



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O Hemisuccinato de Colesterol na Etiologia da Aterogénese

João Carlos Pinho da Silva

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

O Hemisuccinato de Colesterol na Etiologia da Aterogénese

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Otília Vitoriana Vieira (Universidade de Coimbra)

João Carlos Pinho da Silva

2012

“A ciência não pode resolver o mistério final da natureza. E isto porque, em última análise, somos parte do mistério que tentamos resolver”

Max Planck

Agradecimentos

À Doutora Otília Vieira, pela oportunidade, disponibilidade e acompanhamento próximo. Uma experiência da qual, sem dúvida, retiro inúmeros ensinamentos.

Ao Professor Doutor Winchil Vaz pelas sábias palavras, pelo seu tempo e pelos aconselhamentos em busca da Visão.

Ao Doutor Luís Estronca, pela dedicação e pedagogia para o meu enquadramento na ciência experimental. Uma presença indispensável para que pudesse desenvolver o meu trabalho.

Aos meus colegas do laboratório *Infection & Pathogens, CNC*, pelo companheirismo, consideração e pronto auxílio.

Aos meus amigos, verdadeiros amigos, por não necessitar sequer de os nomear para saberem quem são. Têm a responsabilidade de parte importante da minha integridade.

Ao Luís, à Rute e ao Leonardo, pela amizade e carinho com que tantas vezes encurtaram a distância a casa. Obrigado por me tratarem como “um dos vossos”.

Aos meus Pais, pelas palavras que faltam para mostrar eterna gratidão por me darem “asas para voar”. A vossa dedicação de uma vida, não poderia fazer-me sentir mais querido.

Ao meu irmão, por expressar continuamente que encontra um exemplo em mim. É um orgulho indiscreto receber tamanho relevo de alguém cujo sentimento que endereço é um expoente. Obrigado “miúdo”.

À minha Inês, à minha querida Inês, por ser o meu refúgio, o meu propósito. Obrigado por preencheres o que me falta e me fazeres sentir, sentir o que nunca ninguém mais poderia compreender.

Resumo

O excesso de colesterol circulante no plasma sanguíneo, sob a forma de lipoproteínas (LDL), pode em certas regiões das artérias ser acumulado no interior da sua parede devido à força exercida pela pressão que é favorável à entrada por fenestrações na camada endotelial. Neste espaço inicia-se a modificação química dessas mesmas partículas, o que desencadeia uma resposta inflamatória e posterior internalização por macrófagos provenientes do fluxo sanguíneo, depois de diferenciados. Deste processo resultam as conhecidas “células-espumosas” que estão na base dos processos de desenvolvimento da Aterosclerose.

O estado patológico deste tipo de macrófagos (preenchidos de lípido), designado por lipidose, apresenta uma relação directa com LDL quimicamente modificadas por oxidação. Os oxoésteres de colesterol são dos produtos finais deste processo, sendo os hemiésteres seus derivados. Neste estudo, é avaliado o hemisuccinato de colesterol (CHS), no que diz respeito ao seu papel na etiologia da aterogénese. Para tal, incubamos macrófagos com concentrações sub-tóxicas de LDL enriquecidas em CHS, durante 40 dias, e avaliamos de forma sistemática a internalização de CHS, toxicidade e alteração a nível morfológico, recorrendo a microscopia confocal.

Nestas condições experimentais foi possível observar o desencadear de um fenótipo nunca antes verificado, em que os lisossomas assumem dimensões “gigantescas”. Experiências com uma sonda fluorescente, permitiram observar que a acidificação foi um processo preservado. Além disso, por ensaios de fagocitose foi possível verificar que os lisossomas mantiveram a sua capacidade fusogénica. Porém, 40 dias após tratamento, constatamos por imunofluorescência, a aquisição de efectores autofágicos, sugerindo alteração no organelo atípico, com características lisossomais, observado nos macrófagos. De realçar que a viabilidade celular não parece alterada em todo este processo. Dada a implicação dos lisossomas na formação de células-espumosas lipidóticas, pensamos que os resultados obtidos podem ser importantes nos processos iniciais de formação do ateroma. A sua importância irá ser explorada num futuro próximo.

Abstract

Excessive amounts of circulating cholesterol, carried by lipoproteins (LDL), are able to penetrate through the arterial wall, due to blood pressure. Once “inside” the artery, chemical modifications in LDL can occur, triggering inflammatory processes with subsequent internalization of accumulated particles by macrophages (previously recruited and differentiated). “Foam-cells” resulting from this process are the initiators of atherosclerotic lesions development.

Macrophages presenting these “foamy” properties, suffer from a pathological condition called lipidosis, provoked mainly by oxidatively modified LDL molecules. In the present study the role of cholesteryl hemisuccinate (CHS) in atherogenesis is evaluated. CHS is a derivative of cholesteryl oxoesters, a significant product of LDL oxidation. We performed the incubation of macrophages with CHS enriched LDL molecules, at sub-toxic concentrations for 40 days. A systematic evaluation of CHS internalization, toxicity and cell morphological changes, through confocal microscopy was undertaken.

Under these experimental conditions, macrophages assumed a phenotype never observed before, in which lysosomes turned into structures of “giant” dimension. Using a fluorescent dye we could conclude that acidification was maintained. Phagocytosis assays, showed that these “mega-lysosomes” were able to participate in dynamic processes like endocytosis. However, at 40 days of treatment, immunofluorescence results showed the acquisition of autophagy effectors by the “giant” atypical lysosomes, suggesting that they may have acquired modifications and atypical characteristics. During all the process, cell viability was not affected. Considering the role of lysosomes in the induction of lipidosis in macrophages, we thought that our results could have importance to the initial processes of atheroma formation. We intend to explore it in a near future.

ABREVIATURAS

CHS – Hemisuccinato de Colesterol (Cholesteryl Hemisuccinate)

DIC – Differential Interference Contrast microscopy

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

HDL – High Density Lipoproteins

LAMP – Lysosomal associated membrane protein

LAP – LC3-associated phagocytosis

LDL – Low Density Lipoproteins

POPC – 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina

ROS – Reactive Oxygen Species

SMC's – Smooth Muscle Cells

SR's – Scavenger Receptors

4-HNE – 4-hidroxi-non-2-enal

Índice

CAPÍTULO I

Introdução	1
1. Aterosclerose	2
2. Considerações da anatomia arterial	2
3. Hemodinâmica e acumulação de colesterol na <i>íntima</i>	4
3.1 Lipoproteínas, Transportadores de colesterol especializados	4
3.2. Curvaturas e Ramificações – Regiões preferenciais para acumulação sub – endotelial de lipoproteínas	6
3.3. Modificações nas LDL – Resposta à retenção	7
4. Células-espumosas (“Foam Cells”)	10
4.1. Lipidose, base patológica da aterosclerose	12
4.2. Oxidação de LDL, um processo chave na aterogénese	13
5. Objectivo do presente estudo	17

CAPÍTULO II

Materiais e Métodos	19
MATERIAIS	20
1. Compostos Químicos	20
2. Anticorpos e Sondas fluorescentes	20
MÉTODOS	20
1. Preparação de Lipossomas	20
2. LDL	21
2.1. Isolamento de LDL proveniente de plasma humano	21

2.2. LDL – CHS _____	22
3. Células _____	22
3.1. Cultura Celular _____	22
3.2. Incubações _____	22
3.3. Viabilidade Celular _____	23
3.4. Internalização de CHS sua quantificação intracelular _____	23
3.5. Quantificação de Proteína Celular _____	23
3.6. Marcação celular com sondas e Imunofluorescência _____	24
3.6.1. Marcação dos lípidos neutros intracelulares com Oil-red _____	24
3.6.2. Marcação da membrana plasmática, utilizando a sonda fluorescente FM4-64 _____	24
3.6.3. Marcação de organelos acídicos com a sonda fluorescente LysoTracker _____	24
3.6.4. Marcação dos endossomas tardios/lisossomas com anticorpo contra LAMP-2 (Lysosomal associated membrane protein). _____	25
3.6.5. Marcação dos macrófagos com anticorpos que detectam um marcador de autofagia - LC3B (conhecido efector de autofagia) _____	25
3.6.6. Ensaio de fagocitose com “latex beads” opsonizadas _____	26

CAPÍTULO III

Resultados _____	27
1. CHS induz a formação de “grandes vacúolos” citoplasmáticos _____	28
2. Os vacúolos observados são positivos para o LAMP-2 e são acídicos _____	29
3. Após 20 dias de incubação, os lisossomas “gigantes” apresentam capacidade fusogénica _____	33
4. Caracterização adicional dos lisossomas “gigantes” _____	35

4.1. Os lisossomas “gigantes” não apresentam continuidade com a membrana plasmática _____	37
4.2. Os lisossomas “gigantes” recrutam LC3 _____	38
5. O CHS é internalizado pelos macrófagos, até um patamar de saturação __	41
6. A viabilidade celular é mantida ao longo do tempo _____	42

CAPÍTULO IV

Discussão Geral & Conclusões _____	44
Referências _____	48

CAPÍTULO I

Introdução

1. Aterosclerose

Uma grande fracção dos distúrbios severos a nível cardiovascular provêm da Aterosclerose, que é reconhecida como uma patologia cujo desenvolvimento lento e progressivo se inicia logo a partir de estados neo-natais [2]. Como veremos, esta doença afecta maioritariamente as grandes artérias, particularmente em bifurcações, e é consequência da pressão sanguínea bem como da pressão parcial de oxigénio ser bastante elevada nestes vasos, quando comparadas com as veias.

Na patologia da aterosclerose dá-se, ao longo do tempo, um envelhecimento gradual da parede arterial, com a acumulação de gorduras e seus derivados, em regiões específicas da estrutura da artéria (formação do chamado “ateroma”), causando estreitamento luminal. Zonas de curvatura ou ramificação na artéria apresentam maior susceptibilidade a estes processos. Em fases mais avançadas dos ateromas, o desenvolvimento patológico é complexo, incluindo fenómenos inflamatórios, a ruptura dos próprios ateromas e exposição do seu conteúdo ao fluxo sanguíneo no lúmen da artéria. Isto leva à formação de um coágulo, cuja consequência imediata se traduz por um bloqueio do vaso, levando a isquémia do tecido “downstream”, o que conduz a episódios de acidente vascular cerebral ou enfarte do miocárdio, conforme as artérias afectadas sejam, respectivamente, do foro cerebral ou coronário.

No que segue, tentaremos elucidar apenas o processo de iniciação na formação de um ateroma, considerando principalmente as suas origens físicas e químicas. Como, a progressão mais tardia das lesões ateroscleróticas assim como as consequências que induz, são mais dependentes de processos inflamatórios os quais não serão alvo da nossa consideração aqui.

2. Considerações da anatomia arterial

A estrutura arterial apresenta uma organização que pode ser, de modo simplificado, descrita pela existência de dois tubos concêntricos. O interior, em que o sangue circula, é designado por tubo endotelial, visto ser composto por células endoteliais organizadas numa única camada celular e interligadas por “tight junctions”

(Figura 1). O tubo exterior envolve e circunda o endotelial, e é um tubo mais ou menos espesso, constituído por células de músculo liso (smooth muscle cells – SMC's). Entre os dois tubos remanesce um espaço que é designado de *íntima* e que contém uma matriz porosa composta de proteínas fibrosas como o colagénio e de diversos proteoglicanos.

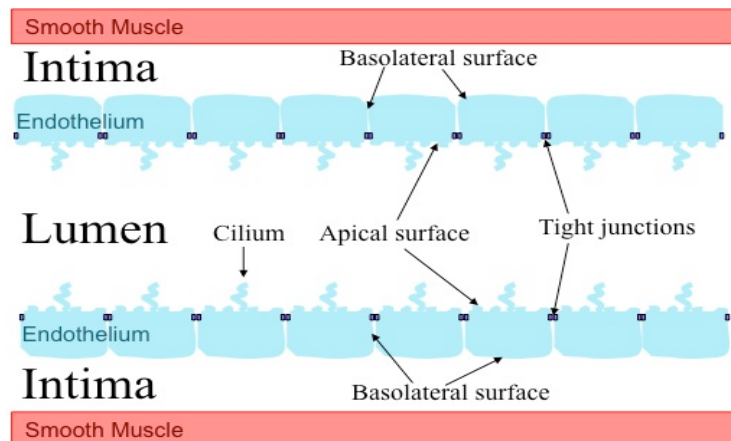


Figura 1 – Estrutura esquemática simplificada, em secção longitudinal, da parede arterial

Na monocamada celular que constitui o tubo endotelial, as células endoteliais, células polarizadas com a superfície apical em contacto com o fluxo sanguíneo, e a superfície basolateral em contacto com a matriz da íntima, encontram-se, como já referido, interligadas por “tight junctions” (Figura 1). Estas apresentam por vezes algumas lacunas, o que faz com que resultem pequenos segmentos abertos ou “fenestrações” (Figura 2), que possuem diâmetro médio entre 20 a 30 nm [3].

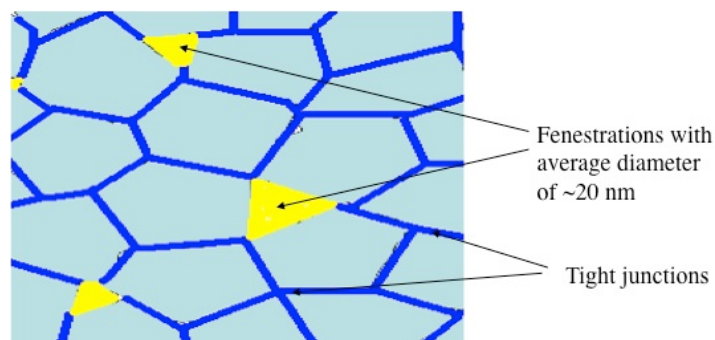


Figura 2 – Espaços remanescentes entre as “tight junctions” das células endoteliais, por onde podem penetrar as moléculas de LDL em circulação.

3. Hemodinâmica e acumulação de colesterol na *íntima*

3.1 Lipoproteínas, Transportadores de colesterol especializados

Na composição do plasma circulante, um dos nutrientes com maior importância para a normal e natural vida das células é o colesterol. Visto que as suas propriedades químicas lhe conferem insolubilidade em ambiente aquoso, este não pode, simplesmente, circular sob a sua forma livre na corrente sanguínea. Como tal, o fígado é o principal órgão (existe outro, o intestino) responsável por sintetizar complexos moleculares designados de lipoproteínas (nanopartículas compostas de uma mistura de lípido e proteína) que são responsáveis por transportar o colesterol até aos vários tecidos periféricos. Existem vários tipos de lipoproteínas no sangue humano, caracterizadas pela sua densidade e tamanho, das quais os dois tipos principais responsáveis pelo equilíbrio de colesterol entre o fígado e tecidos periféricos, são as chamadas lipoproteínas de baixa densidade (“low density lipoproteins” – LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (“high density lipoproteins” – HDL). Em geral, as lipoproteínas são constituídas por um núcleo lipídico, rico em lípidos insolúveis em água como o colesterol (que se encontra na forma esterificada) e triglicerídeos, encapsulados numa monocamada de fosfolípidos, colesterol livre e proteínas. As moléculas que se encontram na superfície destas partículas possuem carácter anfipático, ou seja, interagem com a parte interna, essencialmente lipídica de carácter hidrofóbico, assim como com o ambiente externo aquoso. Esta capacidade inerente aos lípidos polares e às proteínas que formam a “cápsula” superficial das lipoproteínas permite a estabilização da nanopartícula, assim como a mediação de processos de reconhecimento, dessas mesmas proteínas, por receptores celulares específicos, para internalização celular e utilização do conteúdo pelos tecidos.

As LDL, comumente conhecidas como “mau colesterol”, apresentam uma composição lipídica mais rica comparativamente às HDL (vulgarmente reconhecidas como “bom colesterol”) (Figura 3), uma vez que são as responsáveis por fazer chegar o colesterol do fígado até às células e tecidos, enquanto que as HDL têm o papel de

transporte reverso do excesso periférico de colesterol, novamente para o fígado. De realçar que as LDL são significativamente maiores que as HDL.

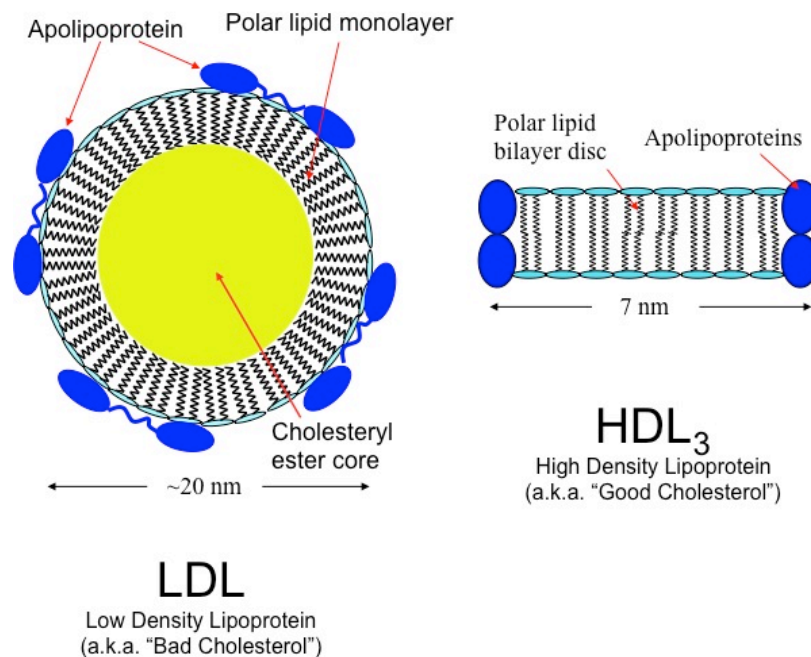


Figura 3 – Estrutura esquemática das partículas de LDL e HDL.

Considerando os tamanhos relativos das partículas de LDL e HDL (Figura 3), assim como o tamanho médio das fenestrações do tubo endotelial arterial, e tendo ainda em consideração que a pressão no lúmen da artéria (Figura 1) é maior do que a pressão na *íntima*, há uma certa probabilidade de que as nanopartículas (LDL e HDL) a circular no sangue, atravessem a parede endotelial e passem para a *íntima*. Uma vez aqui localizadas, as partículas de LDL têm uma menor probabilidade de voltar para o fluxo sanguíneo no lúmen, devido à semelhança do seu tamanho médio, com o diâmetro das fenestrações do endotélio. Pelo contrário, as HDL, apresentando um tamanho muito inferior ao das fenestrações, podem voltar ao sangue por processos passivos de difusão. Deste modo, há claramente uma maior probabilidade de retenção das LDL na *íntima* do que as HDL. Acrescentado a este facto, outro contribui para esta condição e tem que ver com a existência, na *íntima*, de uma matriz de gel poroso que facilita a retenção das partículas neste espaço [4].

3.2. Curvaturas e Ramificações – Regiões preferenciais para acumulação sub – endotelial de lipoproteínas

A passagem das partículas de LDL e HDL, do lúmen arterial para a *íntima*, é um processo que depende fortemente da natureza do fluxo sanguíneo e da pressão nas artérias. Em regiões arteriais que não contenham ramificações ou curvaturas, este fluxo é laminar e num sentido paralelo à superfície do endotélio. No entanto, em regiões de curvatura ou ramificação, o fluxo é turbulento, o que leva a que haja uma maior frequência de colisões das partículas circulantes no sangue com a parede endotelial e conseqüentemente uma maior probabilidade de estas entrarem no espaço da *íntima* [5]. O início de formação de um ateroma, encontra-se assim relacionado com um aumento da permeabilidade da parede arterial e retenção das LDL na *íntima*. Níveis elevados de LDL no sangue, bem como hipertensão favorecem uma maior acumulação destas partículas no espaço sub-endotelial (*íntima*).

Naturalmente que a entrada e acumulação de partículas de LDL circulante terá maior probabilidade de ocorrer se os seus níveis no sangue forem também significativamente elevados. Desta forma, há que ter em conta os processos de homeostase de colesterol, que controlam a sua concentração essencialmente a nível de processos de “feedback”, num mecanismo concertado para a manutenção dos seus níveis no organismo. Neste contexto, os receptores de LDL (LDLr), desempenham um papel fundamental. Encontram-se na superfície membranar celular e desempenham a função de ligação da apo-B, apolipoproteína existente à superfície das partículas de LDL nativas, mediando assim a sua entrada nas células. A expressão de LDLr, é um processo dependente dos níveis de colesterol intracelular e sujeito a “down-regulation”. Isto implica que, quando a célula necessita de colesterol, os receptores são expressos e endereçados para a membrana plasmática, para que possa ocorrer internalização. Ao longo do tempo, ficando satisfeitas as necessidades celulares quanto a LDL internalizada, irá ser bloqueada a expressão dos LDLr através de mecanismos de reconhecimento [6], para que assim deixe de ocorrer entrada de colesterol, de modo a evitar que a concentração intracelular atinja valores demasiado elevados, o que causaria *stress* generalizado. Também importante para os mecanismos de homeostase, é a patologia bastante severa designada de

hipercolesterolemia familiar [7]. Esta doença caracteriza-se pela ausência de expressão de LDLr, na membrana celular, logo as moléculas de LDL circulantes não irão ser absorvidas pelos tecidos periféricos. Isto vai levar a que se acumulem na corrente sanguínea, levando a um grande aumento na sua concentração, o que contribui significativamente para uma maior acumulação na *íntima*. Outro aspecto importante tem que ver com o facto de, em pacientes que sofrem destas condições, as LDL circularem por um período muito superior (cerca de dez dias), o que é muito superior ao que acontece normalmente (entre 3 a 4 dias [8]). Dez dias são suficientes para que as moléculas de LDL se tornem oxidadas, o que é mais um factor de potenciação para o desenvolvimento de Aterosclerose. Não surpreende, portanto, que tenha sido o estudo detalhado da hipercolesterolemia familiar, nos anos 70 e 80 do século passado por Michael F. Brown, Joseph L. Goldstein e seus colaboradores, que iluminou o caminho para o entendimento dos processos de aterosclerose [9].

3.3. Modificações nas LDL – Resposta à retenção

Um dos mais debatidos e reconhecidos aspectos que estão directamente ligados à aterogénese, tem que ver com as modificações químicas que podem ocorrer ao nível das LDL. Não restam dúvidas que a principal e mais significativa modificação diz respeito à oxidação, sendo de entre as várias formas possíveis, a peroxidação a que mais afecta as lipoproteínas. Todo este fenómeno é favorecido pelo facto de, na *íntima* arterial, onde se encontram retidas as moléculas de LDL, existir uma pressão parcial de oxigénio bastante elevada (necessária para o fazer chegar ao músculo liso da própria artéria). Por outro lado, um dos produtos do metabolismo das células que se encontram na região próxima à *íntima* (endoteliais e SMC's), consiste em espécies reactivas de oxigénio ("Reactive Oxygen Species" - ROS). Estas propriedades propiciam um ambiente favorável para que as espécies radicais possam induzir oxidações nas moléculas de LDL [10].

Se for analisado o perfil de oxidação do conteúdo lipídico de uma molécula de LDL (Figura 4), um dos compostos a ter em conta é o linoleato de colesterol. Entre os ésteres de colesterol que constituem o núcleo lipídico destas lipoproteínas, este encontra-se presente em maior percentagem (~60% [1]), logo os produtos de

oxidação vão derivar, maioritariamente, da sua reacção. Sendo o linoleato de colesterol um composto C₁₈ quanto à sua cadeia carbonada, e um ácido gordo do tipo ω-6, no que diz respeito às ligações duplas que o constituem, quando oxidado origina principalmente 4-hidroxi-non-2-enal (4-HNE), que se encontra directamente relacionado com a estimulação inicial de processos inflamatórios, no desenvolvimento da aterosclerose [11, 12].

É demonstrado que o 4-HNE, ao ser produzido por oxidação das LDL na *íntima*, induz localmente as células endoteliais a produzirem quimiomatractores de monócitos em circulação. Ao serem recrutados, estes irão aderir à superfície endotelial, “rolar” sobre ela e posteriormente por diapedese, são capazes de penetrar para o interior da parede da artéria. Posteriormente, mediado por diversos factores inflamatórios, ocorre diferenciação dos monócitos em macrófagos, que são as células responsáveis por iniciar a eliminação das LDL acumuladas. Indubitavelmente que a oxidação é a modificação mais importante e significativa nos estados iniciais de desenvolvimento do ateroma. Na Figura 4, é apresentado um esquema simplificado da peroxidação do linoleato de colesterol, focando nos compostos cuja estrutura inclui colesterol. Surpreendentemente, e apesar do facto de estes compostos terem sido identificados como produtos da peroxidação dos ésteres de colesterol *in vitro* [13] e em ateromas *post – mortem* [14], não têm sido investigados como agentes etiológicos na formação de ateromas.

Existem alguns estudos que defendem também a possível importância de outro tipo de modificações das moléculas que se encontram retidas. Normalmente designadas por modificações não-oxidativas [15], fenómenos como a agregação das LDL podem ocorrer. Outro dos principais eventos não apresentando características de oxidação, diz respeito à possibilidade de serem incluídos derivados de açúcar na estrutura das LDL. Isto causa distúrbios ao nível do receptor normal (LDLr), fazendo com que não ocorra a internalização normal das LDL mediada pelos receptores específicos, levando assim a uma maior taxa da sua acumulação e subsequente modificação, por exemplo, por oxidação [16]. Este último facto justifica a relação, por muitas vezes atribuída, entre aterosclerose e diabetes. Há que salientar que este tipo de modificações, não impedem que concomitantemente ocorra oxidação, o que faz com que as atenções estejam voltadas essencialmente para este tipo de reacção.

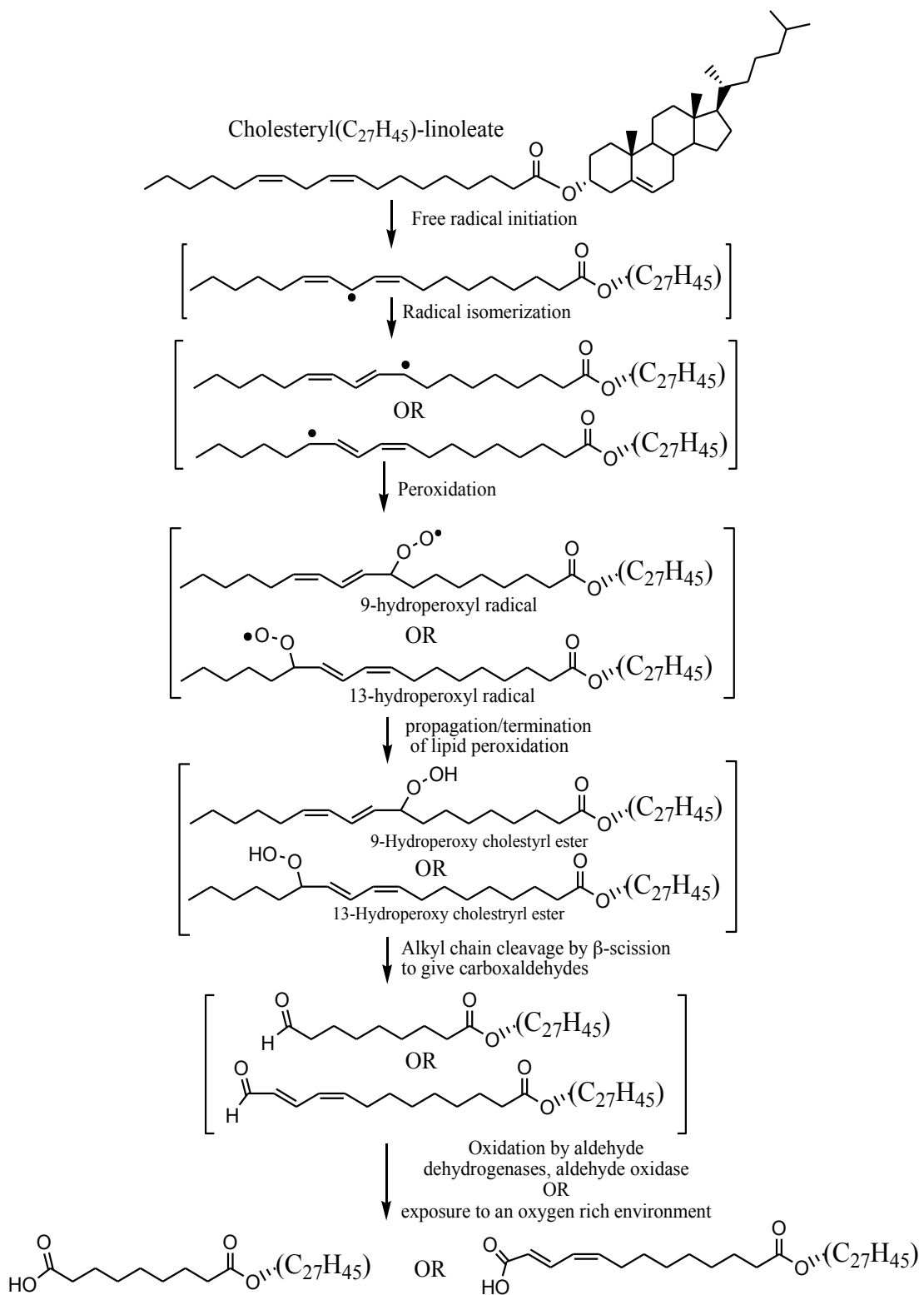


Figura 4 – Esquema de oxidação dos ésteres de colesterol, mais especificamente linoleato de colesterol, presente na composição das LDL (Estronca et al, 2012 [1])

4. Células-espumosas (“Foam Cells”)

Os macrófagos recrutados (inicialmente sob a forma de monócitos) e diferenciados na *íntima* vão actuar nas regiões de acumulação de LDL modificadas por forma a internalizarem essas partículas e assim tentarem promover a sua eliminação da parede arterial. Brown e Goldstein, descreveram que subsequentemente à internalização de LDL modificadas pelos macrófagos, origina-se um novo fenótipo, essencialmente caracterizado por um carregamento lipídico intracelular massivo [9]. Estas novas características levam a que seja atribuída uma nova designação, sendo esta de “células-espumosas” [17], devido ao seu conteúdo altamente rico no que diz respeito ao teor lipídico intracelular. As células-espumosas constituem maioritariamente um ateroma e o seu precursor, o chamado “fatty streak” (“estrias gordas”) [18], logo estão na base da iniciação, manutenção e desenvolvimento das lesões na aterosclerose.

Recorrendo uma vez mais a evidências apresentadas por Brown e Goldstein [19, 20] foi possível compreender que a internalização das LDL modificadas pelos macrófagos ocorre sob diferente mediação, estando envolvidos diferentes receptores das LDL nativas. Foi então proposta a existência de outros receptores, que não os LDLr, sendo designados de “Scavenger Receptors” (SR’s). De facto foi demonstrada a capacidade destes em promoverem o desenvolvimento de células-espumosas, contribuindo assim para o crescimento do ateroma, após interação com LDL quimicamente modificadas [10], especialmente no caso das oxidadas. A família dos SR’s é bastante extensa, existindo diversos tipos de receptores com diferentes organizações estruturais. De entre este grupo destacam-se os SRA-I/II e o CD36, que são os preponderantes no reconhecimento das LDL oxidadas [21].

A mediação por SR’s é um processo que não apresenta regulação, e que ocorre normalmente a taxas muito elevadas, o que é suportado pelo grande número de receptores com esta capacidade, à superfície membranar. Assim sendo, estão reunidas as condições para que a internalização de LDL modificadas seja um processo contínuo e bastante rápido, levando a que os macrófagos adquiram quantidades de lípido colossais para serem processadas. Existem dois tipos de células-espumosas, as quais não são distinguíveis em microscopia óptica para visualização de gotículas

lipídicas. Quando as células ingerem grande quantidade de lípidos (incluindo ésteres de colesterol), estes são hidrolisados nos endolisosomas, sendo os seus componentes – ácidos gordos e colesterol – re-esterificados, no retículo endoplasmático a triglicerídeos (ácidos gordos) ou a ésteres de colesterol (colesterol), que são armazenados no citoplasma celular sob a forma de gotículas de lípido apolar, encapsuladas numa monocamada de fosfolípidos (“lipid storage bodies”). Por acção de lipases (“neutral lipases”) no citoplasma, os ésteres de lípidos armazenados são hidrolisados na medida necessária e reutilizados pelas células. Um outro tipo de célula-espumosa, é formada quando o lípido ingerido não é hidrolisado nos endolisosomas, acumulando-se neste organelo celular. A esta acumulação e subsequente paragem do processo normal de tratamento dos lípidos ingeridos, dá-se a designação de “lipidose” e é uma característica de várias patologias que envolvem o metabolismo lipídico. Entre este tipo de patologias, a doença de Niemann-Pick tipo C, a Hipercolesterolemia Familiar e a Aterosclerose são as mais notáveis, sendo casos em que o colesterol e os seus derivados se encontram especificamente envolvidos.

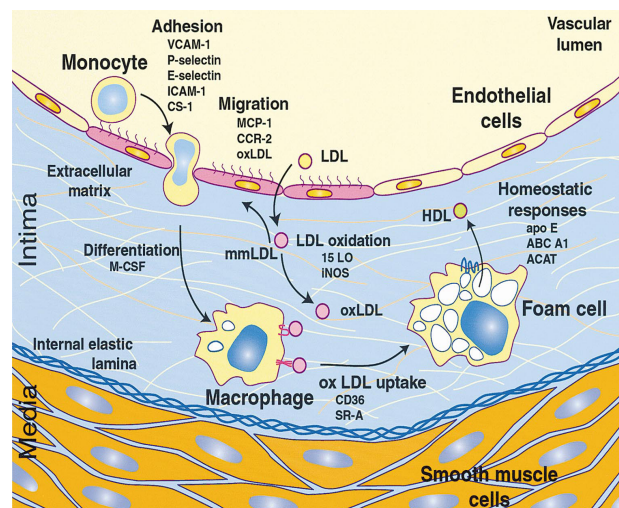


Figura 5 – Esquema representativo de todo o processo de adesão de monócitos, sua diferenciação a macrófagos, e posterior internalização, por parte dos últimos, das LDL oxidadas. O processo resulta na formação de células-espumosas. (Glass and Witztum, 2001 [22])

4.1. Lipidose, base patológica da aterosclerose

As primeiras evidências para a ocorrência dos conhecidos “fatty streaks” nas artérias, reportam aos trabalhos de Lang, em 1970 [23]. Estes eventos associam-se às características patológicas dos processos moleculares, centrando-se em lipidose nos macrófagos e aglomeração de células-espumosas num ateroma. O perfil patológico destas lesões advém de distúrbios a nível lisosomal, subsequentes à internalização de LDL oxidadas [24] e é nestas condições que a doença realmente progride, visto que o outro tipo de células-espumosas (contendo lipid droplets cistosólicas), não possuem qualquer mecanismo bloqueado, sendo o lípido normalmente processado.

O decorrer da investigação no campo das células-espumosas e seus processos de origem, tem nos últimos anos endereçado fortemente o distúrbio severo que ocorre nos lisossomas, levando mesmo a que estes se tornem regiões de acumulação lipídica [18, 25]. Os ésteres de colesterol transportados nas LDL, assim como os produtos da sua oxidação, parecem não ser processados e/ou degradados pela maquinaria do lisossoma, que se torna progressivamente bloqueada e incapaz. Há ainda uma grande incerteza relativamente ao(s) composto(s) específico(s) das LDL oxidadas, bem como ao mecanismo de ação deste(s), no processo de indução de lipidose [18].

Embora já referido que o ateroma é desenvolvido essencialmente por células-espumosas que se encontram nesta condição patológica de lipidose, é de realçar que a acumulação destas últimas acontece localmente. Posteriormente à formação destes agregados, irá ocorrer a deposição de proteínas fibrosas sobre o ateroma em desenvolvimento, formando uma espécie de capa que o envolve. A partir destas etapas, estas estruturas começam já a ser consideradas como placas fibrosas, que contribuem em grande escala para um aumento na rigidez arterial. O núcleo destas placas é, como já referido, constituído por células em estado patológico. Desta forma, podem iniciar o seu processo de morte, inicialmente programada (apoptose) e posteriormente de forma necrótica (no interior do ateroma), levando a que proteínas intracelulares sejam libertadas, e que possuem a capacidade de degradar a capa fibrosa das placas [26]. Com esta ruptura localizada a acontecer, são fortes as possibilidades de que um coágulo se forme no local de ruptura. A este ponto a

doença da aterosclerose manifesta a sintomatologia a ela associada, embora já num estado demasiado tardio, uma vez que do coágulo podem resultar sérios distúrbios como isquémia, com subsequente enfarte do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais.

4.2. Oxidação de LDL, um processo chave na aterogénese

Conhecida a relação directa e fortemente provada de que são as LDL oxidadas as principais responsáveis pela indução de fenótipos como o das células-espumosas, foi naturalmente suscitado o interesse no seu estudo e nos mecanismos do processo global. Remetendo uma vez mais ao perfil molecular da oxidação dos compostos lipídicos presentes nas LDL (Figura 4), pode facilmente verificar-se a extensão bastante significativa do processo, assim como a variedade de derivados de ésteres de colesterol a que dá origem. Aqui coloca-se uma questão muito pertinente e ainda por resolver, que tem que ver com a etiologia química do processo de aterogénese. Isto é, não se encontram ainda estabelecidos qual ou quais dos produtos de oxidação se encontram mais intimamente ligados ao despoletar da indução de lipidose, não havendo portanto uma hierarquia estabelecida.

Analisando com mais detalhe o esquema molecular de oxidação (Figura 4), pode constatar-se que os produtos finais consistem num hemiester de colesterol e o outro, não demonstrado no esquema, é o 4-HNE. Ora, como já referido, este último tem sido amplamente estudado, dada a sua directa relação com a indução da inflamação [11, 12], mas quanto aos oxoésteres de colesterol (derivam para hemiésteres), que são também produtos finais, pouca ou nenhuma atenção e importância lhes tem sido endereçada.

Os oxoésteres de colesterol que frequentemente são encontrados nas LDL oxidadas *in vitro*, encontram-se relativamente definidos [13, 14] e foram recentemente identificados em ateromas humanos [14]. Apresentando uma estrutura variável, essencialmente ao nível da extensão da cadeia carbonada, diferindo quanto ao número de átomos de carbono constituintes, o número, posição e configuração das ligações duplas, podem muito provavelmente, no nosso ponto de vista, desempenhar um papel fundamental na génese de células com lipidose. O 7-

ceto-colesterol, também encontrado nos ateromas tem sido estudado [27] na relação directa com a aterogénese, embora este composto só seja derivado do colesterol livre presente nas LDL, que não é a forma dominante em que o colesterol se encontra nestas partículas.

Tendo em conta todas estas evidências, temos decidido centrar os nossos estudos dos processos aterogénicos, atentando com rigor á química da oxidação de LDL. Pensamos que os oxoésteres de colesterol possam de facto ter a capacidade de induzir acumulação lipídica intracelular patológica, lipidose. Num estudo recentemente publicado, reportamos o papel de um hemiéster de colesterol específico, na formação de células-espumosas e toxicidade [1]. O composto referido é o designado hemisuccinato de colesterol (CHS), e a sua escolha foi justificada por ser o único composto comercialmente disponível com estas características químicas. CHS é um derivado do oxoéster 4-oxobutirato, um composto C₄, que é um dos compostos encontrados em LDL oxidadas, embora seja um componente minoritário. Através de um método por nós desenvolvido, que permitiu proceder a um enriquecimento de partículas de LDL não modificadas (LDL nativas), com o referido CHS (originando LDL-CHS), demonstramos que este composto lipídico, é capaz de originar lipidose em macrófagos. Analisando alguns resultados de microscopia óptica, recorrendo a técnicas de imunofluorescência (Figura 6), e também a imagens de microscopia electrónica (Figura 7), é bastante claro que a incubação de macrófagos com partículas de LDL-CHS, resulta numa acumulação de lípido nos lisossomas. A ocorrência de lipidose fica ainda corroborada pelas imagens obtidas para incubação com LDL acetiladas (modificação não-oxidativa das moléculas de LDL, conhecida por originar “lipid droplets” citosólicas), utilizadas como controlo positivo, que mostram claramente que neste caso, o padrão de acumulação é diferente, originando lipid droplets espalhadas pelo citosol, que consistem em colesterol re-esterificado. No decorrer do estudo referido, realizamos ainda experiências de “chasing” quanto à recuperação após acumulação lipídica, ou seja, se as células eram capazes de promover o transporte reverso do excesso. Para o caso das LDL acetiladas, que haviam induzido “lipid droplets” com tamanho bastante significativo, verificou-se

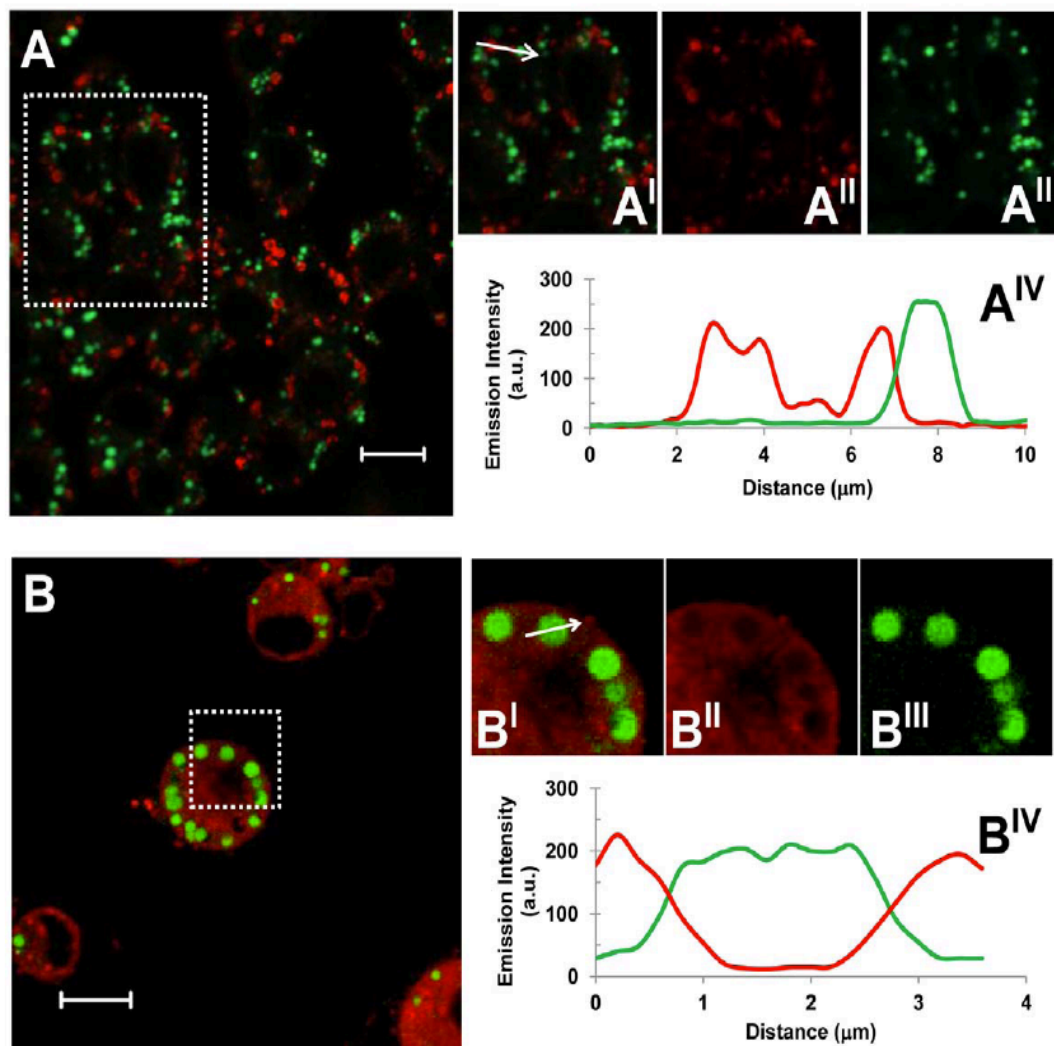


Figura 6 – LAMP – 2 reveste as vesículas ricas em lípido neutro, em macrófagos incubados com LDL – CHS. Macrófagos incubados por um período de 48h com LDL acetiladas (AcLDL) (A – A^{IV}) ou com LDL – CHS (B – B^{IV}) foram fixados e duplamente marcados com anticorpos anti – LAMP – 2 e Bodipy. Imagens sobrepostas (Secções (A – A^I) e (B – B^I)) representam LAMP – 2 em vermelho e Bodipy em verde. Secções (A^I) e (B^I) representam, em zoom, as regiões demarcadas a tracejado em (A) e (B) respectivamente. As secções (A^{II}) e (B^{II}) demonstram a marcação para LAMP – 2. As secções (A^{III}) e (B^{III}) demonstram a marcação para lípidos neutros em gotículas. Todas as secções representam imagens “single slice” de microscópio confocal. As barras representadas indicam o tamanho de 10 μm. Os gráficos (A^{IV}) e (B^{IV}) mostram intensidade correspondente a um varrimento ao longo das setas apresentadas nas secções (A^I) e (B^I), respectivamente, do LAMP – 2 (linha vermelha) e do Bodipy (linha verde). *Adaptado de Estronca, et al, 2012 [1]*

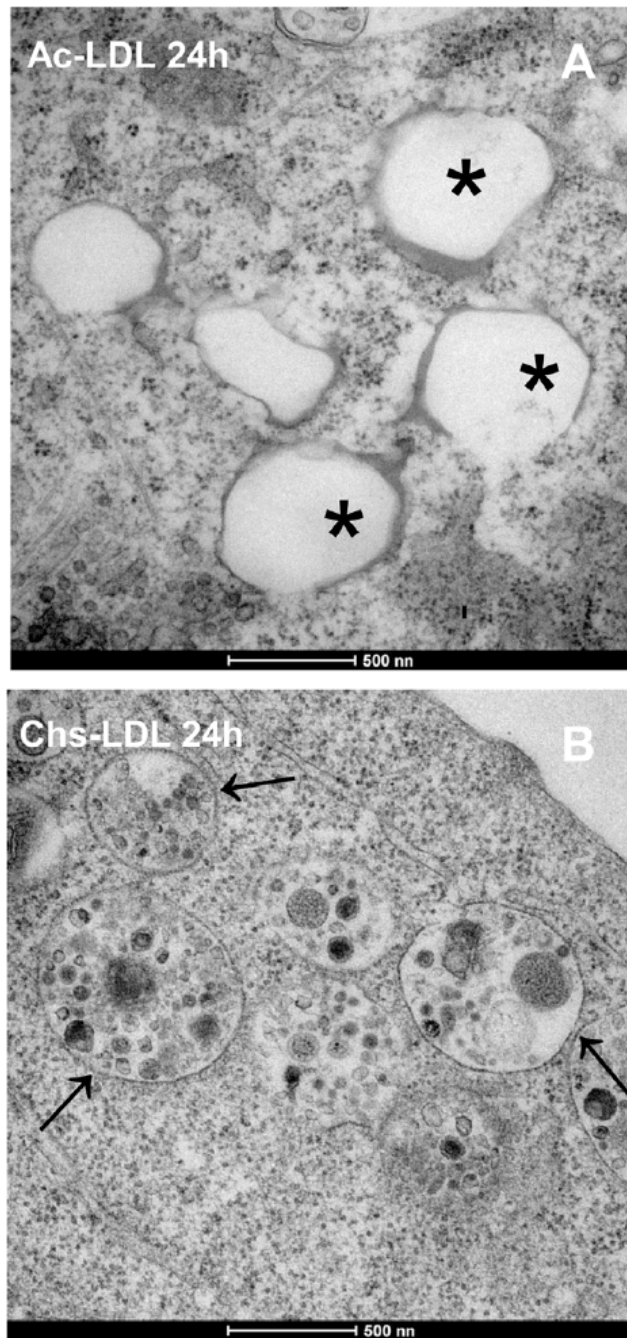


Figura 7 – LDL-CHS induz a formação de vesículas com bicamada, preenchidas por material electronicamente denso. Microscopia electrónica de transmissão para células tratadas, por um período de 24h, com LDL-Ac (A) ou LDL-CHS (B). São visíveis lipid droplets citosólicas (organelos com membrana em monocamada) e estruturas vesiculares com bicamada e com material electrónico denso, respectivamente nas células tratadas com LDL-Ac e LDL-CHS. Os asteriscos (*) indicam as lipid droplets citosólicas em (A). As setas apontam para as vesículas com dupla camada e com material denso electrónico no seu interior em (B). As barras representam o tamanho de 500 nm. *Adaptado de Estronca, et al, 2012 [1].*

uma redução significativa no número de “lipid droplets” e no diâmetro daquelas que ainda persistiam nas células. Já no fenótipo induzido por LDL-CHS, constatou-se um aumento muito significativo da quantidade de lípido acumulado nas células, realçando o estado patológico de lipidose em que os macrófagos se encontravam. Os extractos destas células em estado patológico, quando analisados pela técnica de “shotgun lipidomics”, demonstraram ainda que os conteúdos lipídicos não sofrem alteração estrutural, não sendo por isso processados e/ou hidrolisados pelos lisossomas.

5. Objectivo do presente estudo

Com as evidências conseguidas de que os hemiésteres de colesterol são capazes de induzir lipidose em macrófagos, decidimos planejar novos estudos, com vista a realizar uma aproximação, tão fidedigna quanto possível, às condições fisiológicas. Os primeiros estudos [1] permitiram a obtenção de fenótipos num período temporal relativamente rápido, 24 e 48 horas, utilizando para isso concentrações que induziram também toxicidade celular aguda (Figura 8).

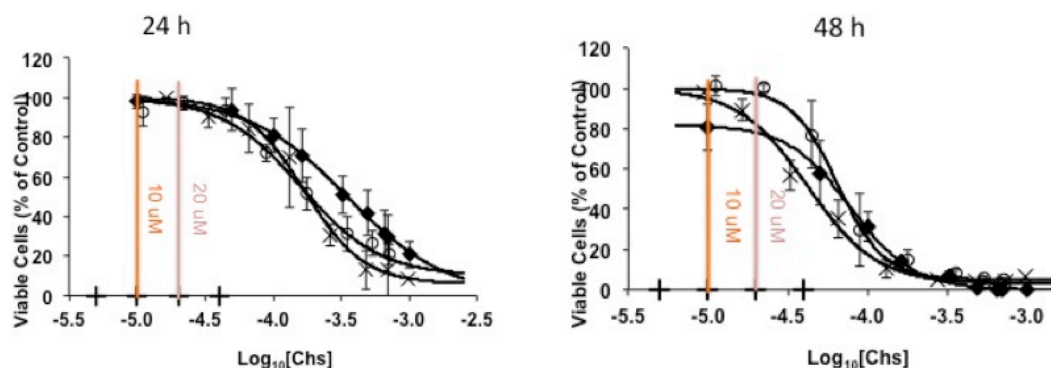


Figura 8 – CHS afecta a viabilidade das células RAW. As células foram expostas a diferentes concentrações de LDL-CHS (1:1000) (O), lipossomas POPC-CHS (55:45) (◆), e (LDL-Ac)-CHS (1:1000) (X), por 24h e 48h. A viabilidade celular foi monitorizada pelo método do MTT e encontra – se expressa em relação à viabilidade das células controlo. *Adaptado de Estronca, et al, 2012 [1].*

Tendo em conta as curvas obtidas, decidimos delinear experiências que permitissem endereçar os efeitos do mesmo hemiéster de colesterol, mas desta feita a concentrações sub-tóxicas e com períodos de incubação longos. A lógica que

seguimos tem que ver com o facto de no desenvolvimento da aterosclerose, fisiologicamente, estarem patentes concentrações bastante mais baixas do que aquelas que inicialmente utilizamos, tendo também em conta o importante facto de que um ateroma leva cerca de 30 anos para se desenvolver.

Com o auxílio das curvas de toxicidade (Figura 8), decidimos testar as concentrações de 10 e 20 μM de CHS, para incubações longas, mantendo as células em constante incubação, por cerca de 40 dias (período máximo razoável para manutenção de células em cultura, realizando passagens a cada dois dias). Durante este período esperamos então seguir a internalização de CHS, marcando esta molécula radioactivamente, assim como monitorizar a viabilidade celular, ao longo da exposição crónica. O possível aparecimento de alterações a nível celular será avaliado por microscopia óptica confocal. Essencialmente iremos focar-nos nas alterações a nível da via endocítica, recorrendo a técnicas de imunofluorescência quando necessário.

CAPÍTULO II

Materiais e Métodos

MATERIAIS

1. Compostos Químicos

O 1-palmitoil-2-oleoilfosfatidilcolina (POPC) e o Colesterol foram adquiridos à empresa *Avanti Polar Lipid (Alabaster, AL)*. O [³H]-Colesterol foi obtido através da *GE Healthcare*. O hemisuccinato de colesterol (CHS), o Dextran (mol wt 9,000 – 11,000) foram provenientes da *Sigma*. Todos os outros tipos de moléculas e compostos usados, nomeadamente em ensaios e técnicas analíticas de quantificação, foram provenientes das fontes locais e de acordo com os respectivos protocolos.

2. Anticorpos e Sondas fluorescentes

O anticorpo primário anti-LAMP-2 (ABL93) foi comprado à *Developmental Studies Hybridoma Bank*. O anti-LC3 foi proveniente da *Cell Signaling, Izasa*. Os anticorpos secundários, conjugados com os fluoróforos Cy5 e Cy3, foram todos provenientes da *Jackson Immuno Research*.

As sondas fluorescentes FM4-64 (sonda lipofílica cuja intensidade de fluorescência aumenta quando se liga à membrana) e LysoTracker (LysoTracker red DND-99) foram adquiridas à *Molecular Probes*. O Oil-red e o DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) foram provenientes da *Sigma*.

MÉTODOS

1. Preparação de Lipossomas

Recorreu-se a uma mistura azeotrópica de clorofórmio e metanol, por forma a dissolver o POPC e o CHS, em proporções previamente definidas. Posteriormente procedeu-se a uma evaporação do solvente, fazendo incidir um fluxo de azoto, na solução aquecida através de um fluxo de ar quente dirigido directamente para a superfície vítrea do tubo. O resíduo resultante foi deixado em vácuo, num exsiccador,

durante pelo menos 12 horas, a 25°C. Seguidamente realizou-se a hidratação, em que o resíduo seco (filme lipídico) foi solubilizado numa solução de 20 mM Hepes, 0,11 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,4 a 65°C. No caso dos lipossomas de POPC – CHS (30:70), foi adicionado Dextran à solução de hidratação após aquecimento prévio a 65°C, de modo que a densidade final fosse cerca de 1,044 g/ml. Posteriormente, submeteram-se as amostras lipídicas a ciclos de sucessivo vortex/incubação/breve sonicação, a 65°C por um período de cerca de 1h.

Finalmente foi realizado o processo de extrusão, para que se formassem LUV (large unilamellar vesicles), utilizando membranas de policarbonato (Nucleopore), de diâmetro 0,1 µM. O extrusor utilizado (Lipex Biomembranes, Vancouver, British Columbia, Canada) foi mantido a 65°C. As proporções finais e respectiva molaridade dos lipossomas POPC-CHS foram 55/45 e 30/70, tendo sido o CHS quantificado pelo método de Lieberman – Burchard, enquanto que os fosfatos do POPC foram quantificados pelo método de Bartlett, como descrito [1].

2. LDL

2.1. Isolamento de LDL proveniente de plasma humano

O isolamento de LDL humano foi processado recorrendo a amostras de sangue, colhidas de doadores humanos adultos e saudáveis que as cederam gentilmente. Recolhendo o sangue, este foi submetido a uma primeira centrifugação para separação de hematócrito e plasma. A este último foi posteriormente adicionado KBr para que a sua densidade atingisse o valor de 1,21 g/ml. Usando uma ultracentrífuga Beckman L80, equipada com um rotor 70.Ti de ângulo fixo, foram efectuadas ultracentrifugações para separação das lipoproteínas do plasma, em gradiente como descrito anteriormente [28]. Depois de recolhidas, as LDL foram dialisadas (para retirar o KBr) e concentradas em filtros com póros de 100 KDa, por centrifugação. Por último foram quantificadas quanto ao seu conteúdo em proteína, pelo método descrito por Lowry, em 1951 [29].

2.2. LDL – CHS

Para a preparação de moléculas de LDL enriquecidas em CHS, foi necessário proceder à incubação de LDL nativas com lipossomas de POPC-CHS- ^{3}H (30/70), numa proporção de 1:2000, para que no final se obtivesse 1:1000 (visto que o processo tem um rendimento de aproximadamente 50%). Os lipossomas, em tampão HEPES, continham Dextran para que possuíssem um valor de densidade de 1,044 g/ml. Esta incubação foi realizada “overnight” à temperatura ambiente, com agitação esporádica. Após o período de incubação, as LDL-CHS foram centrifugadas, de modo a remover os lipossomas de POPC-CHS (mais densos) remanescentes, por ultracentrifugação tal como descrito anteriormente. De seguida procedeu-se a uma diálise (de modo a retirar o KBr), e finalmente as LDL-CHS foram filtradas através de filtros com póros de 0,2 μm , após concentradas através de filtros com póros de 100 KDa, por centrifugação. O conteúdo em CHS nas LDL foi medido por radioactividade. Todas as soluções utilizadas para o processamento de LDL, foram guardadas em azoto, a 4°C, sendo utilizadas por um período máximo de duas semanas.

3. Células

3.1. Cultura Celular

A linha celular utilizada ao longo do presente trabalho foi uma linha de macrófagos designada por RAW 264.7 (ATCC). As culturas foram mantidas em meio de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e streptomina. O crescimento foi realizado numa incubadora humidificada, a 37°C e 5% de CO_2 . As células foram mantidas em cultura, no máximo até à passagem 20.

3.2. Incubações

As células RAW foram mantidas em cultura com LDL-CHS e POPC-CHS, por cerca de 40 dias, em placas de 12-poços. Foram ainda incubadas células apenas em DMEM

e/ou com LDL nativas, de modo a representarem os devidos controlos necessários. De 2 em 2 dias, foi realizada a passagem das células para novas placas e novas partículas de LDL-CHS e POPC-CHS foram adicionadas.

A cada 10 dias, foi também realizado o plaqueamento destas células em placas de 24-poços onde foram colocadas lamelas de vidro, para após 48h ser realizada a sua observação ao microscópio confocal ou a fixação (com paraformaldeído, PFA, a 4%) e posterior marcação (imunofluorescência).

3.3. Viabilidade Celular

A toxicidade celular foi monitorizada através do método de MTT, que se baseia na capacidade das células reduzirem a cristais de formazano [30]. As culturas foram plaqueadas em placas de 96-poços, a cada 10 dias de incubação. De realçar que neste caso as culturas foram sujeitas a diferentes concentrações de LDL-CHS e POPC-CHS.

3.4. Internalização de CHS sua quantificação intracelular

A cada dois dias de incubação com LDL-CHS- ^{3}H e POPC-CHS- ^{3}H , dois poços de células das placas de 12-poços, foram utilizados para efectuar medições de radioactividade ^{3}H . Para isso os extractos celulares foram obtidos e processados como anteriormente descrito [1]. Foi utilizado líquido de cintilação Ultima Gold (Perkin Elmer) sendo as medições efectuadas num cintilador Tri-Carb 2900 TR (Perkin Elmer), usando o protocolo de medição para ^{3}H

3.5. Quantificação de Proteína Celular

Concomitantemente às medições de radioactividade, foram também realizadas medições da proteína celular presente nas amostras, de modo a uniformizar as medidas. Para isso, recorreu-se ao método de BCA conforme descrito no próprio kit (Pierce). Para obtenção da curva padrão, recorreu-se a soluções padrão de albumina sérica bovina.

3.6. Marcação celular com sondas e Imunofluorescência

3.6.1. Marcação dos lípidos neutros intracelulares com Oil-red

Após fixação com 4% de PFA, as células foram lavadas com PBS e incubadas com NH_4Cl , durante 15 minutos. Posteriormente foram permeabilizadas com uma lavagem rápida com uma solução de isopropanol a 60%. De seguida realizou-se a incubação com Oil-red (em 60% de isopropanol), durante 10 minutos. O próximo passo consistiu numa lavagem rápida com uma solução de isopropanol a 60% e finalmente com PBS.

Quando necessário, as células foram também incubadas com DAPI numa diluição de 1:800, por 15 minutos, para marcação dos núcleos. Por último as lamelas foram montadas, utilizando meio de montagem MOWIOL/DABCO, e deixadas a secar à temperatura ambiente.

3.6.2. Marcação da membrana plasmática, utilizando a sonda fluorescente FM4-64

O FM4-64 é uma molécula usada para ensaios de endocitose, uma vez que é capaz de se ligar a membranas, permitindo assim seguir os processos a estas associados. As células em placas de 24-poços foram incubadas com meio tamponizado contendo 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FM4-64, durante 5 minutos em gelo. Após este período, procedeu-se a lavagem imediata e à sua observação no microscópio, dado que a sonda não é fixável.

3.6.3. Marcação de organelos acídicos com a sonda fluorescente LysoTracker

O ensaio com a sonda LysoTracker, foi aplicado nas células por “live microscopy”. As células em placas de 24-poços foram incubadas com lysoTracker 200 nM, em meio tamponizado, durante 10 minutos na estufa a 37°C. Decorrido este período, as

células foram observadas ao microscópio confocal, sem remoção do meio em que se encontravam.

3.6.4. Marcação dos endossomas tardios/lisossomas com anticorpo contra LAMP-2 (Lysosomal associated membrane protein).

Após fixação e permeabilização das células com metanol, estas foram lavadas com tampão PBS e incubadas com uma solução de NH_4Cl , por um período de 15 minutos. As células foram depois incubadas com a solução de bloqueio, gelatina de peixe (“cold water skin fish”) 0,5%, por 30 minutos. Posteriormente foi incubado o anticorpo primário anti-LAMP-2 diluído 1/50 em solução de bloqueio, durante 2 horas à temperatura ambiente. Depois de lavadas com PBS as células foram incubadas com o anticorpo secundário “Donkey anti-rat” conjugado com Cy5, diluído 1/100 durante 2 horas à temperatura ambiente. Por último fizeram-se 3 lavagens com PBS e foram montadas as lamelas com MOWIOL/DABCO.

3.6.5. Marcação dos macrófagos com anticorpos que detectam um marcador de autofagia - LC3B (conhecido efector de autofagia)

As células foram fixadas em PFA (4% em PBS) durante o período de 1 hora. De seguida foram lavadas com PBS e incubadas com uma solução de NH_4Cl durante 15 minutos. Posteriormente realizou-se a permeabilização com Saponina 1% em PBS, durante 10 minutos. Depois, foi realizada a incubação com a solução de bloqueio por 30 minutos e após este passo, as células foram incubadas com o anticorpo primário anti-LC3, diluído 1/100 em solução de bloqueio, por um período de 1 hora e 30 minutos. Após lavagem foi então efectuada a incubação com o anticorpo secundário, “Donkey-anti-rabbit” conjugado com o fluoróforo Cy3, diluído de 1/1000, por um período de 1 hora à temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas e montadas com MOWIOL/DABCO, como já descrito anteriormente.

3.6.6. Ensaio de fagocitose com “latex beads” opsonizadas

Foram realizados ensaios de fagocitose com pérolas de látex (“latex beads”) opsonizadas, que são pequenas esferas susceptíveis (após opsonização) a serem internalizadas por fagocitose, através dos receptores Fc dos macrófagos.

De modo a opsonizar as “latex beads” foi necessário colocá-las numa solução contendo Imunoglobulinas humanas, IgG *overnight* a 4°C, para que adiram à superfície das esferas, por adsorção. Terminado este processo as partículas revestidas (opsonizadas) foram adicionadas às células, sendo estas observadas ao microscópio confocal (visualizadas por DIC), por recolha de imagens em “time lapse”, para assim seguir a internalização, por fagocitose das “latex beads”, no modo “live” (células vivas), a 37°C.

CAPÍTULO III

Resultados

1. CHS induz a formação de “grandes vacúolos” citoplasmáticos

A exposição crónica dos macrófagos, aos dois diferentes modelos de partículas, LDL e lipossomas, contendo a molécula de CHS, por um período de 40 dias, foi um processo seguido de forma sistemática a nível microscópico (microscópio óptico de baixa resolução) para observar o aparecimento de alterações fenotípicas nas células. Este tipo de observação permitiu-nos também confirmar o normal crescimento e a ausência de contaminações (algo provável a acontecer, dada a longevidade do período em que foram mantidas em cultura).

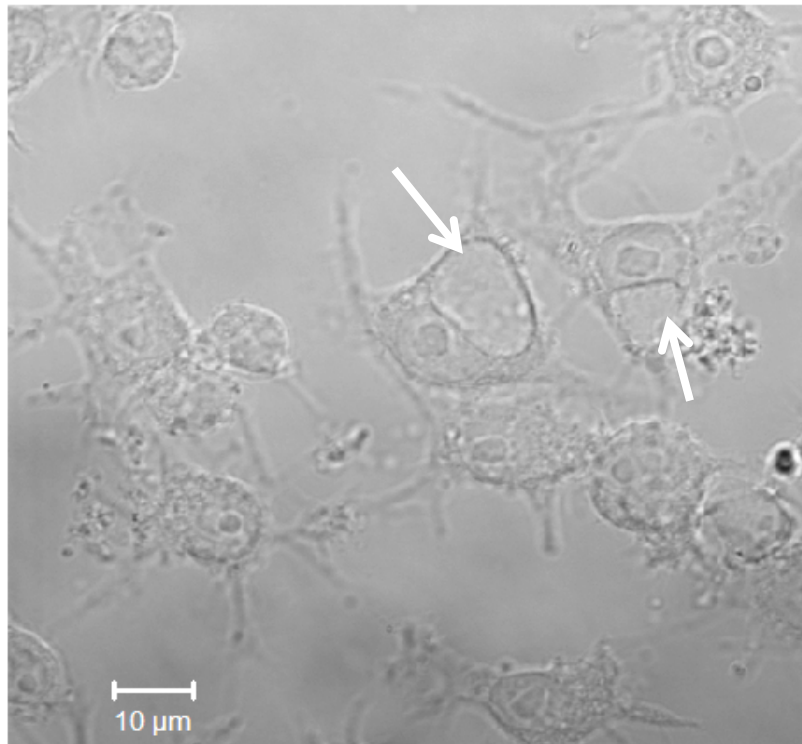


Figura 9 – Imagem de microscopia confocal (DIC - Differential interference contrast microscopy) de macrófagos incubados com LDL-CHS 20 µM, aos 20 dias de exposição, que demonstra o aparecimento de “grandes vacúolos” a ocuparem uma grande porção do citoplasma (como indicado pelas setas).

Entre os 14 e os 20 dias de exposição foi possível observar o aparecimento de vacúolos (geralmente um por célula), em contraste com as células controlo (células incubadas apenas em DMEM e/ou com LDL nativas), no citoplasma dos macrófagos incubados com as diferentes partículas contendo a nossa molécula de interesse.

Dado o fraco poder de resolução e amplificação do microscópio utilizado, foi necessário submeter as células, após fixação, a análise no microscópio óptico confocal. Sem recorrer a qualquer marcação, e observando as células por DIC (Differential interference contrast microscopy) (Figura 9), foi possível observar de forma muito clara que os macrófagos apresentavam, morfológicamente, “grandes” vacúolos a ocuparem uma área bastante significativa no espaço do citoplasma. De modo geral, estas observações foram registadas para as incubações com ambos os modelos (LDL-CHS e POPC-CHS), e para ambas concentrações (10 μ M e 20 μ M), embora fosse mais rápido e evidente para a maior concentração de CHS. Nos controlos negativos (células incubadas apenas em meio DMEM com soro fetal bovino e/ou LDL nativas), não se verificaram quaisquer alterações à morfologia normal dos macrófagos. Embora não seja demonstrada estatística no presente trabalho, devido ao facto de os resultados serem, em número, curtos (dada a elevada duração do método), foi concluído que se deu um aumento gradual na percentagem de células a exhibir os vacúolos, sendo estabelecido um “plateau” no valor aproximado de 10%, a cerca de 20 dias de exposição. Ainda neste contexto, quanto à área apresentada pelos mesmos, não foi verificada alteração significativa, com o decorrer do tempo de exposição. A partir destas evidências, os passos seguintes foram planeados, no sentido de se tentar caracterizar esta aparente nova morfologia celular e assim estabelecer, possivelmente, um novo fenótipo que estaria deste modo associado à condição de exposição crónica a moléculas de LDL enriquecidas em CHS.

2. Os vacúolos observados são positivos para o LAMP-2 e são acídicos

LAMP-2 (“lysosomal associated membrane protein) é a designação atribuída a uma glicoproteína associada a membranas, que desempenha um papel importante na manutenção dos lisossomas. Dado que os estudos aqui reportados, estão dirigidos para a análise dos processos iniciais da aterogénese, nomeadamente ao nível da indução de lipidose em macrófagos, decidimos realizar experiências de imunofluorescência, com anticorpo dirigido para LAMP-2, de modo a verificar se o aparecimento de “grandes vacúolos” (ver secção anterior) decorrentes da exposição

crónica a CHS, estaria localizado e/ou relacionado com alterações na via endocítica. Para além disso, o facto de termos verificado no anterior estudo [1], que elevadas doses de CHS administradas às células induziam uma acumulação lipídica massiva, com inibição de transporte de “carga” a nível dos endossomas tardios/lisossomas, contribuiu também para a decisão de realizar os estudos com LAMP-2.

Analisando a Figura 10A, representativa dos resultados obtidos da imunofluorescência dirigida para LAMP-2, passados 20 dias de exposição (período próximo em que se começam a observar estas evidências morfológicas) dos macrófagos a LDL-CHS 20 μ M, verifica-se que os vacúolos assinalados pelas setas, são positivos para LAMP-2 (a vermelho), ou seja são revestidos por esta proteína. O mesmo padrão foi observado para a concentração de 10 μ M, assim como para os modelos de POPC-CHS, a ambas as concentrações (resultados não demonstrados). Dado que a exposição crónica foi continuamente seguida por microscopia, se analisarmos os resultados para o mesmo tipo de imunofluorescência dirigida a LAMP-2, para estados mais avançados (Figuras 10B e 10C, respectivamente 30 e 40 dias de exposição), pode concluir-se que o padrão foi mantido. Aparentemente as diferenças para a Figura 10A, são mínimas ou inexistentes, no que diz respeito ao vacúolo em si, sendo assim confirmado que este tipo de morfologia persiste ao longo da incubação, assim como a associação de características lisosomais alteradas, inerentes ao próprio fenótipo.

Concomitantemente às experiências acima descritas, foi também realizada marcação das células com Oil-red. Este composto, consiste numa sonda com características fluorescentes, que se particiona, preferencialmente, em gotículas de lípidos neutros permitindo assim a sua detecção. Contudo, não foram observadas quaisquer regiões na célula que contivessem uma acumulação significativa de lípidos neutros. Uma possível explicação para esta observação é que a acumulação de lípido intracelular é muito pequena e abaixo do limite de detecção do Oil-red. Posto isto, o fenótipo a concentrações sub-tóxicas e a longas-exposições, é distinto do descrito por nós em [1], sendo que apesar de o lisossoma e/ou a via endocítica parecer afectada, não se verifica uma acumulação lipídica em massa que possa estar na origem deste bloqueamento.

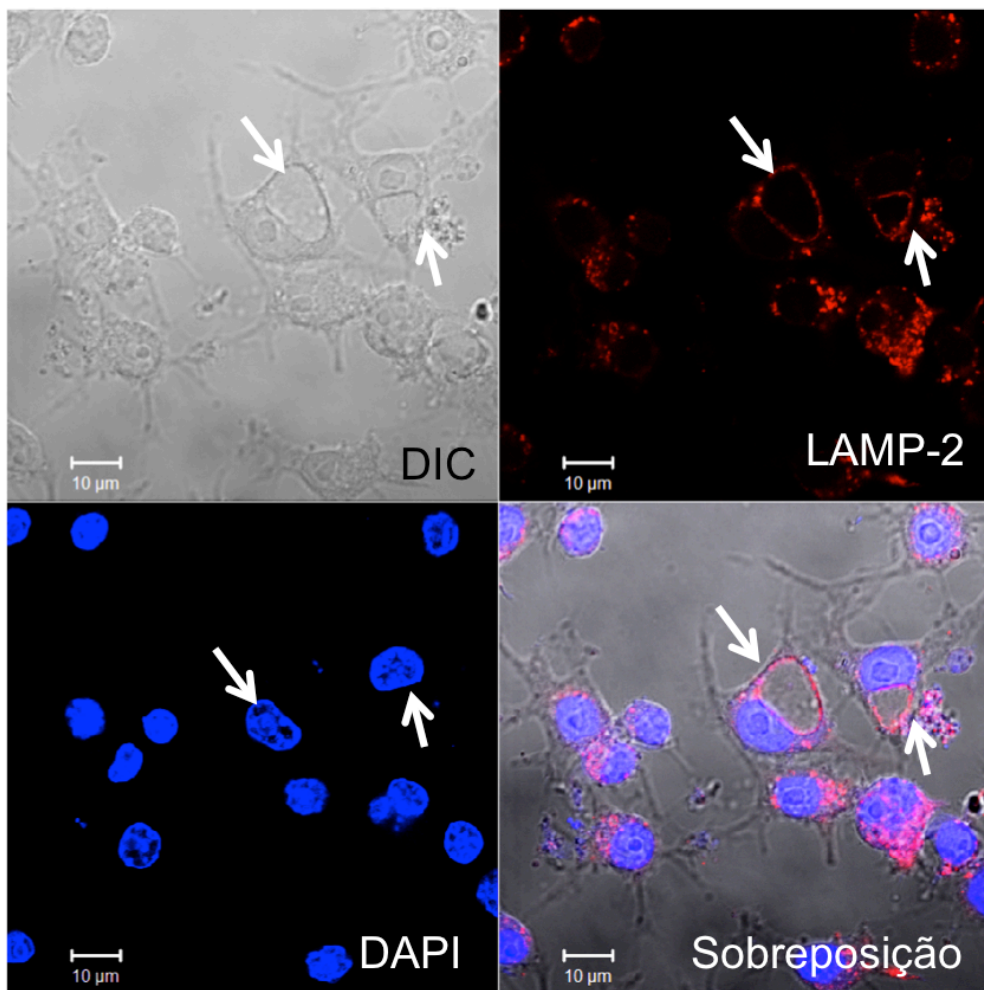


Figura 10 A – Os vacúolos gigantes obtidos em macrófagos incubados com LDL-CHS são positivos para o LAMP-2, após 20 dias de exposição - As setas indicam a presença de “grandes vacúolos” que são positivos para marcação por imunofluorescência dirigida para LAMP-2 (a vermelho). Com o DAPI pode confirmar-se que as células em análise se encontram viáveis

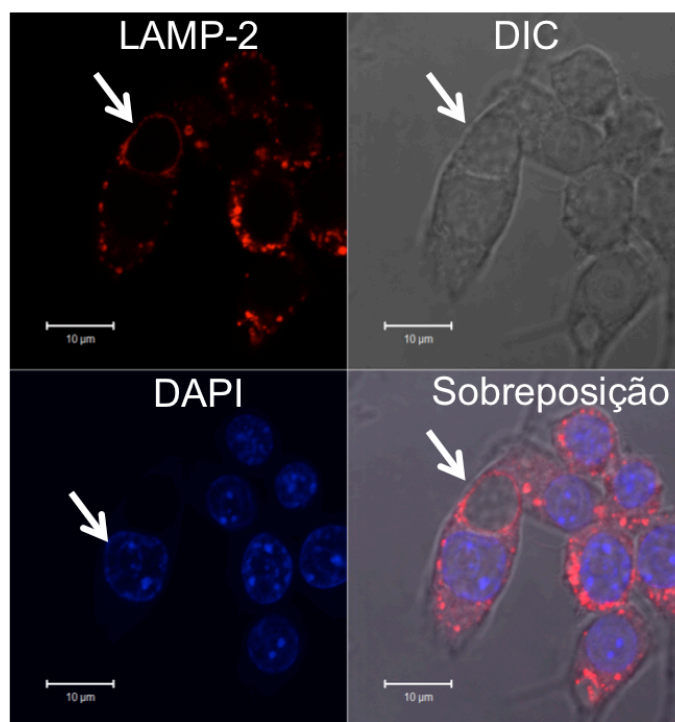


Figura 10 B – Os vacúolos gigantes obtidos em macrófagos incubados com LDL-CHS também são positivos para o LAMP-2 (setas), após 30 dias de exposição com LDL-CHS. Ver legenda da Figura 10 A

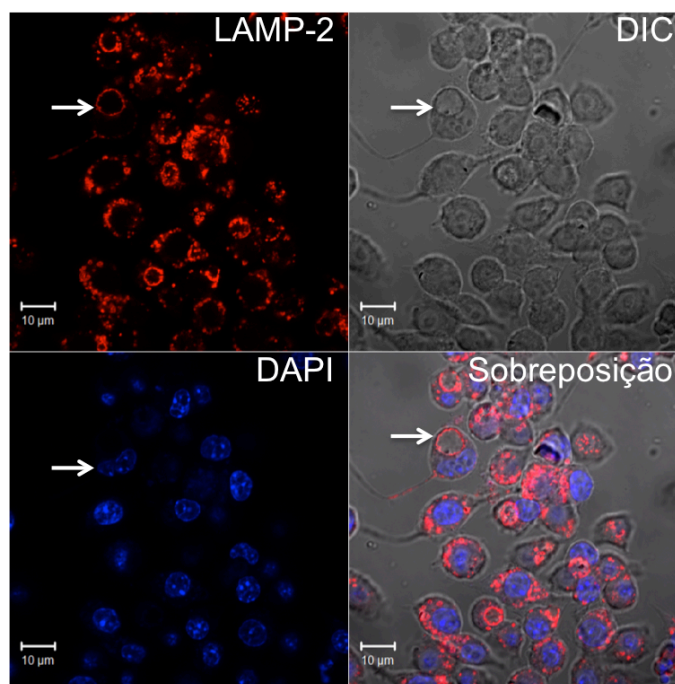


Figura 10 C – Distribuição de LAMP-2 em macrófagos incubados com LDL-CHS durante 40 dias - Macrófagos expostos a LDL-CHS 20 µM, aos 40 dias de exposição. Mesmo a estados mais tardios, os vacúolos continuam a ser revestidos por LAMP-2 (cor vermelha) Ver legenda da Figura 10A.

Após registadas as observações que levaram a concluir que os “grandes vacúolos” observados possuem características de lisossoma, achamos pertinente iniciar uma pesquisa e/ou estudo que permitisse averiguar que tipo de alterações lisossomais pudessem estar na origem do “distúrbio” traduzido pelo novo fenótipo observado. Levando em conta que as desordens ao nível do pH dos lisossomas são directamente associadas ao desenvolvimento de células-espumosas [18], decidimos recorrer a uma sonda fluorescente designada de LysoTracker, com capacidade de ser retida em organelos acídicos. Esta molécula consiste num fluoróforo que possui a si ligada uma base fraca que se encontra apenas parcialmente protonada, logo é capaz de passar a membrana e posteriormente ser retida num ambiente acídico, de baixo pH, devido à ocorrência de protonação.

Analisando a Figura 11, que mostra a distribuição do LysoTracker em macrófagos incubados com 20 μ M de LDL-CHS durante diferentes tempos de exposição, é claro que o vacúolo formado é positivo para o LAMP-2, sendo também acídico. Estes resultados sugerem que o CHS, na concentração testada, não afecta a acidificação dos vacúolos “gigantes” formados, ou seja, não parece interferir com a bomba de prótons responsável pela manutenção do baixo valor de pH, necessário ao normal funcionamento dos lisossomas. Estes resultados sugerem que o normal processamento que ocorre nos lisossomas não se encontra prejudicado, e por isso a sua capacidade degradativa não parece estar a ser comprometida.

3. Após 20 dias de incubação, os lisossomas “gigantes” apresentam capacidade fusogénica

Os resultados, demonstram até aqui que, embora a morfologia normal do lisossoma esteja afectada, estes fenómenos não se traduzem em toxicidade para as células (aprofundado posteriormente). Isto leva naturalmente a inquirir se estes mesmos lisossomas (“grandes vacúolos”), se encontram ou não bloqueados ou não funcionais. De modo a avaliar esta situação, planeamos realizar ensaios de fagocitose com partículas de látex revestidas de imunoglobulina humana em células previamente incubadas com LDL-CHS. As partículas revestidas com anticorpos são

inicialmente internalizadas pelos receptores Fc, culminando com a formação de um novo organelo chamado

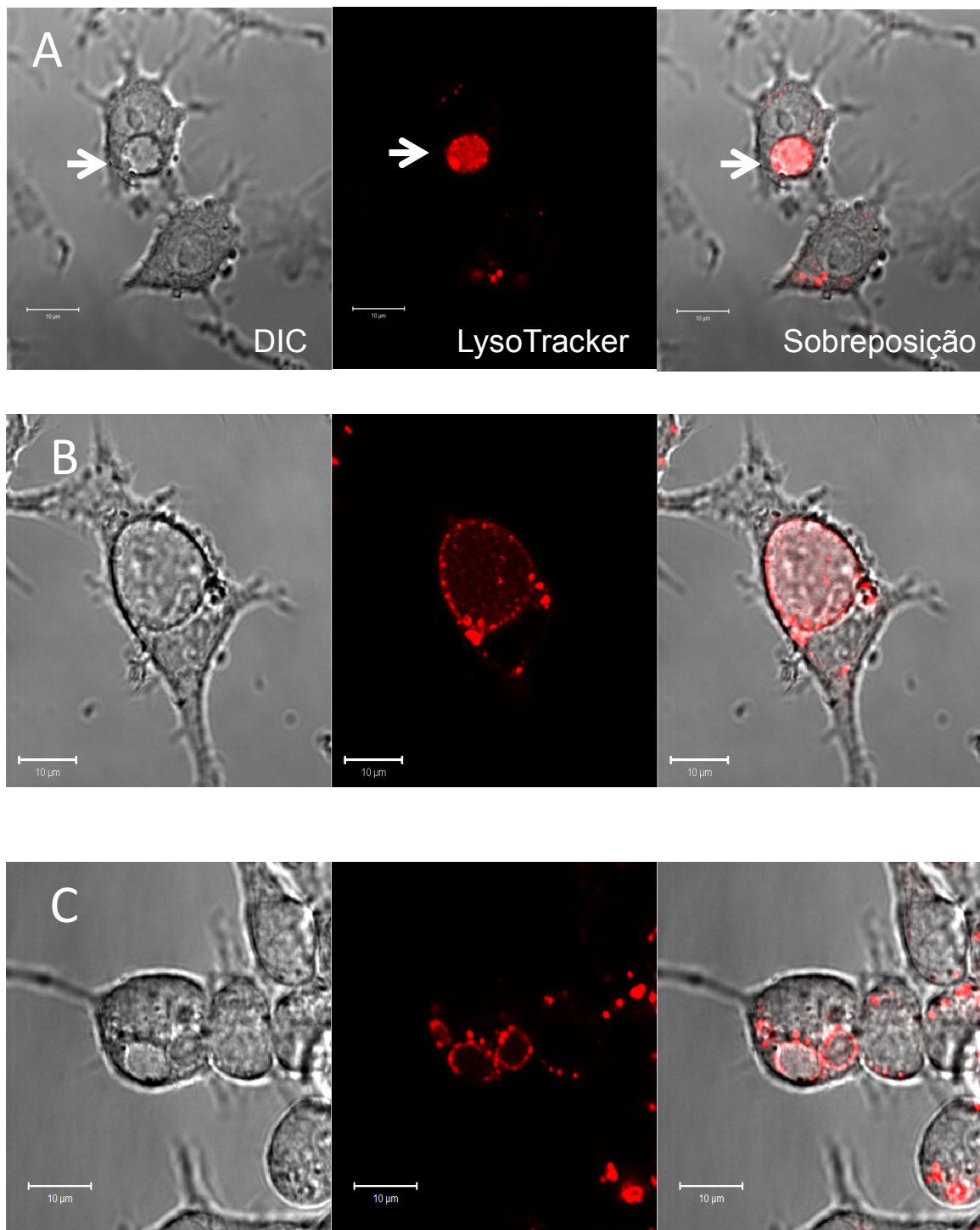


Figura 11 – Os vacúolos gigantes induzidos pela incubação dos macrófagos com LDL-CHS são ácidos – Após o tratamento das células com 20 µM LDL-CHS, por diferentes períodos de tempo, as células foram incubadas com LysoTracker e analisadas no microscópio confocal como descrito na seção de Materiais e Métodos. A – 20 dias de exposição com LDL-CHS; B – 30 dias de exposição com LDL-CHS; C – 40 dias de exposição com LDL-CHS. As setas indicam os vacúolos ácidos.

fagossoma. Este organelo, depois de formado, sofre um processo de maturação que consiste na fusão sequencial com os componentes da via endocítica, formando o fagolisossoma. Assim, se o vacúolo tiver capacidade fusogénica, é de esperar que interaja com o fagossoma durante o seu processo de maturação.

A Figura 12, apresenta uma sequência de imagens em tempo real de células que estão a fagocitar partículas de látex. Como pode ser observado se seguirmos as setas na Figura 12, as partículas são internalizadas, transportadas no interior da célula e aos 30 minutos após adição, já se encontram no interior do vacúolo “gigante”, o que sugere que o organelo (vacúolo) é dinâmico e apresenta capacidades fusogénicas. Por questões de tempo, este tipo de experiência não foi efectuada em macrófagos nos quais os vacúolos já adquiriram marcadores de autofagia. Contudo, será muito importante endereçar se nestas condições, os vacúolos/lisossomas ainda são funcionais. Além disso, gostaríamos de realçar que com o tempo, o vacúolo reduz o seu tamanho (ver imagem dos 80 minutos de fagocitose), sugerindo que há provavelmente fissão membranar. Esta observação, juntamente com o facto de termos observado o desaparecimento do vacúolo com a adição de “carga” (resultados não demonstrados), podem sugerir que a percentagem de células que exibe os vacúolos “gigantes” possa ser muito superior.

4. Caracterização adicional dos lisossomas “gigantes”

As evidências até então, apontam de facto para um novo fenótipo (nunca verificado anteriormente), assim associado a uma longa exposição dos macrófagos a CHS, o que é uma condição próxima às situações fisiológicas. Endereçadas algumas características lisossomais, pensamos que seria de todo interessante e importante, alargar os estudos no sentido de analisar o possível envolvimento dos vacúolos, em outro tipo de processos celulares que possam também estar na origem de desordens que contribuam para a formação de células-espumosas. Tendo em conta um trabalho publicado por Haka, et al, 2009 [31], onde é reportado que os macrófagos são capazes de criar um compartimento ácido extracelular com capacidades de degradação, em casos de comprometimento de lisossomas, decidimos testar se os lisossomas gigantes apresentados poderiam de algum modo estar relacionados com

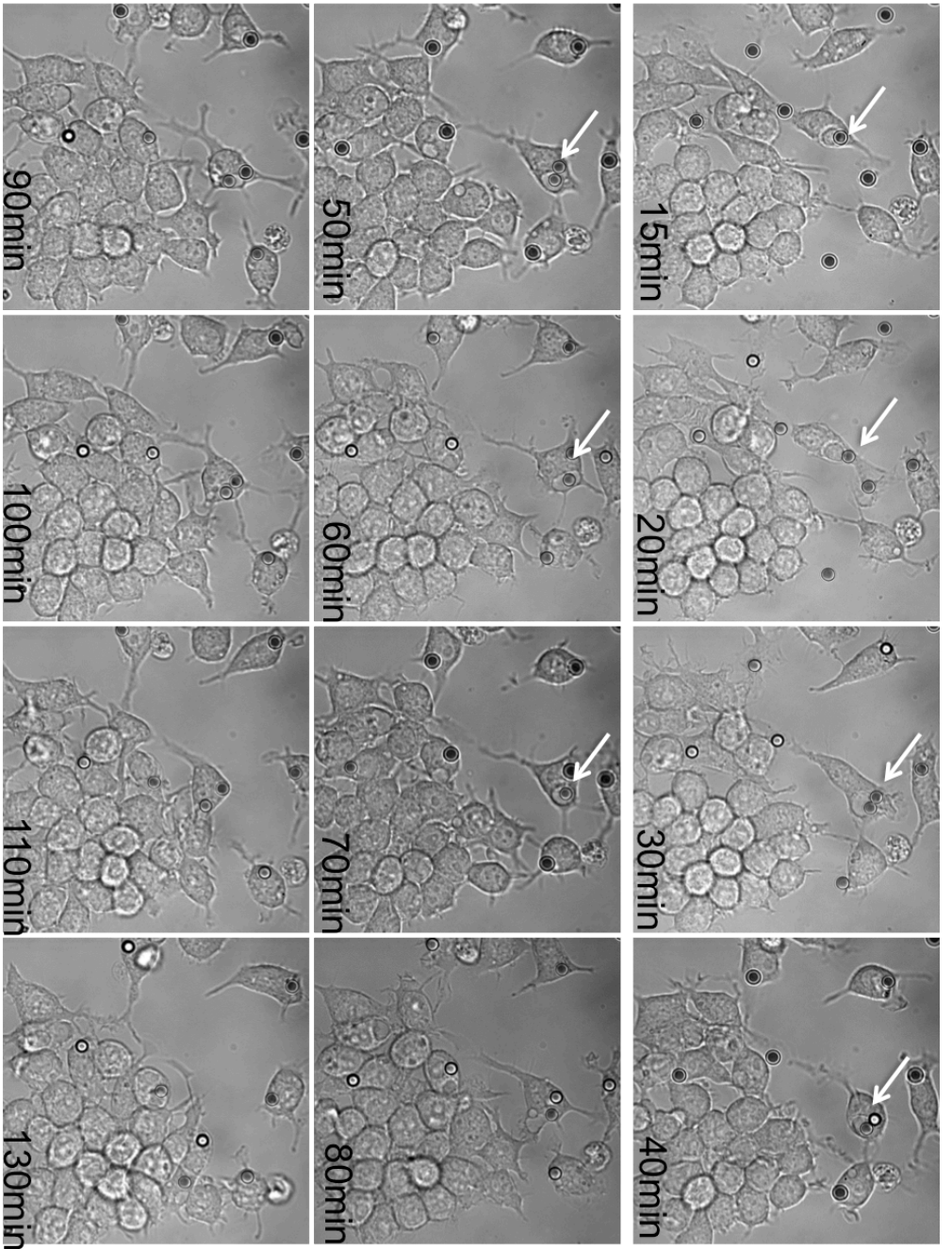


Figura 12 – Sequência de imagens obtidas por “time lapse”, recolhidas do mesmo campo observado ao microscópio, a diferentes tempos por microscopia confocal com células “vivas”. Observa-se, ao longo do tempo, que as “latex beads” (pequenas esferas) são internalizadas e retidas no interior dos vacúolos (setas).

algum tipo de fenómeno semelhante a este. Decidimos também averiguar a possível ocorrência de autofagia como estratégia secundária utilizada pela célula, e de que modo os lisossomas estariam envolvidos. A colocação desta hipótese, foi apoiada pelo facto de recentemente surgirem várias teorias que apontam para a ocorrência de autofagia na aterosclerose, como estratégia de recurso para eliminação de excesso de lípido acumulado [32].

4.1. Os lisossomas “gigantes” não apresentam continuidade com a membrana plasmática

Foram realizados estudos de marcação dos macrófagos, com uma sonda fluorescente, FM4-64, que possui a capacidade de se inserir em membranas, tornando-se fluorescente por aumento do seu rendimento quântico em ambiente lipídico. Com isto era pretendido verificar se os grandes lisossomas estariam em continuidade com a membrana plasmática e se seriam estruturas semelhantes às descritas por Haka, et al, 2009 [31]. Havendo continuidade da membrana do vacúolo com a membrana plasmática, seria de esperar que a sonda FM4-64 marcasse (por difusão lateral) igualmente a membrana do vacúolo e da membrana celular. Como pode ser observado na Figura 13, é bastante claro que os vacúolos não se encontram conectados com a membrana plasmática dos macrófagos, e por isso não estão em continuidade com esta, quer aos 20 dias de exposição (Figura 13 - A), quer a estados mais tardios, 40 dias (Figura 13 - B). Está por isso excluída a hipótese de que os lisossomas de grandes dimensões, por nós observados, sejam compartimentos acídicos conectados com a membrana plasmática e com capacidade para a degradação extracelular.

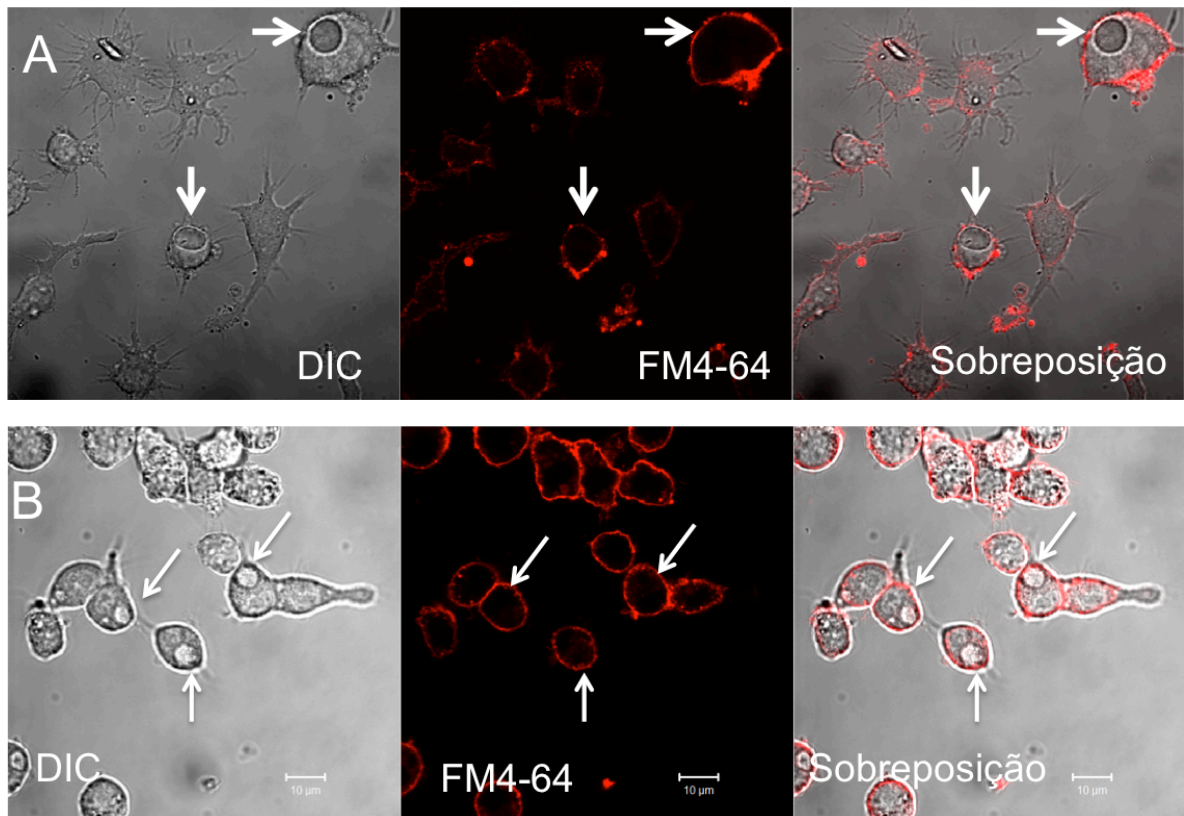


Figura 13 – Os lisossomas de grandes dimensões induzidos por incubação com CHS não apresentam continuidade com a membrana plasmática – Após a incubação dos macrófagos com 20 µM de LDL-CHS durante: A – 20 dias; B – 40 dias, as células foram processadas como descrito na secção de Materiais e Métodos e analisadas por microscopia confocal.

4.2. Os lisossomas “gigantes” recrutam LC3

LC3B é uma proteína existente no citosol, que é recrutada pelo autofagossoma, após ocorrência de degradação de fosfatidil-etanolamina, característicos do início de processos de autofagia. Decidimos então realizar estudos de imunofluorescência, com anticorpos dirigidos a esta proteína, para assim avaliar se estariam a ocorrer processos autofágicos.

Como pode ser observado na Figura 14 A e B, é evidente que aos 20 e 30 dias de exposição, os grandes lisossomas não são positivos para o marcador de autofagia LC3. Em contraste, 40 dias após incubação com LDL-CHS, as estruturas vacuolares são positivas para o LC3 (Figura 14C). Contudo, nunca foi possível observar p62, outro marcador da autofagia, nos lisossomas “gigantes”.

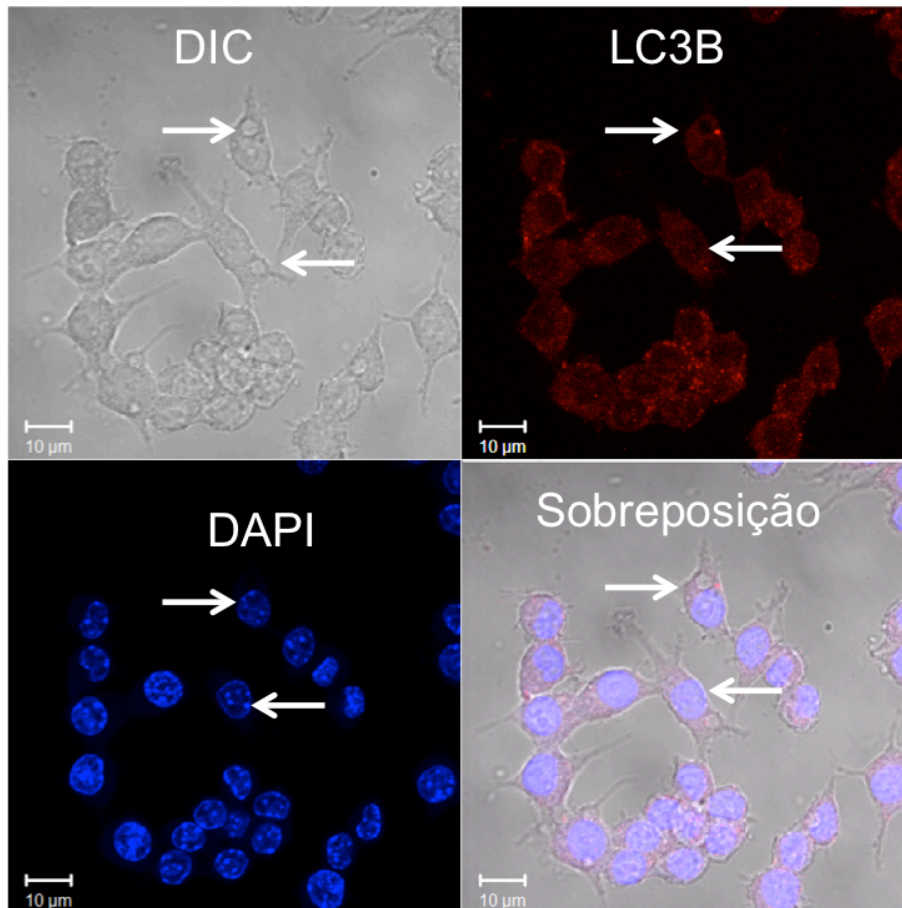


Figure 14 A – Estudos de imunofluorescência dirigidos para LC3B, em células sujeitas a tratamento com LDL-CHS 20 μ M, por um período de 20 dias. As setas indicam vacúolos que não apresentam LC3B.

Mais recentemente, foram descritos vários processos biológicos em que ocorre o recrutamento de efectores autofágicos, o que não é acompanhado pela existência de estruturas celulares com dupla membrana (observáveis por microscopia electrónica) [33]. Aparentemente, estes eventos ocorrem para facilitar a capacidade degradativa da célula. Assim sendo, é imperativo que as células incubadas com LDL-CHS durante 40 dias, sejam sujeitas a microscopia electrónica para podermos distinguir se os vacúolos são autofagossomas ou se são lisossomas que recrutam efectores de autofagia, de modo a facilitar a sua eliminação e assim contornar uma possível disfunção lisossómica.

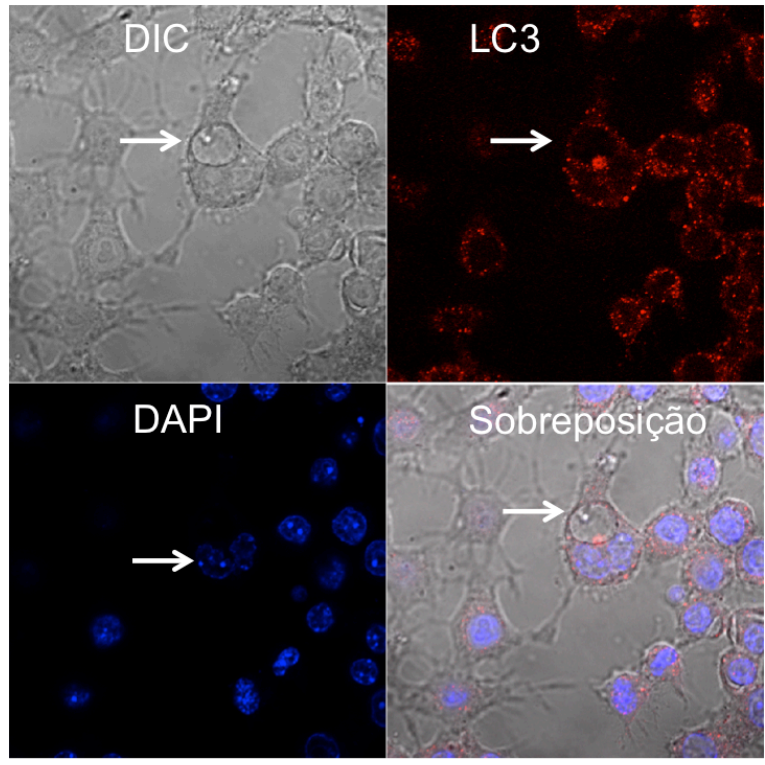


Figure 14 B - Estudos de imunofluorescência dirigidos para LC3B, em células sujeitas a tratamento com LDL-CHS 20 μ M, por um período de 30 dias. As setas indicam vacúolos que não apresentam LC3B.

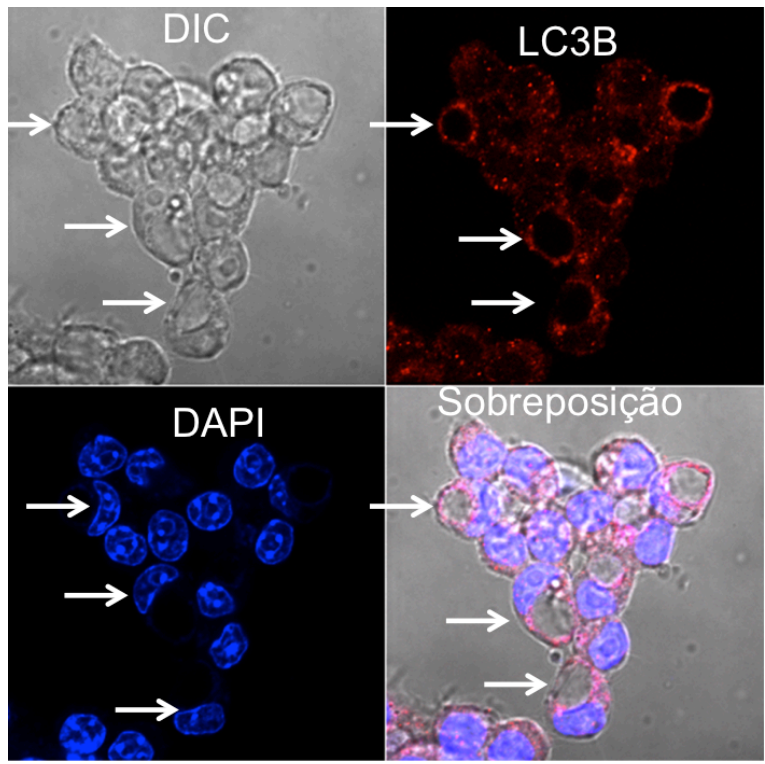


Figure 14 C - Estudos de imunofluorescência dirigidos para LC3B, em células sujeitas a tratamento com LDL-CHS 20 μ M, por um período de 40 dias. As setas indicam vacúolos que são positivos para o LC3B.

5. O CHS é internalizado pelos macrófagos, até um patamar de saturação

Os modelos utilizados neste estudo, contendo a molécula de CHS, continham propriedades radioactivas, dado que os compostos se encontravam marcados com [³H], em colesterol. Assim, foi possível quantificar a internalização de CHS pelas células, em função do tempo. As curvas da Figura 15 demonstram uma acumulação rápida de CHS (5 – 6 dias) e estabilização da concentração intracelular deste composto, ao longo do resto do período examinado (40 dias). Este facto, deve-se possivelmente ao equilíbrio passivo do CHS entre os meios interior e exterior da célula, visto que os tempos considerados são muito longos. A análise das curvas é

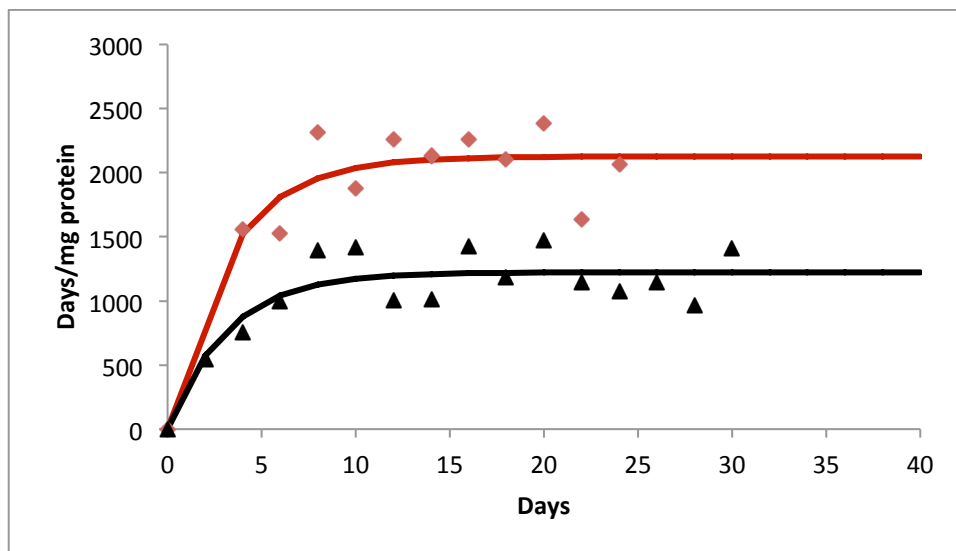


Figura 15 – Acumulação de CHS nos macrófagos ao longo da exposição crónica, através da medição dos valores de radioactividade a cada 2 dias: linha vermelha – 20 µM de LDL-CHS, linha preta – 10 µM de LDL-CHS. Os valores obtidos nestas medições, foram normalizados quanto à quantidade de proteína presente no extractos celulares respectivos. Os pontos representam os valores experimentais (◆ - LDL-CHS 20 µM; ▲ - LDL-CHS 10 µM), e as curvas são o melhor ajuste monoexponencial desses mesmos valores, tendo sido obtidas por cálculo teórico através da fórmula $Y_{\infty} + (Y_0 - Y_{\infty}) e^{-\beta t}$ onde β é a constante característica do processo e t o tempo. (n=2).

bastante simples, sendo que tanto a correspondente a LDL-CHS 10 µM, como LDL-CHS 20 µM, demonstram um aumento exponencial da internalização nos primeiros 5 – 6 dias, tendendo posteriormente para a estabilização com o estabelecimento de um “plateau”. Este é verificado para ambas as concentrações, por volta dos 10 – 12

dias de exposição, o que é um período semelhante ao que foi registado para o início do aparecimento de “grandes vacúolos” (10 – 16 dias). De realçar que a internalização de CHS é dependente da concentração adicionada aos macrófagos e que o valor do “plateau” para a curva correspondente a 20 μ M LDL-CHS, é o dobro do obtido para as células incubadas com 10 μ M de LDL-CHS. Estes resultados sugerem que o CHS é o responsável por induzir esta nova morfologia descrita nos macrófagos.

6. A viabilidade celular é mantida ao longo do tempo

Embora os resultados de microscopia sugerissem a ausência de toxicidade, decidimos quantificar a viabilidade celular dos macrófagos em cultura, incubados com diferentes concentrações de CHS em função do tempo. O método escolhido foi o designado ensaio de MTT, que se baseia na capacidade celular para degradar o composto MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), a cristais de formazano, dando assim origem a uma coloração púrpura que pode ser medida por espectroscopia de absorção UV/visível, avaliando assim a viabilidade subsequente da capacidade metabólica das células, em comparação com um controlo.

A Figura 16 mostra os resultados para os valores de percentagem de viabilidade obtidos para os macrófagos incubados com LDL-CHS. A viabilidade celular foi avaliada de 10 em 10 dias. Como pode facilmente constatar-se, não houve registo de toxicidade, mesmo a estados mais tardios da exposição, oscilando os valores obtidos no patamar dos 100% (comparativamente ao controlo, células incubadas apenas em meio com soro). Deste modo, fica claro que embora pareça ocorrer alguma disfunção na via endocítica culminando com a formação de lisossomas gigantes, que com o tempo começam a recrutar efectores autofágicos, isto não representa toxicidade para os macrófagos, o que aliás entra em concordância com os processos iniciais da aterogénese, em que não se associa morte celular a internalização de lipoproteínas modificadas, sendo essa condição apenas verificada em estados mais tardios, quando o “carregamento” lipídico já é demasiado massivo.

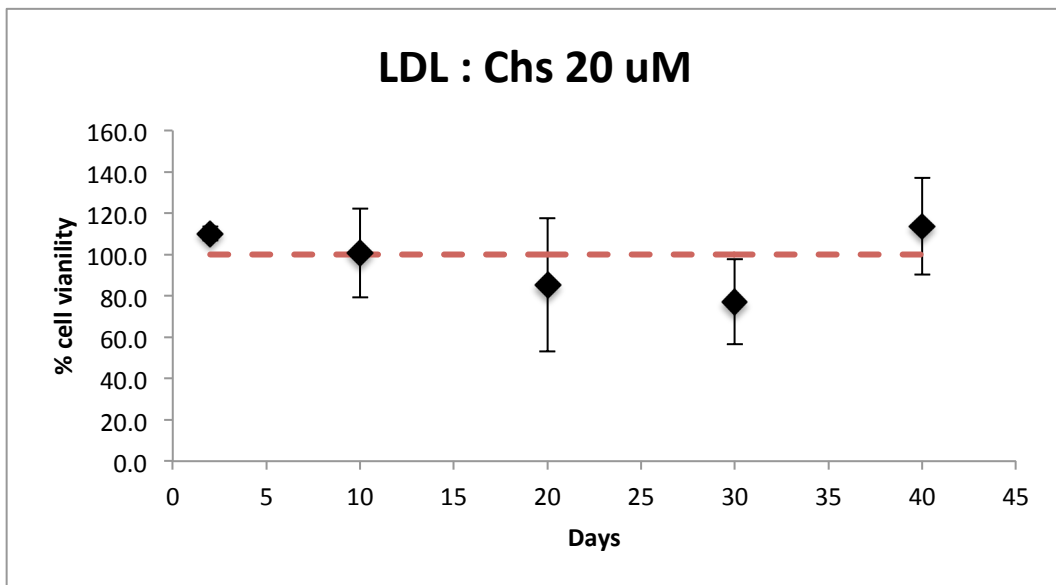
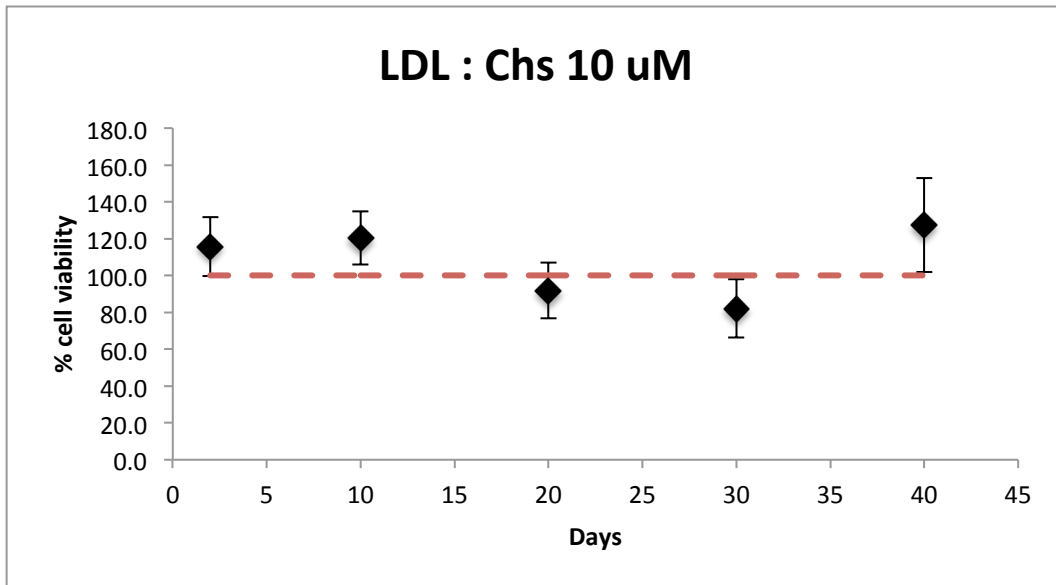


Figura 16 – Valores registados da viabilidade celular, expressa em percentagem relativamente ao controlo. É representado a tracejado vermelho, o patamar dos 100% de viabilidade, para se poder verificar que os valores oscilam em torno deste, ficando claro que não ocorreram fenómenos de toxicidade ao longo da exposição crónica. (n=3).

CAPÍTULO IV

Discussão Geral & Conclusões

A indução de lipidose em células-espumosas é sem dúvida um processo complexo e ainda pouco conhecido, estando no entanto estabelecida a relação directa com as LDL modificadas por oxidação. Durante este processo, há formação de muitos compostos cujas funções não são conhecidas. Além disso, não é sabido qual o papel de cada composto na etiologia da aterogénese. Há contudo estudos extensivos com alguns produtos de oxidação das LDL, como é o caso dos aldeídos, o 4-HNE [11, 12] e do 7-ceto-colesterol [27]. O nosso grupo desenvolveu recentemente uma metodologia, que consiste no enriquecimento de LDL nativas com os nossos compostos de interesse, e identificamos que o CHS, derivado de oxoésteres de colesterol, produtos da oxidação do linoleato de colesterol (ver Introdução), é capaz de induzir a formação de células-espumosas em estado de lipidose, quando incubado com macrófagos [1].

Os ateromas, lesões características da Aterosclerose, levam cerca de 30 anos para se formar. Estas lesões têm início com a acumulação progressiva de lipoproteínas na parede da artéria, que vão sendo modificadas e posteriormente internalizadas pelos macrófagos, através de um processo não controlado. É aqui demonstrado que, uma aproximação a estas condições (fisiológicas), consistindo na submissão deste tipo de células a uma exposição crónica a CHS, em concentrações sub-tóxicas, resulta num fenótipo nunca antes verificado e associado a aterogénese. Os macrófagos apresentam vacúolos “gigantes”, aproximadamente ao final de 16 – 20 dias, que foram identificados como lisossomas, uma vez que apresentam um revestimento de LAMP-2. Uma vez mais é reportado e confirmado que alterações a nível dos lisossomas, estão na base do início do desenvolvimento de modificações morfológicas em macrófagos que internalizem LDL modificadas. Neste caso, foi mantido o ambiente ácido dos lisossomas, não sendo portanto, à partida, prejudicada a função da bomba de prótons, como anteriormente reportado em casos de lipidose [18]. Para além disto, ao longo do tempo parece ser preservada a capacidade fusogénica e/ou o papel activo dos lisossomas nos processos de maturação pela via endocítica. Neste contexto, o facto de os lisossomas de grandes dimensões serem extintos quando as células adquirem “carga”, é algo ainda não compreendido e que necessita de mais investigação, mas que faz suspeitar que a percentagem de células apresentando vacúolos foi sub-estimada (aproximadamente

10%). Assim, serão necessários mais estudos estatísticos que permitam avaliar a evolução da percentagem celular apresentando este novo fenótipo, assim como a área subjacente aos vacúolos.

A célula é cada vez mais reconhecida como uma estrutura complexa, multidinâmica e cooperativa. Os mecanismos de que dispõe, são adaptados a diversas situações, no sentido de estabelecer as condições mais favoráveis para a manutenção, com soluções adaptadas para os problemas que possam surgir. Neste sentido, no caso da aterogénese e neste caso específico em que os lisossomas assumem dimensões muito superiores ao que normalmente acontece, foi colocada a possibilidade de cooperatividade, na medida em que a célula poderia recorrer a outros mecanismos para compensar possíveis distúrbios lisossomais. Existe uma hipótese bem estipulada, de que em situações de stress e perda de capacidade degradativa pelos lisossomas devido a situações de desenvolvimento aterogénico, por internalização de LDL agregadas, a célula pode recorrer a um processo em que é estabelecido um organelo extracelular ácido, com a função de degradação [31]. Os vacúolos resultantes da longa exposição a CHS, não podem ser incluídos neste tipo de processos, uma vez que apesar de se apresentarem ácidos com o decorrer do tempo, não se encontram em continuidade com a membrana plasmática, logo não possuem qualquer conexão ao exterior. A ocorrência de outros fenómenos como a autofagia, que tem ganho relevo nos últimos anos como uma estratégia celular de recurso para adaptação a condições adversas, tem também sido associada a Aterosclerose. De facto, neste caso, para estados mais tardios (40 dias de exposição a CHS), os lisossomas “gigantes” adquirem efectores de autofagia (envolvidos na formação de autofagossomas), sendo neste caso confirmada a presença do LC3B. Um estudo recente, por Cemma et al, 2012 [33], descreve que em casos de bloqueio de lisossomas e subsequente impossibilidade e/ou dificuldade de degradação, ocorre o recrutamento de LC3 para os fagossomas, que assim irão fundir-se com os lisossomas para que ocorra degradação, num processo designado de LC3-associated phagocytosis (LAP). Por forma a confirmarmos ou descartarmos esta hipótese, será necessário realizar estudos acerca da capacidade fusogénica dos lisossomas “gigantes”, quando estes já apresentam marcação para LC3, o que não foi realizado até então, para se testar a alteração de função dos lisossomas “gigantes”. Além disso,

será também necessário proceder a estudos de microscopia electrónica, para a verificação da existência ou não, de duplas membranas nestes mesmos organelos.

Os resultados obtidos neste estudo são promissores e deixam em aberto vários pontos, acerca do entendimento da caracterização e funcionamento relacionado com o novo fenótipo obtido. Pensamos ser importante focar atenções nos lisossomas “gigantes” e reforçar os estudos, a vários tempos de exposição, já realizados até então, assim como proceder a avaliações mais específicas do estado e funcionamento dos mesmos. É importante que seja averiguado o estado de desenvolvimento, formação e maturação dos próprios lisossomas, perceber em que medida processos dependentes de cálcio (ião que funciona como segundo mensageiro) estão ou não afectados nestas condições (vacúolos gigantes), assim como tentar endereçar a capacidade degradativa, em casos de exibição desta morfologia. Com estes esclarecimentos, pretendemos reunir evidências acerca de que fenómenos começam por ser afectados e estão na base inicial do desenvolvimento da Aterosclerose.

Referências

1. Estronca, L.M., et al., *Molecular Etiology of Atherogenesis - In Vitro Induction of Lipidosis in Macrophages with a New LDL Model*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34822.
2. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
3. Ogunrinade, O., G.T. Kameya, and G.A. Truskey, *Effect of fluid shear stress on the permeability of the arterial endothelium*. Ann Biomed Eng, 2002. **30**(4): p. 430-46.
4. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 551-61.
5. Gimbrone, M.A., Jr., *Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis*. Am J Pathol, 1999. **155**(1): p. 1-5.
6. Goldstein, J.L., R.A. DeBose-Boyd, and M.S. Brown, *Protein sensors for membrane sterols*. Cell, 2006. **124**(1): p. 35-46.
7. Goldstein, J.L. and M. Brown, *Familial hypercholesterolemia*, in *The metabolic basis of inherited disease*, M.-H.B. Co., Editor 1983: New York. p. 672.
8. Shepherd, J., *Combined lipid lowering drug therapy for the effective treatment of hypercholesterolaemia*. Eur Heart J, 2003. **24**(8): p. 685-9.
9. Brown, M.S. and J.L. Goldstein, *Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis*. Annu Rev Biochem, 1983. **52**: p. 223-61.

10. Henriksen, T., E.M. Mahoney, and D. Steinberg, *Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6499-503.
11. Molecular Aspects of Medicine, 2003. **24**: p. 148 - 314.
12. Uchida, K., *4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(4): p. 318-43.
13. Kamido, H., et al., *Lipid ester-bound aldehydes among copper-catalyzed peroxidation products of human plasma lipoproteins*. J Lipid Res, 1995. **36**(9): p. 1876-86.
14. Hutchins, P.M., E.E. Moore, and R.C. Murphy, *Electrospray MS/MS reveals extensive and nonspecific oxidation of cholesterol esters in human peripheral vascular lesions*. J Lipid Res, 2011. **52**(11): p. 2070-83.
15. Tabas, I., *Nonoxidative Modifications of Lipoproteins In Atherogenesis*. Annual Reviews, 1999. **19**(Description of the different LDL modifications and its relation with atherogenesis): p. 123 - 139.
16. Onat, D., et al., *Human vascular endothelial cells: a model system for studying vascular inflammation in diabetes and atherosclerosis*. Curr Diab Rep, 2011. **11**(3): p. 193-202.
17. de Duve, C., *The participation of lysosomes in the transformation of smooth muscle cells to foamy cells in the aorta of cholesterol-fed rabbits*. Acta Cardiol, 1974. **Suppl 20**: p. 9-25.
18. Schmitz, G. and M. Grandl, *Endolysosomal phospholipidosis and cytosolic lipid droplet storage and release in macrophages*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(6): p. 524-39.

19. Brown, M.S., et al., *Reversible accumulation of cholesteryl esters in macrophages incubated with acetylated lipoproteins*. J Cell Biol, 1979. **82**(3): p. 597-613.
20. Brown, M.S.a.G., J.L., *Receptor - mediated endocytosis: Insights from the lipoprotein receptor system*. Proc. Natl. Acad. Sci, 1979. **76**(Cholesterol metabolism and Lipoprotein Receptor system): p. 3330 - 3337.
21. Kunjathoor, V.V., et al., *Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49982-8.
22. Glass, C.K. and J.L. Witztum, *Atherosclerosis. the road ahead*. Cell, 2001. **104**(4): p. 503-16.
23. Lang, P.D. and W. Insull, Jr., *Lipid droplets in atherosclerotic fatty streaks of human aorta*. J Clin Invest, 1970. **49**(8): p. 1479-88.
24. Shio, H., M.G. Farquhar, and C. de Duve, *Lysosomes of the arterial wall. IV. Cytochemical localization of acid phosphatase and catalase in smooth muscle cells and foam cells from rabbit atheromatous aorta*. Am J Pathol, 1974. **76**(1): p. 1-16.
25. Jerome, W.G., *Advanced atherosclerotic foam cell formation has features of an acquired lysosomal storage disorder*. Rejuvenation Res, 2006. **9**(2): p. 245-55.
26. Aikawa, M. and P. Libby, *The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach*. Cardiovasc Pathol, 2004. **13**(3): p. 125-38.
27. Jessup, W. and A.J. Brown, *Novel routes for metabolism of 7-ketocholesterol*. Rejuvenation Res, 2005. **8**(1): p. 9-12.

28. Vieira, O.V., et al., *Rapid isolation of low density lipoproteins in a concentrated fraction free from water-soluble plasma antioxidants*. J Lipid Res, 1996. **37**(12): p. 2715-21.
29. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
30. Vieira, O.V., et al., *Surfactants as microbicides and contraceptive agents: a systematic in vitro study*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2913.
31. Haka, A.S., et al., *Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(23): p. 4932-40.
32. Singh, R.C., AM, *Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism*. International Journal of Cell Biology, 2012.
33. Cemma, M. and J.H. Brumell, *Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems*. Curr Biol, 2012. **22**(13): p. R540-5.