhibitor (Sigma-Aldrich), 1 mg/mL in HBSS. Next, samples were submitted to a second dissociation step with 5 mL collagenase type 2 (Worthington), 1 mg/mL in Leibovitz medium (Sigma-Aldrich). The cell suspension was filtered through a 70 μ m cell strainer and then centrifuged at 300 g for 5 minutes. The pellet containing dissociated cells was resuspended in high-glucose DMEM (Invitrogen), supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS) and 1% (vol/vol) penicillin/streptomycin (100 U/mL/100 μ g/mL) (Invitrogen). The cell suspension was pre-plated for 2 hours at 37°C in a 5% CO₂ incubator in order to remove most fibroblasts and other non-muscle cells. Supernatant enriched in cardiomyocytes was then collected and seeded at a density of 1.0 \times 10⁵ cells/well onto 24-well plates containing round coverslips pre-treated with fibronectin (Sigma-Aldrich). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ for 72 hours before experimental procedures. New cultures were prepared for each experiment.

Tissue culture trypomastigotes from *T. cruzi* (*T. cruzi* TCTs), Y strain, were obtained from the supernatant of infected monolayers of the LLC-MK2 cell line and purified as described previously [30].

Cell treatment

For cholesterol depletion from host cell plasma membrane, cardiomyocytes were washed three times with phosphate buffered saline containing Ca^{2+} and Mg^{2+} (PBS+/+) and incubated in high-glucose DMEM containing different concentrations of methyl-beta cyclodextrin (M β CD) (Sigma-Aldrich) for 45 minutes at 37°C. Alternatively, cells were incubated in high-glucose DMEM containing different concentrations of hydroxypropyl-gamma cyclodextrin (H γ CD) (Sigma-Aldrich), an inactive analog of M β CD which does not release cholesterol from cells in significant amounts as an internal control. After drug treatment, monolayers were washed three times with PBS+/+ and used in the different experimental procedures.

Cholesterol repletion was performed by incubating cells, previously treated with the highest concentration of M β CD, in high-glucose DMEM containing 0.05 mM of water soluble cholesterol (WSC) (Sigma-Aldrich), for 30 minutes at 37°C.

Cell invasion assays

Cardiomyocyte cultures pre-treated or not with M β CD were exposed to purified *T. cruzi* TCTs resuspended in high-glucose DMEM at a multiplicity of infection (MOI) of 50. The infection was performed for 40 minutes at 37°C. After infection, monolayers were washed at least four times with PBS+/+ and fixed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich)/PBS+/+. After fixation, cells were processed for immunofluorescence or other labeling.

Immunocytochemistry

After treatment, infection and fixation, coverslips containing attached cells were washed with PBS+/+, incubated for 20 min with PBS+/+ containing 2% bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) and processed for an inside/outside immunofluorescence invasion assay as described previously [30]. Briefly, cells were fixed and extracellular parasites were immunostained using a 1:500 dilution of rabbit anti-*T. cruzi* polyclonal antibodies in PBS containing 2% BSA (PBS/BSA) followed by labeling with Alexa Fluor-546 conjugated anti-rabbit IgG antibody (Invitrogen).

After extracellular parasite staining, cells were permeabilized using a solution containing 2% BSA and 0.5% saponin (Sigma-Aldrich) in PBS (PBS/BSA/saponin) for 20 minutes. Host cell lysosomes were then immunostained using a 1:50 dilution of rat anti-mouse LAMP-1 hybridoma supernatant (1D4B; Developmental Studies Hybridoma Bank, USA) in PBS/BSA/saponin for 45 minutes followed by labeling with Alexa Fluor-488 conjugated anti-rat IgG antibody (Invitrogen), as described previously [3]. Subsequently, the DNA of both host cells and parasites were stained for 1 min with 10 μM of DAPI (Sigma-Aldrich), mounted with ProLong Gold antifade reagent (Molecular Probes), and examined on a Zeiss Axioplan microscope equipped with an oil immersion objective (100 \times , 1.3 NA) and with an AxioCam HRC camera controlled by Axiovision Software (Zeiss).

Cell surface area for the different conditions (treated or not with M β CD or H γ CD) was determined using a plasma membrane labeling agent, CellMask orange plasma membrane stain (Invitrogen), according to manufacturer instructions. Briefly, control non-treated cardiomyocytes, as well as cardiomyocytes treated with either 15 mM M β CD, 15 mM H γ CD or 15 mM M β CD followed by incubation with 0.05 mM of WSC, were washed with PBS+/+ and incubated with a solution of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CellMask in DMEM without serum for 5 minutes, at 37°C. After this period, cells were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde in fresh media for 10 minutes, at 37°C. Coverslips were then washed three times with PBS+/+ and mounted using antifade medium. Images were

collected immediately afterwards using an Olympus FV300 confocal/WX61WI microscope system (Figure S1).

Filipin and GM1 labeling

After cholesterol depletion and repletion, cells were fixed and labeled with either Filipin III (Sigma-Aldrich) or subunit B of cholera toxin-Alexa Fluor 488 (CTXb) (Sigma-Aldrich) for detection of plasma membrane cholesterol and GM1 ganglioside, respectively, as described previously [23]. Briefly, after cholesterol depletion/replenishment cells were washed and fixed with paraformaldehyde as described above. After fixation, cells were permeabilized with PGN solution (PBS+/+, 0.15% gelatin and 0.1% sodium azide) containing 0.1% saponin for 15 minutes. Following permeabilization, cells were labeled with CTXb (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) diluted in PGN for 30 minutes. Cells labeled with CTXb were analyzed using the confocal microscope system described above. Images were collected and analyzed using Fluoview version 5.0. In order to visualize the distribution of cholesterol in cell plasma membrane, fixed cells were labeled with both Filipin III (for cholesterol detection) (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in PGN) and DAPI (for nuclei staining) and examined on a Zeiss Axioplan microscope equipped with an AxioCam HRC camera controlled by Axiovision Software (Zeiss). For quantitative assays of cholesterol depletion/repletion, only Filipin III was stained. Images of 10 fields/coverslip were collected with an oil immersion objective (100 \times , 1.3 NA), using the same CCD exposure time and illumination intensity and then analyzed using the ImageJ image processing program (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) for fluorescence quantification. Four equal squared areas were chosen in each image and the fluorescence intensity of each area was determined. These values were then used to calculate the average fluorescence of each image and then of each experimental group.

β -hexosaminidase secretion assay

To evaluate the level of lysosomal exocytosis after treatment with M β CD, a time dependent β -hexosaminidase secretion assay was performed according to previous work [31]. Briefly cells were exposed to 10 mM M β CD or H γ CD for different incubation periods in the presence or absence of calcium. In the latter calcium was substituted by the same concentration of Mg^{2+} and EGTA was also added. After drug incubation, 350 μL of extracellular media was collected and adhered cells were lysed using 1% Triton x-100 (Sigma-Aldrich) in PBS. Extracellular media and lysates were incubated with 50 μL of β -hexosaminidase substrate, 6 mM 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide (Sigma-Aldrich), dissolved in Na-citrate- PO_4 buffer (pH 4.5). Reactions were stopped by adding 100 μL of Stop Solution (2 M Na_2CO_3 - H_2O , 1.1 M glycine) and read at excitation 365 nm and emission 450 nm in a spectrofluorimeter (Synergy 2, Biotek in the Center of Flow Cytometry and Fluorimetry, Department of Biochemistry and Immunology, ICB-UFMG).

Cell viability assay

After incubation with either 10 mM M β CD or H γ CD for 45 minutes, or with 10 μM Ionomycin for 10 minutes, in the presence or absence of calcium, cardiomyocytes were trypsinized, pelleted and incubated with Hypotonic Fluorochrome Solution (HFS - 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Propidium Iodide (PI) in 0.1% sodium citrate) for 4 hours at 4°C protected from light. This assay was performed in order to quantify cell death after drug treatment according to previous work [32]. The PI fluorescence of 20,000 individual cells was measured using a Becton Dickinson FACscan (BD Biosciences, USA) and data were analyzed using the Cell Quest Pro software (BD Biosciences, USA).

Lysosomal dispersion analysis

Using a set of images, obtained from treated and non-treated cells with labeled nuclei and lysosomes, we analyzed the mean lysosome distance relative to the mean center position in the respective nuclei. For each image (associated with a specific drug treatment), we visually selected a number of isolated nuclei, and using its borders' positions (i.e., the image's [X,Y] coordinates), we computed the mean center position and the mean radius (namely R) of each nucleus.

A computational code has been written using the IDL (Interactive Data Language) programming language in order to assist in these calculations. Subsequently, using the (X,Y) position of each lysosome distributed around each nucleus, the distances to the center were calculated. An average distance (namely D) was computed by using the distances of each lysosome relative to the center. Lysosomes farther than 2 radii from cell center were excluded from the computation of this average value. Finally, the mean lysosome distance (D) relative to the mean nucleus' radius (R) was defined as the ratio D/R. This procedure was repeated for the maximum number of isolated cells available from the image sets of each drug treatment. The results of this analysis are a distribution of D/R values associated to each drug treatment, and are represented as histograms.

Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and repeated at least three times. For Filipin labeling, one-way ANOVA followed by post-hoc comparison Newman-Keuls was performed to evaluate statistically significant differences. For invasion assays, a minimum of 200 cells was counted per coverslip and analyzed using the Student's t-test. For histogram distributions, the cumulative frequency was calculated and analyzed using the Kolmogorov-Smirnov statistical test.

Results

M β CD treatment does reduce the amount of membrane bound cholesterol

Before investigating the influence of cholesterol removal in invasion of cardiomyocytes by *T. cruzi* TCTs, we tested whether M β CD treatment was able to sequester cholesterol from cultured murine cardiomyocyte membranes. Cells treated with different concentrations of M β CD were stained with Filipin III, a sterol-binding fluorescent polyene, which is able to bind to cholesterol present in the plasma membrane [33]). Fluorescence microscopy images of cells pre-treated with 15 mM of M β CD (Fig. 1B) show decreased staining with Filipin when compared to control cells (Fig. 1A), confirming the removal of cholesterol upon drug treatment. Additionally, if M β CD treated cultures were incubated with 0.05 mM of water soluble cholesterol (WSC) diluted in serum free media, causing membrane cholesterol to be replenished, surface staining with Filipin was recovered (Fig. 1C). Quantitative assays, using the ImageJ program to quantify fluorescence intensity, were also performed to measure cell staining with Filipin III before and after treatment with M β CD, as well as upon cholesterol depletion and repletion. As was seen for the qualitative assays, Filipin staining of cholesterol decreased upon treatment with increasing concentrations of M β CD (Fig. 1D). A small reduction was observed upon treatment with 5 mM of the drug, increasing to 30% after treatment with a concentration of 15 mM. Cholesterol replenishment with WSC reverted the process, showing an increase in cell staining as a consequence of the increase in membrane bound cholesterol.

Cholesterol depletion diminishes *T. cruzi* cell invasion into primary neonatal murine cardiomyocytes

Previous studies have shown that host cell cholesterol-enriched microdomains play a significant role in the adhesion and internalization of *T. cruzi* TCTs in professional phagocytic cells [22], as well as *T. cruzi* metacyclic trypomastigotes or extracellular amastigotes forms in non-professional phagocytic cells [23]. Since *T. cruzi* TCT invasion into non-professional phagocytic cells, such as cardiomyocytes, is an important event during clinical infection, in the present work we first investigated whether host cell cholesterol was also relevant in cell invasion of this *T. cruzi* form into cultured, primary neonatal murine cardiomyocytes.

Previously plated cells were incubated with 10 or 15 mM of M β CD for 45 minutes at 37°C (i.e., conditions known to be effective in membrane cholesterol removal [31]), followed by a 40 minute exposure to *T. cruzi* TCTs. As observed before for macrophages [22], we determined that cholesterol depletion from murine cardiomyocytes membranes also leads to a reduction in *T. cruzi* TCT invasion (Fig. 2A and C). Upon treatment with 10 mM or 15 mM M β CD, a reduction of 85–90% in *T. cruzi* cell invasion was observed (Fig. 2A). As a control for M β CD treatment, cells were treated with the same concentrations of H γ CD, a cyclodextrin analog of M β CD with low affinity for cholesterol. H γ CD-treated cells did not show any differences in *T. cruzi* cell invasion as compared to control non-treated cells (Fig. 2A and C). Plus, reduction in the number of invading *T. cruzi* TCTs after M β CD treatment did not appear to be the result of host cell death upon drug treatment since the total number of cardiomyocytes per 10 fields in all conditions tested was not statistically different from each other (Fig. 2A, number above bars).

T. cruzi cell invasion is re-established after membrane cholesterol replenishment

To address whether the reduced *T. cruzi* invasion observed after host cell treatment with M β CD was really due to cholesterol removal from host cell membrane, cells pre-treated with the drug were subsequently incubated with WSC, an exogenous source of cholesterol which replenishes membrane cholesterol, washed with PBS and then exposed to *T. cruzi* TCTs. *T. cruzi* invasion into cholesterol-replenished cells was similar to that observed for non-treated control cells (Fig. 2A and C).

Cholesterol depletion diminishes *T. cruzi* association with lysosomes during invasion into cardiomyocytes

In order to understand why cholesterol depletion was leading to a reduction in *T. cruzi* internalization, we investigate whether association between host cell lysosomes and *T. cruzi* was altered by M β CD incubation since this organelle is crucial for a successful parasite invasion [3,4,5,25]. Untreated control cells, or cells treated with M β CD in different concentrations, were exposed to *T. cruzi* TCTs for 40 min., washed with PBS, fixed and submitted to the inside/outside parasite staining method, as well as labeled with LAMP-1 antibody for lysosomal membrane detection. Cholesterol removal from host cell membrane upon treatment with M β CD not only diminished host-cell invasion by the parasite (Fig. 2A and C), but also reduced the number of internalized parasites that had acquired lysosomal markers (Fig. 2B and C). Pre-treatment of cardiomyocytes with 10 mM M β CD caused a 60% reduction in the number of internalized parasites co-localizing with LAMP-1 (Fig. 2B). Moreover, increasing concentration of M β CD decreased both the number of internalized parasites (Fig. 2A), as well as the number of parasites co-localizing with the lysosomal marker in a dose-dependent manner (Fig. 2B).

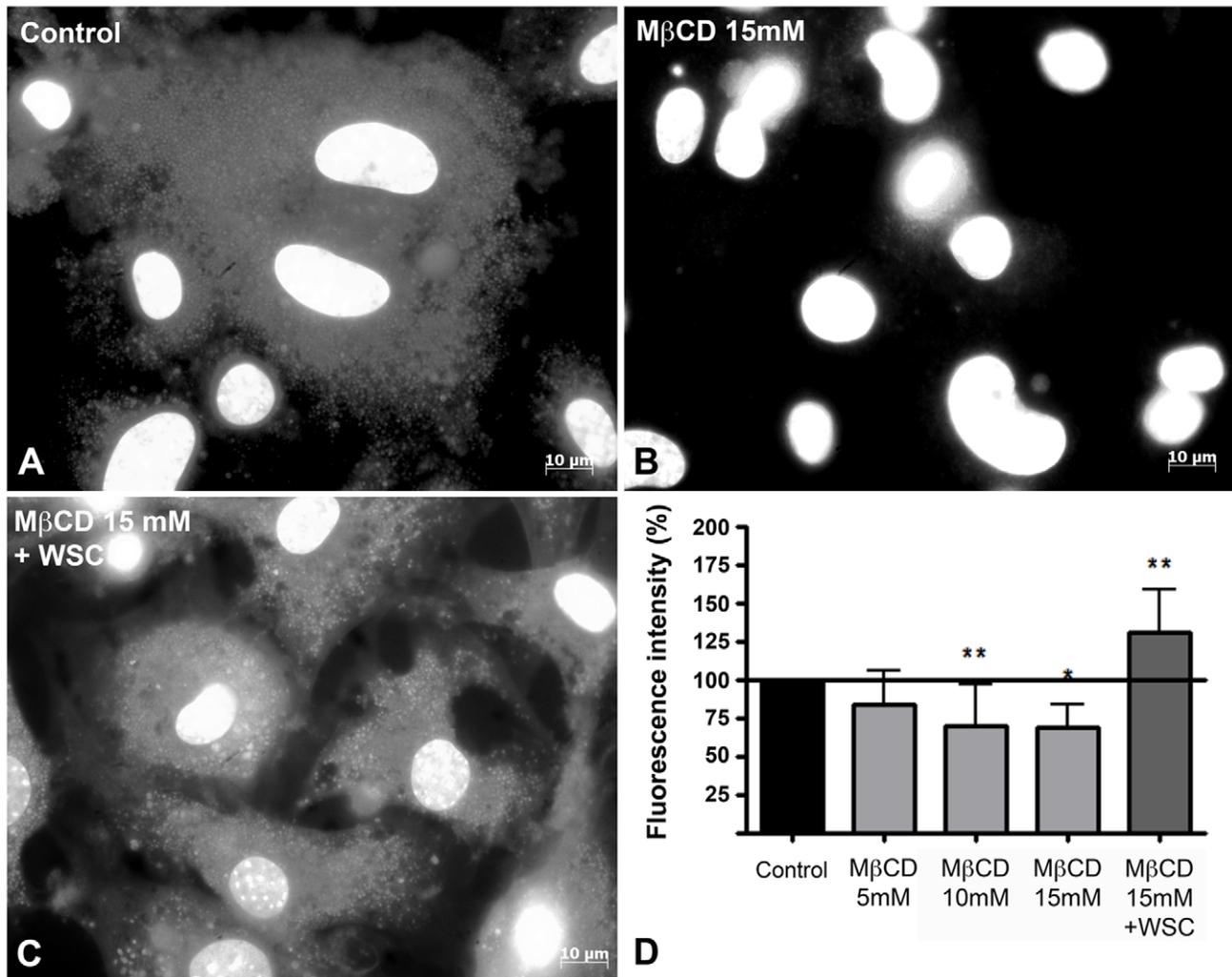


Figure 1. MβCD treatment is effective in sequestering cholesterol from the plasma membrane. (A) Control, (B) 15 mM MβCD treated and (C) 15 mM MβCD followed by 0.05 mM WSC treated cardiomyocytes show significant changes in Filipin labeling. Cholesterol-depleted cells (B) reveal very little Filipin labeling, whereas cholesterol-replenished cells show strong labeling for cholesterol, similar to control cells. (D) Cardiomyocytes treated with 5, 10 or 15 mM of MβCD reveal a substantial decrease in Filipin labeling in a dose-dependent manner whereas cholesterol replenishment with 0.05 mM of WSC returns Filipin fluorescence to control values. Normalized data are shown as mean of triplicates \pm SD. Asterisks indicate statistically significant differences (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$, One way ANOVA followed by Newman-Keuls) between control and treated cells. Scale bar: 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pntd.0001583.g001

15 mM of MβCD led to a reduction of 75% of lysosomal association with internalized trypanomastigotes. Cells treated with HγCD, the inactive analog of MβCD, on the other hand, showed no statistically significant difference in *T. cruzi* invasion (Fig. 2A) or association of *T. cruzi* with host cell lysosomes when compared to control non-treated cells (Fig. 2B and C). Cholesterol replenishment not only re-established the ability of *T. cruzi* to invade host cells (Fig. 2A and C), but also elevated *T. cruzi* association with host cell lysosomes to values comparable with control non-treated cells (Fig. 2B and C).

Cholesterol depletion reduces membrane raft labeling in cardiomyocytes

In order to evaluate how cholesterol depletion affected membrane raft organization, cardiomyocytes, which had their membrane cholesterol removed by treatment with 10 or 15 mM of MβCD, were fixed and labeled with subunit B of cholera toxin

(CTXb). Subunit B of cholera toxin is a homopentamer that binds to GM1, a ganglioside that resides in membrane rafts, on the extracellular leaflet of plasma membrane [34,35,36]. Cells treated with 10 or 15 mM of HγCD or with 15 mM of MβCD, followed by cholesterol replenishment with 0.05 mM of WSC, were likewise stained. Cells with intact membrane cholesterol content show a more intense GM1 labeling, especially of larger lipid rafts (Fig. 3A) in comparison to cholesterol-depleted cells (Fig. 3B). In cardiomyocytes treated with HγCD (Fig. 3C), raft labeling was similar to control cells. In cholesterol-replenished cells (Fig. 3D), some cardiomyocytes retained a labeling pattern similar to that of cholesterol-depleted cells (arrows), while others showed a staining pattern more similar to untreated controls (asterisks). Therefore, MβCD treatment not only induced cholesterol sequestration from cell membranes, but also interfered with membrane raft organization in cardiomyocytes, which could not be totally recovered by cholesterol replenishment.

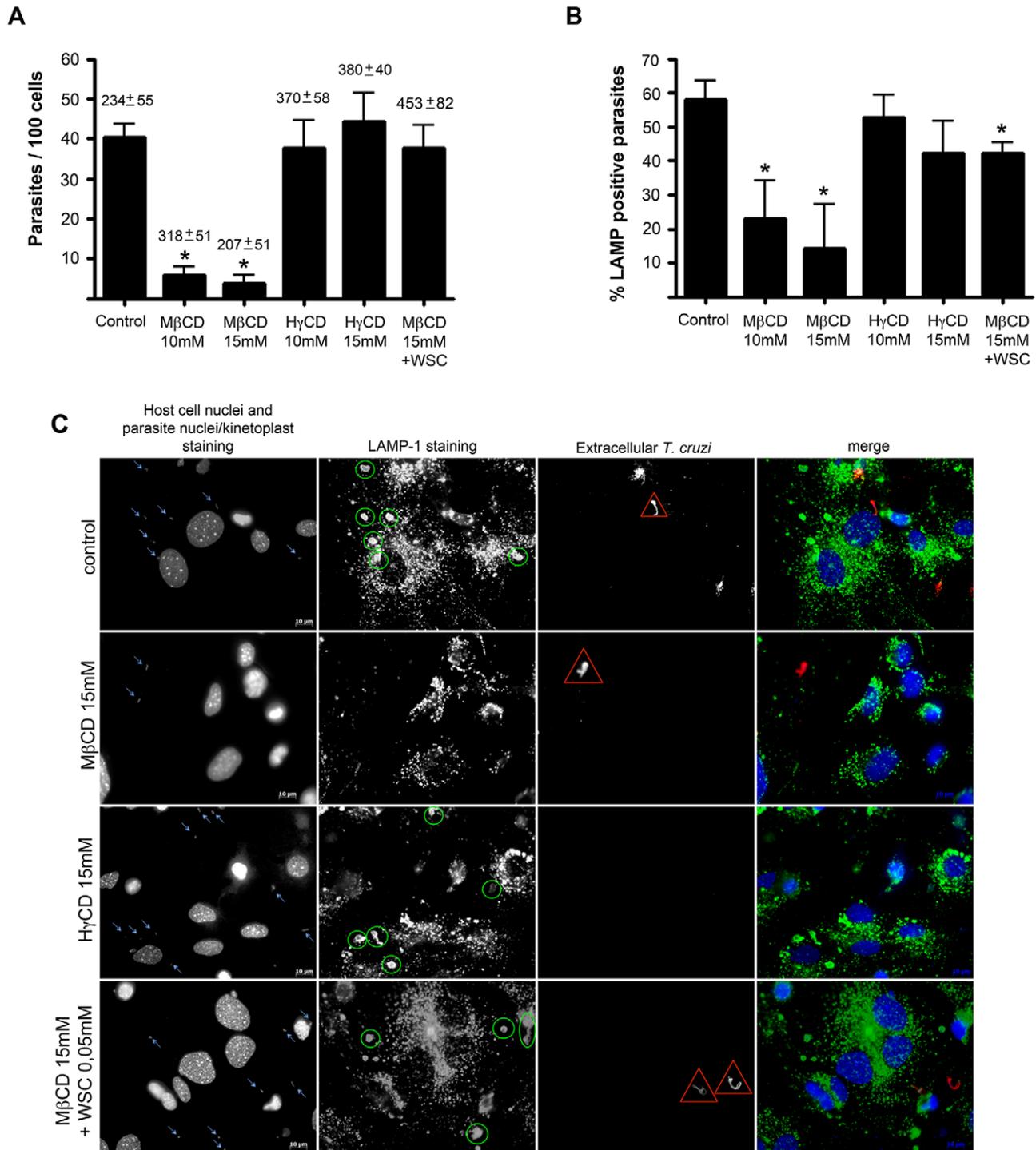


Figure 2. *T. cruzi* invasion of cells and association with LAMP-1 in cardiomyocytes decreases after cholesterol depletion. Cardiomyocytes pre-treated or not with different cyclodextrins were washed and challenged with *T. cruzi* trypomastigotes at a M.O.I of 50, for 40 minutes at 37°C, then fixed and processed for immunofluorescence detection of total intracellular parasites, as well as intracellular parasites associated with LAMP-1 (a lysosomal marker). Both *T. cruzi* internalization (A) and association with host LAMP-1 (B) diminishes after incubation with 10 and 15 mM of MβCD but not after treatment with 10 and 15 mM of HyCD. Cholesterol replenishment after treatment with 15 mM MβCD reverts the effect of the drug on parasite cell invasion (A), and at least partially on LAMP-1 association (B). The average number of cardiomyocytes ±SD per 10 counted fields in each coverslip is shown above the bars (A). Data are shown as mean of triplicates ±SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, Student's *t* test) between control and treated cells. (C) Representative panels of *T. cruzi* invasion and association with host cell lysosomes, revealed by immunocytochemistry. Total cell and parasite nuclei, as well as parasite kinetoplast DNA were labeled with DAPI; lysosomes were labeled with anti-LAMP 1 antibody followed by secondary IgG labeled with Alexa Fluor 488; extracellular parasites in the field were labeled with anti-*T. cruzi* antibody followed by secondary IgG labeled with Alexa Fluor 546. From top to bottom: control cells, 15 mM MβCD treated cells, 15 mM HyCD treated cells and 15 mM MβCD treated cells followed by incubation with 0.05 mM of WSC. Blue arrows show total *T. cruzi* trypomastigotes in

the field, yellow ellipsoids show lysosomal associated trypomastigotes, red triangles points out extracellular trypomastigotes and the last column shows the merge of the three previous. Scale bar: 10 μm .
doi:10.1371/journal.pntd.0001583.g002

Cholesterol depletion causes lysosomal exocytosis in cardiomyocytes

Lysosomal fusion with the plasma membrane (lysosomal exocytosis), which occurs during *T. cruzi* entry into host cells, is an event regulated by calcium and proteins from the SNARE complex, in a mechanism similar to the fusion of synaptic vesicles with the pre-synaptic membrane [26,37]. Depletion of cholesterol from the membrane has been shown to alter synaptic vesicle fusion with the plasma membrane leading to unregulated events of vesicle exocytosis [38]. In order to verify the behavior of lysosomal exocytosis in cholesterol-depleted cells, we performed a time-dependent assay in which the activity of beta-hexosaminidase, an enzyme resident within lysosomes, was measured in the extracellular media of cultured cells. Cardiomyocytes were incubated with 10 mM of either M β CD or H γ CD and both the extracellular

media and cell lysates of treated cells were incubated with a fluorescent substrate of beta-hexosaminidase. Non-treated and Ionomycin (an ionophore, which allows calcium influx into cells and induces lysosomal exocytosis [39]) treated cells were used as negative and positive controls, respectively. Experiments were performed in the presence or absence of calcium. Figure 4 shows that cardiomyocytes treatment with M β CD leads to lysosomal exocytosis events. As early as 10 minutes after the addition of the drug, in the presence of calcium, the rate of lysosomal exocytosis in cardiomyocytes was 3.5 times higher than control non-treated cells (Fig. 4). The levels were even higher the longer the incubation period with the drug. After 20 or 40 minutes of exposure with the drug the exocytosis level was about 5.5 times higher than control non-treated cells (Fig. 4). On the other hand, treatment with H γ CD, the control drug, did not induce expressive exocytosis of

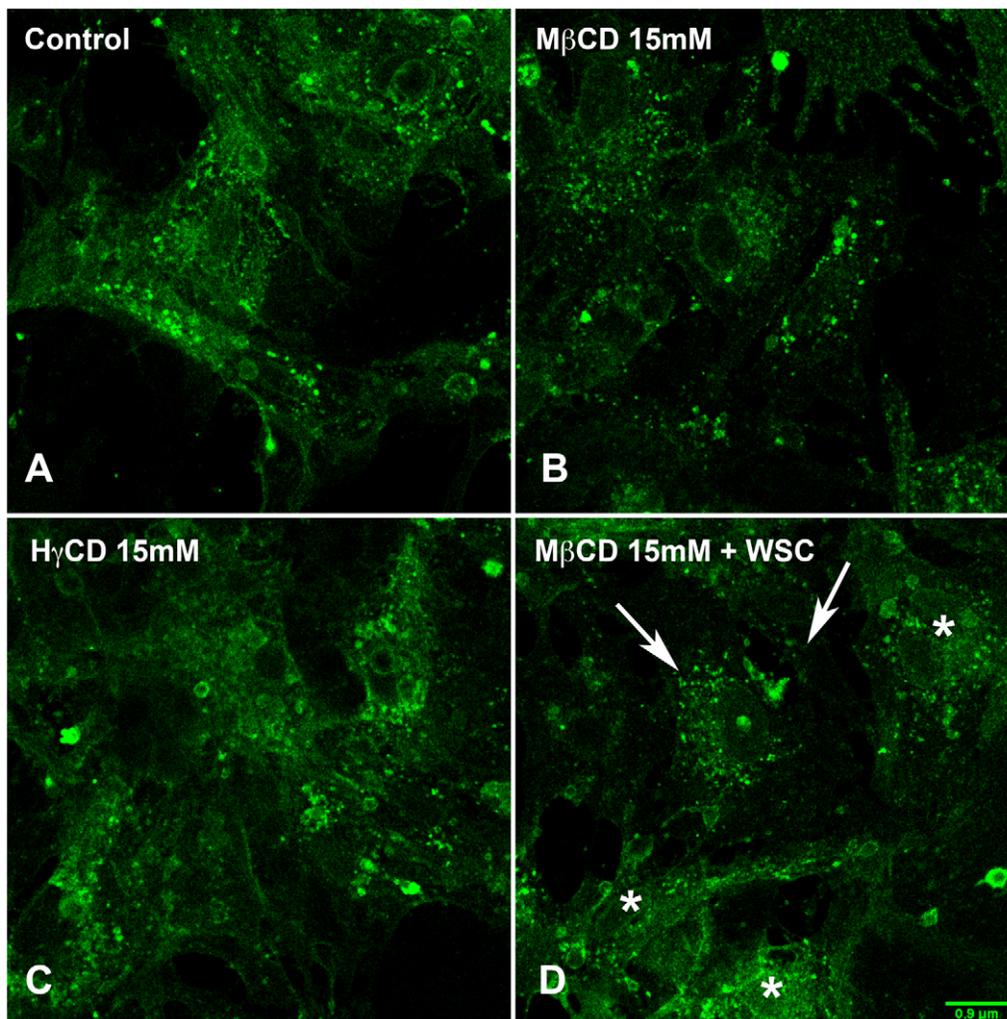


Figure 3. Treatment with M β CD leads to changes in membrane raft organization of cardiomyocytes. Confocal images of control (A) and cardiomyocytes pre-treated with 10 mM M β CD (B) or H γ CD (C). Cells were washed, fixed and then labeled with CTXb-Alexa 488, which recognizes GM1, a raft marker. In comparison to control cells, which show a homogenous strong labeling for GM1, cholesterol-depleted cardiomyocytes reveals a more discrete labeling. Cells treated with H γ CD show GM1 labeling similar to control cells whereas cholesterol-replenished cells (D) exhibit both patterns of cholesterol-depleted (arrows) as well as control (asterisks) GM1 labeling. Scale bar: 0.9 μm .
doi:10.1371/journal.pntd.0001583.g003

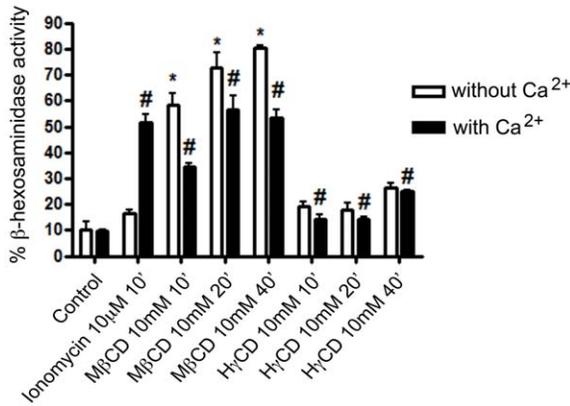


Figure 4. MβCD but not HγCD cell incubation leads to lysosomal exocytosis in cardiomyocytes. Cardiomyocytes were exposed to either 10 mM MβCD or HγCD for 10, 20 or 40 minutes at 37°C, in the absence (white bars) or presence (black bars) of calcium. Both extracellular media and lysates were collected and exposed to 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide, the fluorescent substrate of beta-hexosaminidase, an enzyme resident within lysosomes. Results are shown as ratio between β-hexosaminidase activity in extracellular media and total β-hexosaminidase activity (extracellular media plus β-hexosaminidase cell lysate hexosaminidase activity). Cells treated with 10 μM Ionomycin (Calbiochem) for 10 minutes were used as lysosomal exocytosis positive control. Data are shown as mean of triplicates ±SD. Asterisks indicate statistically significant differences ($p < 0.05$, Student's t test) between control and treated cells.
doi:10.1371/journal.pntd.0001583.g004

lysosomal vesicles in cardiomyocytes (Fig. 4). To test whether these events were occurring spontaneously without calcium regulation, as was the case for synaptic vesicles, the same assay was performed in the absence of calcium and presence of the same concentration of magnesium. The extracellular calcium chelator, EGTA, did not inhibit lysosomal exocytosis induced by the incubation with MβCD. On the contrary, it seemed to slightly enhance exocytosis (Fig. 4).

To confirm that the high levels of beta-hexosaminidase observed in the extracellular media of MβCD treated cells were the result of triggered lysosomal exocytosis and not a consequence of cell injury upon treatment, a cell viability assay was performed. Cardiomyocytes treated or not with MβCD/HγCD were trypsinized and incubated with HFS solution, containing PI (propidium iodide), a nuclei dye impermeable to cell membranes. Negative controls (untreated cardiomyocytes) and positive controls (ionomycin treated cells) were also analyzed. Figure 5 shows that treatment with MβCD did not interfere with cell viability either in the presence or in the absence of calcium (Fig. 5). As expected, treatment with HγCD also did not lead to cell death.

Cholesterol depletion changes lysosomal distribution in cardiomyocytes

In order to understand the effect of exocytosis triggered by cholesterol removal from cell membranes on lysosomal distribution, images from cells submitted or not to treatment with MβCD, HγCD or MβCD + WSC and labeled with both DAPI (nuclei dye) and anti-LAMP-1 (lysosomal marker) were collected. Representative images of each condition are shown in figure 6. Qualitative analyses of the images revealed a more restricted distribution of lysosomes, closer to the cell nuclei, in cells treated with 10 mM or 15 mM MβCD (Fig. 6B and C), in comparison to control non-treated cells (Fig. 6A) or cells treated with HγCD, the MβCD

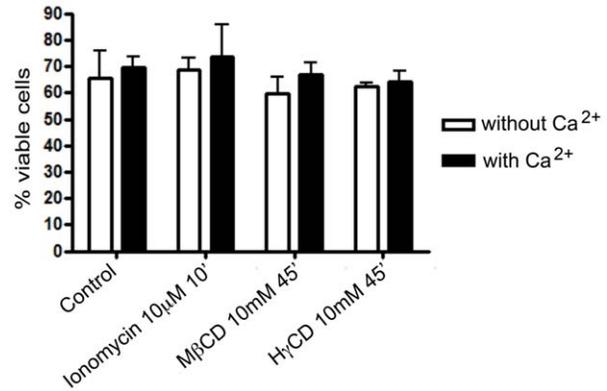


Figure 5. Lysosomal exocytosis events after cholesterol depletion are not due to cell death. After treatment with MβCD or HγCD, in the absence (white bars) or presence (black bars) of calcium, cardiomyocytes were trypsinized, collected and incubated with HFS solution, containing propidium iodide (PI). Cells that became inviable after drug treatment acquired PI labeling in their nuclei due to membrane permeability, and were counted as dead cells by flow cytometer. Data are shown as mean of triplicates ±SD.
doi:10.1371/journal.pntd.0001583.g005

inactive analog (Fig. 6D and E). Cholesterol replenishment after MβCD treatment seemed to revert the distribution of lysosomes to a pattern similar to the control non-treated cells (Fig. 6F). In order to precisely determine these differences, the same images were used to perform a quantitative assay of lysosomal dispersion (Fig. 7). First, for each isolated nucleus, the mean radius (R), was calculated. The next step was to select each lysosome associated with its respective nucleus and to measure the mean distance between a lysosome and cell center (D). Finally, the mean lysosome distance (D) relative to the mean nucleus' radius (R) was defined as the ratio D/R, where values closer to one indicate lysosomes are closer to perinuclear region whereas the opposite indicate lysosomes are more frequent at cell borders. This ratio D/R was measured for several groups of lysosomes associated with each nucleus in the different treatments. The results of this analysis are distributions of D/R values associated to each drug treatment, and are represented as histograms in Figure 7. Gaussian fits from control cells show that the majority of lysosomes are preferentially localized at ratio 1.3 from cell center whereas the peak of Gaussian fits from 10 mM MβCD treated cells show a ratio of 1.2 (Fig. 7A). The same pattern is seen upon treatment with higher concentrations of the drug (Fig. 7B). Moreover, lysosomes at higher ratios, in other words more distant from the cell nuclei, are mostly found in control non-treated cells, with none or only a few found in MβCD treated cells (Fig. 7A and B). On the other hand, no difference in lysosomal distribution was observed when cells were treated with 10 or 15 mM of HγCD as compared to control non-treated cells (Fig. 7C and 7D). Finally, cholesterol replenishment after MβCD treatment was able to, at least in part, revert lysosomal dispersion to a pattern more similar to control cells (Fig. 7E). Cumulative frequencies of lysosomes (Fig. 7F) from the histograms of figures 7A to E were plotted and analyzed using Kolmogorov-Smirnov statistical test. Statistically significant differences were only observed between 10 or 15 mM of MβCD treated and control non-treated cells. 10 and 15 mM HγCD or 15 mM of MβCD + WSC treated cells presented cumulative frequencies similar to control non-treated group. In order to prove that this rearrangement in lysosome distribution was not a consequence of cell surface area decrease upon cholesterol removal from plasma membrane, cells were treated or not with MβCD or its inactive

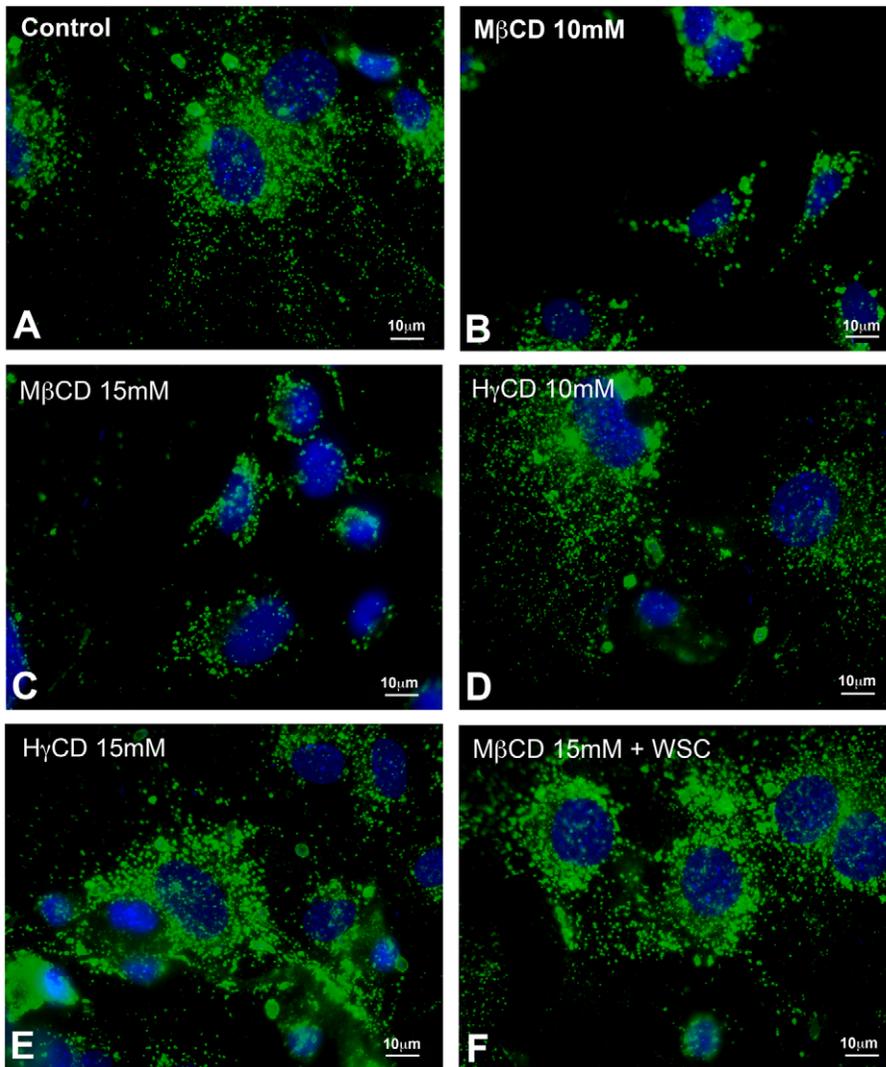


Figure 6. Cholesterol depletion leads to changes in lysosomal distribution within cells. Representative panels of lysosomal distribution in control cardiomyocyte (A) and cardiomyocytes pre-treated either with 10 mM (B) or 15 mM M β CD (C), 10 mM or (D) 15 mM H γ CD (E), or 15 mM M β CD followed by 0.05 mM WSC (F). M β CD treated cardiomyocytes show significant changes in lysosomal dispersion in cell cytoplasm. After drug treatment, cells were washed and incubated with *T. cruzi* TCTs, M.O.I. of 50 parasites per cell for 40 minutes at 37°C. After cell invasion, cells were washed, fixed and immunostained for LAMP-1 (green) DAPI (blue) and analyzed under fluorescence microscope. In comparison to untreated cardiomyocytes (A), which exhibit homogenous and well distributed LAMP-1 labeling, M β CD treated cardiomyocytes, (B) and (C), show a heterogeneous LAMP-1 labeling with lysosomes localized predominantly near cell nuclei. On the other hand, H γ CD treated cardiomyocytes and cholesterol-replenished cells, (E), (F) and (D), present lysosomal distribution similar to control cells. Scale bar: 10 μ m. doi:10.1371/journal.pntd.0001583.g006

analog, H γ CD, as well as M β CD + WSC, and labeled with the plasma membrane stain, CellMask (Invitrogen). Images were collected and cell surface area measured using the ImageJ software. No difference in cell surface area was found among the distinct groups (Supplementary Fig. 1).

Discussion

Two different groups have previously demonstrated the participation of cholesterol and membrane rafts as “hot spots” for *T. cruzi* entry into host cells [22,23]. In 2007 Fernandes and co-workers showed that cholesterol and membrane rafts participate in the internalization of metacyclic trypomastigotes and extracellular amastigotes from two different strains, CL and G, into non-professional phagocytic cells. In this same year, Barrias and co-

workers verified the participation of membrane rafts in the internalization of *T. cruzi* TCTs in phagocytic cells (murine peritoneum macrophages). However, in both studies it was not clear how cholesterol and/or rafts participated in the process of parasite entry into host cells. In the present work we show the participation of cholesterol in *T. cruzi* TCT entry into non-professional phagocytic cells and, most importantly, the mechanism by which plasma membrane cholesterol interferes with parasite invasion into non-professional phagocytic cells.

In order to investigate the participation of cholesterol in *T. cruzi* TCT invasion of non-professional phagocytic cells, we pre-treated cells with different concentrations of M β CD followed by invasion assays with *T. cruzi*. Cyclodextrins, like M β CD, are oligosaccharides constituted by glucopyranose units that are linked by α -(1-4) bonds [40]. These compounds are broadly used as liposoluble

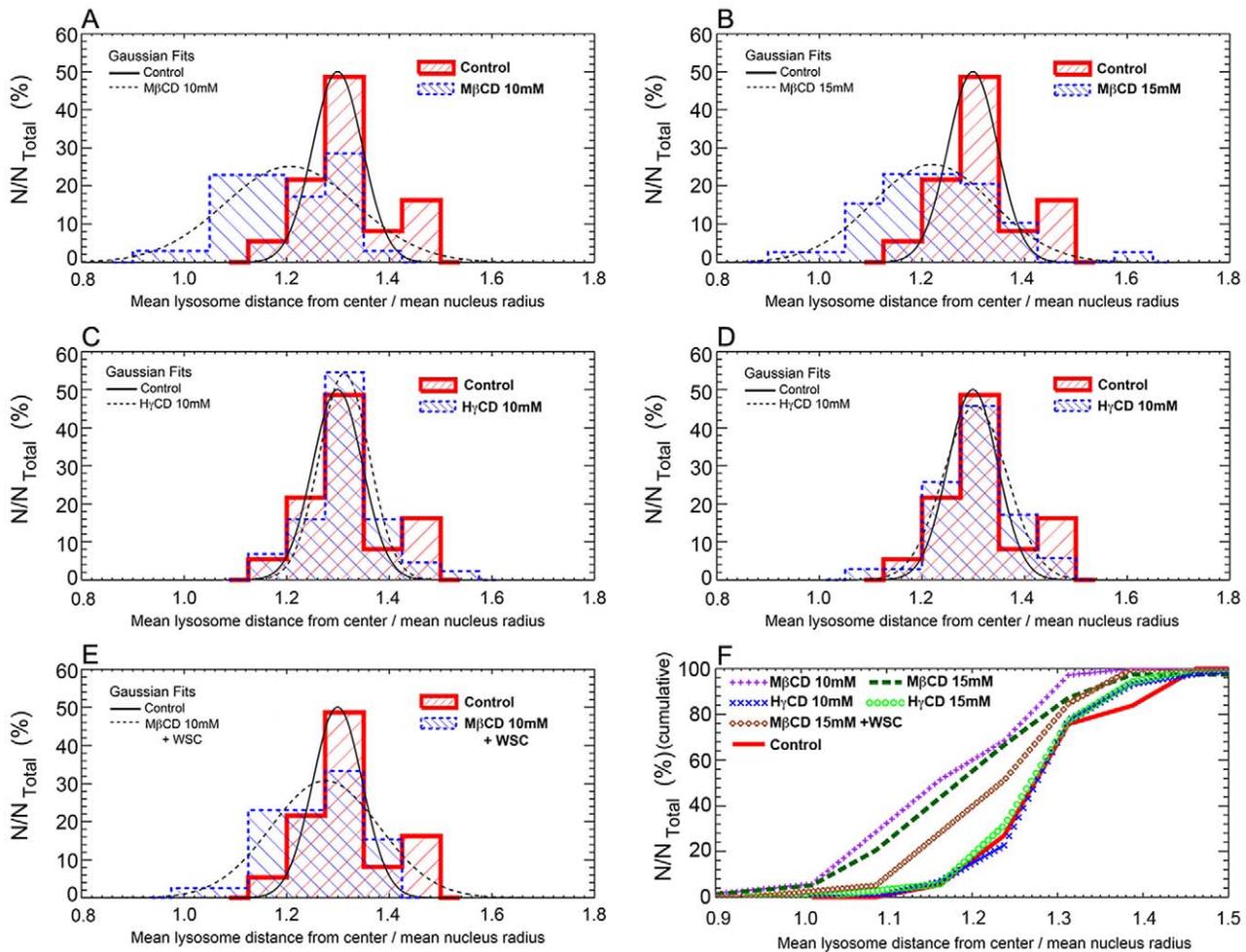


Figure 7. MβCD but not HγCD cell treatment leads to diminishment in lysosomal distribution near cell cortex. Quantitative analysis of lysosomal distribution, relative to cell nuclei, in 10 mM MβCD (A), 15 mM MβCD (B), 10 mM HγCD (C), 15 mM HγCD (D) or 15 mM MβCD followed by incubation with 0.05 mM WSC (E), treated cardiomyocytes in comparison to control non-treated cells. The mean distance between a lysosome and its respective cell center is represented by letter (D) and the mean lysosome distance (D) relative to the mean nucleus' radius (R) was defined as the ratio D/R. Ratio values closer to one indicate lysosomes are close to perinuclear region whereas the opposite indicate lysosomes are more frequent at cell borders. This ratio D/R was measured for several groups of lysosomes associated with each nucleus in the different treatments. The results of this analysis are distributions of D/R values associated to each drug treatment, and are represented as histograms. The histogram for each specific drug treatment is represented with a blue dashed line, which is superposed to the control (non-treated) lysosomal distribution, represented with a red solid thick line. Overlaid Gaussian fits to each distribution were added in order to highlight the main statistical trend of each diagram. The x-axis of each graph represents the ratio D/R whereas the y-axis represents the percentage of analyzed nuclei from each treatment normalized by total cell number. (F) Cumulative frequency of the histograms. Purple plus signs represent MβCD 10 mM treated cells, dark green rectangles represent MβCD 15 mM treated cells, blue crosses represent HγCD 10 mM treated cells, light green circles represent HγCD 15 mM treated cells, brown diamonds represent cells replenished with cholesterol after previous depletion and red continuous line represent control untreated cells. The Kolmogorov-Smirnov (KS) statistical test was performed to compare the cumulative frequency distributions. Statistically significant differences were obtained for MβCD 10 mM 0.02% ($p=0.0002$) or MβCD 15 mM 0.03% ($p=0.0003$) treated cells in relation to control, but not for HγCD 10 mM 79.49% ($p=0.7949$), HγCD 15 mM 86.03% ($p=0.8603$), or MβCD 15 mM + WSC 6.44% ($p=0.0644$) treated cells in relation to control. doi:10.1371/journal.pntd.0001583.g007

drug carriers since they are soluble in water and have a hydrophobic core in which non-soluble substances are transported [41]. β-cyclodextrins, especially MβCD, present a higher affinity for cholesterol as compared to the α and γ cyclodextrins, [42]. Labeling MβCD treated cardiomyocytes with Filipin III (a fluorophore with high affinity for cholesterol) confirmed the ability of the drug to remove cholesterol from cell membranes.

As previously shown for the metacyclic trypomastigotes and extracellular amastigotes forms of *T. cruzi*, we showed that a reduction in host cell surface cholesterol decreases the rate of invasion of non-professional phagocytic cells by *T. cruzi* TCTs, even though these forms of the parasite present different surface

molecules and consequently stimulate cells by distinct mechanisms [43]. This effect on TCT host cell entry was indeed due to cholesterol removal from host cell plasma membrane, since invasion assays with cells previously treated with HγCD, an inactive analog of MβCD which presents very low affinity for cholesterol, did not change the parasite invasion profile in comparison to control untreated cells. Also, host cell viability was not compromised after treatment as shown by a cell viability assay, confirming that the observed reduction in host cell invasion levels was not a result of cell loss due to drug treatment. Moreover, cholesterol replenishment after cell treatment with MβCD re-established invasion to control levels. Together, these results

undoubtedly show that cholesterol is also important for *T. cruzi* TCT entry into cardiomyocytes and that this model can be used to investigate the role of cholesterol in this process. We found that the low invasion rate of *T. cruzi* into cholesterol-depleted cells was accompanied by a diminishment in lysosome recruitment, which is required for the formation of the parasitophorous vacuole. Lysosome recruitment and fusion has been shown to be essential not only for inducing parasite internalization, but also for holding *T. cruzi* inside host cells [3,44]. Fusion of lysosomes with host cell plasma membrane induced by *T. cruzi* leads to a compensatory endocytic pathway that drives parasites into cells [44]. Parasites are known to tightly interact with parasitophorous vacuolar membrane, probably through lysosomal integral membrane proteins such as LAMP [45,46]. Membrane fusion events, such as synaptic vesicle and lysosomal exocytosis as well as other types of vesicle secretion, are regulated by calcium and occur through a mechanism dependent on proteins from the SNARE complex [26,47,48]. It is well known from microscopy studies that these proteins concentrate in submicrometre-sized, cholesterol-dependent clusters, such as membrane rafts, at which sites vesicles fuse [27,28]. Since membrane rafts are cholesterol-enriched microdomains (about 50% of total cellular cholesterol) located in cell plasma membrane [42] and cholesterol removal from cell membranes induces changes in raft organization and function [49,50,51], it is possible that the effect of cholesterol removal on *T. cruzi* entry was a consequence of the disruption of these microdomains. GM1 labeling, a known raft marker, has demonstrated that M β CD treatment of cardiomyocytes leads to changes in raft organization in these cells, suggesting a role not only for cholesterol but also for membrane raft microdomains in TCT's invasion of non-professional phagocytic cells. Raft disorganization, on the other hand, could alter membrane fusion events, by changing SNARE proteins distribution and/or function, disturbing the exocytic events regulated by these proteins. In fact, cholesterol removal led to massive non-regulated lysosomal exocytosis events, which occurred in the absence of calcium, suggesting that disruption of raft organization deregulates lysosomal exocytosis. Corroborating this idea, it has been demonstrated for neuronal exocytosis that SNARE localization in rafts work as negative regulators of secretion and reducing SNAP 23 partitioning to raft sites enhanced vesicle exocytosis [52]. Interestingly, SNAP 23 is one of the SNARE complex proteins involved in lysosomal fusion events [26]. Similar exocytic events, triggered by treatment with M β CD, have already been demonstrated in other animal models. Zamir and Charlton (2006) [53], analyzing neuromuscular junctions in crayfish, realized that treatment with 10 mM M β CD induced a 5-fold increase in the rate of spontaneous miniature excitatory post synaptic potentials (mEPSPs), as a consequence of unregulated, calcium independent, synaptic vesicle fusion events. Other authors have also shown changes in vesicle secretion upon cholesterol removal from plasma membrane [38,54,55,56]. Recently, Chen and co-workers studying cells derived from a mouse model of Niemann-Pick disease (a disorder characterized by a massive accumulation of lipids, including cholesterol, in the endosomal/lysosomal system) have shown that treatment with hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β -CD), a cyclodextrin similar to M β CD, leads to lysosomal exocytosis, as early as 15 minutes post exposure to the drug [57]. This result corroborates our data since cell incubation with M β CD also led to lysosomal exocytosis at early time points. However, contrary to what was observed by these authors, lysosomal exocytosis triggered by incubation with M β CD in cardiomyocytes is independent of extracellular calcium. It is still possible though that intracellular calcium is responsible for these

exocytic events. Another possibility, since HP β -CD and M β CD differ in their efficiency of extracting cell membrane cholesterol, is that the effect of these drugs on exocytosis might be different [42]. In fact, it has been shown that the effect of M β CD on spontaneous release of synaptic vesicles, generating mEPSPs in neuromuscular junctions, occurs in the absence of intracellular and extracellular calcium [53].

Finally, since our data shows that lysosomal exocytosis happened in the early stages of M β CD treatment, one could assume that a significant reduction in lysosomal reservoir occurred during the period of drug incubation. Quantitative analysis of lysosomal distribution in cells before and after cholesterol depletion showed that control cells have their lysosomal pool well distributed throughout the cell cytosol, with vesicles around the perinuclear and cell cortex area (Fig. 6A, qualitative image). However, when cholesterol is sequestered by M β CD, only the lysosomes near the perinuclear area remain (compare Fig. 6A and B), without a change in cell surface area upon treatment (Figure S1). Based on these results it is plausible to assume that cholesterol depletion evokes exocytosis of docked lysosomes localized near the cell cortex. Taken together, these data suggest the existence of two independent lysosomal pools (one near the cell surface and another in the perinuclear area), which might be differentially regulated. The docked lysosomes near the cell surface would then represent the pool triggered by *T. cruzi* and therefore involved in the exocytic events that initiate its internalization process. Without enough lysosomes available at the cell surface for fusion and formation of the parasitophorous vacuole, *T. cruzi* entry is compromised.

We cannot discard however that reduction in membrane cholesterol content and its consequent raft disorganization may also affect intracellular signaling pathways [58,59,60]. Therefore, receptors present in membrane rafts, which might be important for recognition and signal transduction during *T. cruzi* interaction and internalization into host cells, may have their functions attenuated or compromised and consequently affect parasite invasion rates. In this sense the diminishment in *T. cruzi* association with lysosomes observed upon treatment with M β CD could be also partly due to the compromised function of these receptors. Studies are being carried out to evaluate these possibilities.

Supporting Information

Figure S1 Cholesterol depletion does not change the cell area of cardiomyocytes. (A) Representative figure of control, 15 mM M β CD, 15 mM H γ CD and cholesterol-replenished cells labeled with CellMask Orange plasma membrane stain. Briefly, cardiomyocytes were treated with the cyclodextrins, washed and incubated with a 5 μ g/mL solution of CellMask in fresh medium for 5 minutes, at 37°C. After that period, cells were fixed for 10 minutes, at 37°C, washed and mounted with antifade medium and analyzed immediately in a confocal microscope. (B) Histograms showing distributions of cell areas for different treatments (M β CD 15 mM- black squares line; H γ CD 15 mM- blue square-traces line and M β CD 15 mM followed by 0.05 mM WSC- green rectangles line in comparison to control cells (red continuous line). In the cumulative frequency distributions, statistical KS test results shows that control vs M β CD 15 mM is 14.8% ($p = 0.148$); control vs H γ CD 15 mM is 14.3% ($p = 0.143$) and control vs WSC treated cells is 55.5% ($p = 0.555$). Altogether this statistical analysis shows that there are no differences between areas in control or cyclodextrin treated cells. (TIF)

Acknowledgments

We are grateful to Elizabeth Ribeiro da Silva and Patrícia Massara Martinelli for helpful suggestions, to Silvia Carolina Guatimosim Fonseca for help with the primary cardiomyocyte culture, to Dawidson Assis Gomes for help with the spectrofluorimeter Synergy 2 and to Gregory T. Kitten for critical reading of the manuscript.

References

- Epting CL, Coates BM, Engman DM (2010) Molecular mechanisms of host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 126: 283–291.
- Hall BS, Tam W, Sen R, Pereira ME (2000) Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. *Mol Biol Cell* 11: 153–160.
- Andrade LO, Andrews NW (2004) Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med* 200: 1135–1143.
- Tardieux I, Nathanson MH, Andrews NW (1994) Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*-induced cytosolic-free Ca²⁺ transients. *J Exp Med* 179: 1017–1022.
- Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, et al. (1992) Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell* 71: 1117–1130.
- Favoreto S, Jr., Dorta ML, Yoshida N (1998) *Trypanosoma cruzi* 175-kDa protein tyrosine phosphorylation is associated with host cell invasion. *Exp Parasitol* 89: 188–194.
- Schenkman S, Kurosaki T, Ravetch JV, Nussenweig V (1992) Evidence for the participation of the Ssp-3 antigen in the invasion of non-phagocytic mammalian cells by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 175: 1635–1641.
- Rodríguez A, Rioult MG, Ora A, Andrews NW (1995) A trypanosome-soluble factor induces IP₃ formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J Cell Biol* 129: 1263–1273.
- Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, et al. (2000) Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med* 192: 1289–1300.
- Waghaji MC, Keramidis M, Feige JJ, Araujo-Jorge TC, Bailly S (2005) Activation of transforming growth factor beta by *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol* 7: 511–517.
- Cortez M, Atayde V, Yoshida N (2006) Host cell invasion mediated by *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp82 is associated with F-actin disassembly and is inhibited by enteroinvasive *Escherichia coli*. *Microbes Infect* 8: 1502–1512.
- Singer SJ (1975) Structure of membranes. *Adv Pathobiol*. pp 5–15.
- van Meer G (1989) Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol* 5: 247–275.
- Simons K, Ikonen E (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569–572.
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang ZL, Casanova JE, Lisanti MP (1994) In vitro phosphorylation of caveolin-rich membrane domains: identification of an associated serine kinase activity as a casein kinase II-like enzyme. *Oncogene* 9: 2589–2595.
- Danielsen EM, van Deurs B (1995) A transferrin-like GPI-linked iron-binding protein in detergent-insoluble noncaveolar microdomains at the apical surface of fetal intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* 131: 939–950.
- Casey PJ (1995) Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268: 221–225.
- Hanzal-Bayer MF, Hancock JF (2007) Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett* 581: 2098–2104.
- Incardona JP, Eaton S (2000) Cholesterol in signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 12: 193–203.
- Lafont F, van der Goot FG (2005) Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* 7: 613–620.
- Manes S, del Real G, Martínez AC (2003) Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol* 3: 557–568.
- Barrias ES, Dutra JM, De Souza W, Carvalho TM (2007) Participation of macrophage membrane rafts in *Trypanosoma cruzi* invasion process. *Biochem Biophys Res Commun* 363: 828–834.
- Fernandes MC, Cortez M, Geraldo Yoneyama KA, Straus AH, Yoshida N, et al. (2007) Novel strategy in *Trypanosoma cruzi* cell invasion: implication of cholesterol and host cell microdomains. *Int J Parasitol* 37: 1431–1441.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 31–39.
- Burleigh B, Andrews NW (1995) A 120 kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca²⁺ signaling factor for mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 5172–5180.
- Rao SK, Huynh C, Proux-Gillardeaux V, Galli T, Andrews NW (2004) Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. *J Biol Chem* 279: 20471–20479.
- Lang T, Bruns D, Wenzel D, Riedel D, Holroyd P, et al. (2001) SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *Embo J* 20: 2202–2213.
- Gil C, Soler-Jover A, Blasi J, Aguilera J (2005) Synaptic proteins and SNARE complexes are localized in lipid rafts from rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 117–124.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CG LOA. Performed the experiments: BH JGD LFK FPS HLdP PHG AMdP. Analyzed the data: BH FPS PHG AMdP UA CG LOA. Contributed reagents/materials/analysis tools: UA ONM CG EC LOA. Wrote the paper: BH CG LOA. Designed the software used in analysis: FPS.

- Predescu SA, Predescu DN, Shimizu K, Klein IK, Malik AB (2005) Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 37130–37138.
- Andrews NW, Hong KS, Robbins ES, Nussenweig V (1987) Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 64: 474–484.
- Martinez I, Chakrabarti S, Hellevik T, Morehead J, Fowler K, et al. (2000) Synaptotagmin VII regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J Cell Biol* 148: 1141–1149.
- Idone V, Tam C, Goss JW, Toomre D, Pypaert M, et al. (2008) Repair of injured plasma membrane by rapid Ca²⁺-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 180: 905–914.
- Kruth HS, Vaughan M (1980) Quantification of low density lipoprotein binding and cholesterol accumulation by single human fibroblasts using fluorescence microscopy. *J Lipid Res* 21: 123–130.
- Middlebrook JL, Dorland RB (1984) Bacterial toxins: cellular mechanisms of action. *Microbiol Rev* 48: 199–221.
- Chinnapen DJ, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI (2007) Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett* 266: 129–137.
- Day CA, Kenworthy AK (2009) Tracking microdomain dynamics in cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788: 245–253.
- Rodríguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW (1997) Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 137: 93–104.
- Wasser CR, Ertunc M, Liu X, Kavalali ET (2007) Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling. *J Physiol* 579: 413–429.
- Jans R, Sartor M, Jadot M, Poumay Y (2004) Calcium entry into keratinocytes induces exocytosis of lysosomes. *Arch Dermatol Res* 296: 30–41.
- Davis ME, Brewster ME (2004) Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 3: 1023–1035.
- Ohtani Y, Irie T, Uekama K, Fukunaga K, Pitha J (1989) Differential effects of alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins on human erythrocytes. *Eur J Biochem* 186: 17–22.
- Zidovetzki R, Levitan I (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1311–1324.
- Yoshida N, Cortez M (2008) *Trypanosoma cruzi*: parasite and host cell signaling during the invasion process. *Subcell Biochem* 47: 82–91.
- Fernandes MC, Cortez M, Flannery AR, Tam C, Mortara RA, et al. (2011) *Trypanosoma cruzi* subverts the sphingomyelinase-mediated plasma membrane repair pathway for cell invasion. *J Exp Med* 208: 909–921.
- Albertti LA, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO (2010) Role of Host Lysosomal Associated Membrane Protein (LAMP) in *T. cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect* 12(10): 784–789.
- Lopez M, Huynh C, Andrade LO, Pypaert M, Andrews NW (2002) Role for sialic acid in the formation of tight lysosome-derived vacuoles during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Mol Biochem Parasitol* 119: 141–145.
- Chen YA, Scheller RH (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 98–106.
- Jahn R, Lang T, Sudhof TC (2003) Membrane fusion. *Cell* 112: 519–533.
- Larbi A, Douziech N, Khalil A, Dupuis G, Gherairi S, et al. (2004) Effects of methyl-beta-cyclodextrin on T lymphocytes lipid rafts with aging. *Exp Gerontol* 39: 551–558.
- Shadan S, James PS, Howes EA, Jones R (2004) Cholesterol efflux alters lipid raft stability and distribution during capacitation of boar spermatozoa. *Biol Reprod* 71: 253–265.
- Martinez-Seara H, Rog T, Karttunen M, Vattulainen I, Reigada R (2010) Cholesterol induces specific spatial and orientational order in cholesterol/phospholipid membranes. *PLoS One* 5: e11162.
- Salaun C, Gould GW, Chamberlain LH (2005) Lipid raft association of SNARE proteins regulates exocytosis in PC12 cells. *J Biol Chem* 280: 19449–19453.
- Zamir O, Charlton MP (2006) Cholesterol and synaptic transmitter release at crayfish neuromuscular junctions. *J Physiol* 571: 83–99.
- Boerke A, Tsai PS, Garcia-Gil N, Brevis IA, Gadella BM (2008) Capacitation-dependent reorganization of microdomains in the apical sperm head plasma membrane: functional relationship with zona binding and the zona-induced acrosome reaction. *Theriogenology* 70: 1188–1196.
- Vikman J, Jimenez-Felstrom J, Nyman P, Thelin J, Eliasson L (2009) Insulin secretion is highly sensitive to desorption of plasma membrane cholesterol. *FASEB J* 23: 58–67.

56. Xia F, Xie L, Mihic A, Gao X, Chen Y, et al. (2008) Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells. *Endocrinology* 149: 5136–5145.
57. Chen FW, Li C, Ioannou YA (2010) Cyclodextrin induces calcium-dependent lysosomal exocytosis. *PLoS One* 5: e15054.
58. Chini B, Parenti M (2004) G-protein coupled receptors in lipid rafts and caveolae: how, when and why do they go there? *J Mol Endocrinol* 32: 325–338.
59. Lamb ME, Zhang C, Shea T, Kyle DJ, Leeb-Lundberg LM (2002) Human B1 and B2 bradykinin receptors and their agonists target caveolae-related lipid rafts to different degrees in HEK293 cells. *Biochemistry* 41: 14340–14347.
60. Zuo W, Chen YG (2009) Specific activation of mitogen-activated protein kinase by transforming growth factor-beta receptors in lipid rafts is required for epithelial cell plasticity. *Mol Biol Cell* 20: 1020–1029.